

丙酮丁醇梭菌发酵菊芋汁生产丁醇

陈丽杰¹, 辛程勋², 邓攀¹, 任剑刚¹, 梁环环¹, 白凤武¹

1 大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024

2 大庆九环生物新能源有限公司, 大庆 163511

摘要: 对丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* L7 发酵菊芋汁酸水解液生产丁醇进行了初步研究。实验结果表明, 以该水解液为底物生产丁醇, 不需要添加氮源和生长因子。当水解液初始糖浓度为 48.36 g/L 时, 其发酵性能与以果糖为碳源的对照组基本相同, 发酵终点丁醇浓度为 8.67 g/L, 丁醇、丙酮和乙醇的比例为 0.58 : 0.36 : 0.06, 但与以葡萄糖为碳源的对照组相比, 发酵时间明显延长, 表明该菌株葡萄糖转运能力强于果糖。当水解液初始糖浓度提高到 62.87 g/L 时, 发酵终点残糖浓度从 3.09 g/L 增加到 3.26 g/L, 但丁醇浓度却提高到 11.21 g/L, 丁醇、丙酮和乙醇的比例相应为 0.64 : 0.29 : 0.05, 表明适量糖过剩有助于 *C. acetobutylicum* L7 胞内代谢从丙酮合成向丁醇合成途径调节; 继续提高水解液初始糖浓度, 发酵终点残糖浓度迅速升高, 丁醇生产的技术经济指标受到明显影响。

关键词: 丙酮丁醇梭菌, 菊芋汁水解液, 丁醇发酵

Butanol production from hydrolysate of Jerusalem artichoke juice by *Clostridium acetobutylicum* L7

Lijie Chen¹, Chengxun Xin², Pan Deng¹, Jiangan Ren¹, Huanhuan Liang¹, and Fengwu Bai¹

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China

2 Daqing Nine Ring Bio New Energy Co., Ltd., Daqing 163511, China

Abstract: Butanol production from acid hydrolysate of Jerusalem artichoke juice by *Clostridium acetobutylicum* L7 was investigated, and it was found that natural components of the hydrolysate were suitable for solvent production with the species. With batch fermentation using the medium containing 48.36 g/L total sugars, 8.67 g/L butanol was produced at 60 h, and the ratio of butanol to acetone to ethanol was 0.58:0.36:0.06, which were similar to the fermentation with fructose as carbon source, but both of these two fermentations were slower than that with glucose as carbon source, indicating the fructose transport of the species might not be effective as that for glucose. When the total sugars of the medium were increased to 62.87 g/L, the residual sugars increased slightly from 3.09 g/L to 3.26 g/L, but butanol production of the fermentation system was improved significantly, with 11.21 g/L butanol produced and the ratio of butanol to acetone to ethanol at 0.64:0.29:0.05, which illustrated that an excess in sugars enhanced the butanol biosynthesis of the species by compromising its acetone production. When the sugar concentration of the medium was further increased, much more sugars were remained unconsumed, making the process economically unfavourable.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum*, hydrolysate of Jerusalem artichoke juice, butanol fermentation

与乙醇相比,丁醇具有能量密度高、亲水性弱、腐蚀性小、更易与汽油或柴油混合等优点,更适宜于作为发动机燃料,因此被认为是第2代生物燃料^[1]。目前丁醇主要以淀粉质原料如玉米、小麦、黍米等和糖质原料如糖蜜生产^[2],原料成本高的问题十分突出。此外,与燃料乙醇一样,以粮食类淀粉质原料大规模生产丁醇作为燃料,也会产生影响粮食安全的社会问题。开发廉价的、非粮生物质原料,是发展丁醇作为生物燃料的必然出路。

菊芋 Jerusalem artichoke, 又名洋姜或鬼子姜,为菊科向日葵属多年生宿根性草本植物,其生态适应性强,耐旱、耐寒、耐盐碱,能够在不适宜于粮食和经济作物生长的盐碱地、滩涂地等边际土地上种植,生物量产量高^[3]。鲜菊芋块茎中含水 70%~80%,碳水化合物 15%~20%,以菊粉的形式存在。菊粉 (Inulin), 又称菊糖,是由 D-果糖经 β -2,1 糖苷键连接的聚合度不高的聚果糖,末端为一个葡萄糖残基^[4]。与目前国内外普遍关注的以农作物秸秆为代表的木质纤维素类生物质原料相比,菊芋易被酸或菊粉酶水解而生成果糖和葡萄糖的混合物,是生产果糖、果糖基产品和微生物发酵生产生物燃料和生物基化学品等的良好原料^[5]。

