

Clostridium saccharobutylicum 利用玉米秸秆水解液 发酵生产燃料丁醇

王 云^{1,2}, 倪 晔^{*1,2}, 孙志浩^{1,2}, 宋 刚^{1,2}, 夏子义^{1,2}

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

摘要: 以 *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 为丁醇生产菌株,采用正交优化法确定了以玉米秸秆水解液为底物的最优培养基配方:CaCO₃ 2.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, 玉米浆干粉 15 g/L, MnSO₄·H₂O 0.01 g/L。采用该最优培养基配方,在 3 L 发酵罐中发酵培养 40 h 后,总溶剂为 16.1 g/L,其中丁醇 10.59 g/L,发酵强度为 0.40 g/(L·h),生产率为 0.33 g/g。通过对发酵过程进行变温调控证实低温有利于溶剂积累,总溶剂由 17.01 g/L 提高至 19.98 g/L。在稀释率为 0.1 h⁻¹ 的变温连续发酵过程中,从 80 h 开始进入稳定产溶剂状态并持续至 269 h,该阶段平均总溶剂为 12.28 g/L(其中丁醇 8.50 g/L),发酵强度为 1.23 g/(L·h),是变温分批发酵(D 方式)的 4.92 倍。

关键词: *Clostridium saccharobutylicum*; 玉米秸秆水解液; 丁醇; 变温连续发酵

中图分类号: TK 6

文献标志码: A

文章编号: 1673—1689(2012)09—0904—08

Production of Biobutanol from Corn Stover Hydrolyzate by *Clostridium saccharobutylicum*

WANG Yun^{1,2}, NI Ye^{*1,2}, SUN Zhi-hao^{1,2}, SONG Gang^{1,2}, XIA Zi-yi^{1,2}

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

Abstract: In this study, butanol production from corn stover hydrolyzate by *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 was investigated. The medium composition was optimized by orthogonal method as follows: CaCO₃ 2.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, corn steep powder 15 g/L, and MnSO₄·H₂O 0.01 g/L. In a 3 L bioreactor, total solvent of 16.1 g/L (butanol 10.59 g/L) was reached after 40 h of fermentation, and the productivity and yield were 0.40 g/(L·h) and 0.33 g/g, respectively. Batch fermentation process using temperature-shifting demonstrates that lower temperature is beneficial to the solvent accumulation. Compared with temperature-constant process(37 °C), total solvent was increased from 17.01 g/L to 19.98 g/L. The temperature-shifting continuous fermentation process was operated for 269 h at dilution rate of 0.1 h⁻¹, and the

收稿日期: 2011-11-28

基金项目: 国家 863 计划重点项目(2011CB710800)。

* 通信作者: 倪晔(1975—),女,江苏无锡人,工学博士,教授,硕士研究生导师,主要从事生物催化、发酵工程、酶工程方面的研究。E-mail: yni@jiangnan.edu.cn

solvent production entered a stable phase at around 80 h. The average solvent during the stable solvent-production stage is 12.28 g/L (including 8.50 g/L butanol), and the average solvent productivity is 1.23 g/(L·h), representing 4.92 times of temperature-shifting batch fermentation (D).

Keywords: *Clostridium saccharobutylicum*, corn stover hydrolyzate, butanol, temperature-shifting continuous fermentation

20 世纪 80 年代, 丙酮丁醇发酵工业曾是仅次于乙醇发酵工业的第二大发酵产业。但由于石油工业的发展, 发酵法生产丙酮丁醇逐渐被淘汰。近年来, 随着石油资源的短缺, 原油价格的波动, 发酵法生产新型生物燃料——丁醇得到广泛的关注^[1-2]。国内生物丁醇的生产主要以玉米为原料, 丁醇生产的原料成本占了总成本的 75%, 因此寻找价廉质优的非粮原料发酵生产丁醇成为一种必然趋势。

