



研究报告

利用以废弃毕赤酵母为氮源的丁酸发酵上清液和葡萄糖 高效生产具有高丁醇/丙酮比特征的生物丁醇

官立鹏 程文君 陈程 陈雪寒 卫津宇 丁健 史仲平*

江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122

摘要:【背景】生物丁醇是高效的液态燃料。丁醇发酵，也称丙酮-丁醇-乙醇(Acetone-Butanol-Ethanol, ABE)发酵，其发酵的产品是丁醇、丙酮和乙醇的混合物，主产物丁醇与主要副产物丙酮的质量比率(B/A比)约为2.0。【目的】丁酸是ABE发酵合成丁醇的重要前体物质，以丁酸/葡萄糖为双底物可以高效生产具有以高B/A比为特征的丁醇，提高ABE发酵产品的品质。【方法】7 L厌氧发酵罐下，以玉米淀粉/废弃毕赤酵母处理液为原料得到的丁酸发酵上清液与葡萄糖溶液直接复配作为ABE发酵培养基，并按需要在发酵途中添加该上清液和浓缩葡萄糖溶液。【结果】与使用150 g/L玉米淀粉的传统ABE发酵相比，丁醇浓度保持在12.7–12.8 g/L的较高水平，B/A比从2.0大幅提高到4.4–5.0，丁醇对总碳源的得率从0.32–0.34提升至0.39–0.41(摩尔基准)，丁酸/葡萄糖质量消耗比高达37%–53%。【结论】ABE发酵性能的改善得益于丁酸发酵上清液中丁酸、寡糖和氨基酸等得到了有效利用，NADH利用效率大幅提高。该发酵策略节省了ABE发酵的原料和操作成本，大幅降低了丁酸发酵上清液中残存的寡糖浓度，还可根据市场供需和产品价格变化的状况实现发酵产品的多样性和生产操作的灵活性，具有良好的经济和环保意义。

关键词: 丁醇发酵，丁酸/葡萄糖双底物，废弃毕赤酵母，寡糖，B/A比，NADH有效利用

Efficient bio-butanol production featured with high butanol/acetone ratio using waste *Pichia pastoris* based butyrate fermentation supernatants and glucose as co-substrate

GONG Lipeng CHENG Wenjun CHEN Cheng CHEN Xuehan WEI Jinyu

DING Jian SHI Zhongping*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education; School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China

Abstract: [Background] Bio-butanol is a powerful liquid fuel. The products of butanol fermentation (acetone-butanol-ethanol fermentation, ABE fermentation) are the mixture of butanol, acetone and ethanol, weight ratio of the primary product (butanol) over the major by-product (acetone) (B/A ratio) is about 2.0.

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (21606106)

*Corresponding author: E-mail: zpshi@jiangnan.edu.cn

Received: 13-08-2020; Accepted: 23-10-2020; Published online: 09-12-2020

基金项目: 国家自然科学基金(21606106)

*通信作者: E-mail: zpshi@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2020-08-13; 接受日期: 2020-10-23; 网络首发日期: 2020-12-09

[Objective] Butyric acid is an important precursor for butanol synthesis in ABE fermentation. Using butyric acid/glucose as co-substrate would efficiently produce butanol featured with high B/A ratio and improve the quality of ABE fermentation products. **[Methods]** In a 7-L anaerobic fermentor, the supernatant originated from butyrate fermentation (BFS) with corn starch/waste *Pichia pastoris* as the raw materials was directly mixed with glucose solution as the ABE fermentation medium, then BFS and concentrated glucose solution were fed during the fermentation as required. **[Results]** Compared with traditional ABE fermentation using 150 g/L corn, butanol concentration could be maintained at an equivalently high level of 12.7–12.8 g/L, B/A ratio largely increased from 2.0 to 4.4–5.0, butanol yield to total carbon source also increased from 0.32–0.34 to 0.39–0.41 (mole base), butyrate/glucose consumption ratio reached high levels between 37% and 53%. The ABE fermentation benefited from the efficient utilization of butyrate, oligosaccharides, amino acids, etc. in the BFS and the enhanced NADH utilization efficiency. **[Conclusion]** The proposed fermentation strategy could save raw materials and operating costs of ABE fermentations, largely reduce the residual oligosaccharides concentrations in BFS, increase diversity and flexibility of the fermentation processes based on variations of marketing requirement and products prices, which have reasonably high economic and environmental effects.

Keywords: butanol fermentation, butyrate/glucose as co-substrate, waste *Pichia pastoris*, oligosaccharides, B/A ratio, NADH efficient utilization

丁醇和丁酸是重要的平台化合物, 广泛应用于化工、塑料、医药等行业。同时, 生物丁醇(Bio-Butanol)还是可再生的高效液态燃料和燃料添加剂^[1-2]。丁醇发酵也称为丙酮-丁醇-乙醇(Acetone-Butanol-Ethanol, ABE)发酵, 发酵产品是丙酮、丁醇和乙醇的混合物, 质量比率约为3:6:1^[1-2]。丁醇发酵(ABE 发酵)中, 主产物丁醇对丁醇生产菌(丙酮丁醇梭菌等)具有强烈的产物抑制, 丁醇浓度一般只能达到约 12 g/L^[3], 产量低, 产品精制费用高, 以传统淀粉类物质进行工业发酵利润低, 至今无法实用化。因此, 从以下 3 个角度提出解决问题的办法: (1) 利用原位分离技术选择性地丁醇从发酵液相移除。常见的原位分离技术有液-液萃取发酵、气提发酵等^[3-5], 但是原位分离技术存在操作成本高、操作复杂等诸多问题, 现在还难以在工业生产中得到应用。(2) 使用廉价的废弃生物质, 如秸秆、工业生产废弃物等降低原料成本。(3) 传统 ABE 发酵产品是丁醇、丙酮和乙醇的混合物, 产品分离精制能耗很大。要在保证丁醇浓度不变或略有提高的前提下, 尽可能地提高丁醇/丙酮的比率(B/A 比, 简称 B/A)或丁醇/ABE 的比率(B/ABE)。提高 B/A 的方法主要有:

添加少量电子载体, 如中性红、甲基紫等色素物质^[6]; 外添少量纯丁酸为发酵辅料(丁酸/葡萄糖质量消耗比 4%–8%)^[7]; 通入 CO 气体使电子往复穿梭系统中的氢化酶失活、充分利用 H⁺于 NADH 合成途径^[8]等。但上述方法提高丁醇浓度或 B/A 的幅度并不大, 而且存在发酵液需要褪色处理、有安全隐患和辅料价格昂贵等问题。Luo 等^[9]利用丙酮丁醇梭菌/酿酒酵母混合培养同时添加少量合成丁酸的方法, 将传统 ABE 发酵中的丁醇浓度和 B/A 分别提高到了 15.7 g/L 和 2.83 的较高水平。要解决上述后 2 个问题, 还需要开辟新的途径从使用廉价原料、完全利用发酵原料、简化培养基配制、有效利用 NADH 等几方面着手, 提出一些新办法。

ABE 发酵有 2 个阶段: 产酸期和产溶剂期。产酸期产生的少量有机酸(丁酸、乙酸)在产溶剂期可以转化成丁醇和丙酮^[1]。由于丁酸→丁酰辅酶 A→丁醇处于 ABE 发酵代谢途径的最下游, 理论上丁酸可以 100%向丁醇转化。但是, 上述反应途径需要还原力 NADH, 而 NADH 只能从糖酵解途径和与之相耦联的电子往复穿梭系统中得到^[8]。以丁酸为 ABE 发酵的共同底物(丁酸/葡萄糖质量消耗比

≥30%)是提高 ABE 发酵 B/A 的一个有效途径^[10]。Tashiro 等^[10]使用两步式“生物催化”方法,以葡萄糖和合成丁酸为双底物,以休眠状态的 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC 13564 催化丁醇合成,丁醇浓度和 B/A 分别达到 7.0–7.5 g/L 和 4.67–4.69,丁酸/葡萄糖消耗比约为 72%。Ventura 等^[11]以 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC 27021 为发酵菌株,利用 TYA 为发酵培养基外添合成丁酸或丁酸发酵上清液(以酪丁酸梭菌 *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 为发酵菌株、CGM 培养基为氮源、Brown Alga 为碳源)合成丁醇,前者丁醇浓度和 B/A 均有显著提升(10.5 g/L→16.4 g/L, 2.1→4.1),丁酸/葡萄糖质量消耗比约为 18%;后者丁醇浓度和 B/A 也有一定提升(10.5 g/L→13.2 g/L, 2.1→3.3),丁酸/葡萄糖消耗比约为 13%。

丁酸也是一种重要的平台化合物,丁酸及其衍生物广泛应用于食品、化工、制药、农药、饲料等行业,丁酸与丁醇价格基本相同。从经济角度上讲,以消耗纯合成丁酸为代价,增产几乎等量的发酵丁醇和提高 B/A 有点得不偿失。目前,平台化合物和液态生物燃料的市场价格变化无常。如果丁醇价格远高于丁酸的价格,则使用丁酸为共同底物生产丁醇就有了重要的现实意义,可以按照市场需求生产多种不同的产品,实现发酵产品的多样化。本研究室前期的丁酸发酵研究中,利用 80 g/L 玉米粉并在发酵 20 h 左右添加 18–28 g-DCW/L 的废弃重组毕赤酵母(Recombinant *Pichia pastoris*)水解液作为共同底物,以 *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 为发酵菌株进行丁酸发酵,改善了发酵性能,最终的丁酸浓度、得率和丁酸占总酸的比率(B/TA)分别达到约 45 g/L、0.40 g/g 和 ≥90% 的较高水平^[12]。在特定市场需求的条件下(如丁醇价格远高于丁酸价格),将上述丁酸发酵上清液与葡萄糖进行直接复配,可以完全省去使用昂贵的复合氮源,以最为直接和简单的方式配制丁醇发酵培养基,以最为经济的方式生产丁醇:(1) 丁酸浓度和