以菊芋块茎为原料生产乙醇的研究工作在国内外均有报道^[6-7],然而鲜菊芋块茎含水量高,直接水解获得的糖难以满足乙醇发酵对高浓度底物的要求,但却可以很好地满足丁醇发酵的要求。由于丁醇发酵梭菌没有菊粉酶生产能力,不能水解菊芋中的菊粉多糖,因此生产丁醇时需要将菊芋原料进行水解。本文以菊芋汁稀酸水解糖为底物,研究其发酵生产丁醇的可行性,为第2代生物燃料丁醇生产开辟新的原料来源。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种

本实验室驯化保存的丙酮丁醇梭状芽胞杆菌 *Clostridium acetobutylicum* L7。

1.1.2 实验原料

菊芋汁:鲜菊芋块茎直接压榨,由中国科学院

大连化学物理研究所杜昱光教授提供。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基配制

葡萄糖培养基 (g/L):葡萄糖 50, 乙酸铵 2.3, K_2HPO_4 0.5, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 邻氨基苯甲酸 0.01, 生物素 0.01, 初始 pH 5.5。

果糖培养基 (g/L):果糖 50, 乙酸铵 2.3, K_2HPO_4 0.5, KH_2PO_4 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2, 邻氨基苯甲酸 0.01, 生物素 0.01, 初始 pH 5.5。

菊芋汁用硫酸调节至 pH 值 2.0~3.0, 沸水浴保温维持 60 min 使菊粉水解,用 NaOH 调节水解液至 pH 6.0, 即得菊芋汁水解液 (Hydrolysate of Jerusalem artichoke juice, HJA), 于 121 $^{\circ}C$ 蒸汽灭菌 20 min, 冷却后保存备用。将准备好的菊芋汁水解液稀释到所需的糖浓度, 添加对照培养基中除碳源外的其他成分, 用少量硫酸调节其初始 pH 5.5。

以上培养基接种前均在 121 $^{\circ}C$ 下蒸汽灭菌 15 min。

1.2.2 培养方法

菌种活化培养:将 1 mL 冷冻保藏的菌种接种于 20 mL 玉米醪试管培养基中,沸水浴下处理 1~2 min, 在温度 37.5 $^{\circ}C$ 下厌氧活化培养, 自然 pH 值。

摇瓶培养:将活化好菌种以体积比 10% 的接种量接种于 100 mL 发酵培养基中,充无菌氮气 10 min, 于温度 37.5 $^{\circ}C$, 150 r/min 摇床培养, 初始 pH 为 5.5。

发酵罐培养:在 2.5 L 发酵罐 (KF-2.5) 中进行, 装液量为 1 L, 接种量 10% (V/V), 搅拌转速 150 r/min, 发酵温度 37.5 $^{\circ}C$, 初始 pH 5.5。接种后向发酵罐中通入无菌氮气 30 min, 以保证发酵罐内的厌氧环境。

1.2.3 糖的测定

糖浓度测定采用 DNS 法^[8]。对葡萄糖为碳源的培养基和发酵液, 其标准曲线使用葡萄糖标准溶液绘制; 以果糖和菊芋汁水解液为碳源的培养基和发酵液, 其标准曲线使用果糖标准溶液绘制。样品离心处理后, 取适当稀释的上清液 1 mL, 加入 1 mL 水, 再加入 1.5 mL DNS 试剂, 摇匀, 沸水浴 5 min, 立即冷却至室温, 加蒸馏水至 25 mL, 摇匀, 540 nm 测吸光度, 根据相应的标准曲线计算样品糖浓度。