玉米秸秆是我国最为丰富的农作物秸秆之一, 玉米秸秆中含有大量的纤维素类物质, 包括纤维素、半纤维素和木质素^[3-4]。其中纤维素和半纤维素被降解为可发酵的戊糖和己糖^[5]。国内外以玉米秸秆为原料发酵生产丙酮丁醇的报道表明, 利用玉米秸秆生产丙酮丁醇是可行的。2006 年, Qureshi 等^[6]以 *Clostridium acetobutylicum* P260 为实验菌种, 玉米秸秆为碳源发酵生产丙酮丁醇, 当玉米秸秆水解液糖质量浓度为 60 g/L 并添加 5 g/L 木糖或木聚糖分批发酵时, 总溶剂为 9.60 g/L, 生产强度和生产率分别为 0.20 g/(L·h)、0.41 g/g。2009 年, 王旭明等^[7]利用 *Clostridium acetobutylicum* CICC 8008 为生产菌种, 以 NaOH 预处理的玉米秸秆酶解液为发酵底物进行丙酮丁醇的发酵, 丁醇质量浓度达到 6.20 g/L。2010 年, Qureshi 等^[8]以 *Clostridium beijerinckii* P260 为实验菌种, 利用 Ca(OH)₂ 去毒处理后的玉米秸秆水解液为碳源发酵生产丙酮丁醇, 获得 26.27 g/L 的总溶剂(丙酮 8.00 g/L, 乙醇 3.77 g/L, 丁醇 14.50 g/L), 生产强度为 0.31 g/(L·h), 生产率为 0.44 g/g。2011 年, Lin 等^[9]以 *Clostridium acetobutylicum* CICC 8008 为生产菌种, 玉米秸秆水解液为底物, 采用 Plackett-Burman (P-B) 和 Central Composite Design (CCD) 法对丙酮丁醇发酵培养基进行优化, 发酵获得的最大丁醇产量为 6.57 g/L。

连续发酵是指在发酵过程中以一定的速率添加新鲜培养基的同时以相同的速率放出发酵液的

培养方式。与其他发酵方式相比, 它缩短了发酵时间, 提高了生产强度和利用率, 便于自动化控制^[10]。

国外秸秆燃料丁醇的研究生产水平已经达到甚至超过了粮食发酵水平, 但国内对其研究仍处于初步阶段, 溶剂生产水平较低。作者以 *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 为发酵菌株, 利用玉米秸秆水解液为碳源, 通过正交优化实验确定了最优培养基配方, 并进行了 3 L 发酵罐培养; 同时考察了变温发酵过程对溶剂积累的影响, 进行了变温连续发酵的初步研究。作者首次进行了秸秆丁醇的变温连续发酵, 为实现以廉价糖质原料为底物连续发酵生产丙酮丁醇的工业化提供了依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864, 购自德国微生物菌种保藏中心(DSMZ)。

1.1.2 培养基

1) 种子培养基(RCM 培养基): 酵母膏 3 g/L, 牛肉膏 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 可溶性淀粉 1 g/L, 葡萄糖 5 g/L, 半胱氨酸盐酸盐 0.5 g/L, NaCl 3 g/L, NaAC 3 g/L, 刃天青 3 mg/L; pH 6.5, 115 °C 灭菌 20 min。

2) TYA 培养基: 葡萄糖 40 g/L, 牛肉膏 2 g/L, 酵母膏 2 g/L, 胰蛋白胨 6 g/L, 乙酸铵 3 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L; pH 6.5, 115 °C 灭菌 20 min。

3) 初始发酵培养基: 玉米秸秆水解液(以总糖计) 56.16 g/L, CaCO₃ 3.2 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, 玉米浆干粉 10 g/L, MnSO₄·H₂O 0.01 g/L; pH 6.0, 115 °C 灭菌 20 min。

1.2 实验方法

1.2.1 玉米秸秆水解液的制备 秸秆(3 cm)于烘箱中 60 °C 烘烤过夜, 粉碎机粉碎过 40 目筛; 70 g

秸秆与 1 L 1%NaOH 溶液混匀,于灭菌锅中 120 ℃处理 120 min。将处理后的秸秆水洗至中性,110 ℃烘干,粉碎机粉碎过 40 目筛,得碱预处理后的秸秆。称取碱处理后玉米秸秆 7 g 加 100 mL 水, H₂SO₄ 调 pH 至 4.8,按 20 FPIU/g 秸秆的量加入 ZSL 酸性纤维素酶(购自山东泽生生物科技有限公司),50 ℃ 100 r/min 水解 72 h,离心,上清液即为玉米秸秆水解液。

1.2.2 培养方法

1) 种子培养:菌种孢子液按体积分数 1%转接于 RCM 培养基中,于真空干燥器中 37 ℃培养 12~18 h。

2) 摇瓶培养:按体积分数 8%将种子液接种于新鲜发酵培养基(TYA 培养基、正交优化所得的最优培养基)中,250 mL 三角瓶装液量为 150 mL,37 ℃培养 48 h。

3) 3 L 发酵罐培养:装液量 1.5 L,接种体积分数 8%,培养温度 37 ℃,培养时间 48 h,培养基为正交优化所得最优培养基。

4) 3 L 发酵罐变温调控培养:初始温度 37 ℃;pH 降至 5.1 时,下调温度至 33 ℃;pH 升至 5.3 时,下调温度至 30 ℃,培养时间 72 h。其余同 3 L 发酵罐培养。