B/TA 高,乙酸对提高 B/A 的影响小;(2) 丁酸发酵上清液中残存有较多的氨基酸,有利于丁醇合成^[13];(3) 丁酸发酵上清液还残存有较多的寡糖,而丙酮丁醇梭菌(丙丁梭菌)具有较强的寡糖利用能力,有利于实质性丁醇得率的提升^[14–15];(4) 丁酸发酵上清液中含有较高浓度的 SO_4^{2-} ,可以使更多的 H^+ 走向 NADH 合成途径,形成 NADH 相对丰富的环境,间接提升依赖于 NADH 再生的丁醇合成和 B/A^[16];(5) 丁酸/葡萄糖质量耗量比大幅提升,丁酸有望成为丁醇合成的主要物质之一,丁酸发酵上清液中的有价值物质可被充分利用,实现发酵原料完全利用的原则。

本论文通过充分利用丁酸发酵上清液中的各类有用物质、提高发酵丁酸/葡萄糖质量消耗比、节省发酵原料、简化培养基的配制等措施,以期利用丁酸发酵上清液、高效生产具有高 B/A 比特征的生物丁醇提供有用的信息储备和参考。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824), 本研究室保藏。该菌株能够以玉米、木薯等淀粉类物质通过厌氧发酵生产丁醇、丙酮等,以孢子液形式保藏于 50 g/L 玉米醪液中(4 °C)。

酪丁酸梭菌 (*Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755), 可利用葡萄糖厌氧发酵生产丁酸。购自广东省微生物菌种保藏中心,菌株保藏于甘油管中(-20 °C)。

毕赤酵母,一种为产猪 α 干扰素的重组毕赤酵母,另一种为产溶菌酶的重组毕赤酵母,本实验室保藏。本研究室利用上述重组毕赤酵母发酵得到相应的遗传产物后,在 8 000 r/min 离心 20 min 得到废弃毕赤酵母,然后将其置于冰箱保藏(4 °C)。

1.2 培养基

复合培养基的配制参照文献[12],用于酪丁酸梭菌活化及发酵。

丙丁梭菌活化培养基见参考文献[17]。

丁醇发酵培养基: (1) 80 g/L 和 150 g/L 玉米粉(购自本地农贸市场)培养基(对照), 配制方法参见文献[17]。(2) 直接使用浓度适当的葡萄糖溶液和丁酸发酵上清液, 以 4:1 的比例配制, 使得初始葡萄糖和丁酸浓度达到设定要求。葡萄糖溶液在 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。丁酸发酵上清液置烘箱 95 °C 处理 2 h, 冷却后与灭菌后的葡萄糖溶液直接混合。

流加培养基: 500 g/L 葡萄糖溶液, 丁酸发酵上清原液(30–33 g/L 丁酸原液 I, 38–45 g/L 丁酸原液 II)。

1.3 主要试剂和仪器

正丁醇、丙酮、乙醇、正丁酸、乙酸、葡萄糖, 国药集团化学试剂有限公司。7 L 厌氧发酵罐, 上海保兴生物设备工程公司; 生物传感器分析仪, 山东科学院生物研究所; 气相色谱仪, 上海精密科学仪器公司; 高效液相色谱仪 1, Waters 公司; 高效液相色谱仪 2, Agilent Technologies 公司; 紫外分光光度仪, 尤尼柯(上海)仪器公司。

1.4 培养/发酵方法

1.4.1 菌种活化方法

酪丁酸梭菌和丙丁梭菌活化方法同文献[17]报道^[17]。

1.4.2 丁酸上清液制备

在 7 L 厌氧发酵罐中进行丁酸发酵, 控制温度和 pH 在 37 °C 和 5.5–6.5 的水平。发酵约 20 h, 按 1:4 的比例加入经过碱法处理的废弃毕赤酵母悬浊液(88–140 g-DCW/L 规格, 中和后 SO_4^{2-} 浓度约 12 g/L)或无糖发酵用复合培养基(含 5 g/L 酵母膏、胰蛋白胨, 3.6 g/L SO_4^{2-} 盐、 NH_4^+ / Mg^{2+} / Fe^{2+} 等), 葡萄糖耗尽后连续添加浓缩葡萄糖溶液, 产气明显下降后终止发酵^[12]。发酵结束后, 8 000 r/min 离心 20 min 得到丁酸发酵上清液(原液, BFS)。原液中的丁酸浓度范围: 使用废弃酵母悬浊液时 38–45 g/L, 使用无糖复合培养基时 30–33 g/L。

1.4.3 ABE 发酵

ABE 发酵也在 7 L 厌氧发酵罐中进行, 初始装液量 1.5 L, 接种量 10%。接种前向培养基中通入

氮气约 15–25 min, 接种后继续通氮气约 10 min, 在 0.035 MPa 下保压。自产气开始压力上升后, 调节通气阀开度将罐压稳定在 0.035–0.040 MPa。按照不同的发酵策略流加葡萄糖溶液与丁酸发酵上清液。

1.5 分析方法

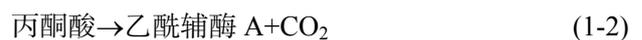
溶剂和有机酸的测定: 使用气相色谱仪测定^[17]。葡萄糖测定: 用生物传感器分析仪测定。寡糖测定: 使用高效液相色谱仪^[17]测定。氨基酸测定: 使用高效液相色谱仪^[18]测定。细胞浓度测定: 使用紫外分光光度仪, 以对应初始培养基为参比, 测定 OD_{600} 值。发酵自产气测定参考文献[17]。 SO_4^{2-} 盐浓度的测定采用铬酸钡光度法^[19]。以上测定均测量 3 次, 取平均值。

1.6 NADH 合成/消耗速度和 NADH 胞内浓度变化的计算方法

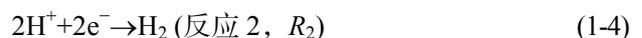
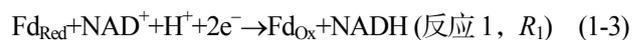
1.6.1 NADH 合成速度计算

还原力 NADH 的有效利用是影响 ABE 发酵丁醇浓度和 B/A 的重要因素之一。在丙丁梭菌代谢葡萄糖/丁酸等底物的过程中, NADH 合成仅在糖酵解途径(EMP 途径)和电子往复穿梭系统中形成。

糖酵解途径:



电子往复穿梭系统:



总化学计量公式:



其中, Fd_{Red} 和 Fd_{Ox} 分别代表还原型铁氧化蛋白和氧化型铁氧化蛋白。电子往复穿梭系统中, NADH 和氢气合成对质子 H^+ 形成竞争关系, α 是 H^+ 用于 NADH 的合成比率。与此同时, 根据式(1-5)–(1-9), NADH 生成速率 $R_{\text{NADH}}^{\text{F}}$ 和 α 与葡萄糖消耗速率 R_{GLC} 及 CO_2 生成速度 R_{CO_2} 和 H_2 生成速度 $R_{\text{H}_2}(R_2)$ 之间存在以下关系^[20], α 和 NADH 合成速率(摩尔基准)可由式(1-8)和(1-9)计算:

$$R_{\text{CO}_2}(t) = R_1(t) + R_2(t)R_{\text{GAS}}(t) = R_{\text{CO}_2}(t) + R_{\text{H}_2}(t) \quad (1-6)$$

$$R_2(t) = R_{\text{H}_2} = R_{\text{GAS}}(t) - R_{\text{CO}_2} \quad (1-7)$$

$$\alpha = \frac{R_1(t)}{R_1(t) + R_2(t)} = \frac{R_{\text{CO}_2}(t) - R_2(t)}{R_{\text{CO}_2}(t)} = \frac{2R_{\text{GLC}}(t) - R_2(t)}{2R_{\text{GLC}}(t)} \quad 0 \leq \alpha(t) \leq 1 \quad (1-8)$$

$$R_{\text{NADH}}^{\text{F}}(t) = 2(1 + \alpha(t))R_{\text{GLC}}(t) = 2 \left(1 + \frac{2R_{\text{GLC}}(t) - R_2(t)}{2R_{\text{GLC}}(t)} \right) \times R_{\text{GLC}}(t) \quad (1-9)$$

其中, $R_{\text{GAS}}(t)$ 代表 t 时刻的产气量(L/L),按照一定比例将产气量拆分为 H_2 和 CO_2 ,比例拆分的原则是:高 SO_4^{2-} 环境下, $\text{H}_2/(\text{H}_2+\text{CO}_2)$ 气量比为 0.3;低或无 SO_4^{2-} 存在环境下, $\text{H}_2/(\text{H}_2+\text{CO}_2)$ 为 0.4^[16]。然后,利用理想气体状态方程得到不同发酵时刻下的各气体生成量,再以时间为独立变量,对气体生成量进行多项式拟合。最后,将各多项式对时间求导(气体量 mol/L 对时间 h),计算出 R_{CO_2} 和 $R_{\text{H}_2}(R_2)$ 的释放速度[mol/(L·h)]。

1.6.2 NADH 消耗速度计算

理论上,1 mol 葡萄糖生成 1 mol 丁醇消耗 4 mol NADH,1 mol 丁酸生成 1 mol 丁醇则要消耗 2 mol NADH。以发酵时间为独立变量,分别对丁醇生成量与葡萄糖消耗量[用于计算式(1-10)中的丁醇得率 $Y_{\text{P/G}}$]、丁酸消耗速度(R_{BA})、葡萄糖消耗速度(R_{GLC})进行回归计算。在葡萄糖/丁酸共存的条件下,丁醇对葡萄糖的得率 $Y_{\text{P/G}}$ 无法反映葡萄糖用于丁醇合成的真实消耗速度。从葡萄糖到丁醇的发酵代谢