接种后立即取样, 测定初始糖浓度; 发酵过程

中或发酵结束后取样, 测定发酵液中残糖浓度。

1.2.4 生物量的测定

摇瓶发酵由于菌体浓度低, 且发酵液中含有的少量固形物对生物量测定干扰严重, 因此严格控制实验组与对照组接种量和其他实验条件, 比较添加氮源和维生素对溶剂生产的影响。发酵罐培养过程生物量测定方法如下: 取 2.5 mL 发酵液离心, 12 000 r/min 离心 5 min 后, 用去离子水洗涤 2 次, 在 85℃ 下干燥至恒重。

1.2.5 溶剂测定方法

用气相色谱 HP-INNOWAX(19091N-233) 测定溶剂各组分, FID 检测器。色谱条件: 毛细管色谱柱 (30 m×0.25 mm×0.50 μm), 柱温 100℃; 进样温度 250℃; FID 检测器温度 300℃, H₂ 流速 40 mL/min, 空气流速 400 mL/min; 载气 N₂ 流速 30 mL/min; 进样量 0.2 μL, 分流比 50:1。采用内标法定量, 内标物为异丁醇。

2 结果与讨论

发酵培养基组成对 *C. acetobutylicum* 生长和溶剂生产各个环节的调控至关重要。目前以玉米为原料生产丁醇, 按照发酵要求浓度调配的粉浆蒸煮后, 冷却到发酵温度即可使用, 无需添加任何营养组分。与玉米原料相比, 菊芋块茎灰分偏高, 磷含量足以满足需求, 但蛋白含量很低, 因此以菊芋汁为发酵底物是否需要补充氮源, 需要通过实验来确定。此外, 已有研究工作表明生物素和氨基苯甲酸是 *C. acetobutylicum* 菌体生长和溶剂生产必需的维生素^[9], 但菊芋汁水解液作为发酵底物是否需要添加这两种维生素尚未见报道。

表 2 培养基中生长因子对菊芋汁丁醇发酵的影响

Table 2 Effect of growth factors on butanol production from Jerusalem artichoke juice hydrolysate by *C. acetobutylicum* L7

Vitamins	Initial sugars (g/L)	Residual sugars (g/L)	Acetone (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)
0.01 g/L o-aminobenzoic acid	45.14	2.67	3.90	0.94	8.93
0.01 g/L biotin	45.78	14.20	2.51	0.59	6.39
0.01 g/L o-aminobenzoic acid + 0.01 g/L biotin	44.99	13.95	2.84	0.59	6.40
None	44.42	2.70	4.87	0.79	8.88

2.1 氮源对菊芋汁丁醇生产的影响

添加乙酸盐有助于溶剂生产^[10], 因此乙酸钠是 *C. acetobutylicum* 培养的良好氮源。表 1 所示为向培养基中添加 2.3 g/L 乙酸钠时批式发酵的实验结果。可见, 与对照组相比, 添加乙酸钠没有明显促进溶剂, 特别是丁醇的生产, 表明菊芋汁水解液作为底物培养 *C. acetobutylicum* L7 生产丁醇不需要添加氮源。

表 1 培养基中氮源对菊芋汁丁醇发酵的影响

Table 1 Effect of nitrogen sources on butanol production from Jerusalem artichoke juice hydrolysate by *C. acetobutylicum* L7

Nitrogen source	Initial sugar (g/L)	Residual sugar (g/L)	Acetone (g/L)	Ethanol (g/L)	Butanol (g/L)
Ammonium acetate	43.96	13.07	3.09	0.44	6.00
None	46.09	4.99	4.11	0.47	8.07

2.2 邻氨基苯甲酸和生物素对菊芋汁水解液丁醇生产的影响

表 2 所示为菊芋汁酸水解液中添加邻氨基苯甲酸和生物素对溶剂生产的影响。可见, 与未添加这两种维生素的对照组相比, 不论是单独添加还是混合添加, 均没有显著影响, 表明菊芋汁水解液作为底物培养 *C. acetobutylicum* L7 生产丁醇不需要添加这两种维生素。

