

原料碳氮比对丁醇发酵两阶段发酵性能的影响

李 鑫^{1,2}, 李志刚^{1,2}, 史仲平^{*1,2}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡, 214122; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 在丙酮丁醇发酵的产酸期和产溶剂期两阶段, 向葡萄糖质量浓度固定的培养基中添加不同质量浓度酵母浸粉, 比较了不同碳氮比培养下的丙丁梭菌在相应阶段产气、耗糖、产有机酸、发酵相转型和产溶剂等发酵性能的差异。结果表明, 在产酸期, 适中的碳氮比(46.7~93.4 mol/mol)能够保证菌体以正常速度生长, 不至于过分刺激或是抑制有机酸的合成, 使发酵顺利完成相转型, 有利于缩短发酵周期; 在产溶剂期, 较高的碳氮比(93.4~186.7 mol/mol)可以有效抑制副产物溶剂丙酮和乙醇的积累, 且保持丁醇产量达到 12 g/L 以上, 从而获得较高的丁醇/总溶剂比例。继而再利用玉米粉、木薯粉和豆饼粉 3 种含碳氮比差异较大的生物质原料进行丙酮丁醇发酵, 验证了上述关于原料碳氮比对丁醇发酵各阶段发酵性能影响效应的结论。

关键词: 原料碳氮比; 丁醇发酵产酸期; 丁醇发酵产溶剂期; 丙酮丁醇梭菌

中图分类号: Q 815 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)11—1168—08

Effect of Carbon/Nitrogen Ratio on Butanol Fermentation Performances in Two Periods

LI Xin^{1,2}, LI Zhigang^{1,2}, SHI Zhongping^{*1,2}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Glucose-based media containing different contents of yeast extract were used to culture *Clostridium acetobutylicum*, either in the acidogenic or in the solventogenic phase. The fermentation performances in the different period were concerned, including gas production, glucose consumption, organic acids and solvents production, and phase-shift, in order to explore the effects of carbon/nitrogen (C/N) ratio on butanol fermentation performances. The results indicated that a moderate C/N ratio (46.7~93.4 mol/mol) in the acidogenesis could maintain the normal growth rate of strain without large accumulation of organic acids, which resulted in a smooth switch of phase-shift and shortening fermentation time. While a higher C/N ratio (93.4~186.7 mol/mol) in the solventogenesis was benefit for restraining the synthesis of by-product solvents acetone and ethanol,

收稿日期: 2014-01-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(20976072)。

作者简介: 李 鑫(1984—), 男, 湖北武汉人, 发酵工程博士研究生, 主要从事生物质发酵产丁醇方面的研究。E-mail: lixin084@163.com

* 通信作者: 史仲平(1962—), 男, 北京人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵过程控制与优化方面的研究。

E-mail: zpshi@jiangnan.edu.cn

and simultaneously kept the butanol production upon 12 g/L, leading to a relatively high ratio of butanol to total solvent. Moreover, three kinds of biomasses which contained distinct C/N ratios were used as substrate for butanol fermentation. The results further demonstrate the conclusion acquired above about the impacts on fermentation performances brought by C/N ratio alteration of substrate.

Keywords: carbon/nitrogen ratio, butanol fermentation acidogenesis, butanol fermentation solventogenesis, *Clostridium acetobutylicum*

丁醇,既是重要的化工原料,又是一种新型液体生物燃料。相比传统液态生物燃料—乙醇,丁醇在化学结构上多两个亚甲基,因此具有更高的疏水性,较低的挥发性,可与汽油以任意比例混合,并具有与汽油相当的热值^[1]。丁醇的生物发酵一般利用产溶剂梭菌 *Clostridia* 在严格厌氧条件下进行的,其主要产物为丁醇、丙酮和乙醇,比例约为 6:3:1。目前,厌氧发酵生产生物丁醇的主要原料为玉米等粮食资源。近年来,由于受到人口增长、耕地减少、以及生物炼制行业迅速发展等因素的影响,粮食类原料的价格节节攀升,以致丁醇发酵的生产成本大幅提高。研究者们尝试了多种非粮作物或农业废弃物为原料进行丁醇发酵,包括木薯^[2-3]、玉米秸秆^[4-5]、大麦秆^[6]等。但这类原料在营养成分上存在共同的缺陷,含碳量高而含氮量极低,营养比例严重失衡。Madiah 等在碳源总量(50 g/L 西米椰子淀粉)固定的情况下,以酵母浸粉和 NH_4NO_3 为混合氮源并设置不同浓度,结果发现随着发酵原料的碳氮比由 3.6 mol/mol 逐步提高到 42.8 mol/mol 时,总溶剂产量由 26.98 g/L 直线下降至 2.63 g/L^[7]。由此可见,原料的碳氮比是影响丁醇发酵溶剂产量的一个极为主要的因素。以往的研究主要集中在优化发酵初始的原料碳氮配比,而忽略了丁醇发酵存在产酸期和产溶剂期两个阶段。作者以葡萄糖和酵母浸粉为碳氮源配制合成培养基,在发酵产酸和产溶剂两个阶段分别设置不同碳氮比,比较丙丁梭菌在相应阶段、不同碳氮比培养条件下产气、耗糖、产酸、相转型和产溶剂等方面的性能。然后采用玉米粉、木薯粉和豆饼粉三种碳氮比含量差别明显的原料,进行丙酮丁醇发酵,进一步阐明了原料碳氮比对发酵过程产酸、相转型和溶剂中丁醇比例的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株