5) 变温发酵过程调控培养:(A) 恒温 37 ℃;(B) 初始温度 37 ℃;pH 降至 5.1 时,下调温度至 33 ℃;pH 升至 5.3 时,下调温度至 30 ℃;(C) 初始温度 37 ℃;pH 降至 5 时,下调温度至 33 ℃;(D) 初始温度 37 ℃;pH 降至 5 时,下调温度至 30 ℃。500 mL 装液量 300 mL,接种体积分数 8%,培养基同 3 L 发酵罐培养(培养基中玉米秸秆水解液糖质量浓度为 56.16 g/L,添加葡萄糖使总糖达 60 g/L)。

6) 变温连续发酵培养:发酵罐 5 个,500 mL 装液量为 300 mL,稀释率 0.1 h⁻¹,培养基同 3 L 发酵罐培养。发酵开始时 5 个罐中均装有 300 mL 新鲜培养基,同时接种(接种体积分数 8%),均于 37 ℃培养至 pH 降至 5,开始补料连续发酵,同时将后 3 个罐降至 30 ℃下培养。

1.3 测定方法

1.3.1 菌体 OD 值测定 用 1.8 g/dL 稀盐酸稀释发酵液 10 倍(除去发酵液中的不溶物 CaCO₃),于分光光度计中测定 660 nm 下的吸光值,为菌体浓度。

1.3.2 糖含量测定 采用高效液相色谱法(HPLC)测定葡萄糖、木糖和阿拉伯糖。色谱柱:Aminex HPX-87H 离子色谱柱(300 mm×7.8 mm,9 μm;美

国 Bio-Rad);检测器:示差检测器;流动相:3 mmol/L 硫酸;流速:0.5 ml/min;柱温:55 ℃。

1.3.3 溶剂及有机酸测定 溶剂(丙酮、乙醇、丁醇)和有机酸(乙酸、丁酸)的测定:采用气相色谱法(GC);色谱柱:PEG-2M 毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm×0.4 μm);检测器:FID;载气:N₂;进样量:1 μL;分流比:90:1;内标法定量,内标为异丁醇。

2 结果与分析

2.1 *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 对玉米秸秆水解液中糖类的利用情况

秸秆水解液中主要含有葡萄糖、木糖和阿拉伯糖,作者考察了 *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864 对这 3 种糖及由这 3 种糖复配而成的混合糖的利用情况,以预测该菌株以玉米秸秆水解液为底物发酵生产丙酮丁醇的情况。

由表 1 可以看出,*C. saccharobutylicum* DSM 13864 可以分别利用木糖、葡萄糖、阿拉伯糖(糖质量浓度均为 40 g/L)为底物发酵生产丙酮丁醇,产生 9.04、11.80、10.02 g/L 总溶剂,糖利用率分别达到 80.84%、100%、100%。按照美国农业部 Qureshi 课题组^[8]水解所得玉米秸秆水解液中木糖、葡萄糖、阿拉伯糖的组成配置的混合糖(木糖 15.6 g/L,葡萄糖 22 g/L,阿拉伯糖 2.4 g/L)也能被该菌利用,产生 11.61 g/L 总溶剂,包括:丁醇 8.42 g/L,丙酮 2.81 g/L 和乙醇 0.38 g/L,糖利用率达 100%。由此推测 *C. saccharobutylicum* DSM 13864 能够较好的利用玉米秸秆水解液来发酵生产丙酮丁醇。

2.2 发酵培养基正交优化

对初始发酵培养基中主要成分:(NH₄)₂SO₄、CaCO₃、K₂HPO₄ 和玉米浆干粉,进行了四因素三水平正交优化实验,见表 2,以期获得利用玉米秸秆水解液发酵生产丙酮丁醇的最优培养基配比。根据表 3 中极差分析结果可知,影响丁醇积累的因素由主到次为:C>B>D>A,即玉米浆干粉>CaCO₃>K₂HPO₄>(NH₄)₂SO₄。根据表中数据分析,培养基最优配比为 C₃B₁D₂A₁,即玉米浆干粉 15 g/L,CaCO₃ 2.0 g/L,K₂HPO₄ 0.5 g/L,(NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L。由于该组合在正交表中并未出现,因此在最优配比条件下进行验证实验可得总溶剂为 14.97 g/L,其中丁醇 10.86 g/L,丙酮 3.51 g/L,乙醇 0.61 g/L。确定该组合为培养基的最优配比。

表 1 *C. saccharobutylicum* DSM 13864 利用组成玉米秸秆水解液的主要糖类及其混合糖发酵产溶剂

Tab.1 Production of ABE from individual sugars (glucose, xylose, arabinose) and their mixed sugars present in corn stover hydrolyzate by *C. saccharobutylicum* DSM 13864

