

非离子表面活性剂对丙酮丁醇梭菌发酵的影响

Menledy Gbor Jr. Edwin¹, 沙如意^{1,2,3}, 张 徐¹, 方吉雷¹

(1. 浙江科技学院 生物与化学工程学院, 杭州 310023; 2. 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 杭州 310023; 3. 浙江省农业生物资源生化制造协同创新中心, 杭州 310023)

摘 要: 环境保护意识的增强和化石燃料的日益枯竭,促进了生物质能源的开发。为了解决生物丁醇燃料工业化发酵底物成本高而丁醇产量较低的问题,今探讨影响丙酮丁醇梭菌发酵产丙酮-丁醇-乙醇(ABE)溶剂的促进剂。以生物质木质纤维素的水解产物作为丙酮丁醇梭菌的发酵底物,利用非离子型表面活性剂 Tween-80 和聚乙二醇(PEG)6000 作为丙酮丁醇梭菌的发酵促进剂。结果表明,添加 Tween-80 和 PEG6000,降低了丙酮丁醇梭菌的比生长速率和菌体最大质量浓度,提高了发酵产物 ABE 的产量,从而为发酵法提高生物丁醇产量提供基础参数,也为利用木质纤维素的水解液发酵生产生物丁醇提供了基本依据。

关键词: 丙酮丁醇梭菌;木质纤维素;非离子表面活性剂;生物丁醇

中图分类号: TS201.2;TQ923

文献标志码: A

文章编号: 1671-8798(2016)03-0216-09

Effect of nonionic surfactant on fermentation by *Clostridium acetobutylicum*

Menledy Gbor Jr. Edwin¹, SHA Ruyi^{1,2,3}, ZHANG Xu¹, FANG Jilei¹

(1. School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory for Chemical and Biological Processing Technology of Farm Produce, Hangzhou 310023, China; 3. Zhejiang Collaborative Innovation Center of Chemical and Biological Manufacturing for Agricultural Biological Resources, Hangzhou 310023, China)

Abstract: With the enhancement of increasing environmental protection consciousness and depletion of fossil fuels, biomass energy is being developed. In order to solve the problem of the high cost of fermentation substrate and low butanol productiticy influencing biobutanol fermentation, the accelerator in fermentation of acetone-butanol-ethanol (ABE) solvent by *Clostridium acetobutylicum* was investigated. The enzymatic hydrolysate of lignocellulosic

收稿日期: 2016-04-13

基金项目: 国家星火计划项目(2015GA700079);浙江省重点研发计划项目(2015C02031);浙江省教育厅科研计划项目(Y201327551);浙江科技学院科研启动基金项目(F501103C01)

作者简介: Menledy Gbor Jr. Edwin(1989—),男,利比里亚人,硕士研究生,研究方向为生物资源利用。

通信作者: 沙如意,讲师,博士,主要从事生物资源利用相关研究。

biomass was used as the carbon substrate for *C. acetobutylicum* fermentation, the nonionic surfactants such as Tween-80 and polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) was used as fermentation accelerator. The results showed that Tween-80 and PEG 6000 can significantly improve the yields of ABE, but reducing maximum dry cell weight and the specific growth rate of *C. acetobutylicum*. This provides basic parameters for improving the fermentation of biobutanol, and establishes a basis for biobutanol fermentation using hydrolysates of lignocellulose as substrate.

Keywords: *Clostridium acetobutylicum*; lignocellulose; nonionic surfactant; biobutanol

随着环境保护意识的增强和化石燃料的逐渐枯竭,人们对可再生生物能源的研究日益重视。生物乙醇的辛烷值较高,可以和汽油以任意比例混合,与水溶液也互不相溶,最重要的是利用生物丁醇不需要对发动机做任何改造,因此,它是一种具有独特优势的生物质燃料^[1-2]。生物丁醇主要由丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)等为代表的厌氧微生物(acetone-butanol-ethanol, ABE)发酵所得,该工艺又称为“ABE 发酵”。目前,限制生物丁醇工业化生产的主要因素是发酵原料成本过高、丁醇产量较低^[3]。一般地,在生物发酵工业,底物的使用成本约占整个生物产品生产成本的 60%以上^[4-5],因此,从工程经济学角度来考虑,应利用廉价的发酵底物,如农林废弃物、残渣和生活的固液废弃物等^[6-7]。生物质是地球上最丰富的可再生资源之一,主要由纤维素、半纤维素和木质素组成,利用纤维素酶法水解木质纤维素得到的水解液,对微生物无毒害,可为微生物发酵提供基础碳源。因此,木质纤维素的水解液是一种理想的生物丁醇发酵底物。