作者所在实验室保藏的丙酮丁醇梭状芽孢杆

菌(*Clostridium acetobutylicum* ATCC824),于质量浓度 5 g/dL 的玉米培养基中培养成孢子液,4 ℃冰箱保存。

1.2 培养基

种子培养基:玉米粉经 40 目筛子过筛。使用 5 g/dL 的玉米粉,加蒸馏水煮沸糊化 60 min, pH 自然,121 ℃灭菌 50 min。

葡萄糖培养基 I:葡萄糖质量浓度固定为 100 g/L,酵母浸粉质量浓度分别为 0、1.25、5、10、20 g/L,其它成分包括 KH_2PO_4 0.5 g/L、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L, pH 6.0, 121 ℃灭菌 20 min。

葡萄糖培养基 II:葡萄糖质量浓度固定为 50 g/L,酵母浸粉质量浓度分别为 0、1.25、2.5、5 g/L,其它成分包括与葡萄糖培养基 I 相同, pH 4.5, 121 ℃灭菌 20 min。

玉米培养基:玉米粉经 40 目筛子过筛。传统发酵使用 15 g/dL 的玉米粉,蒸馏水配料,顺序添加液化酶(8 U/g 淀粉,沸水浴中液化 45 min),糖化酶(130 U/g 淀粉,62 ℃下糖化 60 min)制备, pH 自然, 121 ℃灭菌 20 min。

木薯培养基:木薯粉经 40 目筛子过筛。传统发酵使用 15 g/dL 的木薯粉,制备方法同玉米粉。

豆饼粉培养基:豆饼粉经 40 目筛子过筛。传统发酵使用 7.5 g/dL 的豆饼粉,制备方法同玉米粉。由于豆饼粉碳源质量浓度严重不足,制备完成后需补加已灭菌的葡萄糖溶液至还原糖质量浓度为 70 g/L, pH 6.0。

1.3 实验方法

1.3.1 种子液的制备 将保存的孢子液按体积分数 10%接入装有 50 mL 种子培养基的厌氧瓶中,抽真空 2 min,再先后经过沸水热处理 1 min,冰水冷却 1 min,最后置于 37 ℃恒温水浴,培养 26 h 后作为发酵菌种。

1.3.2 不同碳氮比对丁醇发酵产酸期影响的实验

将制备好的种子液按体积分数 10% 分别接入无氮或碳氮比为 373.5、93.4、46.7、23.3 mol/mol 的葡萄糖培养基 I 中,置于 37 ℃ 恒温水浴培养,以菌体产气停止作为发酵终止的条件。每组相同的碳氮比均设有 3 个平行对照。

1.3.3 不同碳氮比对丁醇发酵产溶剂期影响的实验 将制备好的种子液按体积分数 10% 接入含 10 g/L 酵母浸粉(碳氮比 46.7 mol/mol)的葡萄糖培养基 I 中,置于 37 ℃ 恒温水浴培养。菌体发酵进入产溶剂期后(24 h),逐瓶离心收集菌体,并将菌体分别接入无氮或碳氮比为 373.5、93.4、46.7、23.3 mol/mol 的葡萄糖培养基 II 中,并保证与离心前的培养基菌体浓度相同,37 ℃ 恒温水浴继续培养至菌体产气停止。每组相同的碳氮比均设有 3 个平行对照。

1.3.4 发酵方法 玉米粉、木薯粉和豆饼粉发酵方法相同。采用 7 L 厌氧发酵罐(由上海保兴生物设备工程有限公司按设计要求专门订做),装液量 2.5 L,配有螺旋蛇管,连接恒温循环水浴槽可在静态条件下将发酵温度控制在 37 ℃。为保证罐内厌氧环境,接种前向装有培养基的罐中持续通氮气 15 min,并调节培养基初始 pH 于 6.0。按体积分数 10% 接入种子液,轻微搅拌后关闭搅拌。如需添加酵母浸粉(添加量 2.5 g/L),则将制备好的酵母浸粉浓缩液于 115 ℃ 灭菌 20 min,由蠕动泵打入。

1.4 分析方法

1.4.1 发酵有机酸和溶剂的测定 气相色谱测定^[8]。

1.4.2 发酵产气的测定 量筒排水置换法^[8]。

1.4.3 淀粉和葡萄糖的测定 淀粉以酸水解发测定,所测还原糖(葡萄糖)质量浓度与淀粉质量浓度的换算方式为:淀粉质量浓度=还原糖质量浓度×0.9^[8];葡萄糖利用生物传感器(SBA-40B,山东科学院)测定^[8]。