途径中分别有丙酮、乙醇和 CO_2 的生成,计量/扣除它们的作用/影响,测量误差大,无法准确计算。丁酸只可能利用 2 mol NADH 合成丁醇,而葡萄糖则利用乙酰辅酶 A 节点以下的碳流,通过消耗 4 mol NADH 合成丁醇。在此定义一个新的参数 γ ,并可以通过式(1-10)推算 NADH 的消耗速度 $R_{\text{NADH}}^{\text{C}}(t)$:

$$R_{\text{NADH}}^{\text{C}}(t) = 2 \times R_{\text{BA}}(t) + 4 \times Y_{\text{P/G}}(t) \times (1 - \gamma(t)) \times R_{\text{GLC}}(t) \quad \gamma(t) = \frac{R_{\text{BA}}(t)}{R_{\text{GLC}}(t) + R_{\text{BA}}(t)} \quad (1-10)$$

1.6.3 胞内 NADH 积累浓度的推算

用式(1-11)计算并推定胞内 NADH 浓度积累 C_{NADH} ,积分间隔 ΔT 为 1 h。

$$C_{\text{NADH}}(t) = C_{\text{NADH}}(t=0) + \sum_{t=0}^t (R_{\text{NADH}}^{\text{F}}(t) - R_{\text{NADH}}^{\text{C}}(t)) \times \Delta T \quad C_{\text{NADH}}(t=0) = 0 \quad (1-11)$$

2 结果与分析

2.1 100 mL 厌氧瓶 ABE 发酵策略探讨

以 ABE 发酵中的丁醇浓度和丁醇/丙酮比(B/A)这两个指标来评判 ABE 发酵性能优劣。如表 1 所示,与合成培养基(CGM)相比,相同的葡萄糖浓度下(25 g/L),使用葡萄糖与丁酸发酵上清液直接复配培养基(批次#d 和#e),发酵性能有一定改善。其中,批次#d 中的丁醇浓度和 B/A 分别为 5.61 g/L 和 3.60,批次#e 中的丁醇浓度和 B/A 分别为 7.95 g/L 和 3.70,但是丁醇浓度远未达到使用 150 g/L 玉米淀粉时(批次#a)的水平。

表 1 不同操作条件下 ABE 发酵性能比较(100 mL 厌氧瓶)

Table 1 Comparison of ABE fermentation performance under different operating conditions

Batch	Butanol (g/L)	Acetone (g/L)	Ethanol (g/L)	ABE (g/L)	B/A (W/W)	Total sugar usage rate (%)	BA dosage (g/L)	Glucose dosage (g/L)	Corn (g/L)
Corn, #a	11.48	4.93	2.27	18.68	2.33	44.3	0	0	150
Corn, #b	5.51	2.33	0.71	8.55	2.36	38.2	0	0	80
CGM, #c	4.59	1.69	0.31	6.59	2.71	98.8	0	25	0
Glucose+BFS, #d	5.61	1.56	0.30	7.47	3.60	74.4	14	25	0
Glucose+BFS, #e	7.95	2.15	0.43	10.53	3.70	84.0	7	25	0

注: Corn: 玉米粉培养基; CGM: CGM 培养基^[17]; BFS: 丁酸发酵上清液(37.4 g/L 规格); B/A: 丁醇/丙酮比; BA: 丁酸
Note: Corn: Corn medium; CGM: CGM medium^[17]; BFS: Butyric acid fermentation supernatant (37.4 g/L specification); B/A: Butanol/Acetone ratio; BA: Butyric acid

2.2 7 L 厌氧发酵罐下的丁醇发酵

Ding 等的研究结果显示, 以 *Clostridium acetobutylicum* 为发酵菌株, 以 80 g/L (批次#a)或 150 g/L 的玉米淀粉培养基为发酵原料(批次#b)进行分批发酵时, 最终丁醇浓度分别达到 4.75 g/L 和 11.1 g/L 的水平(B/A 约 2.0)^[15]。

2.2.1 以复合培养基生产的丁酸上清液复配葡萄糖溶液的 ABE 分批补料发酵

Luo 等在丙丁梭菌/酿酒酵母混合培养(玉米粉用量 150 g/L)时添加少量合成丁酸提高 ABE 发酵丁醇浓度和 B/A 方法的基础上, 为降低使用纯丁酸的原料成本, 利用酪丁酸梭菌和复合培养基发酵生产丁酸, 并用旋转蒸发法浓缩丁酸发酵上清液(原液中丁酸浓度约 27 g/L)后, 在 ABE 发酵产溶剂期将浓缩丁酸发酵上清液分批添入到上述 ABE 发酵体系中, 结果显示, 丁醇浓度和 B/A 分别提高到 16.3 g/L 和 3.0, 丁酸/葡萄糖质量消耗比为 7.8%^[21]。参照上述方法, 本研究利用复合培养基生产得到的丁酸上清液与葡萄糖溶液直接复配(无旋转蒸发浓缩操作), 同时为防止“酸崩溃”的问题^[22], 将初始葡萄糖和丁酸浓度分别控制在约 25 g/L 和 10 g/L 的水平(批次#c)。发酵过程中流加丁酸发酵上清液, 将丁酸浓度维持在 8–10 g/L 的水平。ABE 发酵结束(40 h)时 B/A 提高到 4.28 的高水平, 丁酸/葡萄糖质量消耗比为 44%, 但丁醇浓度仅有 6.2 g/L, 葡萄糖没有消耗完全, 发酵性能远未达到令人满意的结果(图 1)。为了进一步提高丁醇浓度和 B/A, 批次#d 的发酵策略在批次#c 的基础上进行了改进, 将初始葡萄糖和丁酸浓度控制在约 10 g/L 和 5 g/L。发酵过程中, 当葡萄糖浓度低于 2 g/L 时立即向发酵液中流加浓缩葡萄糖溶液, 将葡萄糖浓度提升到 4–5 g/L; 与此同时, 通过丁酸补料, 将丁酸浓度控制在 5–7 g/L。采取该策略的目的是尽量降低葡萄糖浓度, 间接减小 NADH 合成速度, 提高 NADH 的利用效率, 使 ABE 发酵尽可能多地使用丁酸。但是, 用此方法进行 ABE 发酵, 发酵 78 h 丁醇浓度也仅有 8.66 g/L,

B/A 为 4.0, 丁酸/葡萄糖质量消耗比为 50%, 发酵性能也没有大的改善。

2.2.2 以玉米粉/废弃酵母水解液为混合原料生产的丁酸上清液复配葡萄糖溶液的 ABE 分批补料发酵

相比于复合培养基生产得到的丁酸上清液, 以玉米粉/废弃酵母水解液为混合原料得到的丁酸上清液中含有的丁酸/营养物质/寡糖含量更高。发酵批次#e (使用产猪 α 干扰素的废弃毕赤酵母得到丁酸上清液)中, 将初始葡萄糖和丁酸浓度控制在约 25 g/L 和 7 g/L 的水平。当葡萄糖浓度低于 3 g/L 时, 向发酵液流加浓缩葡萄糖溶液将葡萄糖浓度提升到 5–7 g/L 的水平。丁酸补料 2 次, 每次添加 4 g/L, 最大丁酸浓度达到约 14 g/L, 补料后丁酸可以得到快速消耗。58 h 发酵结束时, 丁醇浓度约为 12.8 g/L, B/A 达到 5.04 的高水平, 丁酸/葡萄糖消耗比为 37%, ABE 发酵性能大幅提高。为了验证上述实验策略的有效性和重复性, 发酵批次#f (使用产溶菌酶的废弃毕赤酵母得到丁酸上清液)将初始葡萄糖和丁酸浓度控制在约 10 g/L 和 5 g/L 的水平, 并采用了与 2.2.1 中批次#d 相同的葡萄糖流加策略, 将葡萄糖浓度控制在 1–3 g/L 的极低水平。丁酸补料 3 次, 每次添加 4 g/L, 丁酸浓度控制在 5–10 g/L 的水平。58 h 发酵结束时, 丁醇浓度约为 12.7 g/L, 丁酸/葡萄糖消耗比为 53%。但由于本批次丁酸发酵上清液中的乙酸浓度较高(10.4 g/L), 而乙酸是可以转化成丙酮的, 最终导致 B/A 略有下降, 但也达到了 4.39 的较高水平。所有发酵批次的结果总结归纳于表 2 和图 1 中。

2.3 废弃毕赤酵母为混合原料所得丁酸上清液复配葡萄糖提高 ABE 发酵性能理论分析

2.3.1 ABE 发酵培养基及丁酸上清原液中的主要成分构成

表 3 总结了传统 ABE 发酵培养基(批次#a、#b)及丁酸上清原液中(批次#c、#f)的主要成分构成(葡萄糖除外)。表 3 的结果表明: (1) 玉米粉含量不同, 液化/糖化处理后的玉米粉培养基中的寡糖浓度

