

doi: 10.3969/j.issn.1671-7627.2013.01.016

基于 pH 调控的渗透汽化 原位分离耦合丁醇发酵的研究

陈啸鹏¹ 吴昊¹ 刘公平¹ 孙柏军¹ 郭亭^{1,2} 姜岷¹ 韦萍¹

(1. 南京工业大学 生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009;
2. 广州甘蔗糖业研究所, 广东 广州 510316)

摘要: 对 *Clostridium acetobutylicum* XY16 开展了渗透汽化原位分离耦合发酵研究, 考察了 pH 调控及分离膜面积对耦合发酵性能的影响。结果表明: 与分批发酵相比, 渗透汽化原位分离耦合发酵得到的渗透液中丙酮、丁醇、乙醇 (ABE) 总浓度达到了 103 g/L, 提高了 472%, 但 ABE 生产速率为 0.29 g/(L·h), 仅提高了 16%。通过 pH 调控, 可使 ABE 生产速率提高至 0.34 g/(L·h)。通过增大渗透汽化膜的分离面积, 溶剂移出率达 92%, 使体系内的丁醇质量浓度保持在 4 g/L 左右, ABE 生产速率达到 0.4 g/(L·h), 与分批发酵相比, 提高了 60%。

关键词: 丁醇; 渗透汽化膜; 原位分离; 发酵; pH 调控

中图分类号: Q815 文献标志码: A 文章编号: 1671-7627(2013)01-0076-05

Butanol fermentation integrated with in-situ pervaporation by PDMS/ceramic composite membrane with pH control

CHEN Xiaopeng¹, WU Hao¹, LIU Gongping¹,
SUN Baijun¹, GUO Ting^{1,2}, JIANG Min¹, WEI Ping¹

(1. State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and
Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;
2. Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou 510316, China)

Abstract: Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation integrated with pervaporation (PV) membrane was studied using *Clostridium acetobutylicum* XY16. The effects of pH control and PV membrane area on the coupled process were discussed. Results showed that ABE in PV fermentation was 103 g/L, and increased by 472% compared with batch fermentation, and the ABE productivity was 0.29 g/(L·h), and only increased by 16%. The ABE productivity was up to 0.34 g/(L·h) with pH control. The solvent removing rate achieved 92% by increasing the separation area of PV membrane, the mass concentration of butanol in the reactor was kept in 4 g/L, and the ABE productivity was 0.4 g/(L·h), and increased by 60% compared with batch fermentation.

Key words: butanol; pervaporation membrane; in-situ separation; fermentation; pH control

收稿日期: 2012-02-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(21106067); 江苏省高校自然科学研究重大项目(11KJA530001); 材料化学工程国家重点实验室基金;
江苏省“青蓝工程”资助项目; 林业公益性专项(201004001); 高等学校博士学科点专项基金资助课题(20093221110005)

作者简介: 陈啸鹏(1985—), 男, 安徽芜湖人, 硕士, 主要研究方向为微生物学; 姜岷(联系人), 教授, E-mail: bioengine@njut.edu.cn.

丁醇作为一种新型的生物燃料,与乙醇相比,具有能量密度高、可直接用于发动机、运输方便等优势^[1]。随着石油资源的匮乏和环境问题的日益突出,生物法制备丁醇又重新受到人们的重视^[2]。生物法制备丁醇又称为 ABE(丙酮、丁醇、乙醇)发酵,由于丁醇质量浓度达到 5 g/L 时,即可对菌株生长产生抑制作用,若丁醇质量浓度达到 10 g/L,则细胞被完全抑制^[3],因此产物抑制导致 ABE 发酵的产物质量浓度极低(总溶剂 ABE 质量浓度 < 20 g/L)。