1.4.4 原料总蛋白质量浓度测定 原料以固态形式酸水解后测定总氨基酸含量^[9]。

1.4.5 碳氮比的计算 原料中的碳含量,均以初始测定的还原糖(葡萄糖)质量浓度 C_{Glu} 计算;原料中的氮含量按其总蛋白质量浓度 C_{protein} 的 16% 计算,碳氮比计算见下式:

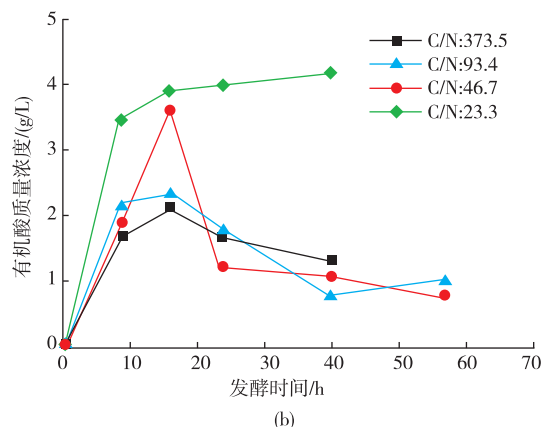
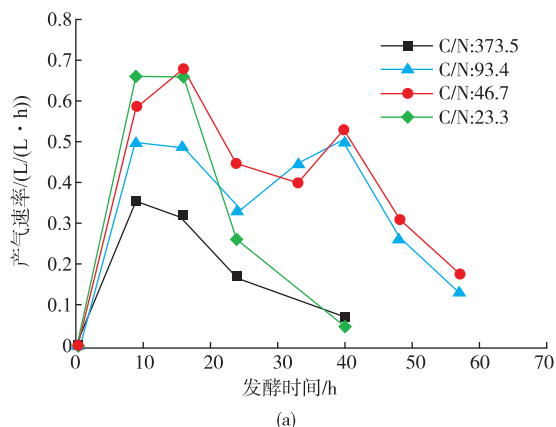
$$C/N = \frac{C_{\text{Carbon}}}{C_{\text{Nitrogen}}} = \frac{C_{\text{Glu}} \times 6 \div 180}{C_{\text{protein}} \times 16\% \div 14} \text{ (mol/mol)}$$

2 结果与讨论

2.1 不同碳氮比培养条件对丙丁梭菌产酸和发酵相转型的影响

丁醇发酵初期,大量的有机酸如乙酸、丁酸等被合成,导致发酵液 pH 值迅速下降,这一时期称之为发酵产酸期。在此阶段,菌体快速生长,并伴随着大量气体(主要是 CO_2 和 H_2)的产生,因此,可以通过测定发酵产气来判断菌体的生长状况。当有机酸的积累达到一定量的时候,丙丁梭菌产酸能力逐渐减弱,转而吸收发酵液中积累的有机酸合成丙酮、丁醇和乙醇等溶剂,这一过程称之为相转型。发酵过程顺利完成相转型是合成溶剂的先决条件。我们在发酵初始设置 5 个梯度的碳氮比,包括无氮、373.5、93.4、46.7、23.3 mol/mol。图 1 是不同碳氮比培养条件下丙丁梭菌发酵性能的比较。

如图 1 所示,随着培养基中氮源质量浓度的升高,即碳氮比降低,丙丁梭菌在发酵前期产气速率加快,葡萄糖的消耗量也增大,说明高氮源添加量能够明显刺激菌体生长。同时,发酵液中有有机酸的累积量也随之提高。丙丁梭菌的生长速度与有机酸产量是相偶联的,菌体生长需要大量能量物质 ATP