目前,多种工艺被开发用于提高生物丁醇发酵的产量。包括生产工艺参数的改进、基因工程菌种的构建、代谢流调控、新菌种的发现和发酵促进剂的使用等^[8-9]。其中,表面活性剂因同时含有亲水和亲油的两亲性基团,能够降低溶液的表面张力,具有增溶和乳化等特性^[10],特别是非离子类表面活性剂最能有效提高纤维素的水解,已有文献报道利用非离子型表面活性剂增强木质纤维素的酶解、糖化,以及促进微生物的代谢发酵,如 Tween-80、司班系列和聚乙二醇系列等表面活性剂常被用于增强木质纤维的酶解糖化^[11-13]。

尽管已有大量关于非离子表面活性剂促进木质纤维素类物质水解和糖化的研究报道^[14-16],但将非离子表面活性剂作为发酵促进剂用于丙酮丁醇梭菌发酵、以木质纤维素的水解液作为底物生产 ABE 的研究报道并不多,也很少有关于利用 Tween-80 和聚乙二醇 PEG 类表面活性剂对丙酮丁醇梭菌的菌体生长动力学的系统研究报道。

基于此,本研究主要探讨非离子型表面活性剂 Tween-80 和 PEG6000 对丙酮丁醇梭菌发酵产 ABE 和菌体生长特性的影响,以期对丙酮丁醇梭菌以木质纤维素的水解液发酵生产生物丁醇提供理论指导依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂与材料

C. acetobutylicum,筛选自下水道,通过斜面保藏于实验室。

Tween-80、葡萄糖、DNS 试剂、PEG6000、玉米粉、牛肉膏、乙醇、丙酮、丁醇、异丁醇、可溶性淀粉、胰蛋白胨、乙酸钠、L-半胱氨酸盐酸盐、磷酸二氢钾、七水合硫酸镁、醋酸铵等,均为分析纯,购自上海国药集团有限公司。

竹粉粉碎过筛(80 目),采用 2% 的氢氧化钠在 120 °C 下保温 1 h,过滤洗涤残渣至中性。90 °C 烘箱烘干后,称取一定量干竹纤维残渣,按照料液质量体积比 1 : 10(g/mL),纤维素酶添加量为 1 g/L,50 °C 下

水解 72 h, 得到竹粉纤维的水解液。

1.1.2 仪器设备

气相色谱仪(GC2014, 日本岛津有限公司), 恒温恒湿培养箱(HWS-50KB, 上海森信试验仪器有限公司), 低温高速离心机(microfuge 16, 美国贝克曼), 高压蒸汽立式灭菌锅(YXQ-LS-50SII, 上海博讯实业有限公司), 单人单面操作超净台(SW-CJ-ID, 苏州苏净集团), 紫外-可见分光光度计(5500PC, 上海元析仪器有限公司), 循环水式真空泵(SHZ-DC3 型, 巩义市英裕予华仪器厂), 以及三菱厌氧袋、厌氧盒、厌氧瓶、无菌注射器等。

1.1.3 培养基配置

菌种活化培养基: 称量约 50 g 玉米粉, 加适量水后, 80 °C 糊化 35 min, 自来水定容至 1 L, 然后置于 121 °C 高压蒸汽灭菌锅保持 20 min。

RCM 富集强化培养基: 氯化钠 3 g, 酵母浸膏 3 g, 牛肉浸膏 3 g, 乙酸钠 3 g, 胰蛋白胨 10 g, 葡萄糖 5 g, L-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g, 去离子水定容至 1 L, 然后置于 115 °C 高压蒸汽灭菌 15 min。

改进的 TYA 发酵培养基: 竹粉纤维水解液(葡萄糖终质量浓度为 20 g/L), 硫酸镁 0.2 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 胰蛋白胨 6 g, 牛肉浸膏 2 g, 酵母浸膏 2 g, 乙酸铵 3 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 去离子水定容至 1 L, 然后置于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种的活化、富集和发酵培养

菌种的活化: 取一管冷冻的 *C. acetobutylicum*, 置于 100 °C 沸水浴中激活 35 s, 然后接种到含有 50 mL 玉米醪培养基的厌氧瓶(100 mL)中, 抽真空(-0.09 MPa)后于 37 °C 恒温箱中培养 72 h。