底物	丙酮质量浓度/ (g/L)	乙醇质量浓度/ (g/L)	丁醇质量浓度/ (g/L)	总溶剂质量浓度/ (g/L)	残糖质量浓度/ (g/L)	糖利用率 %	细胞浓度/OD ₆₀₀
葡萄糖	3.55±0.06	0.43±0.04	7.82±0.16	11.80±0.26	0.00±0.00	100±0.00	3.80±0.03
木糖	2.08±0.16	0.25±0.02	6.71±0.31	9.04±0.08	7.67±0.26	80.84±0.08	3.03±0.00
阿拉伯糖	2.38±0.04	0.26±0.03	7.38±0.47	10.02±0.46	0.00±0.00	100±0.00	2.08±0.11
混合糖 ^b	2.81±0.34	0.38±0.04	8.42±0.07	11.61±0.32	0.00±0.00	100±0.00	3.56±0.36

注:^a 糖利用率/%= (消耗的总糖 / 原有总糖)×100%。

^b 混合糖: 木糖 15.6 g/L, 葡萄糖 22 g/L, 阿拉伯糖 2.4 g/L (总糖 40 g/L)。

发酵培养基为 TYA 培养基, 用 40 g/L 的单糖(木糖/阿拉伯糖)或混合糖取代 40 g/L 的葡萄糖; 发酵时间为 48 h。

表 2 优化培养基配方的四因素三水平正交实验方案

Tab.2 Four factors and three levels of orthogonal experiment on fermentation medium

水平	因素			
	A: (NH ₄) ₂ SO ₄ / (g/L)	B: CaCO ₃ / (g/L)	C: corn steep powder/(g/L)	D: K ₂ HPO ₄ / (g/L)
1	1	2	5	0.2
2	2	3	10	0.5
3	3	4	15	0.8

表 3 优化培养基配方的正交实验结果

Tab.3 Results of orthogonal experiment on fermentation medium

实验号	因素				丁醇质量浓度 % (g/L)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	8.56
2	1	2	2	2	9.10
3	1	3	3	3	9.05
4	2	1	2	3	9.19
5	2	2	3	1	9.53
6	2	3	1	2	7.80
7	3	1	3	2	10.12
8	3	2	1	3	7.80
9	3	3	2	1	8.75

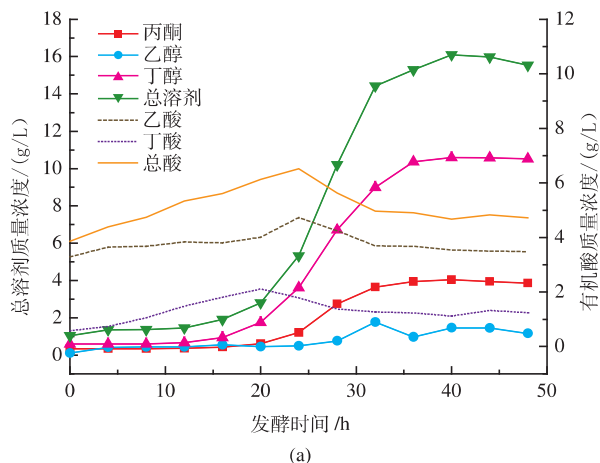
注: a 数据为数次实验的平均值。

2.3 3 L 发酵罐培养

作者考察了 *C. saccharobutylicum* DSM 13864 以玉米秸秆水解液为底物, 在 3 L 发酵罐中发酵生产丙酮丁醇过程中各参数(菌体生长、溶剂积累、有机酸产生等)的变化情况。培养基为 2.2 优化所得的最优培养基。由图 1 可知, 发酵总时间为 48 h, 在

40 h 时发酵结束, 总溶剂为 16.1 g/L, 其中丁醇 10.59 g/L, 丙酮 4.04 g/L, 乙醇 1.46 g/L, 发酵强度为 0.40 g/(L·h), 生产率为 0.33 g/g。发酵 20 h 时溶剂开始迅速积累, 随着溶剂的产生, 有机酸(乙酸和丁酸)量减少, 乙酸和丁酸转化为乙醇和丁醇。发酵初始总糖质量浓度为 51.33 g/L (葡萄糖 37.5 g/L, 木糖 12.67 g/L, 阿拉伯糖 1.16 g/L), 随着发酵的进行, 葡萄糖大量减少, 阿拉伯糖于 28 h 耗尽, 发酵末期残留 2.25 g/L 的木糖, 结合表 1 中糖利用情况, 说明 *C. saccharobutylicum* DSM 13864 对木糖的代谢能力弱于葡萄糖和阿拉伯糖。