渗透汽化是利用极性低、表面能小的橡胶态聚合物制备的疏水性膜,将挥发组分或有机组分有选择性地膜内汽化透过并被浓缩回收,而营养物质、糖以及细胞等被截留的一种分离技术,具有选择性好、清洁无污染、分离条件温和等优点^[4]。将该技术与发酵过程耦合,可提高发酵产率及底物利用率,并可同时实现产物的富集和回收,降低发酵成本^[5]。Qureshi 等^[6]将渗透汽化膜与间歇发酵直接耦合,对 *Clostridium beijerinckii* BA101 发酵无消极影响。Geng 等^[7]将 PDMS 材质的渗透汽化膜与丁醇的间歇及补料分批发酵相耦合,丁醇被移出,葡萄糖消耗速率显著提高。Qureshi 等^[8]将渗透汽化分离与补料分批发酵技术耦合,渗透液中的 ABE 质量浓度达到 165.1 g/L。

ABE 是典型的两阶段发酵^[9],分为产酸期和产溶剂期,产酸期产生乙酸、丁酸,pH 下降;而在产溶剂期,产酸期产生的丁酸和乙酸被还原成丙酮丁醇等溶剂,pH 上升。Kim 等^[10]发现 pH 是影响 ABE 发酵效率的一个重要因素,将分批发酵过程中的 pH 始终维持在 5.8,无丁醇生成,而将 pH 控制在 4.5,可获得较高的产物质量浓度。Godin 等^[11]利用 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 进行 ABE 发酵时,第一阶段将 pH 维持在 4.5,第二阶段将 pH 维持在 4.5~5.0,ABE 溶剂达到了 21 g/L,糖转化率达到 0.36 g/g。本课题组在前期研究中发现,对 *Clostridium acetobutylicum* XY16 发酵进行 pH 调控,ABE 生产速率提高了 20%,其控制策略为:发酵前 8 h,维持 pH 5.5,随后维持 pH 4.9 至发酵结束。

本文以 PDMS 陶瓷复合渗透汽化膜为分离介质,开展了渗透汽化膜原位分离耦合发酵制备丁醇的研究,该膜可在 37 °C 下直接从发酵液中提取 ABE,并具有较强的耐污性能^[12]。同时本研究中将 pH 调控应用于原位分离耦合系统,以进一步提高 ABE 生产速率,为原位分离耦合系统应用于丁醇发酵的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

752 型紫外-可见光分光光度计(上海启威电子有限公司);SBA-40C 型生物传感分析仪(山东省科学院生物研究所);SP-6800A 气相色谱仪(浙大智达);pH 计(上海雷磁有限公司);色谱柱:石英毛细管柱;PDMS 陶瓷复合膜(0.004 98 m²/0.016 m²,南京工业大学自制);BT50-1J 恒流泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

酵母粉、玉米浆、蛋白胨均为工业级;分析试剂均为色谱纯或分析纯。

1.2 菌种和培养基

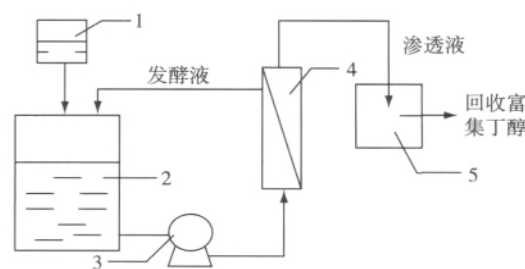
菌种:丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* XY16(笔者所在实验室选育并保藏,中国典型培养物保藏中心,保藏号:CCTCC 2010011)。

一级、二级种子培养基:酵母粉 3 g/L,蛋白胨 5 g/L,可溶性淀粉 10 g/L,乙酸铵 2 g/L,NaCl 2 g/L,MgSO₄ 3 g/L,K₂HPO₄ 1 g/L,KH₂PO₄ 1 g/L,FeSO₄·7H₂O 0.1 g/L,pH 6.0,121 °C 灭菌 15 min。发酵培养基:乙酸铵 2.2 g/L,K₂HPO₄ 0.5 g/L,KH₂PO₄ 0.5 g/L,MgSO₄ 0.2 g/L,MnSO₄ 0.01 g/L,FeSO₄ 0.01 g/L,NaCl 0.01 g/L,玉米浆 1 g/L,葡萄糖 40~60 g/L,121 °C 灭菌 15 min。补料培养基:葡萄糖 500 g/L,其他同上。