菌种的富集培养: 将培养有 *C. acetobutylicum* 的玉米醪活化培养基摇匀, 接种到装有 50 mL RCM 富集强化培养基的厌氧瓶中(接种量 10%, 体积分数), 抽真空(-0.09 MPa)后于 37 °C 恒温箱中培养 72 h。

菌种发酵培养: 将培养有 *C. acetobutylicum* 的 RCM 富集培养基摇匀, 接种到装有 50 mL RCM 改进的 TYA 发酵培养基中(接种量 10%, 体积分数), 抽真空(-0.09 MPa)后于 37 °C 恒温箱中培养 72 h。

1.2.2 菌体干质量和葡萄糖质量浓度的标准曲线绘制

C. acetobutylicum 于 RCM 富集强化培养 72 h 后, 分别取样 5、10、20、25、35 mL 各 2 组于 50 mL 的离心机中, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。一组沉淀经过烘干后称取质量, 另一组沉淀利用去离子水重新悬浮溶解、定容至 50 mL, 然后置于 610 nm 处测定吸光度 A , 绘制菌体干质量和吸光光度值的标准曲线。

发酵液中葡萄糖质量浓度的测定采用 DNS 试剂法^[17]。

1.2.3 丙酮、丁醇和乙醇标准曲线绘制

分别称取一定质量的丙酮、丁醇和乙醇, 利用去离子水定容, 配制质量浓度为 10 g/L 的母液, 然后系列稀释母液至质量浓度范围 1.0~10.0 g/L, 得到各溶剂不同质量浓度下的系列标准溶液。量取各标准液 10 mL, 加入 75 μ L 的异丁醇作为内标物, 再利用气相色谱进行检测^[18]。

气相色谱条件: 火焰离子检测器(FID), 色谱柱 RTX-5, 进样温度 240 °C, 检测温度 240 °C, 柱温 90 °C, 进样量 0.4 μ L。以丙酮、丁醇和乙醇的质量浓度为横坐标, 各溶剂峰面积和内标物峰面积比为纵坐标, 建立丙酮、丁醇和乙醇的标准曲线。

1.2.4 发酵液样品中 ABE 质量浓度的测定

取发酵液 1.5 mL 于离心管中, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL 加入 7.5 μ L 异丁醇内标物, 混匀并用 0.45 μ m 微滤膜过滤后, 利用气相色谱分析检测。

1.2.5 不同种类表面活性剂对菌体生长的影响

分别配制质量分数为 0.5% 的 Tween-80、PEG6000、PEG6000 和 Tween-80 的混合物(质量比 1:1)

TYA改进的发酵培养基,于不同时间点取样,10 000 r/min 离心 5 min,取沉淀物重新悬浮于去离子水,测定其在 610 nm 处的吸光度值。

1.2.6 不同质量分数表面活性剂对溶剂产量的影响

分别配制 0.5%、1%、1.5%、3%和 6%质量分数的非离子型表面活性剂 Tween-80 和 PEG6000,每隔一定时间取样,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液检测发酵液中丙酮、丁醇和乙醇 3 种产物的质量浓度。

1.2.7 不同质量分数 PEG6000 对菌体生长的影响

分别配制 0.5%、1%、1.5%、3%和 6%质量分数的非离子型表面活性剂 Tween-80 和 PEG6000,每隔一定时间取样,10 000 r/min 离心 5 min,取沉淀物重新悬浮于去离子水,测定其在 610 nm 处的吸光度值。

1.2.8 不同质量分数 PEG6000 条件下的菌体生长动力学参数

利用 Origin8.5 软件中的 Logistic 方程,模拟不同质量分数 PEG6000 影响条件下的菌体生长,进行非线性拟合规划,采用全局性收敛的 Levenberg-Marquardt 等修正的高斯-牛顿法,以误差平方和最小为目标,获得待估参数,计算不同条件下的菌体最大生长速率 μ_{\max} 、最大菌体质量浓度 X_{\max} 和初始菌体质量浓度 X_0 。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖和细胞干质量标准曲线的绘制

利用 DNS 试剂法测定葡萄糖质量浓度,得到葡萄糖的标准曲线为 $y=0.3141x-0.0588$,其中线性相关系数为 $R^2=0.9979$,在葡萄糖质量浓度为 1.0~3.0 g/L 的范围内,线性相关系数较好,如图 1 所示。

利用干细胞重法测定丙酮丁醇梭菌的干质量与其在 610 nm 条件下吸光度的关系,所得的细胞干质量的标准曲线为 $y=2.0492x-0.0238$,相关系数 $R^2=0.9935$,在干细胞质量浓度为 0.03~0.35 g/L 的范围内具有良好的线性相关性,如图 2 所示。