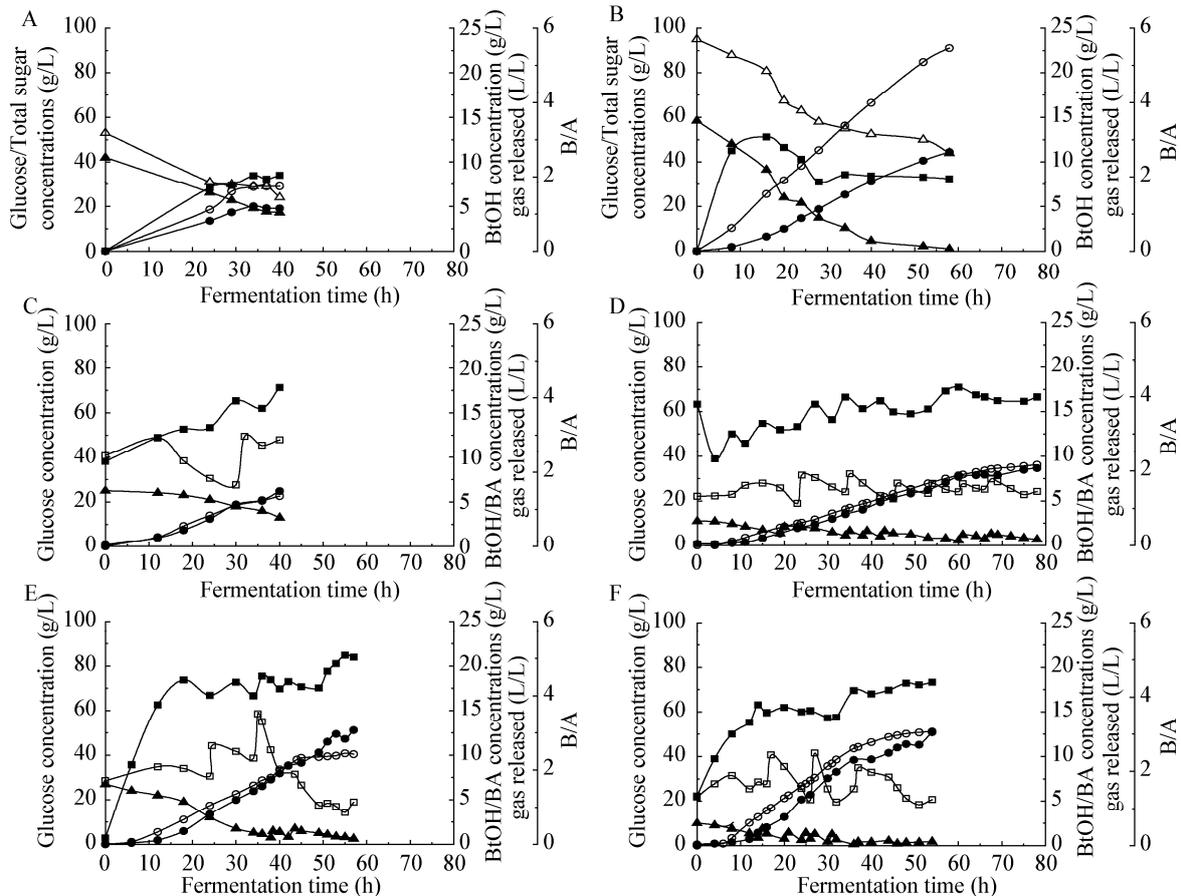


图1 不同操作条件下的发酵性能比较

Figure 1 ABE fermentation performance comparison under different operating conditions

注: A: 对照 I, 80 g/L 玉米粉培养基, 批次#a; B: 对照 II, 150 g/L 玉米粉培养基, 批次#b; C: 批次#c; D: 批次#d; E: 批次#e; F: 批次#f. ▲-▲: 葡萄糖; △-△: 总糖; ●-●: 丁醇(BtOH); ○-○: 气体释放量; ■-■: B/A 比; □-□: 丁酸(BA); 批次#c、#d: 丁酸上清液由来自于基于复合培养基的发酵液; 批次#e、#f: 丁酸上清液由来自于基于废弃酵母悬浊液的发酵液

Note: A: Control I, 80 g/L corn medium, run #a; B: Control II, 150 g/L corn medium, run #b; C: Run #c; D: Run #d; E: Run #e; F: Run #f. ▲-▲: Glucose; △-△: Total sugar; ●-●: Butanol (BtOH); ○-○: Gas released; ■-■: B/A ratio; □-□: Butyric acid (BA); Run #c, #d: Using complex medium based butyrate fermentation supernatants (BFS); Run #e, #f: Using waste *P. pastoris* based BFS

表2 不同操作条件下丁醇发酵性能综合比较(7 L 发酵罐)

Table 2 Butanol fermentation performance under different operating conditions in 7 L anaerobic fermentor

Fermentation strategies	Butanol (g/L)	Acetone (g/L)	Ethanol (g/L)	B/A (W/W)	B/ABE (W/W)	Gas released (L/L)	Initial BA (g/L)	Initial glucose (g/L)	BA dosage (g/L)	Glucose dosage (g/L)	BA usage (g/L)	Glucose usage (g/L)	Butanol yield (mol/mol)
80 g/L corn, run #a ^[15]	4.99	2.46	0.53	2.03	0.63	7.25	0.00	42.00	0.00	0.00	0.00	24.80	0.321
150 g/L corn, run #b ^[15]	11.11	5.72	1.23	1.94	0.62	22.76	0.00	58.50	0.00	0.00	0.00	57.90	0.340
25 g/L glucose+	6.20	1.45	0.20	4.28	0.79	5.64	10.00	25.00	5.00	0.00	5.69	13.00	0.419
10 g/L BFS*, run #c													
10 g/L glucose+	8.66	2.17	0.40	3.99	0.77	9.05	5.00	10.00	12.00	11.00	10.85	21.60	0.324
5 g/L BFS*, run #d													
25 g/L glucose+	12.80	2.54	0.80	5.04	0.79	9.93	7.00	25.00	8.00	10.00	12.37	33.50	0.405
7 g/L BFS**, run #e													
10 g/L glucose+	12.70	2.89	1.09	4.39	0.76	12.77	5.00	10.00	13.00	22.00	16.34	30.80	0.386
5 g/L BFS**, run #f													

注: BFS: 丁酸发酵上清液; BA: 丁酸; *: 使用 80 g/L 玉米粉外添复合培养基得到; **: 使用 80 g/L 玉米粉外添 28 g/L 废弃毕赤酵母(140 g-DCW/L 规格)得到

Note: BFS: Butyric acid fermentation supernatant; BA: Butyric acid; *: Butyrate supernatant obtained using 80 g/L corn flour and complex medium; **: Butyrate supernatant obtained using 80 g/L corn flour and 28 g/L waste *Pichia pastoris* (140 g-DCW/L specification)

表 3 ABE 发酵培养基及丁酸上清原液中的主要成分构成

Table 3 The major components in ABE fermentation media and butyric acid supernatants

Batch	Aromatic (g/L)	Pyruvate (g/L)	Aspartic (g/L)	Total amino acids (g/L)	2-sugar (g/L)	3-sugar (g/L)	4-sugar (g/L)	Total sugar (g/L)	SO ₄ ²⁻ (g/L)	BA (g/L)	AA (g/L)
Run #a	0.01	0.10	0.01	0.30	10.50	1.90	12.70	25.10	N/A	0.00	0.00
Run #b	0.05	0.24	0.03	0.68	5.37	12.52	0.88	18.77	N/A	0.00	0.00
Run #c	0.68	1.41	0.49	2.76	1.00	0.78	0.11	1.89	1.79	33.50	2.80
Run #d	1.29	1.52	0.53	3.48	1.18	1.21	0.67	3.06	2.50	33.50	2.80
Run #e	0.51	0.64	0.42	1.92	4.84	1.76	0.46	7.06	8.86	37.40	3.50
Run #f	0.57	1.14	0.16	2.99	5.55	2.19	0.65	8.39	10.34	41.60	10.40

注: N/A: 没有测量; Aromatic: 芳香族氨基酸; Pyruvate: 丙酮酸族氨基酸; Aspartic: 天冬氨酸族氨基酸; 2-sugar: 二糖; 3-sugar: 三糖; 4-sugar: 三糖以上寡糖; Total sugar: 总寡糖; BA: 丁酸; AA: 乙酸

Note: N/A: Not applicable; Aromatic: Aromatic amino acids family; Pyruvate: Pyruvate amino acids family; Aspartic: Aspartic amino acids family; 2-sugar: Disaccharide; 3-sugar: Trisaccharide; 4-sugar: The oligosaccharides over trisaccharide; Total sugar: Total oligosaccharides; BA: Butyric acid; AA: Acetic acid

高, 总氨基酸浓度很低(0.30–0.68 g/L); (2) 无论是利用复合培养基所得到的丁酸发酵上清液(丁酸原液 I), 还是利用玉米粉/废弃酵母水解液得到的上清液(丁酸原液 II), 其中的总氨基酸浓度均较高(1.9–3.5 g/L); (3) 丁酸原液 II 中的寡糖浓度(7.1–8.4 g/L)比丁酸原液 I 中的浓度(1.9–3.1 g/L)高出近一倍; (4) 丁酸原液 I 中的 SO₄²⁻ 浓度较低(1.8–2.5 g/L), 而丁酸原液 II 中的 SO₄²⁻ 浓度较高(8.9–10.3 g/L), 后者大约是前者的 4 倍; (5) 丁酸原液 II 中的乙酸浓度低, 但受丁酸发酵条件的影响, 某些发酵批次的乙酸浓度较高(批次#f, 乙酸浓度 10.4 g/L)。

2.3.2 细胞生长/丁醇合成与氮源(氨基酸)环境因子的关系

许多研究报道表明, 在利用丙丁梭菌发酵生产丁醇时, 许多氨基酸有益于丙丁梭菌生存和丁醇合成^[13,16,23]。对丁醇发酵有益的氨基酸包括芳香族(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸)、丙酮酸族(亮氨酸和缬氨酸)及天冬氨酸族氨基酸(甲硫氨酸和赖氨酸)^[13,16]。其中, 苯丙氨酸有利于细胞生长, 天冬氨酸族和丙酮酸族氨基酸则对丁醇合成具有正调节作用^[16]。