1.3 实验方法

1.3.1 反应分离耦合装置的构建

渗透汽化膜连接前需 121 °C 灭菌 15 min,再通过硅胶管将 2 L 自制厌氧反应器、恒流泵与渗透汽化膜连接,构建反应分离耦合装置,如图 1 所示。



1—补料装置;2—厌氧反应器;

3—恒流泵;4—渗透汽化膜;5—冷阱

图1 渗透汽化-发酵原位分离耦合装置

Fig.1 Schematic diagram of PV-fermentation device

1.3.2 厌氧批式发酵制备丁醇

将 1.5 mL 种子甘油管接种入一级种子培养基,

37 ℃厌氧培养 8 h 后,按 5% 体积分数将活化种子液接入二级种子培养基,37 ℃厌氧培养 12 h 后,按 10% 体积分数将活化种子液接入发酵培养基,37 ℃下厌氧培养 72 h。

1.3.3 两阶段 pH 调控分批补料发酵产丁醇

前期操作同上,发酵至 17 h,葡萄糖消耗至 20 g/L 左右。将反应器与渗透汽化膜耦合,膜面循环流速为 15 L/h。补加新鲜培养基,将糖质量浓度提升至 30~40 g/L,如此反复补料 10 次。在此基础上调控该体系的 pH,调控策略为:发酵前 8 h 维持 pH 5.5,其后维持 pH 4.9 直至发酵结束,并考察不同膜面积对耦合系统稳定性的影响。

1.4 检测方法

葡萄糖采用 SBA-40C 型生物传感分析仪检测。有机溶剂、乙酸及丁酸的检测采用气相色谱法, FID 检测器,以异丁醇作为内标物^[13]。

葡萄糖消耗速率或总溶剂生产速率的计算方法见式(1)。

$$v = \frac{\rho_1 - \rho_2}{t} \quad (1)$$

式中: ρ_1 为发酵前葡萄糖质量浓度或发酵后总溶剂质量浓度 g/L; ρ_2 为发酵后葡萄糖质量浓度或发酵前总溶剂质量浓度 g/L; t 为发酵周期 h; v 为葡萄糖消耗速率或 ABE 生产速率 g/(L·h)。

2 结果与讨论

2.1 *Clostridium acetobutylicum* XY16 分批发酵

将种子液接入装有 1.5 L 培养基的反应器中,厌氧发酵 72 h 结果如图 2 所示。

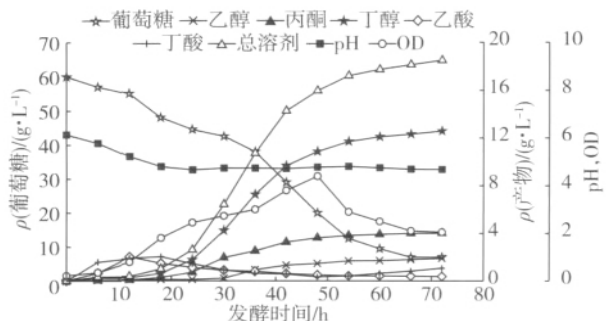


图2 *Clostridium acetobutylicum* XY16 产丁醇的分批发酵进程曲线

Fig. 2 Curves of batch butanol fermentation process from *Clostridium acetobutylicum* XY16

由图 2 可知:整个发酵过程的溶剂产量为 18.3 g/L, ABE 生产速率为 0.25 g/(L·h), 溶剂转化率为

0.34 g/g。厌氧发酵 18 h,菌株进入对数期。发酵至 48 h,丁醇质量浓度超过 5 g/L,菌株进入衰亡期。当发酵液中丁醇质量浓度达到 10 g/L,菌体细胞死亡 30%,生产速率降至 0.12 g/(L·h),可见产物抑制导致溶剂生成性能迅速下降。