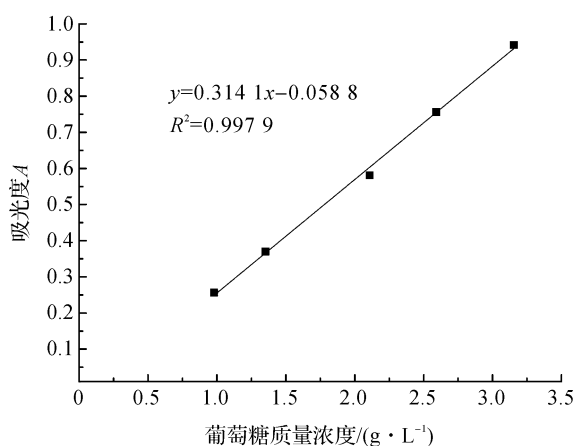


图1 葡萄糖标准曲线
Fig. 1 Standard curve of glucose

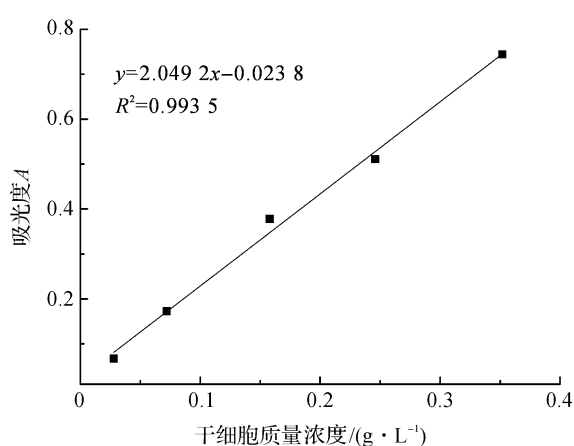


图2 干细胞质量浓度标准曲线
Fig. 2 Standard curve of dry cell mass concentration

2.2 丙酮、丁醇和乙醇标准曲线的绘制

对各种不同质量浓度的标准溶剂(丙酮、丁醇和乙醇)进行气相色谱(GC)测定,所得线性回归结果如表 1 所示。丙酮、丁醇和乙醇的质量浓度在 1.0~5.0 g/L 范围内,质量浓度 x 和峰面积比 y (标准物质峰面积与异丁醇内标物的峰面

表1 丙酮、丁醇和乙醇的标准曲线

Table 1 Standard curve of acetone, butanol and ethanol

标准物质	线性回归方程	相关系数 R^2
丙酮	$y=0.1439x-0.0233$	0.9993
丁醇	$y=0.1653x-0.1137$	0.9994
乙醇	$y=0.1266x-0.0178$	0.9871

积比)呈现良好的线性关系,其中丙酮和丁醇的线性相关系数均在 0.999 以上,相关性良好,这说明可以利用 RTX-5 色谱柱实现 ABE 色谱峰的分离。

2.3 不同类型表面活性剂对 *C. acetobutylicum* 生长的影响

为了考察不同种类的表面活性剂对丙酮丁醇梭菌发酵产 ABE 的影响,在前期预实验中,研究了非离子表面活性剂(Tween-80 和 PEG6000)、阴离子表面活性剂 SDS 和阳离子表面活性剂 CTAB 对 *C. acetobutylicum* 生长的影响,结果表明,SDS 和 CTAB 对于该菌的生长具有明显的抑制作用。因此,本研究选用 Tween-80 和 PEG6000 非离子型表面活性剂为代表,考察它们对 *C. acetobutylicum* 生长的影响。

将竹粉纤维用体积分数为 2% 的稀碱预处理,再利用纤维素酶水解得到的葡萄糖作为发酵碳源(经测定,其中葡萄糖质量浓度为 20 g/L)。分别添加质量分数 0.5% 的 Tween-80、PEG6000 及这两种表面活性剂的混合物至发酵培养基中,结果如图 3 所示。在此质量分数下,两种表面活性剂均延长了 *C. acetobutylicum* 的迟滞期,降低了进入对数生长期后的生长速率,而两种表面活性剂的混合物对生长的抑制作用则尤为明显,这可能是两种表面活性剂组成的混合胶束对细菌的细胞膜具有更强的渗透作用,从而更加不利于细菌的生长^[19]。考虑到文献报道中非离子型表面活性剂虽然会对菌的生长具有一定的抑制作用,但可能会有助于发酵产物产量的提高,因此,以下分别探讨 Tween-80 和 PEG6000 对 *C. acetobutylicum* 生产 ABE 溶剂的影响。