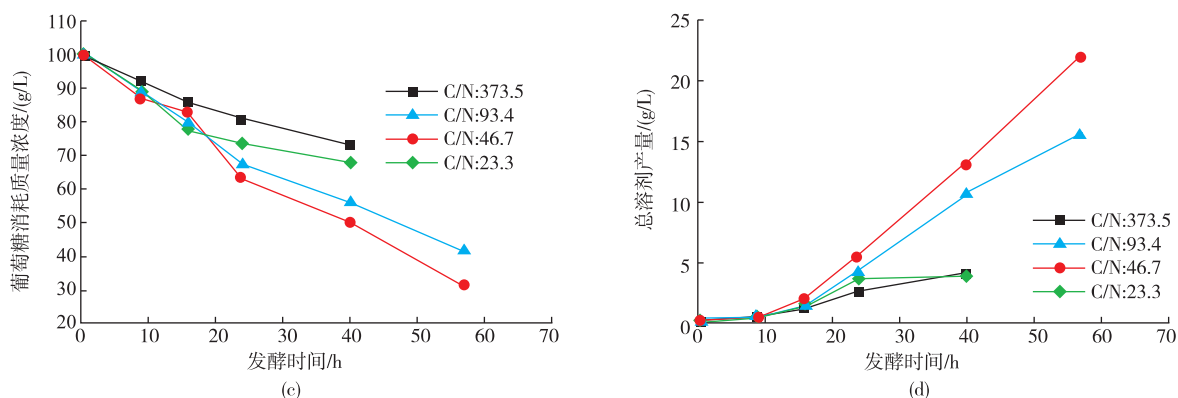


图1 不同碳氮比培养条件下丙丁梭菌产酸期发酵性能的比较

Fig. 1 Performance comparisons of the acidogenic state *Clostridium acetobutylicum* cultured in the media with different carbon/nitrogen ratios

的参与,而乙酸和丁酸的合成是胞内除糖酵解途径外的主要 ATP 生成途径。但菌体生长过快时,发酵液中会迅速积累大量有机酸,导致菌体细胞中毒,而发酵在糖并未完全耗完、且溶剂产量还极低的情况下提前中止,这一现象称为“酸崩溃”^[10]。在碳氮比为 23.3 mol/mol 时,观察到此现象:发酵 9 h 时乙酸和丁酸总量已经达到 3.5 g/L,之后一直处于 4 g/L 的高质量浓度水平,发酵过程迟迟无法转入产溶剂期,产气速率在 16 h 后出现急剧下降,最终发酵在 40 h 中止,溶剂总产量仅有 3.98 g/L。另一方面,当碳氮比过高(373.5 mol/mol)时,菌体发酵前期产气明显不足,糖消耗缓慢,与生长偶联的有机酸产量也明显偏低,这些均反映出菌体生长活力不强。进入转型期时,仅有的氮源可能已消耗殆尽,发酵无法继续进行。相比较下,适中的碳氮比(46.7~93.4 mol/mol)能够保证菌体在发酵前期生长速度正常,不至于过分刺激或是抑制有机酸的合成。发酵 16 h 后顺利转入产溶剂期,发酵液中有机酸浓度迅速回落,溶剂产量逐渐增加。另外,当葡萄糖培养基中完全不含氮源时,几乎测量不到有气体产生,也没有有机酸或溶剂的积累,表明菌体在此条件下无法正常代谢。

2.2 不同碳氮比培养条件对丙丁梭菌溶剂总产量及其中丁醇比例的影响

丁醇发酵产溶剂期是丙丁梭菌生长的稳定期,这一时期菌体可能对碳、氮源的需求量与产酸期(菌体的对数生长期)有所不同。但产溶剂期是菌体经历产酸期后的下一阶段,发酵过程不能跳过产酸期直接进入产溶剂期。如果与前面实验方法一样,

从初始就设置不同碳氮比的培养条件,可能会出现产溶剂期适用的碳氮比不适合产酸期,导致无法顺利通过相转型。因此,为了保证菌体能顺利进入产溶剂期,利用合适碳氮比(46.7 mol/mol)的葡萄糖培养基 I 对丙丁梭菌进行培养。当发酵进入产溶剂期后(24 h),分瓶将菌体离心收集,再转入等体积、含不同碳氮比的葡萄糖培养基 II 中,培养基 pH 在菌体转入前一律调节到更适合溶剂合成的值 4.5。葡萄糖培养基 II 中设有 4 个梯度的碳氮比,包括无氮、186.7、93.4、46.7 mol/mol。图 2 为进入产溶剂期的丙丁梭菌在转入不同碳氮比培养基后发酵性能的比较。

如图 2 所示,进入产溶剂期的丙丁梭菌经过转接后,并没有重新进入产酸期合成大量有机酸,不同碳氮比实验组的发酵液中有有机酸积累量均稳定在 1~1.5 g/L。发酵 10 h 后各实验组均检测到不同程度的溶剂产量,对比种子液接种的发酵 10 h 后几乎检测不到溶剂产生,表明经过转接的菌体仍然处于产溶剂期。但菌体生产溶剂的水平,在转接后普遍偏低。含氮量最高、碳氮比最低(46.7 mol/mol)的实验组,在葡萄糖的消耗速率和菌体产气速率方面是最快的;同时,丁醇和总溶剂产量也是 4 个实验组中最高的,分别为 8.75、15.27 g/L。但其丁醇产量并未达到产物抑制浓度(12~14 g/L 丁醇),且相比之前从产酸期就在碳氮比 46.7 mol/mol 的葡萄糖培养基 I 中发酵的水平(丁醇和总溶剂产量分别为 13.77、22.04 g/L),有明显差距。另外,值得注意的是,进入产溶剂期的丙丁梭菌转接到完全无氮的培养条件下,可以监测到气体产生和葡萄糖的消耗,也检测到有机酸和溶剂的生成,表明进入产溶剂期