可见, 尽管菊芋块茎的营养组份不如玉米丰富, 但足以满足 *C. acetobutylicum* L7 培养生产丁醇的需要, 这对降低丁醇生产成本十分有利。

2.3 菊芋汁水解液为底物发酵生产丁醇

菊芋汁水解液是以果糖和葡萄糖为主要成分的混合糖, 其发酵过程糖消耗、菌体生长和溶剂各组分生成情况图 1~5 所示。

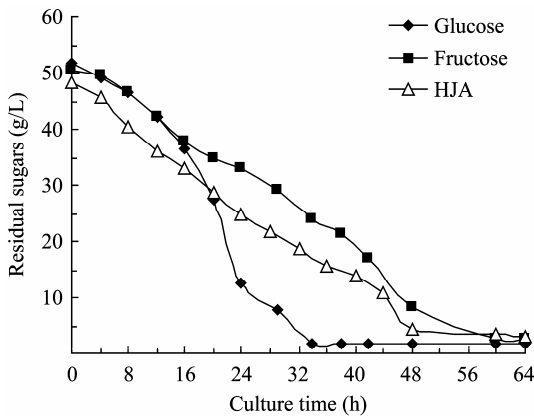


图1 丙酮丁醇梭菌发酵过程残糖浓度的变化
Fig. 1 Time course of residual sugars during butanol production by *C. acetobutylicum* L7.

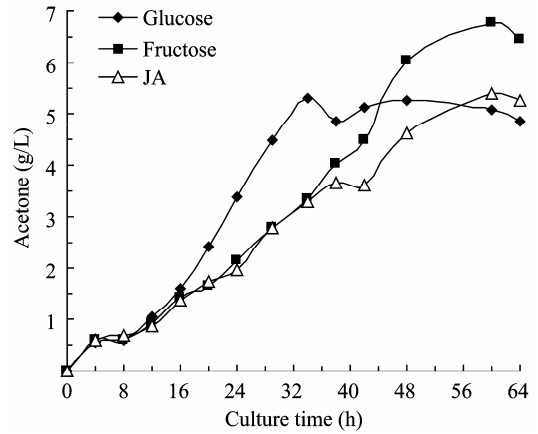


图4 丙酮丁醇梭菌发酵生产丙酮
Fig. 4 Time course of acetone production by *C. acetobutylicum* L7.

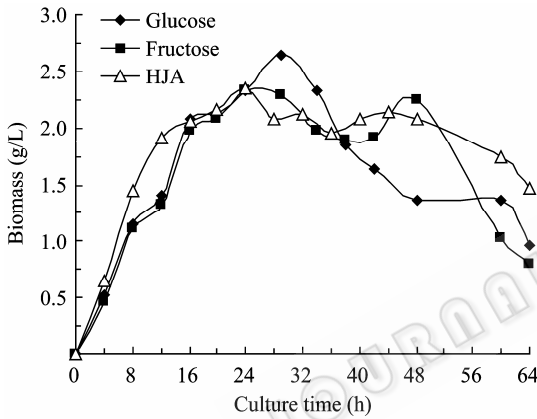


图2 丙酮丁醇梭菌发酵过程生物量浓度的变化
Fig. 2 Time course of biomass during butanol production by *C. acetobutylicum* L7.

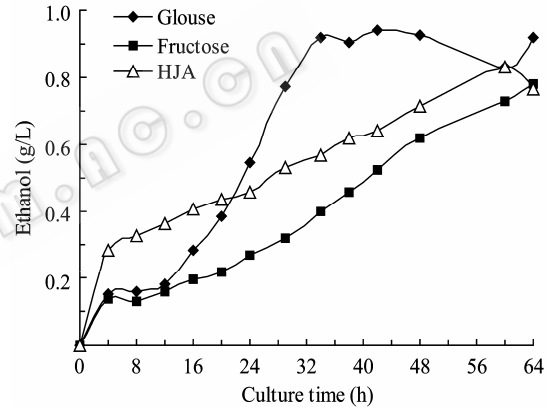


图5 丙酮丁醇梭菌发酵生产乙醇
Fig. 5 Time course of ethanol production by *C. acetobutylicum* L7.