2.4 表面活性剂对 *C. acetobutylicum* 利用底物的影响

进一步研究表面活性剂对 *C. acetobutylicum* 利用竹纤维素水解底物利用率的影响,结果如图 4 所示。添加质量分数 0.5% 的 Tween-80、PEG6000 及其两种表面活性剂的混合物,并未影响该菌对底物葡萄糖的摄取速率,这说明竹粉纤维水解产物可以作为该菌种的发酵碳源,而且能够被该菌高效地利用。

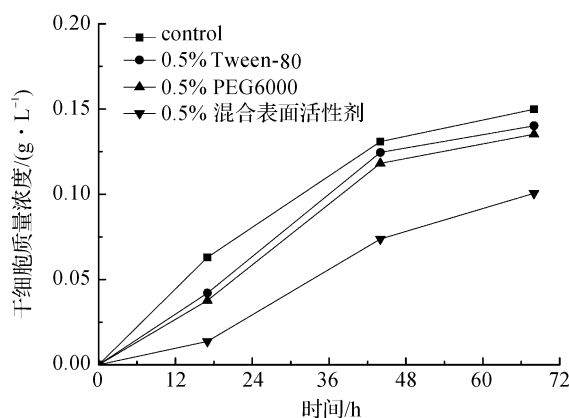


图 3 表面活性剂类型对菌体生长的影响

Fig. 3 Effect of type of surfactant on bacteria growth

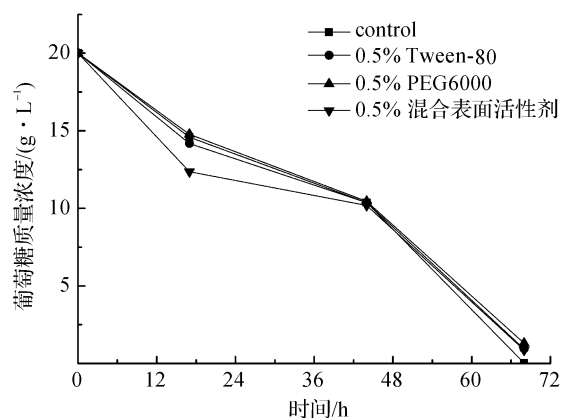


图 4 表面活性剂种类对底物利用效率的影响

Fig. 4 Effect of type of surfactant on substrate utilization efficiency

2.5 不同质量分数 Tween-80 对 *C. acetobutylicum* 发酵产 ABE 的影响

Tween-80 对 *C. acetobutylicum* 的生长稍有抑制,而葡萄糖底物的利用能力基本无太大改变,可能在此条件下,并不影响底物碳源代谢产物的形成。研究不同质量分数下 Tween-80 对 *C. acetobutylicum* 产 ABE 溶剂的影响,结果如图 5 所示,丙酮和丁醇产量随着 Tween-80 质量分数的增加而显著增加(质量分数小于 1%),最高总溶剂产量达 2.0 g/L。超过这一剂量范围,丙酮和丁醇产量受到明显抑制,而乙醇质量分数受 Tween-80 质量分数的影响并不显著。

常温下 Tween-80 在水溶液中的临界胶束质量分数(CMC)为 0.14%,试验中所用的 Tween-80 质量分数(0.5%~6.0%)远高于其 CMC,在此条件下,Tween-80 以胶束的形式存在于发酵液中,再加上发酵液中同时存在丁醇和乙醇等强极性物质,会显著降低表面活性剂在水溶液中的临界胶束质量分数^[20-21],

因此,Tween-80 在发酵液中形成多个胶束而对丙酮和丁醇等溶剂具有增溶作用,在一定程度上降低了发酵产物丙酮和丁醇对细胞的毒性,促使生物转化向着有利于 ABE 发酵的方向进行,从而提高丁醇、丙酮等溶剂的产量。

此外,细胞表面的亲/疏水特性也会因 Tween-80 的存在而发生变化,细胞表面亲/疏水性改变有助于细胞对营养底物的摄取和吸收,这可能是 Tween-80 能够提高 *C. acetobutylicum* 产 ABE 产量的原因之一。

继续增加 Tween-80 的质量分数至 6%,ABE 的产量均会显著下降,在此质量分数条件下,一方面细菌的毒性增强,另一方面 Tween-80 的存在会增加培养液中的气体传递速率,导致细胞汲取氧气的能力增强,破坏了局部微厌氧的环境,从而降低了丙酮、丁醇和乙醇等在厌氧代谢条件下的产量。