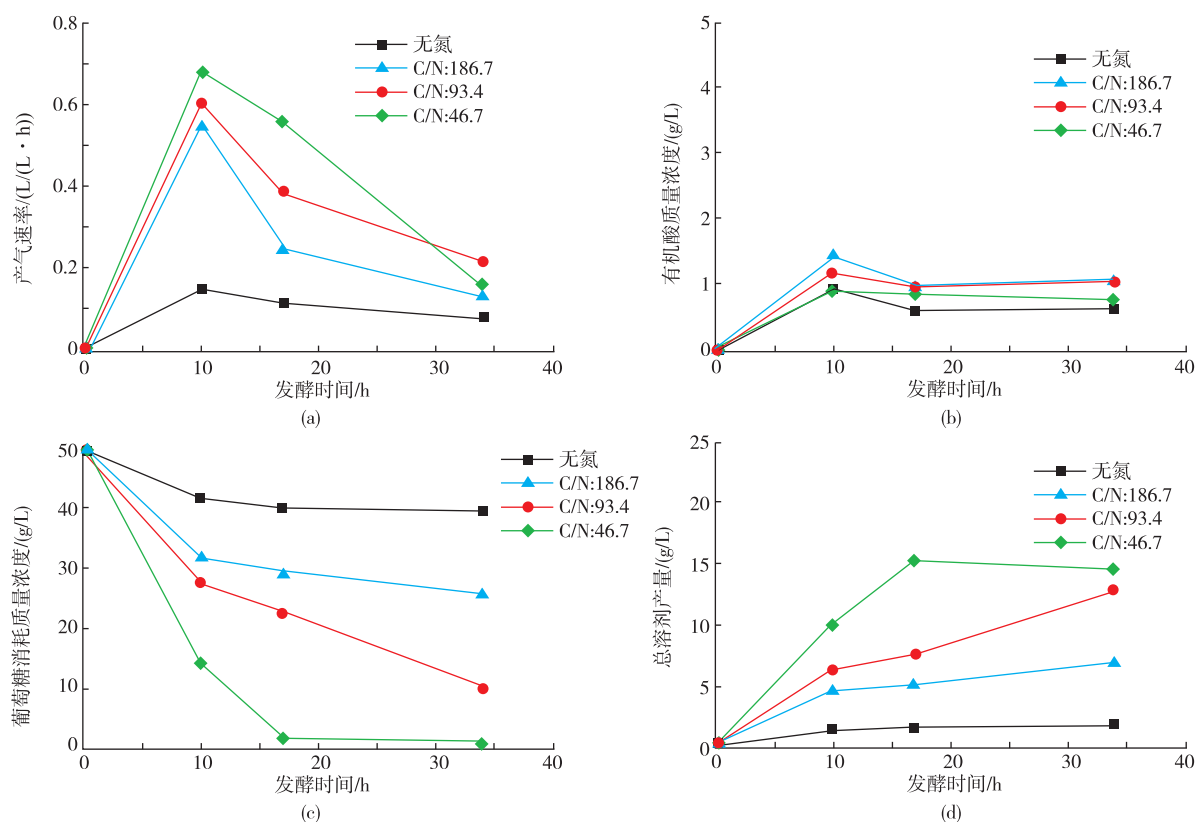


图 2 进入产溶剂期的丙丁梭菌在不同碳氮比培养条件下发酵性能的比较

Fig. 2 Performance comparisons of the solventogenic state *Clostridium acetobutylicum* in the media with different carbon/nitrogen ratios

的丙丁梭菌可以无氮培养条件下存活并合成溶剂。

对于丙丁梭菌在转接后合成溶剂的水平下降,分析原因可能是转接前培养基中积累有一定量的有机酸,而转接以后的培养集中不含有机酸。丙丁梭菌在产溶剂期不仅消耗葡萄糖,还会吸收培养基中产酸期积累的乙酸和丁酸用于生产丁醇、丙酮和乙醇等溶剂。因此,尝试在转接菌体之前,向葡萄糖培养基Ⅱ中添加终质量浓度为 4 g/L 的有机酸(乙酸、丁酸各 2 g/L),仍调节培养基初始 pH 为 4.5。如图 3 所示,相比未加入有机酸的实验组,添加一定浓度有机酸后,各碳氮比实验组的丙丁梭菌产气速率略有提高,而葡萄糖消耗量则有明显提高,说明产溶剂期初期发酵液中积累的有机酸不仅可以作为合成溶剂的底物,也能刺激菌体对葡萄糖的代谢。不同碳氮比实验组中,仍是含氮量越高的菌体产气速率和葡萄糖消耗速率越快,但并不是溶剂产量越高。如图 3d 所示,无氮条件下丙丁梭菌生产总溶剂 16.42 g/L,当培养基中氮源质量浓度增加时,溶剂产量也随之提高,在碳氮比为 93.4 mol/mol 时,