ABE 发酵属于典型的生长非耦联型发酵过程。产酸期丙丁梭菌细胞增殖生长, 而进入到产溶剂期后, 细胞停止生长, 溶剂物质(丁醇、丙酮等)开始

大量合成。在细胞生长期, 细胞增殖依赖氮源、SO₄²⁻ 等诸多环境因子的共同作用。玉米是粮食作物, 在玉米油等高价物质被提取后所得到的玉米粉中氨基酸极其匮乏(表 3), 但是其他微量氮源(如 NH₄⁺、NO₃⁻ 等)等应该依旧存在。发酵批次#a (玉米粉含量 80 g/L)中, 玉米粉培养基中的主要营养成分含量太低, 发酵无法正常进行。将玉米粉含量提升到 150 g/L 后(发酵批次#b), 培养基中的营养成分增加, ABE 发酵基本完全, 但总糖无法耗尽而大量残存。此时发酵产气量达到约 23 L/L 的水平, 约为发酵批次#c 和#f 的 2–4 倍(图 1, 表 2)。大量使用玉米淀粉是可以有效收获丙丁梭菌细胞的, 其主要缺点就是总糖无法耗尽、产气量巨大、原料大量浪费且 B/A 低。另外, 发酵批次#a 和#b 中, 培养基中的玉米粉颗粒与细胞混杂在一起, 无法计量细胞密度(OD₆₀₀)。用丁酸发酵原液与葡萄糖复配得到的 ABE 培养基是清液, 细胞密度可以测量。用丁酸原液 I 与葡萄糖复配得到的 ABE 发酵培养基(批次#c 和#d), 本质上属于半复合培养基, 构成组分相对单一, 虽然丁酸原液和培养基中的初始氨基酸浓度与丁酸原液 II 及相应培养基中的浓度基本持平(表 3, 表 4), 但 SO₄²⁻ 等营养元素相对匮乏, 细胞增殖速度慢, 细胞浓度远低于批次#e 和#f (使用丁酸原液 II 的复配培养基)的相应水平。使用丁酸原液 II 与葡萄糖复配得到的 ABE 发酵培养基(批次#e 和#f)则属于半天

表 4 ABE 发酵过程中各主要营养/有用物质变化情况

Table 4 Variations of the major nutrient/useful substances during ABE fermentations

Batch		Aromatic (g/L)	Pyruvate (g/L)	Aspartic (g/L)	Total amino acids (g/L)	2-sugar (g/L)	3-sugar (g/L)	4-sugar (g/L)	Total oligosaccharides (g/L)	SO ₄ ²⁻ (g/L)
Run #a	Initial instant	0.01	0.10	0.01	0.24	N/A	N/A	N/A	53.00*	0.00
	During fermentation	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00*	0.00
	End	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	25.00*	0.00
Run #b	Initial instant	0.05	0.24	0.03	0.54	N/A	N/A	N/A	95.00*	0.00
	During fermentation	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00*	0.00
	End	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	45.00*	0.00
Run #c	Initial instant	0.37	0.79	0.31	1.56	0.50	0.35	0.03	0.88	0.32
	During fermentation	0.05	0.12	0.04	0.23	0.08	0.06	0.01	0.16	0.15
	End	0.51	1.10	0.42	2.17	0.27	0.26	0.02	0.55	0.41
Run #d	Initial instant	0.18	0.44	0.35	0.82	0.32	0.33	0.16	0.81	0.47
	During fermentation	0.52	0.61	0.21	1.40	0.59	0.61	0.33	1.53	1.00
	End	0.43	0.93	0.35	1.85	0.27	0.22	0.04	0.52	1.29
Run #e	Initial instant	0.35	0.41	0.27	1.20	1.21	0.84	0.21	2.26	1.54
	During fermentation	0.10	0.12	0.08	0.37	0.95	0.34	0.09	1.38	1.68
	End	0.97	0.66	0.36	2.22	0.29	0.20	0.03	0.52	2.81
Run #f	Initial instant	0.30	0.51	0.16	1.41	1.49	1.07	0.37	2.94	2.18
	During fermentation	0.19	0.40	0.06	1.04	1.93	0.76	0.23	2.91	3.62
	End	0.43	0.74	0.28	1.63	0.55	0.54	0.08	1.17	3.25

注: N/A: 没有测量; Aromatic: 芳香族氨基酸; Pyruvate: 丙酮酸族氨基酸; Aspartic: 天冬氨酸族氨基酸; 2-sugar: 二糖; 3-sugar: 三糖; 4-sugar: 三糖以上寡糖; *: 总糖(总寡糖+葡萄糖)

Note: N/A: Not applicable; Aromatic: Aromatic amino acids family; Pyruvate: Pyruvate amino acids family; Aspartic: Aspartic amino acids family; 2-sugar: Disaccharides; 3-sugar: Trisaccharides; 4-sugar: The oligosaccharides over trisaccharides; *: Total sugar (total oligosaccharides+glucose)

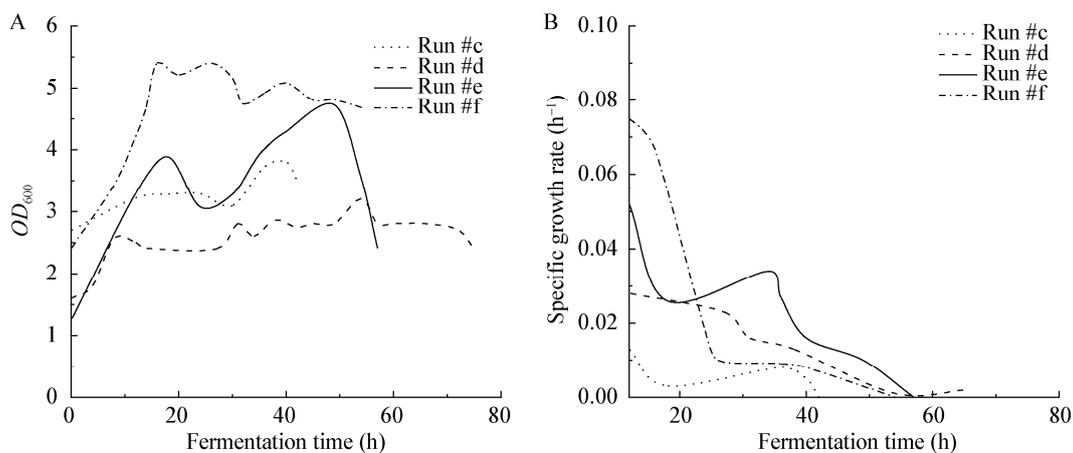


图 2 各发酵批次的细胞浓度(A)和比生长速度(B)

Figure 2 The cells concentrations (A) and specific growth rates (B) in different fermentation batches

然培养基。废弃酵母悬浊液中的各种自然组成成分在丁酸发酵结束时并没有得到完全利用。因此,使用该复配培养基时, SO_4^{2-} 浓度高, 细胞增殖速度较快, 浓度较高(图 2)。ABE 发酵中, 细胞浓度越大, 丁醇合成速度越高, 提高细胞浓度间接地为促进发酵后期的丁醇合成提供了有利条件。ABE 发酵进入到产溶剂期后, 梭菌细胞也会自产某些氨基酸以抵抗高浓度的丁醇环境胁迫; 同时, 通过连续添加丁酸发酵原液(含较高浓度的氨基酸), 还可以营造出有益于丁醇合成的高氨基酸浓度环境。但是, 如表 4 的结果所示, 发酵结束时, 总氨基酸和其他对丁醇合成有益的氨基酸并没有减少, 甚至有所升高。这个现象是与文献报道结果相符的, 即高氨基酸浓度只能营造出有利于细胞生存/丁醇合成的环境, 而氨基酸自身并没有得到实质性的利用^[15]。

2.3.3 高 SO_4^{2-} 浓度环境提高丁醇发酵 B/A 比
依照梅森定理(Mason Theory)^[24], 可以将丙丁

梭菌代谢网络图转换成有向线图形式, 据此计算各发酵原料(葡萄糖、丁酸等)走向终端产物(丁醇、丙酮等)的传递系数, 推算理想底物投料比下 B/A 的理论值。鉴于篇幅和理论背景, 在此对该理论不多介绍。计算结果表明, 以葡萄糖和丁酸为共同底物发酵丁醇时, 丁酸/葡萄糖的理想投料比应为 2.0 (摩尔基准), 折算成质量投料比为 0.98。另外, 提高电子往复穿梭系统中 H^+ 用于 NADH 合成的比率 α , 可以大幅提升 ABE 发酵的 B/A ($\alpha \approx 0.5$, B/A ≈ 4.3 ; $\alpha \approx 0.7$, B/A ≈ 8.1)。但是, 梅森定理仅仅依靠代谢网络中各步反应的化学计量系数进行计算, 并没有也无法整合各步酶促反应的非线性特征, 以及中间/最终代谢产物对整个发酵过程的抑制/调控生理机制, 因此, 其推算结果只能作为理论参考。图 3 是丙酮丁醇梭菌合成丁醇的代谢图。