2.6 不同质量分数 PEG6000 对 *C. acetobutylicum* 发酵产 ABE 的影响

PEG6000 作为另一种非离子型的表面活性剂,与 Tween-80 具有相似的化学结构,质量分数在其 CMC 以上能显著降低发酵液的表面张力,这已被许多文献报道用作微生物细胞发酵中代谢产物产量提高的发酵促进剂或者提高纤维酶解效率的助剂^[22-23]。与添加 Tween-80 的结果相似,如图 6 所示,丙酮和丁醇产量随着 PEG6000 质量分数的增加而显著增加(质量分数小于 0.5%),最高总溶剂产量达 2.32 g/L,超出这一剂量范围,丙酮和丁醇产量受到明显抑制,而乙醇产量受 PEG6000 质量分数的影响并不显著,在低质量分数范围内,ABE 产量所受的影响最为明显。PEG6000 的添加不仅能提高 *C. acetobutylicum* 发酵产 ABE 的量,而且在利用戊糖发酵产乙醇的研究中,当 PEG 质量分数为 18%时,可以将乙醇的产量提高为原来的 2 倍,奇怪的是,在不同质量分数 PEG 条件下,初始乙醇生成速率基本相近^[24],这与本试验中所观察到的结果基本一致。此外,ABE 发酵产物含量的增加,也可能是因为 PEG6000 具有类似 Tween-80 对 ABE 几种溶剂的萃取效应所致^[25-26]。

2.7 不同质量分数 PEG6000 对 *C. acetobutylicum* 生物量积累的影响

不同质量分数 PEG6000 对 *C. acetobutylicum* 细胞代谢产物的影响不同(图 6),但 PEG6000 是否通过影响菌体的质量浓度而影响代谢产物的积累尚不能定论。因此,以下研究不同质量分数的 PEG6000 对 *C. acetobutylicum* 生长特性的影响,结果如图 7 所示。由图 7 可见,该菌体的生长抑制与 PEG6000 的质量分数具有显著的相关性。菌体的生长迟滞期随着 PEG6000 质量分数的增加而增加,在低质量分数时,对菌体的生长抑制效果不明显。

一般地,低相对分子质量的 PEG(如相对分子质量在 200~1 500 之间)很可能会因类似洗涤剂的效应而作用于细胞壁和细胞膜结构,或因渗透压的增加使细胞液外渗而对细胞的生长具有抑制作用^[27-28]。可是,PEG6000 能够在引起细胞生长受抑制的条件下仍然维持高产 ABE 代谢产物,这可能是 PEG6000