总溶剂产量达到 20.97 g/L。继续增加含氮量使碳氮比降低至 46.7 mol/mol 时,总溶剂产量没有提高反而略微降低,达到 19.99 g/L。进一步分析合成的溶剂中丁醇、丙酮的分配比例,如图 4 所示,发现虽然无氮条件下总溶剂产量最低,但丁醇产量并不低,达到 11.48 g/L,占总溶剂产量的 69.9%,与主要副产物丙酮的质量比为 3.3:1。当培养条件为中、高碳氮比(186.7、93.4 mol/mol)时,丁醇产量有所增强,分别达到 12.34、13.95 g/L。但副产物丙酮和乙醇的产量也随之提高,丁醇占总溶剂中比例维持在 67.0%左右,丁醇/丙酮质量比下降至 3.0:1。继续增加氮源在培养基中的比例至碳氮比为 46.7 mol/mol 时,丁醇产量不再提高,稳定在 12.81 g/L,而副产物丙酮和乙醇的产量则继续增加,丁醇对总溶剂和丙酮的比例分别下降至 64.1%和 2.7:1。实验结果表明,高碳低氮、甚至无氮的培养环境并不影响丙丁梭菌在产溶剂期生产丁醇,反而更有利于抑制副产物丙酮和乙醇的合成,提高总溶剂中目标产物丁醇的比例。

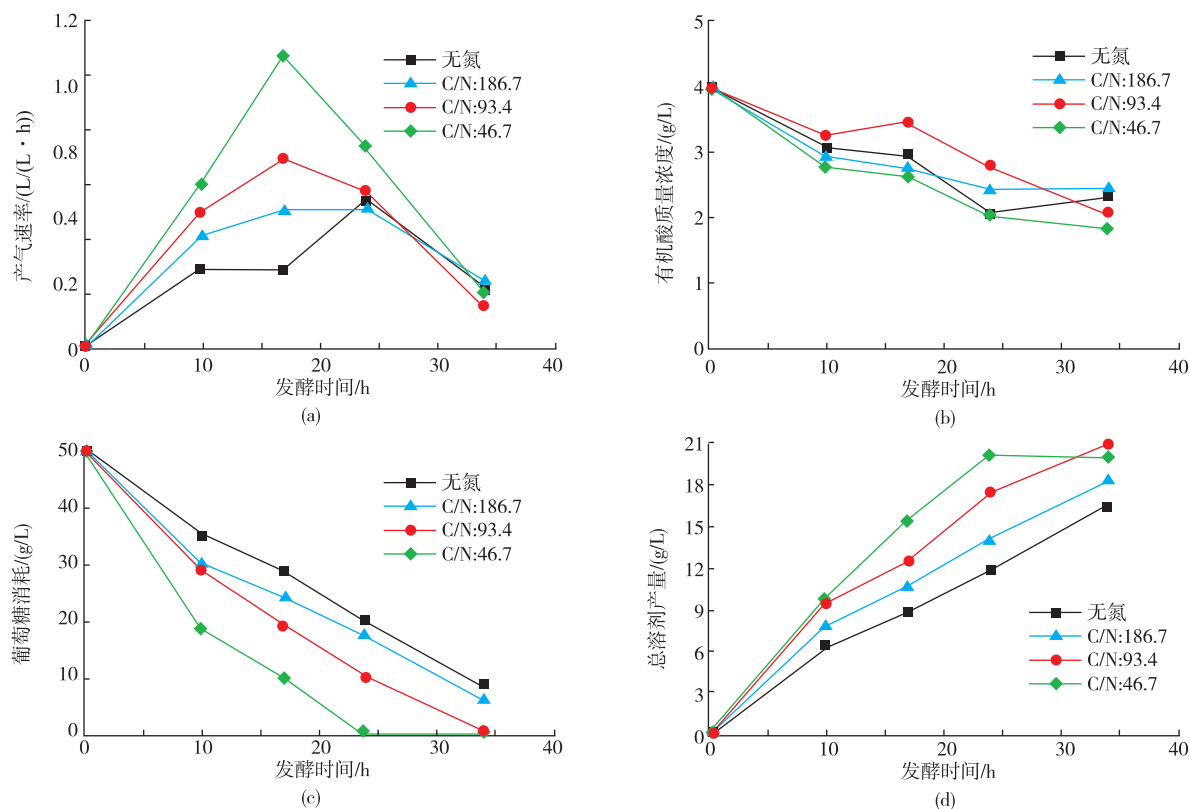


图3 进入产溶剂期的丙丁梭菌在添加相同有机酸、不同碳氮比的培养条件下发酵性能的比较

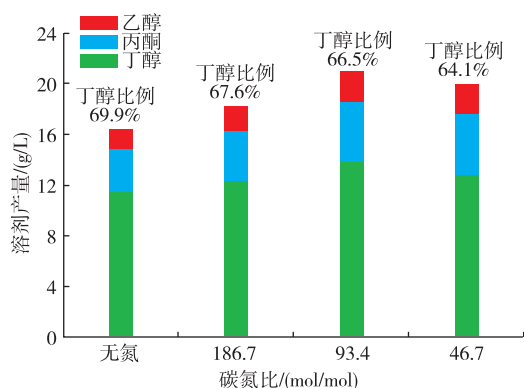
Fig. 3 Performance comparisons of the solventogenic state *Clostridium acetobutylicum* in the media with certain concentration of organic acid and different carbon/nitrogen ratios