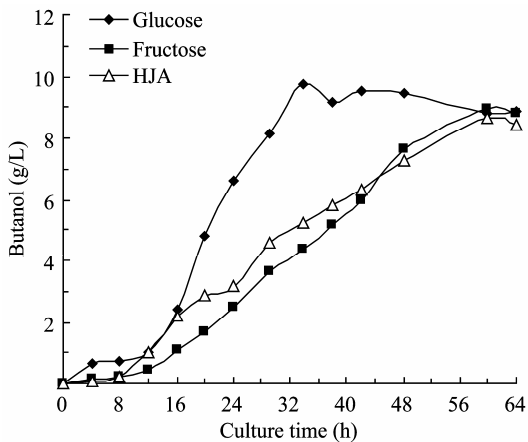


图3 丙酮丁醇梭菌发酵生产丁醇
Fig. 3 Time course of butanol production by *C. acetobutylicum* L7.

从图 1 可见，以菊芋汁水解液为底物时，糖消耗进程与以果糖为碳源的培养基一致，因为菊芋汁水解液混合糖的主要组分是果糖，但在培养进入到约 16 h 时，菌体生长开始进入静止期 (图 2)，以葡萄糖为碳源的培养基糖消耗速率比果糖和菊芋汁水解液为碳源的培养基快，而此时产物丁醇开始大量合成，如图 3 所示，至 34 h 丁醇浓度到最大值 9.73 g/L；而以果糖和菊芋汁酸水解液为碳源的培养基，丁醇生成相对缓慢，发酵至 60 h 丁醇浓度分别达到最大值 8.93 g/L 和 8.67 g/L，表明 *C. acetobutylicum* 在丁醇合成阶段葡萄糖代谢速率比果糖快，但其机理有待建立胞内代谢网络，分析相关代谢途径通量分布来阐明。

丙酮和乙醇是 *C. acetobutylicum* 丁醇发酵的共生产物。图 4 和图 5 的实验结果表明, 丙酮和乙醇与丁醇生成同步。以葡萄糖为底物时, 其最高浓度分别为 7.32 g/L 和 0.92 g/L, 而以果糖为底物时, 分别为 6.75 g/L 和 0.73 g/L, 当以菊芋汁水解液为底物时, 分别为 5.41 g/L 和 0.83 g/L。

丁醇、丙酮和乙醇的比例是衡量丁醇发酵水平的主要指标之一, 发酵终点丁醇的比例越高, 其生产的技术经济指标就越好。目前国内外实验室研究普遍使用的 *C. acetobutylicum* 菌株, 其发酵终点丁醇、丙酮和乙醇的比例一般在 6:3:1 的水平, 而生产上使用的工业菌株可以使丁醇、丙酮和乙醇的比例维持在 7:2:1 的水平。菊芋汁水解液发酵溶剂各组分比例如表 3 所示, 可见与果糖为碳源的培养基相比基本相同, 但与葡萄糖为碳源相比, 丁醇比例略低, 而丙酮比例有所提高。值得注意的是, 这 3 种不同碳源培养基发酵结束时, 乙醇生成比例基本相同, 占总溶剂的比例约 5%, 而以往研究工作报道乙醇占总溶剂的比例约 10%, 目前正在对这

一现象进行分析。

2.4 高浓度菊芋汁水解液发酵生产丁醇

丁醇对菌体具有强抑制效应, 导致发酵终点产物浓度低, 是丁醇生产能耗高的主要原因。提高培养基初始糖浓度, 是提高发酵液丁醇浓度的前提条件。表 4 所示为菊芋汁水解液中不同初始糖浓度发酵生产丁醇的实验结果, 可见当糖浓度提高到 62.87 g/L 时, 虽然发酵时间延长到 84 h, 但丁醇浓度从 8.67 g/L 增加到 11.21 g/L, 继续提高糖浓度到 95.63 g/L 时, 虽然丁醇浓度略有增加, 达到 12.56 g/L, 但此时发酵液残糖浓度已经高达 37.00 g/L, 呈严重过剩状态。另一方面, 随底物初始糖浓度的提高, 丁醇占总溶剂的比例增加, 丙酮生成比例相应减少, 表明发酵过程糖过剩有利于 *C. acetobutylicum* L7 胞内代谢从丙酮合成向丁醇合成途径调节, 但糖过剩不仅导致原料的浪费, 增加丁醇生产的原料消耗, 而且增加发酵醪精馏操作分离丁醇的难度。因此, 优化培养基初始糖浓度, 使其适量过剩以提高总溶剂中丁醇的比例, 对丁醇生产十分重要。