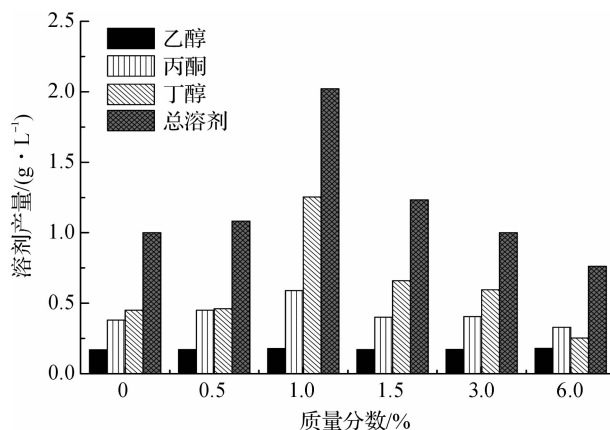


图 5 不同质量分数 Tween-80 对 ABE 产量的影响

Fig. 5 Effect of different concentrations of Tween-80 on production of ABE

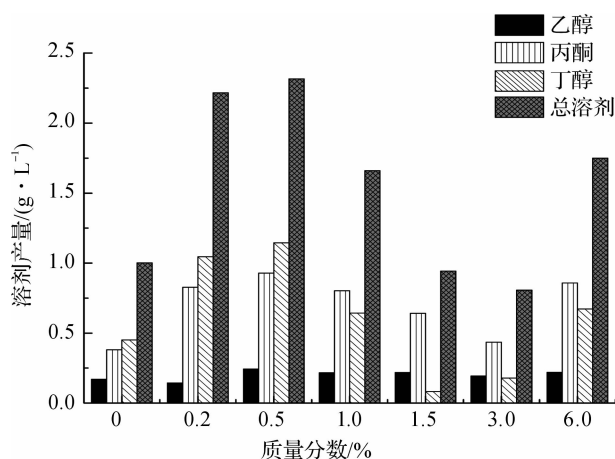


图 6 不同质量分数 PEG6000 对 ABE 产量的影响

Fig. 6 Effect of different concentrations of PEG6000 on production of ABE

含有的多个醇羟基具有很强的吸水性,其添加会降低发酵液局部微环境中的水分活度,在水分活度应激力作用下,细胞的代谢会自我调节,此时的细胞可能会以降低细胞生长速率为代价而保持基础代谢,这点对于酿酒酵母细胞来说尤为明显,然而水分活度的降低仍然会导致乙醇产物含量的提高^[24]。相反的是,Hahn-Hägerdal 等人在利用热带假丝酵母发酵生产木糖研究中,向发酵液中添加高质量分数的 PEG (18%),从而显著降低了发酵液中的水分活度(由初始的 1.0 降至 0.989),此时发现细胞生长速率和生物质积累量并未降低^[29],这与本研究中发现的 PEG 质量分数增加,ABE 产量增加,同时生物质积累量降低并不完全一致,这可能是本研究中所用到的丙酮丁醇梭菌与 Hahn-Hägerdal 等人所用的酵母细胞种属有差异所致,具体机制还需进一步研究与完善。

2.8 不同质量分数 PEG6000 条件下 *C. acetobutylicum* 生长动力学

为了进一步解释 PEG6000 造成菌体生物量积累的降低,而 ABE 产量反而增加的矛盾,故进一步对 PEG6000 作用下 *C. acetobutylicum* 的生长动力学进行研究。利用 Verhulst-Pearl 等提出的经典 Logistic 方程,对在不同质量分数 PEG6000 条件下的丙酮丁醇梭菌分批发酵过程中菌体生长变化的规律进行研究。最高菌体质量浓度随着 PEG6000 质量分数的增加而降低(表 2),利用 Origin 8.5 软件对各种条件下的菌体生长实验结果进行拟合,丙酮丁醇梭菌生长拟合曲线如图 8 所示。结果表明,在不同质量分数 PEG6000 条件下,利用 Logistic 方程均可较好地模拟 *C. acetobutylicum* 的生长状况,利用非线性回归方程和方差分析结果得到的 R^2 值均较高,如表 2 所示。这说明 Logistic 模型可以较好地用于预测 PEG6000 存在条件下丙酮丁醇梭菌的生长动态过程。

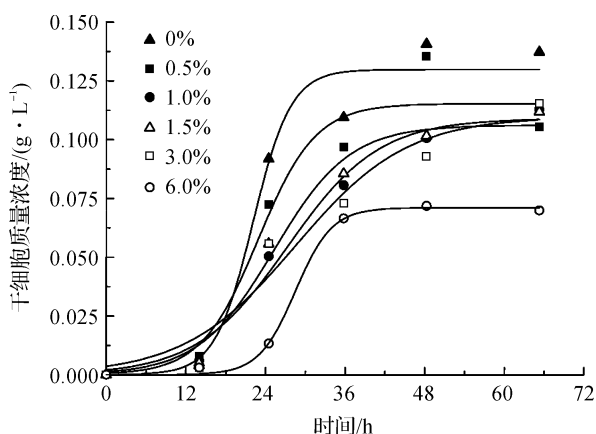


图 7 不同质量分数 PEG6000 对丙酮丁醇梭菌生物量积累的影响

Fig. 7 Effect of different concentrations of PEG6000 on biomass accumulation of *C. acetobutylicum*

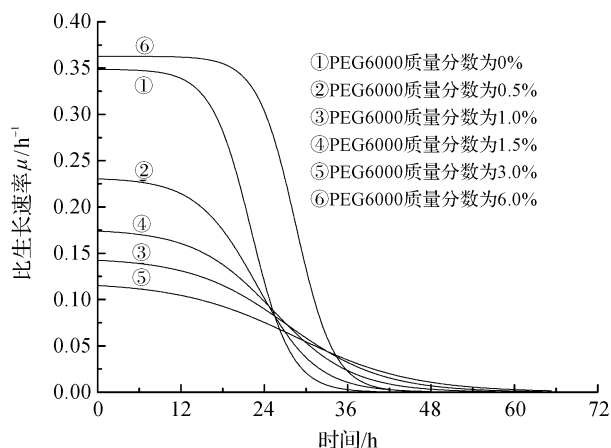


图 8 不同质量分数 PEG6000 对丙酮丁醇梭菌比生长速率的影响

Fig. 8 Effects of different concentrations of PEG6000 on specific growth rate of *C. acetobutylicum*