图4 在不同碳氮比的培养条件下丙丁梭菌产丁醇占总溶剂中的比例

Fig. 4 Ratios of butanol to total solvents produced by *Clostridium acetobutylicum* under various culture condition containing different carbon/nitrogen ratios

2.3 含碳氮比不同的生物质原料丁醇发酵性能的比较

采用添加不同质量浓度酵母浸粉的葡萄糖培养基,研究了丙丁梭菌在不同碳氮比的培养条件下产酸期和产溶剂期的发酵性能,了解了培养基的碳

氮比对丙丁梭菌产酸、相转型以及所产丁醇占总溶剂比例等方面的影响。为验证上述结论能否应用于成分复杂的生物质原料,采用玉米粉、木薯粉和豆饼粉三种碳氮比质量分数差异很大的原料,进行丙酮丁醇发酵。表1为各原料的淀粉和蛋白质质量分数。其中玉米粉的淀粉和蛋白质质量分数均比较充足,计算出的碳氮比为21.9 mol/mol;木薯粉是典型的高碳低氮型原料,碳氮比为118.8 mol/mol;豆饼粉含氮量高但淀粉质量分数太低,需要额外补充葡萄糖,补充后碳氮比为6.5 mol/mol。

表1 各原料的淀粉和蛋白质质量分数

Table 1 Contents of starch and protein in each fermentation substrates

项 目	玉米粉	木薯粉	豆饼粉	酵母浸粉
淀粉质量分数/(g/100 g)	54	73.3	4	0
蛋白质质量分数/(g/100 g)	7.9	1.8	33	62.5

实验结果见表2。含中、低碳氮比的原料(玉米

粉和豆饼粉),发酵过程耗时短,平均产气速率快,相转型顺利,但发酵过程生产的副产物量高。玉米粉为原料时,丙酮和乙醇产量分别达到 6.30、1.83 g/L,丁醇比例只占 59.5%。豆饼粉为原料时整个发酵过程有机酸积累量一直很高,最高值达到 6.29 g/L,发酵结束时仍残留 3.99 g/L。虽未出现“酸崩溃”现象,但溶剂产量明显受到影响,仅为 16.33 g/L,其中丁醇终产量只有 9.92 g/L,并未达到产物抑制质量浓度(12~14 g/L 丁醇),且所占比例与玉米原料的水平相似,为 60.7%。而高碳低氮的原料(如木薯粉),菌体平均产气速率低,相转型出现延滞导致发酵时间延长至 66 h。但转型完成后,副产物溶剂产量相对较低,丁醇产量占到总溶剂产量的 63.8%。在其他研

究中,也发现高碳低氮生物质为原料的发酵,耗时长,溶剂产量低,但丁醇占总溶剂的比例很高。王风芹等利用玉米秸秆水解液发酵丙丁梭菌,发酵时长 60 h,总溶剂产量 6.72 g/L,但丁醇产量有 4.54 g/L,占总溶剂的 67.5%^[11]。以上结果基本证实了在葡萄糖培养基中总结出的不同碳氮比对丁醇发酵各阶段发酵性能的影响效应。接着,通过在产酸期补加少量酵母浸粉(添加量 2.5 g/L),降低木薯原料碳氮比至 83.6 mol/mol,在前面总结出的适中范围内(46.7~93.4 mol/mol)。结果发现,发酵过程的平均产气速率明显提高,相转型顺利完成,发酵时间缩短至 50 h,总溶剂产量提高到 21.10 g/L,其中丁醇所占比例依然维持在 64.5%的较高水平。

表 2 采用含不同碳氮比原料的丁醇发酵性能比较

Table 2 Fermentation performances on different substrates containing various carbon/nitrogen ratio

发酵性能参数	玉米粉	木薯粉	木薯粉补加酵母浸粉	豆饼粉加葡萄糖
碳氮比/(mol/mol)	21.9	118.8	83.6	6.5
发酵时间/h	50	66	50	45
还原糖消耗量/(g/L)	53.75	68.30	56.25	51.40
平均产气速率/(L/(L·h))	0.54	0.40	0.62	0.53
有机酸质量浓度最高值/(g/L)	3.59	2.68	2.43	6.29
有机酸质量浓度最终值/(g/L)	1.92	0.34	0.34	3.99
丁醇产量/(g/L)	11.92	11.75	13.61	9.92
丙酮产量/(g/L)	6.30	5.45	6.07	5.08
乙醇产量/(g/L)	1.83	1.21	1.42	1.33
总溶剂产量/(g/L)	20.05	18.41	21.10	16.33
丁醇/丙酮	1.89	2.16	2.24	1.95
丁醇占总溶剂比例/%	59.5	63.8	64.5	60.7