表 3 菊芋汁水解液、葡萄糖和果糖作为碳源发酵丁醇性能的比较

Table 3 Effect of different carbon sources on butanol production by *C. acetobutylicum* L7

Carbon source	Initial sugar (g/L)	Residual sugar (g/L)	Butanol (g/L)	Acetone (g/L)	Ethanol (g/L)	Total solvent (g/L)	Butanol/Acetone/Ethanol	Y _{Butanol/Sugar} (g/g)
Glucose	51.78	1.77	9.73	5.32	0.92	15.97	0.61/0.33/0.06	0.195
Fructose	50.38	2.59	8.93	6.75	0.73	16.41	0.54/0.41/0.04	0.187
HJA	48.36	3.09	8.67	5.41	0.83	14.91	0.58/0.36/0.06	0.192

表 4 *C. acetobutylicum* L7 发酵不同糖浓度菊芋汁酸水解液生产丁醇

Table 4 Effect of initial sugar concentration of Jerusalem artichoke juice hydrolysate on butanol production by *C. acetobutylicum* L7

Initial sugars (g/L)	Culture time (h)	Residual sugars (g/L)	Butanol (g/L)	Acetone (g/L)	Ethanol (g/L)	Total solvent (g/L)	Butanol/Acetone/Ethanol
48.36	59	3.09	8.67	5.41	0.83	14.91	0.58/0.36/0.06
62.87	84	3.26	11.21	5.01	0.94	17.16	0.64/0.29/0.05
95.63	89	37.00	12.56	4.46	1.20	18.22	0.69/0.24/0.07

3 展望

菊芋汁水解液作为 *C. acetobutylicum* L7 培养生产丁醇的底物, 其发酵性能与以果糖为碳源的培养基相似, 且其天然营养成分可以满足菌体生长和丁醇生产的基本要求, 有助于工业生产过程节省辅助

原料消耗, 降低生产成本。

丁醇生产面临的最大问题是成本高。降低丁醇生产成本可以从两方面入手: 一是开发高浓度发酵技术, 提高发酵醪中丁醇浓度, 节省能耗; 二是提高总溶剂中丁醇比例, 节省原料消耗。以菊芋为原料生产丁醇, 不论是菊芋汁, 还是直接使用菊芋块

茎, 围绕提高发酵终点丁醇浓度和总溶剂中丁醇比例, 都有大量的研究工作需要开展, 但这一原料体系与以秸秆为代表的木质纤维素类生物质相比, 易于处理获得可发酵性糖, 与粮食类淀粉质原料相比, 其种植不挤占耕地, 不会产生影响粮食安全的问题, 因此菊芋原料生产丁醇的基础研究和技术开发将越来越被关注。

REFERENCES

- [1] Dürre P. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol J*, 2007, **2**: 1525–1534.
- [2] Jones DT, Woods DR. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev*, 1986, **50**: 484–524.
- [3] Long XH, Liu ZP, Wang L, *et al.* Effects of seawater irrigation on yield composition and ion distribution of different varieties of *Helianthus tuberosus* in coastal mudflat of semiarid region. *Acta Pedol Sin*, 2007, **44**: 300–306.
隆小华, 刘兆普, 王琳, 等. 半干旱地区海涂海水灌溉对不同品系菊芋产量构成及离子分布的影响. *土壤学报*, 2007, **44**: 300–306.
- [4] Khodzhaeva MA, Kondratenko ES. The structure of the inulin from *Inula grandis*. *Chem Nat Compd*, 1982, **3**: 394–395.
- [5] Denoroy P. The crop physiology of *Helianthus tuberosus* L.: a model orientated view. *Biomass Bioenerg*, 1996, **11**: 11–32.
- [6] Nakamura T, Ogata Y, Hamada S, *et al.* Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ferment Bioeng*, 1996, **81**: 564–566.
- [7] Caserta G, Cervigni T. The use of Jerusalem artichoke stalks for the production of fructose or ethanol. *Bioresource Technol*, 1991, **35**: 247–250.
- [8] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426–428.
- [9] Soni BK, Soucaille P, Goma G. Continuous acetone-butanol fermentation: influence of vitamins on the metabolic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, **27**: 1–5.
- [10] Chen CK, Blaschek HP. Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 170–173.