该发酵过程的初始 pH 为 5.67, 随着发酵初期有机酸(乙酸、丁酸)的产生, 12 h 时 pH 降至最低值 4.99, 随后发酵进入溶剂产生阶段, 发酵液 pH 值逐渐升高, 发酵末期(48 h) pH 值为 5.62。由于发酵液中添加了 CaCO₃ 作为缓冲物质, 发酵过程最低 pH 为 4.99; 而未添加 CaCO₃ 的实验表明, 发酵过程的 pH 可降至 3.64, 造成过酸环境不利于菌体生长, 因而引起溶剂产量的下降, 表明 CaCO₃ 是利用糖类原料进行丙酮丁醇发酵中一种重要的 pH 缓冲物质。



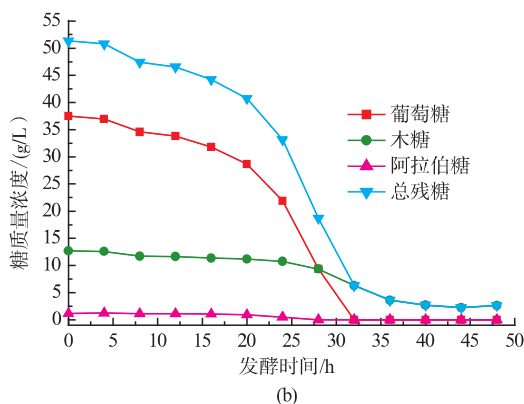


图1 *C. saccharobutylicum* DSM 13864 利用玉米秸秆水解液在 3 L 发酵罐中发酵生产丁醇

Fig.1 Production of butanol from corn stover hydrolyzate by *C. saccharobutylicum* DSM 13864 in a 3 L bioreactor

2.4 3 L 发酵罐变温调控培养

中国科学院研究所顾阳等^[11]报道,在产溶剂阶段下调发酵温度,可以提高丁醇产物浓度。为了提高溶剂积累量,进行了 3 L 发酵罐变温调控培养(初始温度 37 °C; pH 降至 5.10 时,下调温度至 33 °C; pH 升至 5.30 时,下调温度至 30 °C)。由图 2 可知,发酵进行至 60 h 时结束,总溶剂为 17.02 g/L,其中丁醇 11.90 g/L,丙酮 4.61 g/L,乙醇 0.51 g/L,发酵强度为 0.28 g/(L·h),生产率为 0.35 g/g。发酵初始总糖质量分数为 48.8 g/L (葡萄糖 37.51 g/L, 木糖 10.39 g/L, 阿拉伯糖 0.9 g/L),葡萄糖、木糖和阿拉伯糖分别于 44、48、32 h 时耗尽,糖利用率达 100%。发酵过程初始 pH 为 5.61,于 24 h 时下降至最低 4.99,发酵末期(72 h) pH 值为 5.74。

与 3 L 发酵罐培养相比,发酵产溶剂阶段下调发酵温度虽然延长了发酵周期(延长了 20 h),降低了发酵生产强度,但是提高了溶剂积累量和糖的利用率。因此,发酵过程变温调控可用于发酵强度比较高的连续发酵中,以提高溶剂积累量和糖利用率。

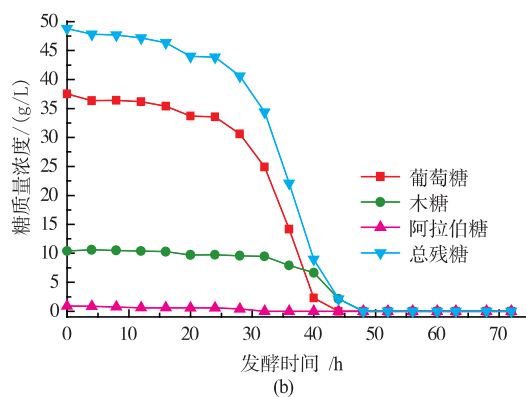
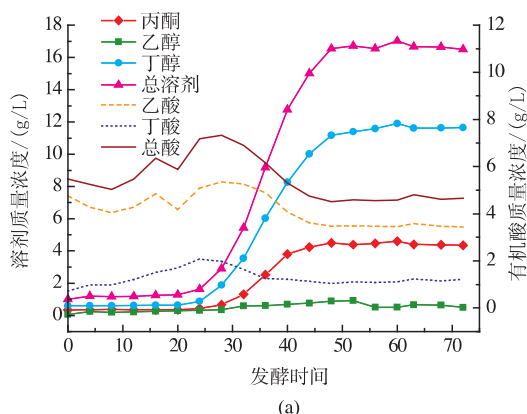


图2 *C. saccharobutylicum* DSM 13864 利用玉米秸秆水解液在 3 L 发酵罐中变温调控发酵生产丁醇

Fig.2 Production of butanol from corn stover hydrolyzate by *C. saccharobutylicum* DSM 13864 using temperature-shifting in a 3 L bioreactor