2.2 渗透汽化膜原位分离耦合丁醇补料分批发酵

采用 0.004 98 m² 的渗透汽化膜为分离介质,发酵过程共持续 132 h,发酵曲线如图 3 所示。发酵结束后共获得 58.3 g 总溶剂,70% 的溶剂被移出, ABE 质量收率为 0.25 g/g,低于分批发酵的质量收率,但渗透液中的产物质量浓度(101 g/L)比分批发酵提高了 472%。该过程中溶剂生产速率和葡萄糖消耗速率分别为 0.29 g/(L·h) 和 1.17 g/(L·h),分别提高了 16% 和 30%。在耦合过程中,前 2 次补料期间,体系中的 pH 保持在 4.7 左右,溶剂 ABE 生产速率达到 0.7 g/(L·h),反应器内丁醇质量浓度 < 5 g/L。第 4 次补料后,反应器内的丁醇达到 7.3 g/L。随着 pH 降至 4.3,溶剂生产速率降至 0.33 g/(L·h)。随着 pH 回升至 4.55,在第 6 次补料期间,溶剂生产速率又达到 0.48 g/(L·h),但随后,体系中的丁酸达到 1.2 g/L, pH 再降至 4.5,溶剂生产速率(0.24 g/(L·h))比耦合稳定期时降低了 50%。丁酸的解离常数 pK_a 为 4.82,当 pH 偏离 pK_a 时,丁酸分子的解离状态会发生变化。文献[14]报道,当 pH 为 6.0 时,丁醇发酵体系中仅有 6% 的丁酸呈未解离态,而当 pH < 4.5 时,体系中 66% 的丁酸呈未解离态。当体系中未解离的丁酸达到 0.2~0.4 g/L 时,就会对菌株产生抑制作用^[15]。由此可见,在渗透汽化耦合发酵过程中,低 pH 环境会导致未解离丁酸的积累,进而影响菌株的代谢,降低发酵效率。

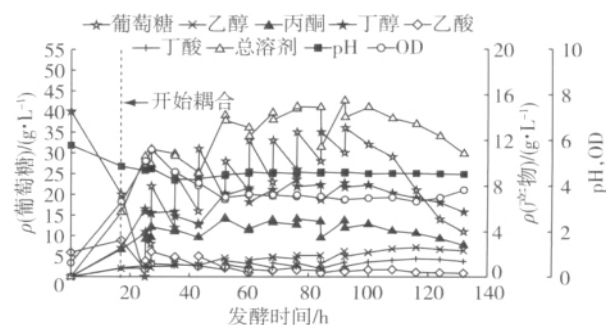


图3 渗透汽化膜耦合 *Clostridium acetobutylicum* XY16 丁醇补料分批发酵进程曲线(膜面积 0.004 98 m²)

Fig. 3 Curves of fed-batch butanol fermentation process integrated with PV using *Clostridium acetobutylicum* XY16 (membrane area 0.004 98 m²)

2.3 基于 pH 调控的渗透汽化膜原位分离耦合丁醇补料分批发酵

采用 0.004 98 m² 的渗透汽化膜为分离介质, 结合 pH 调控, 耦合发酵过程共持续 141 h, 发酵曲线如图 4 所示。

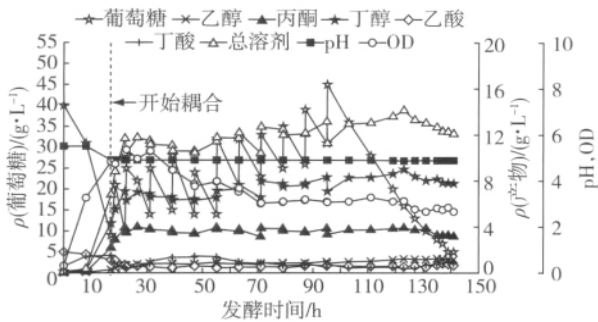


图 4 基于 pH 调控的渗透汽化膜原位分离耦合丁醇补料分批发酵进程曲线(膜面积 0.004 98 m²)