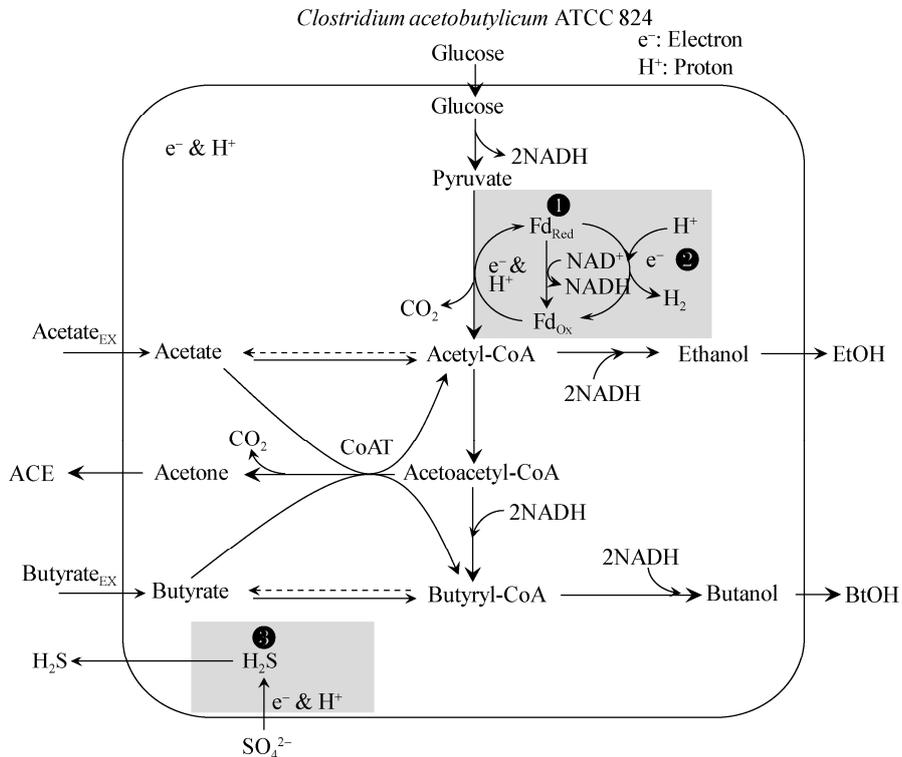
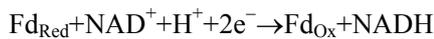


图 3 丙酮丁醇梭菌合成丁醇的代谢图
Figure 3 Metabolic map of butanol synthesis by *C. acetobutylicum*

注: BtOH: 丁醇; ACE: 丙酮; EtOH: 乙醇; 下标“EX”: 外部添加
Note: BtOH: Butanol; ACE: Acetone; EtOH: Ethanol; Subscript “EX”: External addition

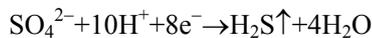
丙丁梭菌合成丁醇与酪丁酸梭菌合成丁酸的代谢途径都存在电子往复穿梭系统^[12,16]。ABE 发酵中, 丁醇合成依赖于 NADH, 而丙酮合成则不需要。因此, NADH 的有效生成和消耗有利于提高丁醇浓度和 B/A。有文献报道指出, 添加约 2.0 g/L 的电子受体 SO_4^{2-} 可以促进丁醇合成^[16]。使用玉米粉/废弃酵母水解液获得的丁酸上清液(丁酸原液 II) 复配葡萄糖得到的培养基中, 初始 SO_4^{2-} 浓度较高 (1.5–2.2 g/L, 表 4), 对提高丁醇浓度和 B/A 有利。丙丁梭菌合成丁醇的代谢途径中存在硫还原反应: $\text{SO}_4^{2-} + 10\text{H}^+ + 8\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{S}\uparrow + 4\text{H}_2\text{O}$ ^[16]。丙丁梭菌可将 SO_4^{2-} 还原成 H_2S , 同时消耗质子 H^+ 和电子 e^- , 其中 e^- 消耗更多, 使胞内电子往复穿梭系统中的 H^+ 流和 e^- 流产生迁移。有 3 个反应同时存在于电子往复穿梭系统中, 相互竞争利用 H^+ 和 e^- , 即:

反应 1, NADH 再生反应:



反应 2, 氢气合成反应: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

反应 3, H_2S 合成反应:



反应 3 的反应强度虽然微弱, 但其 e^- 和 H^+ 的化学消耗计量系数很大, 分别为 8 和 10, 而且 H^+ 消耗得更多(多 25%), 造成 e^- 相对过剩、 H^+ 相对匮乏。为了恢复 H^+/e^- 间的原有平衡、相对有限的 H^+

需要被优先利用在耗 e^- 多($\text{H}^+/2\text{e}^-=0.5$) 的 NADH 合成反应(反应 1)上。结果导致电子往复穿梭系统中的 e^- 将向消耗较少 H^+ 的 NADH 生成反应(反应 1)发生迁移, 形成高 NADH 的浓度环境, 碳流更多地走向依赖 NADH 的丁醇合成途径^[16]。使用玉米粉培养基生产丁醇时, 气体成分中的 H_2 约占总气 ($\text{CO}_2 + \text{H}_2$) 的 40%; 使用丁酸原液 II 复配葡萄糖得到的培养基时 SO_4^{2-} 浓度大幅提高^[12], H^+ 被 H_2S 合成反应过量消耗, H_2 合成途径受阻, H_2 生成量下降到总气的 30%^[16]。按照 1.6.1 中的公式(1-8) 的计算, 使用丁酸原液 II 复配葡萄糖得到的培养基时产溶剂期的 α 基本在 0.50–0.75 的高位水平上波动, 而使用玉米粉培养基时 α 在 0.50 或更低水平上变化(图 4A), 导致 B/A 比发生显著改变, 最终 B/A 使用玉米粉培养基时的 2.0 大幅提升到使用丁酸原液 II 复配葡萄糖培养基时 ≥ 4.4 的水平(图 4B)。

2.3.4 高丁酸/葡萄糖质量消耗比提高 ABE 发酵 B/A

丁酸是丁醇发酵的前体物质之一, 丁酸作为丁醇发酵的共同底物, 沿着丁酸 \rightarrow 丁酰辅酶 A \rightarrow 丁醇的途径合成丁醇。如图 3 所示, 丁酸处在丙丁梭菌代谢各种产物的最下游, 只能用于合成丁醇, 而不可能合成处在代谢上端的丙酮、乙醇、 CO_2

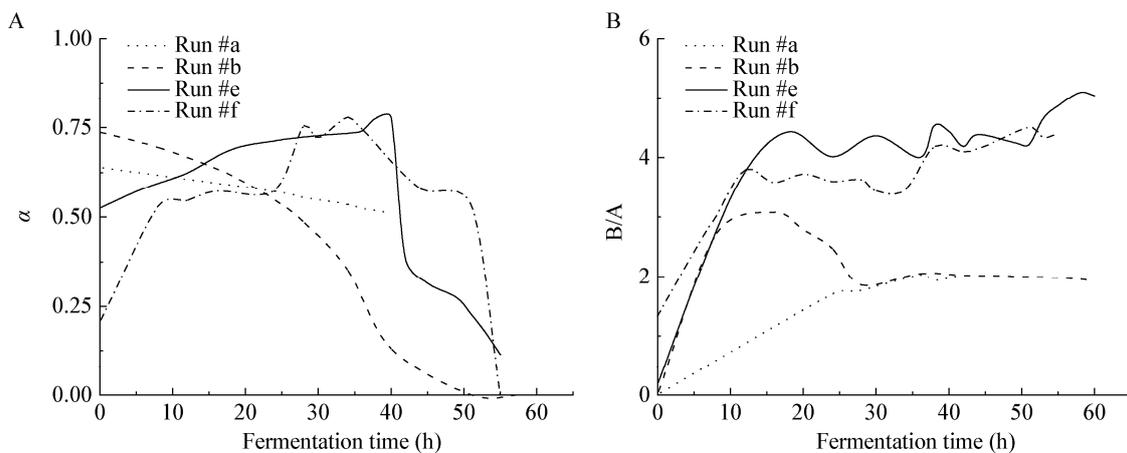


图 4 H^+ 用于 NADH 合成的比率 α (A) 及其与 B/A (B) 之间的关系

Figure 4 The ratio of H^+ directing to NADH synthesis pathway α (A) and the relevant B/A ratio (B)

等。理论上, ABE 发酵中的丁酸/葡萄糖质量消耗比越大, B/A 越高。依据 2.2.1-2.2.2 的结果, 使用丁酸发酵原液与葡萄糖复配得到的 ABE 发酵培养基, 丁酸/葡萄糖消耗比在 37%-53%之间, B/A 提高到 4.0-5.0 的高水平(表 2)。但是, 丁酸发酵原液 II 中的乙酸浓度过高会在一定程度降低 B/A, 因为乙酸是可以合成丙酮的。

2.3.5 寡糖充分利用提高丁醇得率/降低 ABE 发酵液中的寡糖含量

根据表 3 和表 4, 丁酸发酵原液 II (7.06-8.39 g/L) 和利用丁酸原液 II 复配葡萄糖得到的培养基均含有相当量的寡糖(2.26-2.94 g/L)。丙丁梭菌具有较强的分泌糖化酶和利用寡糖的能力。当 ABE 发酵中葡萄糖浓度降低到一定程度, 糖化酶分泌可以得到强化、诱发细胞利用寡糖(2 糖、3 糖和 3 糖以上寡糖)的能力^[25]。Tashiro 等提出了以葡萄糖/丁酸为双底物时丁醇对总碳源得率 Y 的计算方法^[10](摩尔基准):

$$Y = \frac{C_{\text{BiOH}} \times 4}{C_{\text{GLC}} \times 6 + C_{\text{BA}} \times 4} \quad (2-2)$$

式中, C_{BiOH} 、 C_{GLC} 和 C_{BA} 分别代表最终丁醇浓度、葡萄糖和丁酸消耗量(mol/L)。Tashiro 等^[10]将处于休眠状态的 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC 13564 细胞置于磷酸缓冲液中, 以葡萄糖与纯丁酸为双底物合成丁醇。与此同时、外添 1 mmol/L 电子载体(色素物质)甲基紫, 丁醇对总碳源的摩尔得率 Y 达到 0.67 mol/mol 的最高水平(丁醇浓度 7.57 g/L), B/A 达到 4.85。本研究中, 使用玉米粉培养基生产丁醇时, 按照 Tashiro 等的公式计算, 丁醇得率 Y 仅有 0.32-0.34; 利用玉米粉/废弃酵母水解液得到的丁酸原液 II 复配葡萄糖所形成的培养基并在途中添加丁酸原液 II, 丁醇得率 Y 提高到 0.39-0.41。批次#e 和#f 的寡糖利用效率 δ 和残留寡糖浓度(C_{OG}^{f})分别达到 80%-86%的高水平和 0.52-1.17 g/L 的低水平(表 4), 实现了完全利用残余寡糖、降低寡糖浓度的目标。这里, 寡糖利用效率 δ 由式(2-3)计算:

$$\delta = \frac{C_{\text{OG}}^0 + C_{\text{OG}}^{\text{A}} - C_{\text{OG}}^{\text{f}}}{C_{\text{OG}}^0 + C_{\text{OG}}^{\text{A}}} \quad (2-3)$$