2.5 不同变温调控方式对溶剂积累的影响

为了确定合适的温度梯度,尝试了几种不同的变温调控方式。使用 T 检验对不同变温调控方式下的溶剂积累量和残糖进行显著性分析:A 方式(对照)与 B 方式(初始温度 37 °C; pH 降至 5.1 时,下调温度至 33 °C; pH 升至 5.3 时,下调温度至 30 °C)、C 方式(初始温度 37 °C; pH 降至 5 时,下调温度至 33 °C)、D 方式(初始温度 37 °C; pH 降至 5 时,下调温度至 30 °C),结果见图 3。表明存在极显著性差异 ($P < 0.01$),说明低温有利于溶剂的积累并提高糖利用率;B、C、D 之间总溶剂积累量无明显差异 ($P > 0.05$),但是 B 与 C、D 之间丁醇积累量存在显著性差异 ($P < 0.01$)。C 方式和 D 方式能达到基本相同的

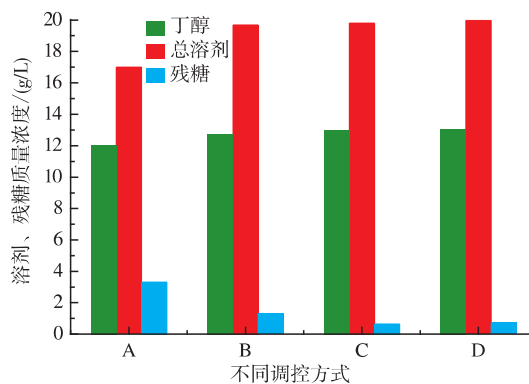


图3 不同变温调控方式对 *C. saccharobutylicum* DSM 13864 溶剂积累的影响

Fig.3 Effect of different temperature-shifting operation on batch ABE fermentation by *C. saccharobutylicum* DSM 13864

提高丁醇积累的效果,总溶剂由 17.01 g/L(其中丁醇 12.01 g/L)分别提高至 19.81 g/L(其中丁醇 12.99 g/L)和 19.98 g/L(其中丁醇 13.03 g/L)。从节能方面考虑,可根据不同的季节选用 C 或 D 方式。低温虽然有利于积累溶剂和提高糖利用率,但是降低温度使细胞代谢减缓,延长了发酵周期,降低了生产强度。C 方式和 D 方式的生产周期延长为 80 h,生产强度为 0.25 g/(L·h)。

2.6 变温连续发酵

连续发酵通过连续流加新鲜培养基并以相同的速率连续地排出发酵液而使菌体保持稳定的生长环境和生长状态,从而提高产率和产品质量。连续发酵生产丙酮丁醇不仅可以减少溶剂对菌体的毒害作用,也可以缩短发酵菌种延迟期提高丁醇的产率^[10]。作者采用下进上出的五级连续发酵方式,由于丙酮丁醇发酵过程中产生大量气体(CO₂和H₂),在该方式下,气体产生的压力不仅可以使发酵液自发地连续不断向后流动,也可实现各罐中发酵液的搅拌混匀。在连续发酵过程的前 17 个小时,5 个罐均处于 37 ℃ 分批发酵,待各罐 pH 下降至 5.00 时,即发酵将进入产溶剂阶段,启动补料泵开始稀释率为 0.1 h⁻¹ 的连续发酵,同时将后 3 个罐移入 30 ℃ 条件下发酵培养。从图 4 看出,该发酵过程在前 80 小时经历了一个不稳定阶段,原因在于补入第一个罐中的新鲜培养基要经过 40 h 才能到达末级罐中,即 57 h 后末级发酵罐才获得补料,获得补料后饥饿状态的细胞迅速增殖,产酸量增加,产溶剂量较低。

连续发酵过程在 80 h 左右进入稳定状态并持续至 269 h,稳定期平均总溶剂为 12.28 g/L,其中丁醇 8.50 g/L,丙酮 3.41 g/L,乙醇 0.37 g/L,发酵强度为 1.23 g/(L·h),是变温分批发酵(D 方式)的 4.92 倍;平均总酸为 4.42 g/L,乙酸 2.97 g/L,丁酸 1.45 g/L。在 65 h 时总溶剂达最高,为 15.29 g/L(其中丁醇 10.82 g/L),发酵末级罐中的平均残糖为 7.33 g/L(木糖),说明发酵仍未完全结束,该连续发酵工艺仍需优化。与其他(表 4)以糖质原料为底物固定化细胞或细胞循环连续发酵生产丙酮丁醇实验相比,本研究的总溶剂量有所提高。