Fig. 4 Curves of fed-batch butanol fermentation process integrated with PV based on pH control (membrane area 0.004 98 m²)

发酵结束后共获得 ABE 总溶剂为 63.7 g (渗透液中 ABE 质量浓度为 104 g/L), ABE 质量收率为 0.26 g/g。该过程的 ABE 生产速率达到 0.34 g/(L·h)。在耦合过程中, 由于 pH 调控的作用, 尽管反应器内丁酸质量浓度达到 1.4 g/L, 前 4 次补料期间的溶剂 ABE 生产速率达到了 0.6 g/(L·h)。从第 6 次补料开始, 丁酸质量浓度从第 4 次补料时的 1.4 g/L 降低至第 10 次补料的 0.7 g/L, 但体系中的丁醇质量浓度也从 6.2 g/L 上升至 8.3 g/L, 溶剂 ABE 生产速率则由 0.6 g/(L·h) 降至 0.27 g/(L·h)。由此可见, 在渗透汽化耦合发酵过程中, 通过 pH 调控可降低未解离丁酸的质量浓度, 提高溶剂生产速率, 但是如果产物不能及时移出, 仍会导致丁醇质量浓度的提高, 进而影响该发酵体系的稳定性。

为了避免渗透汽化耦合发酵体系中丁醇的积累, 采用膜面积为 0.016 m² 的渗透汽化膜为分离介质, 并结合 pH 调控。发酵过程共持续 140 h, 发酵曲线如图 5 所示。

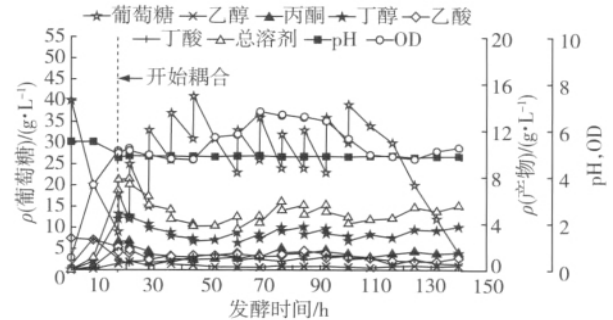


图 5 基于 pH 调控的渗透汽化膜原位分离耦合丁醇补料分批发酵进程曲线(膜面积 0.016 m²)

Fig. 5 Curves of fed-batch butanol fermentation process integrated with PV based on pH control (membrane area: 0.016 m²)

发酵结束后共获得 ABE 总溶剂为 82.8 g (渗透液中 ABE 为 74.6 g, ABE 质量浓度为 103 g/L), 90% 的溶剂被移出。与未调控之前相比, 溶剂移出率提高了 29%, ABE 质量收率(0.29 g/g)提高了 16%。ABE 生产速率(0.40 g/(L·h))提高了 17%, 而与分批发酵相比, 提高了 60%。在该耦合过程中, 前 3 次补料期间, 丁醇质量浓度逐步降至 4 g/L, 丁酸质量浓度仅为 0.6 g/L, 溶剂 ABE 生产速率达到了 0.86 g/(L·h)。从第 4 次补料至第 10 次补料结束, 丁醇质量浓度为 2.8 ~ 4 g/L, 丁酸浓度为 0.3 ~ 0.6 g/L, 溶剂 ABE 生产速率稳定在 0.45 g/(L·h)。

以上各种耦合发酵过程的效率比较见表 1。由表 1 可见: 通过采用 pH 调控策略和增大膜面积的方法, 可在减少丁酸毒害的同时, 及时移出溶剂, 解除了产物抑制现象, 显著提高了丁醇发酵效率。

表 1 *Clostridium acetobutylicum* XY16 不同发酵方式的比较

Table 1 Comparison of different fermentation methods for *Clostridium acetobutylicum* XY16