其中, C_{OG}^0 、 C_{OG}^{A} 和 C_{OG}^{f} 分别代表初始培养基、发酵途中添加和发酵结束时的总寡糖浓度。

2.3.6 NADH 消耗模式和胞内积累对改善丁醇合成和 B/A 的影响

NADH 的有效消耗和胞内积累与提高丁醇浓度和 B/A 直接相关。利用式(1-10)和式(1-11), 推算出不同发酵批次下 NADH 的消耗模式以及 NADH 胞内浓度变化情况。NADH 是发酵中间产物, 按照代谢工程理论的中间代谢物质“拟稳态”假设, 胞内 NADH 浓度应该基本保持在某一恒定水平。但是, 上述假设似乎在本研究中并不完全成立。图 5 显示了不同 ABE 发酵批次中胞内 NADH 浓度的变化情况。使用玉米淀粉的发酵批次(批次#a 和#b, 对照)中的胞内 NADH 逐渐上升, 进入饱和状态直至发酵结束, NADH 没有得到有效利用。其中, 发酵批次#a、NADH 合成中止的原因是碳源以外的营养物质匮乏; 而发酵批次#b、NADH 合成中止则是因为丁醇浓度达到了产物抑制水平, 发酵体系已经无法正常运行。利用丁酸原液 I 与葡萄糖复配得到的 ABE 发酵培养基(批次

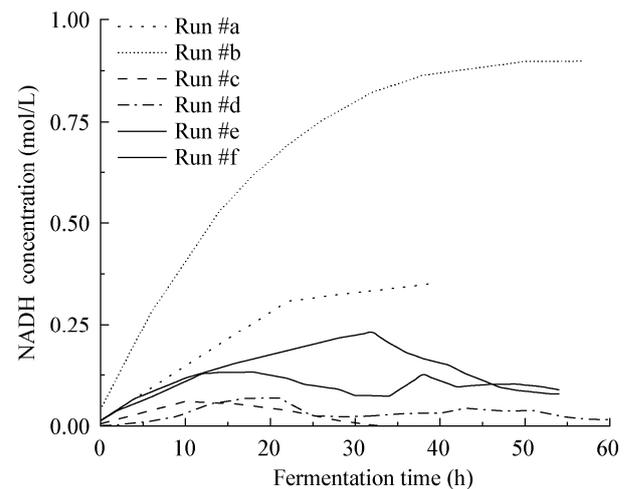


图 5 NADH 浓度积累和消耗模式对改善丁醇合成和 B/A 的影响

Figure 5 The effects of NADH accumulation and consumption on increasing butanol synthesis and B/A

#c 和#d)进行 ABE 发酵时胞内 NADH 得到了利用, 浓度基本维持在恒定水平。但是, 可能由于氨基酸以外的其他营养物质(如 SO_4^{2-} 等)不足的缘故, 胞内 NADH 浓度只能维持在极低水平, 虽然 B/A 也得到了提高, 但丁醇浓度停留在较低水平上(6.2–8.7 g/L)。特别是发酵批次#c, 发酵约 32 h 胞内 NADH 浓度降低到 0, 丁醇无法继续合成。然而利用丁酸原液 II 与葡萄糖复配得到的 ABE 发酵培养基(批次#e 和#f)时, 胞内 NADH 浓度稳定维持在较高的恒定水平上, 丁醇浓度和 B/A 均达到了较高水平(12.7–12.8 g/L, 4.4–5.0)。

3 讨论与结论

本研究根据完全利用廉价发酵原料、有效利用 NADH 和培养基中的营养物质、简化培养基配制工艺的原则, 在维持 ABE 发酵丁醇浓度不变的前提下, 大幅提高 B/A 比, 改善 ABE 发酵的产品质量。

以 *Clostridium acetobutylicum* 为发酵菌株, 以 80 g/L 的玉米淀粉为原料进行 ABE 分批发酵时(批次#a), 由于玉米粉培养基中的氮源(氨基酸)等营养成分不足, 还原糖(葡萄糖)尚未耗尽、丁醇浓度(约 4.75 g/L)远未达到其抑制浓度时, 发酵即告中止; 而以 150 g/L 的玉米淀粉为原料时(批次#b), 玉米粉培养基中的营养成分有所提高, 还原糖(葡萄糖)基本全部耗尽, 最终丁醇浓度接近其抑制浓度(约 11.1 g/L), 但总糖利用效率极低(约 50%), 发酵原料浪费很大; 同时, 二者的 B/A 均停留在约 2.0 的较低水平^[15]。

使用葡萄糖和丁酸为双底物提高 B/A 并非新理论或工艺。Tashiro 等以葡萄糖与丁酸为双底物, 用两步式“生物催化”法进行 ABE 发酵, 丁醇对总碳源的摩尔得率 Y 达到 0.67 mol/mol 的最高水平, 丁酸/葡萄糖质量消耗比约为 42%^[10]。但是, 休眠细胞的获取及其丁醇催化合成是建立在使用昂贵的 TYA 培养基和化学合成丁酸基础上的。Ventura 等^[11]和 Luo 等^[21]生产丁醇的方式与本研究

有类似之处, 就是向 ABE 发酵液中添加发酵丁酸上清液: 前者以 CGM 培养基、市售 Brown Alga 为碳源生产丁酸(丁酸浓度约 11 g/L), 以 TYA 培养基进行 ABE 发酵, 最终丁醇浓度和 B/A 分别达到 13.2 g/L 和 3.3 的水平; 后者以复合培养基、葡萄糖为碳源生产丁酸(丁酸浓度约 27 g/L), 用丙丁梭菌/酿酒酵母混合培养的方式并以 150 g/L 的玉米粉培养基进行 ABE 发酵, 最终丁醇浓度和 B/A 分别达到 16.3 g/L 和 3.0 的水平。但两者均要使用昂贵的 CGM/TYA 或复合培养基, 而且发酵丁酸浓度较低, 只能作为 ABE 发酵的辅料使用(丁酸/葡萄糖消耗比 7.8%–13.0%)^[11,21]。本研究中, 所使用的发酵原料仅有玉米淀粉(丁酸发酵)、葡萄糖(ABE 发酵、丁酸发酵)和废弃毕赤酵母(丁酸发酵, 负原料价值), 丁酸发酵原液 II 与葡萄糖直接复配, ABE 发酵中的丁醇浓度为 12.7–12.8 g/L, 特别是 B/A 达到了 4.4–5.0 的高水平。同时, 完全省去了昂贵复合氮源的使用和上述研究报道中所需要的离心、研磨、过滤、蒸发浓缩、褪色等一系列操作过程^[10-11,21], 原料/操作成本大大降低。

甲醇营养型毕赤酵母(*Methylotrophic Pichia pastoris*)是高效外源蛋白表达宿主, 表达生产的产品广泛应用于饲料、酶制剂、医药和纺织等诸多行业。重组毕赤酵母生产外源蛋白过程中, 外源蛋白主要分泌于发酵上清液中, 上清液是主产品。然而废弃毕赤酵母是一种特殊的、具有高能量和高密度化特征的废弃生物质, 而且不能作为饲料蛋白使用。离心分离得到的毕赤酵母细胞干重约为 140 g-DCW/L, 含有 46%的蛋白质(氮源)和 36%的多糖(碳源)^[26]。废弃毕赤酵母产生量很大, 如果废弃酵母越聚越多又得不到有效处理, 必将对环境产生恶劣影响。传统的焚烧、填埋、堆肥化或者仓储处理方式不能解决废弃毕赤酵母减量化和资源化的问题。其实废弃毕赤酵母也可以直接用于 ABE 发酵中。Ding 等通过碱水解法处理废弃毕赤酵母后, 以 *Clostridium acetobutylicum* 为发酵菌株,

并以 80 g/L 玉米淀粉和 28 g-DCW/L 废弃酵母水解液为混合原料进行 ABE 发酵, 发酵性能较佳, 总糖利用效率从 $\leq 50\%$ 提高到 $\geq 90\%$, 节省玉米粉用量 57%以上, 丁醇浓度稳定在 10 g/L 左右, 但 B/A 较低(约 2.0)^[15]。以玉米粉和废弃酵母水解液为混合原料的 ABE 发酵还有以下特点: (1) 可溶性寡糖利用率较高, 但氨基酸利用率较低; (2) 发酵产气特别旺盛, 产气量比使用 150 g/L 玉米淀粉时高 30% 左右, 废弃酵母得到减量化^[15]。陈程等^[12]同样利用玉米粉/废弃酵母水解液为混合原料, 辅以葡萄糖连续流加进行丁酸发酵, 也改善了发酵性能。但是, 与 ABE 发酵正相反, 丁酸发酵中, 氨基酸利用率较高而寡糖利用率较低。丁酸发酵上清液(发酵原液 II)含有较多的寡糖、 SO_4^{2-} 等物质和适量的氨基酸, 丁酸发酵原液与葡萄糖直接复配后进行 ABE 发酵, 发酵途中还需要添加丁酸发酵原液, 发酵结束时发酵液中氨基酸和 SO_4^{2-} 等物质的浓度基本不变甚至略有升高。但是, 寡糖浓度的降低幅度非常明显, 特别是批次#e 和#f 的最终寡糖浓