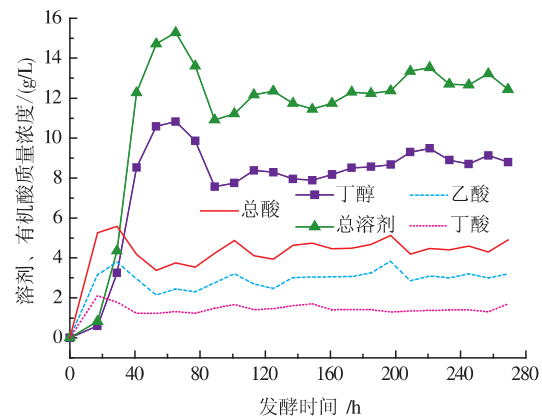


图 4 *C. saccharobutylicum* DSM 13864 利用玉米秸秆水解液在五级变温连续发酵中末级罐的溶剂及有机酸的生产

Fig.4 Time course of solvent and acids production from corn stover hydrolyzate in final stage of the five-stage temperature-shifting continuous fermentation by *C.saccharobutylicum* DSM 13864

表 4 文献报道的连续发酵生产丙酮丁醇的数据比较

Tab.4 Comparison of parameters in reported ABE continuous fermentation and this study

细胞状态	菌种	底物	稀释率/h ⁻¹	生产强度 ^a /(g/(L·h))	产率 ^b /(g/g)	最高总溶剂/(g/L)	文献
固定化细胞	<i>C.beijerinckii</i> BA101	葡萄糖	2.00	15.80	0.38	7.90	2000 ^[12]
	<i>C.beijerinckii</i> NCIMB 8052	葡萄糖+丁酸	0.04	0.40	0.44 ^c	10~13 丁醇	2008 ^[13]
	<i>C.acetobutylicum</i> BCRC 10639	葡萄糖	0.11	1.21	0.19	—	2011 ^[14]
	<i>C.beijerinckii</i> ATCC 55025	葡萄糖	0.20	1.76	—	8.99	2009 ^[15]
循环细胞	<i>C.Saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4	葡萄糖	0.11	7.55	0.46	8.58	2005 ^[16]
游离细胞	<i>C.saccharobutylicum</i> DSM 13864	玉米秸秆水解液	0.10	1.23	0.23	15.29	本实验

注:^a 生产强度/(g/(L·h))=稀释率×总溶剂;^b 产率/(g/g)=总溶剂/消耗总糖;^c 产率/(g/g)=丁醇/消耗总糖

3 结 语

C. saccharobutylicum DSM 13864 可较好地利用玉米秸秆水解液中的主要糖分——木糖、葡萄糖、阿拉伯糖以及由这 3 种糖复配而成的混合糖为底物发酵生产丙酮丁醇。作者通过正交优化的方法确定了以玉米秸秆水解液为底物的最优培养基配比: CaCO_3 2.0 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 g/L, K_2HPO_4 0.5 g/L, 玉米浆干粉 15 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g/L。在该条件下进行 3 L 发酵罐培养, 40 h 时发酵结束, 总溶剂为 16.1 g/L, 其中丁醇 10.59 g/L, 丙酮 4.04 g/L, 乙醇 1.46 g/L, 发酵强度为 0.40 g/(L·h), 生产率为 0.33

g/g。在产溶剂阶段下调发酵温度虽然会延长发酵周期但可以提高溶剂量, 降低残糖。对发酵强度较高的连续发酵进行变温调控, 稀释率为 0.1 h^{-1} , 80 h 左右时发酵过程进入稳定状态并持续至 269 h (11 天), 稳定期平均总溶剂为 12.28 g/L, 其中丁醇 8.50 g/L, 丙酮 3.41 g/L, 乙醇 0.37 g/L, 发酵强度为 1.23 g/(L·h), 是变温分批发酵(D 方式)的 4.92 倍。作者对变温连续发酵生产丁醇的进行了初步实验, 在工艺上仍需进一步研究和改进。以玉米秸秆水解液为底物发酵生产丙酮丁醇, 对于实现可再生资源的能源化具有重要的意义, 为丙酮丁醇工业化生产工艺提供了参考。

参考文献:

- [1] 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: 559–565.
- [2] Qureshi N, Saha B C, Hector R E, et al. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I—batch fermentation[J]. *Biomass Bioenergy*, 2008, 32: 168–175.
- [3] Kumar S, Kothari U, Kong L Z, et al. Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres[J]. *Biomass Bioenergy*, 2011, 35: 956–968.
- [4] LIN Z X, HUANG H, ZHANG H M, et al. Ball milling pretreatment of corn stover for enhancing the efficiency of enzymatic hydrolysis[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 162: 1872–1880.
- [5] 孙万里, 陶文沂. 木质素与半纤维素对稻草秸秆酶解的影响[J]. *食品与生物技术学报*, 2010, 29(1): 18–22.
SUN Wan-li, TAO Wen-yi. Effect of lignin and hemicellulose on enzymatic hydrolysis of cellulose from rice straw[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(1): 18–22. (in Chinese)
- [6] Qureshi N, Li XL, Hughes S, et al. Butanol production from corn fiber xylan using *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Biotechnol Progr*, 2006, 22(3): 673–680.
- [7] 王旭明, 仇天雷, 林有胜, 等. 酶水解液的丁醇发酵条件优化研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(34): 17277–17280.
WANG Xu-ming, QIU Tian-lei, LIN You-sheng, et al. Optimization of butanol production from corn straw hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2009, 37(34): 17277–17280. (in Chinese)
- [8] Qureshi N, Saha B C, Hector R E, et al. Production of butanol (a biofuel) from agricultural residues: part II—use of corn stover and switchgrass hydrolysates[J]. *Biomass Bioenergy*, 2010, 34: 566–571.
- [9] LIN Y S, WANG J, WANG X M, et al. Optimization of butanol production from corn straw hydrolysate by *Clostridium acetobutylicum* using response surface method[J]. *Chin Sci Bull*, 2011, 56(14): 1422–1428.
- [10] 王媛, 范栋, 陈有容, 等. 微生物发酵过程的多种培养技术[J]. *生物技术通报*, 2009, 21: 122–125.
WANG Yuan, FAN Dong, CHEN You-rong, et al. Multiple cultivation technologies of fermentation process of microbes[J]. *Biotechnol Bull*, 2009, 21: 122–125. (in Chinese)
- [11] 顾阳, 蒋宇, 吴辉, 等. 生物丁醇制造技术现状和展望[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 914–923.
GU Yang, JIANG Yu, WU Hui, et al. Current status and prospects of biobutanol manufacturing technology [J]. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 914–923. (in Chinese)
- [12] Qureshi N, Schripsema J, Lienhardt J, et al. Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2000, 16: 377–382.
- [13] Lee S M, Cho M O, Park C H, et al. Continuous butanol production using suspended and immobilized *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate[J]. *Energy Fuels*, 2008, 22: 3459–3464.

- [14] Yen H W, Li R J. The effects of dilution rate and glucose concentration on continuous acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* immobilized on bricks[J]. **J Chem Technol Biotechnol**, 2011, 86(11): 1349-1456.
- [15] ZHANG Y D, MA Y J, YANG F X, et al. Continuous acetone-butanol-ethanol production by corn stalk immobilized cells [J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2009, 36: 1117-1121.
- [16] Tashiro Y, Takeda K, Kobayashi G, et al. High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding[J]. **J Biotechnol**, 2005, 120(2): 197-206.

会议信息

1. 会议名称(中文): 2012 全国农业系统工程学术研讨会

开始日期: 2012-12-14

结束日期: 2012-12-16

所在城市: 浙江省 杭州市

具体地点: 浙江大学

主办单位: 中国农业工程学会农业系统工程专业委员会 中国系统工程学会农业系统工程

承办单位: 浙江大学生物系统工程与食品科学学院

联系人: 王福林

联系电话: 0451-55191462

E-MAIL: nyxtgc@163.com

会议网站: http://www.csae.org.cn/news_look.asp?typecode=0601&Id=2116

2. 会议名称(中文): 第一届国际先进的同步能源技术及催化应用研讨会

会议名称(英文): 1st International Symposium on Advanced Synchrotron Techniques for Energy and Catalysis Applications

所属学科: 生物技术与生物工程, 能源技术基础与储能节能, 再生能源技术与工程

开始日期: 2012-11-12

结束日期: 2012-11-14

所在城市: 上海市 黄浦区

主办单位: 中国科学院上海应用物理研究所 国家重点实验室材料科学研究所, 中国科学院金属研究所

联系人: Dr. Jian-Qiang Wang 联系电话: +86-(0) 21 3919 4793 传真: +86-(0) 21 3919 4793

E-MAIL: wangjianqiang@sinap.ac.cn

会议网站: <http://sec2012.csp.escience.cn/dct/page/1>

3. 会议名称(中文): 2012 中国工程前沿青年研讨会

所属学科: 生物技术与生物工程, 计算机网络, 纳米科学与技术, 再生能源技术与工程

开始日期: 2012-11-01

所在城市: 北京市 东城区

主办单位: 中国工程院

联系人: 姬学

联系电话: (010)59300186

传真: (010)59300289

E-MAIL: jix@cae.cn

会议网站: <http://www.cae.cn/cae/publish/html/main/gcgyqnyth2012/gcgyqnyth2012.html>