生物质原料成分复杂,其中所含氮源和碳源并不能像酵母浸粉和葡萄糖一样,能被菌体迅速、完全的吸收利用。但根据在葡萄糖培养基中总结出的不同碳氮比对丁醇发酵性能的影响效应,基本能在不同碳氮比生物质原料的丁醇发酵中体现出来。以上述结论可以作为参考用于调配生物质原料的碳氮比,改善以生物质、尤其是碳氮比失衡的一类原料的丁醇发酵性能,提高原料利用效率。

3 结 语

利用含不同质量浓度酵母浸粉的葡萄糖培养基,以及 3 种碳氮比不同的生物质原料进行丁醇发酵,研究了原料的碳氮比对丁醇发酵不同时期发酵

性能的影响,得到如下结论:

1) 适中的碳氮比(46.7~93.4 mol/mol)有利于菌体在发酵产酸期能以正常速度生长,不会造成有机酸的过度积累,发酵能顺利而平稳进入产溶剂期,为后面溶剂的正常生产提供了保证。

2) 较高的碳氮比(93.4~186.7 mol/mol)既不影响菌体在产溶剂期的丁醇产量,又可以有效抑制副产物溶剂丙酮和乙醇的合成,从而获得较高的丁醇/总溶剂比例。

3) 上述结果可作为参考,用于调配不同生物质原料的碳氮比,可改善碳氮比失衡的生物质为原料的丁醇发酵性能,提高原料的利用效率。

参考文献:

- [1] Liu S, Qureshi N. How microbes tolerate ethanol and butanol[J]. **New Biotechnology**, 2009, 26(3-4): 117-121.
- [2] Lu C, Zhao J, Yang S T, et al. Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 104: 380-387.
- [3] Gu Y, Hu S, Chen J, et al. Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium[J]. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2009, 36(9): 1225-1232.
- [4] Du T F, He A Y, Wu H, et al. Butanol production from acid hydrolyzed corn fiber with *Clostridium beijerinckii* mutant[J]. **Bioresource Technology**, 2013, 135: 254-261.
- [5] Qureshi N, Ezeji T C, Ebener J, et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber[J]. **Bioresource Technology**, 2008, 99(13): 5915-5922.
- [6] Qureshi N, Saha B C, Dien B, et al. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part I—use of barley straw hydrolysate[J]. **Biomass & Bioenergy**, 2010, 34(4): 559-565.
- [7] Madhah M S, Ariff A B, Sahaid K M, et al. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2001, 17(6): 567-576.
- [8] 张龙云, 杨影, 史仲平. 丁醇萃取发酵耦联生产改良型生物柴油过程的性能优化 [J]. 生物工程学报, 2008, 24 (11): 1943-1948.
ZHANG Longyun, YANG Ying, SHI Zhongping. Performance optimization of property-improved biodiesel manufacturing process coupled with butanol extractive fermentation[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2008, 24(11): 1943-1948. (in Chinese)
- [9] Li X, Li Z, Zheng J, et al. Yeast extract promotes phase shift of bio-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 using cassava as substrate[J]. **Bioresource Technology**, 2012, 125: 43-51.
- [10] Maddox I S, Steiner E, Hirsch S, et al. The cause of "acid crash" and "acidogenic fermentations" during the batch acetone-butanol-ethanol (ABE-) fermentation process [J]. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, 2000, 2 (1): 95-100.
- [11] 王凤芹, 原欢, 楚乐然, 等. 玉米秸秆水解液燃料丁醇发酵条件优化研究[J]. 食品与发酵工业, 2010, 36(10): 79-83.
WANG Fengqin, YUAN Huan, CHU Leran, et al. Optimization of butanol fermentation condition with corn straw hydrolyze as raw material[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2010, 36(10): 79-83. (in Chinese)

科技信息

欧盟规定能量饮料应突出咖啡因警告标志

据外媒报道,根据欧盟有关法规的要求,自12月起所有咖啡因含量高于150 mg/L的与能量饮料需突出标注咖啡因警告信息。

孕期大量摄取咖啡因,会导致婴儿低体重,增加日后出现健康问题的几率。而且它还与心跳加速、心悸、血压升高、癫痫有关联。儿童大量摄取咖啡因还会出现注意力不集中、心跳加快以及睡眠问题。

英国食品标准局称,根据欧盟食品标签规则(EU)1169/2011号法规的要求,对于添加咖啡因以起到生理效应,而且咖啡因含量高于150 mg/L的能量饮料,应从2014年12月13日起,加注“高咖啡因含量”的警示信息,字体大小与产品名称一致,同时还应将每100 mL产品当中的咖啡因标出。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟规定能量饮料应突出咖啡因警告标志 [EB/OL]. (2014-9-30). <http://news.foodmate.net/2014/09/277898.html>