发酵方式	溶剂 ABE 生产速率/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	ρ(丁醇) ^① / (g·L ⁻¹)	发酵周期/ h	ρ(ABE) ^① / (g·L ⁻¹)
分批发酵	0.25	10.4	72	18.3
渗透汽化耦合发酵	0.29	7.3	132	101
基于 pH 调控的渗透汽化耦合发酵 ^②	0.34	7.5	141	104
基于 pH 调控的渗透汽化耦合发酵 ^③	0.40	3.0	140	103

注: ①分批发酵为反应器内 ABE 质量浓度, 其他耦合发酵为渗透液中的 ABE 质量浓度; ②渗透汽化膜面积为 0.004 98 m²; ③渗透汽化膜面积为 0.016 m²。

3 结论

1) 与传统的分批发酵相比,渗透汽化原位分离耦合丁醇发酵获得的渗透液中 ABE 产物质量浓度达到了 103 g/L,提高了 472%,但低 pH 环境会导致未解离丁酸的积累,进而对菌株产生毒害,ABE 生产速率为 0.29 g/(L·h),仅提高了 16%。

2) 通过对发酵过程的 pH 调控,解除了丁酸毒害作用,使 ABE 生产速率提高至 0.34 g/(L·h)。在此基础上通过增大渗透汽化膜的面积,溶剂移出率达到 92%,提高了 29%,体系内的丁醇浓度保持在 4 g/L 左右,ABE 生产速率达到了 0.4 g/(L·h),与分批发酵相比,提高了 60%。

参考文献:

- [1] 刘娅,刘宏娟,张建安,等. 新型生物燃料: 丁醇的研究进展[J]. 现代化工, 2008, 28(6): 28-33.
- [2] Dürre P. Biobutanol: an attractive biofuel[J]. Biotechnology Journal, 2007, 2: 1525-1534.
- [3] Jones D T, Woods D R. Acetone-butanol fermentation revisited[J]. Microbiological Reviews, 1986, 50: 484-524.
- [4] 童灿灿, 杨立荣, 吴坚平, 等. 丙酮-丁醇发酵分离耦合技术的研究进展[J]. 化工进展, 2008, 27(11): 1782-1788.
- [5] O'Brien D J, Craig J C. Ethanol production in a continuous fermentation/membrane pervaporation system[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 44: 699-704.
- [6] Quershi N, Blaschek H P. Production of acetone butanol ethanol (ABE) by a hyper-producing mutant strain of *Clostridium beijerinckii* BA101 and recovery by pervaporation[J]. Biotechnology Progress, 1999, 15: 594-602.
- [7] Geng Q, Park C H. Pervaporative butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* B18[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1994, 43: 978-986.
- [8] Qureshi N, Blaschek H P. Butanol production using *Clostridium beijerinckii* BA101 hyperbutanol-producing mutant strain and recovery by pervaporation[J]. Applied biochemistry and Biotechnology, 2000, 84: 5-15.
- [9] 陈陶声, 陆祖棋. 发酵法丙酮和丁醇生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991.
- [10] Kim B H, Zeikus J G. Importance of hydrogen metabolism in regulation of solventogenesis by *Clostridium acetobutylicum*[J]. Developments in Industrial Microbiology, 1985, 26: 1-14.
- [11] Godin C, Engasser J M. Two-stage continuous fermentation of *Clostridium acetobutylicum*: effects of pH and dilution rate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 33(3): 269-273.
- [12] Liu Gongping, Wang Wei, Wu Hao. Pervaporation performance of PDMS/ceramic composite membrane in acetone butanol ethanol (ABE) fermentation-PV coupled process[J]. Journal of Membrane Science, 2011, 373: 121-129.
- [13] 唐波, 余晓彬, 李灵巧. 添加有机酸对 *Clostridium acetobutylicum* 合成丙酮和丁醇的影响[J]. 生物加工过程, 2008, 6(3): 24-28.
- [14] Haggstrom L. Acetone-butanol fermentation and its variants[J]. Biotechnology and Advances, 1985, 3: 13-28.
- [15] Monot F, Engasser J M, Petitdemange H. Regulation of acetone butanol production in batch and continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1983, 13: 207-216.