度从丁酸原液 II 中的 7.06–8.39 g/L 降低到 0.52–1.17 g/L 的低水平(表 3 和表 4)。图 6 总结概括了使用丁酸发酵原液 II 生产丁醇的特征和优越性。

本研究以玉米淀粉与废弃酵母水解液为原料得到的丁酸发酵上清液, 与葡萄糖直接复配作为 ABE 发酵培养基, 并按需要在发酵途中添加丁酸发酵原液和葡萄糖浓缩液。与使用 150 g/L 玉米淀粉的传统发酵相比, 丁醇浓度保持在 12.7–12.8 g/L 的较高水平; B/A 从 2.0 大幅提高到 4.4–5.0 的高水平; 丁醇对总碳源的摩尔得率从 0.32–0.34 提升至 0.39–0.41。该发酵策略节省了 ABE 发酵的原料和操作成本, 具有良好的经济意义; 大幅降低了丁酸发酵液中的寡糖含量, 减轻了使用现有的废水处理系统处理发酵废水的工作压力/负担, 环保效果显著。丁酸发酵上清液既可以用来精制生产丁酸, 也可作为 ABE 发酵的原料生产高品质(高 B/A)的丁醇。整个发酵体系能够应对市场供需情况, 灵活控制生产操作, 实现发酵产品的多样化。

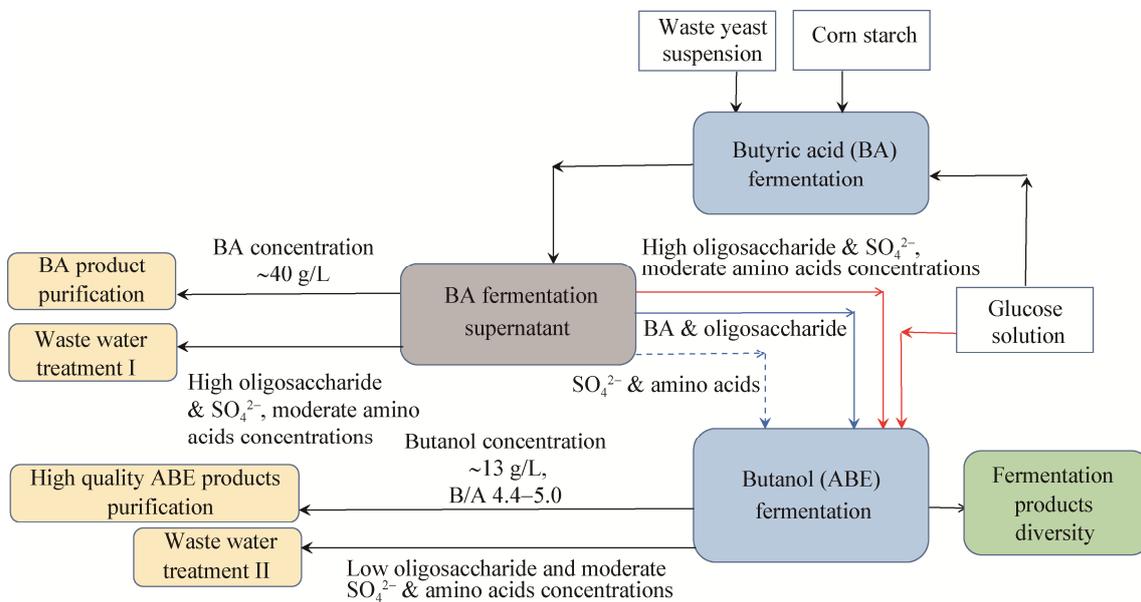


图 6 研究内容和结论总结

Figure 6 The summary of the research contents and conclusions

注: 红线: ABE 发酵配料; 蓝线: 丁酸发酵上清液中有用/营养物质对 ABE 发酵贡献; —: 直接; ---: 间接

Note: Red line: ABE fermentation medium; Blue line: The contributions of useful/nutrient substances on ABE fermentation; —: Direct; ---: Indirect

REFERENCES

- [1] Lee SY, Park JH, Jang SH, Nielsen LK, Kim J, Jung KS. Fermentative butanol production by *Clostridia*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2008, 101(2): 209-228
- [2] Dürre P. Biobutanol: an attractive biofuel[J]. Biotechnology Journal, 2007, 2(12): 1525-1534
- [3] Bankar SB, Survase SA, Singhal RS, Granström T. Continuous two stage acetone-butanol-ethanol fermentation with integrated solvent removal using *Clostridium acetobutylicum* B 5313[J]. Bioresource Technology, 2012, 106: 110-116
- [4] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and *in situ* recovery by gas stripping[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(6): 595-603
- [5] Yen HW, Lin SF, Yang IK. Use of poly (ether-block-amide) in pervaporation coupling with a fermentor to enhance butanol production in the cultivation of *Clostridium acetobutylicum*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2012, 113(3): 372-377
- [6] Girbal L, Vasconcelos I, Saint-Amans S, Soucaille P. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1995, 16(2/3): 151-162
- [7] Li X, Shi ZP, Li ZG. Increasing butanol/acetone ratio and solvent productivity in ABE fermentation by consecutively feeding butyrate to weaken metabolic strength of butyrate loop[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2014, 37(8): 1609-1616
- [8] Kim BH, Bellows P, Datta R, Zeikus JG. Control of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* fermentations: utilization of carbon monoxide to inhibit hydrogen production and to enhance butanol yields[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(4): 764-770
- [9] Luo HZ, Ge LB, Zhang JS, Zhao YL, Ding J, Li ZG, He ZN, Chen R, Shi ZP. Enhancing butanol production under the stress environments of co-culturing *Clostridium acetobutylicum*/*Saccharomyces cerevisiae* integrated with exogenous butyrate addition[J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0141160
- [10] Tashiro Y, Shinto H, Hayashi M, Baba SI, Kobayashi G, Sonomoto K. Novel high-efficient butanol production from butyrate by non-growing *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564) with methyl viologen[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2007, 104(3): 238-240
- [11] Ventura JRS, Jahng D. Improvement of butanol fermentation by supplementation of butyric acid produced from a brown alga[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(6): 1142-1150
- [12] Chen C, Cheng WJ, Gong LP, Ding J, Shi ZP. Enhanced butyrate production using waste *Pichia pastoris* as the efficient nitrogen source[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(3): 22-29 (in Chinese)
- 陈程, 程文君, 宫立鹏, 丁健, 史仲平. 以废弃毕赤酵母为高效氮源强化丁酸发酵生产[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(3): 22-29
- [13] Masion E, Amine J, Marczak R. Influence of amino acid supplements on the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1987, 43(3): 269-274
- [14] Ezeji T, Milne C, Price ND, Blaschek HP. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(6): 1697-1712
- [15] Ding J, Xu M, Xie F, Chen C, Shi ZP. Efficient butanol production using corn-starch and waste *Pichia pastoris* semi-solid mixture as the substrate[J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 143: 41-47
- [16] Ding J, Luo HZ, Xie F, Wang H, Xu M, Shi ZP. Electron receptor addition enhances butanol synthesis in ABE fermentation by *Clostridium acetobutylicum*[J]. Bioresource Technology, 2018, 247: 1201-1205
- [17] Luo HZ. The key technologies of synthesizing typical fermentation products under different substrates feedings/oxygen supply and reductive power regulation strategies[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2016 (in Chinese)
- 罗洪镇. 不同底物流加/供氧和发酵还原力调控模式下典型发酵产物合成的关键技术[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2016
- [18] Li X, Li ZG, Zheng JP, Shi ZP, Li L. Yeast extract promotes phase shift of bio-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 using cassava as substrate[J]. Bioresource Technology, 2012, 125: 43-51
- [19] Chen LY, Liang L. Improvement of barium chromate spectrophotometric determination of sulfate in water environment[J]. Environmental Protection and Technology, 2001, 7(4): 34-35,37 (in Chinese)
- 陈丽娅, 梁莉. 铬酸钡光度法测定水环境中硫酸盐的改进[J]. 贵州环保科技, 2001, 7(4): 34-35,37
- [20] Li ZG, Shi ZP, Li X, Li L, Zheng JP, Wang ZG. Evaluation of high butanol/acetone ratios in ABE fermentations with cassava by graph theory and NADH regeneration analysis[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2013, 18(4): 759-769
- [21] Luo HZ, Zeng QW, Han S, Wang ZY, Dong Q, Bi YH, Zhao YP. High-efficient *n*-butanol production by co-culturing *Clostridium acetobutylicum* and *Saccharomyces cerevisiae* integrated with butyrate fermentative supernatant addition[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 33(4): 76
- [22] Maddox IS, Steiner E, Hirsch S, Wessner S, Gutierrez NA,

- Gapes JR, Schuster KC. 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
- [23] Heluane H, Evans MR, Dagher SF, Bruno-Bárcena JM. Meta-analysis and functional validation of nutritional requirements of solventogenic *Clostridia* growing under butanol stress conditions and cointilization of D-glucose and D-xylose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(13): 4473-4485
- [24] Shimizu K, Matsuoka Y. Fundamentals of Systems Analysis and Modeling of Biosystems and Metabolism[M]. Sharjah, U.A.E.: Bentham Science Publishers Ltd., 2015: 41-47
- [25] Luo HZ, Zhang JS, Wang H, Chen R, Shi ZP, Li X, Ding J. Effectively enhancing acetone concentration and acetone/butanol ratio in ABE fermentation by a glucose/acetate co-substrate system incorporating with glucose limitation and *C. acetobutylicum/S. cerevisiae* co-culturing[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, 118: 132-142
- [26] Chen CN. Isolation, purification and bioactivities of polysaccharide from *Pichia pastoris*[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2011 (in Chinese)
陈超男. 巴斯德毕赤酵母多糖的分离纯化及生物活性研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2011