表 2 不同质量分数 PEG6000 条件下菌体生长动力学参数

Table 2 Growth kinetic parameters of biomass under different concentrations of PEG 6000

PEG 质量分数/%	最高菌体质量浓度 $X_{\max}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	最高比生长速率 μ_{\max}/h^{-1}	相关系数 R^2
0	0.130	0.349	0.953 81
0.5	0.115	0.232	0.919 31
1.0	0.109	0.145	0.977 38
1.5	0.106	0.176	0.974 07
3.0	0.110	0.120	0.923 80
6.0	0.071	0.363	0.997 59

进一步地,对不同质量分数 PEG6000 条件下,丙酮丁醇梭菌的比生长速率进行计算分析。由图 8 可知,随着培养时间的延长,比生长速率逐渐降低,最大比生长速率大致随着 PEG6000 质量分数的增加而增加,奇怪的是在 6.0% 的质量分数下,该菌具有最高的最大比生长速率,而且能够维持较长一段时间的

最高比生长速率,但是并不能获得最高的菌体质量浓度,这也可能有助于解释在添加 PEG6000 质量分数高达 6.0%的剂量下,ABE 及总溶剂产量反而很高的原因(图 6)。因此,采用合理的工艺条件对丙酮丁醇梭菌的比生长速率进行调控,有助于调控 ABE 的产量。

3 结 语

Tween-80 和 PEG6000 对丙酮丁醇梭菌的最大菌体质量浓度和最高比生长速率均具有抑制作用,且质量分数越高抑制作用越明显。在 Tween-80 和 PEG6000 质量分数分别小于 1.0%和 0.5%的条件下,均能显著增强丙酮丁醇梭菌发酵产 ABE 能力。

参考文献:

- [1] RANJAN A, MOHOLKAR V S. Biobutanol: science, engineering, and economics[J]. International Journal of Energy Research,2012, 36(3): 277.
- [2] EZEJI T C, QURESHI N, BLASCHEK H P. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors[J]. Current Opinion in Biotechnology,2007, 18(3): 220.
- [3] GARCÍA V, PÄKKILÄ J, OJAMO H, et al. Challenges in biobutanol production: how to improve the efficiency? [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews,2011, 15(2): 964.
- [4] PEREIRA L G, DIAS M, MARIANO A P, et al. Economic and environmental assessment of n-butanol production in an integrated first and second generation sugarcane biorefinery: fermentative versus catalytic routes[J]. Applied Energy,2015, 160: 120.
- [5] BROWN T R. A techno-economic review of thermochemical cellulosic biofuel pathways[J]. Bioresource Technology, 2015, 178: 166.
- [6] MORONE A, PANDEY R A. Lignocellulosic biobutanol production: gridlocks and potential remedies [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews,2014, 37(3): 21.
- [7] KUMAR M, GAYEN K. Developments in biobutanol production: new insights[J]. Applied Energy,2011, 88(6): 1999.
- [8] GOTTUMUKKALA L D, PARAMESWARAN B, VALAPPIL S K, et al. Biobutanol production from rice straw by a non acetone producing *Clostridium sporogenes* BE01[J]. Bioresource Technology,2013, 145(19): 182.
- [9] DUSSÉAUX S, CROUX C, SOUCAILLE P, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture [J]. Metabolic Engineering,2013, 18(1): 1-8.
- [10] SIPOS B, DIENES D, SCHLEICHER Á, et al. Hydrolysis efficiency and enzyme adsorption on steam-pretreated spruce in the presence of poly (ethylene glycol)[J]. Enzyme and Microbial Technology,2010, 47(3): 84.
- [11] ELSAMADONY M, TAWFIK A, SUZUKI M. Surfactant-enhanced biohydrogen production from organic fraction of municipal solid waste (OFMSW) via dry anaerobic digestion[J]. Applied Energy,2015, 149: 272.
- [12] ZHANG Q, HE G, WANG J, et al. Mechanisms of the stimulatory effects of rhamnolipid biosurfactant on rice straw hydrolysis[J]. Applied Energy,2009, 86(11): S233.
- [13] 席琳乔, 吴书奇, 马春晖. 非离子表面活性剂 PEG 对棉秆木质纤维素酶解的影响[J]. 农业工程学报,2012, 28(23): 176.
- [14] LIN X, QIU X, ZHU D, et al. Effect of the molecular structure of lignin-based polyoxyethylene ether on enzymatic hydrolysis efficiency and kinetics of lignocelluloses[J]. Bioresource Technology,2015, 193: 266.
- [15] 孙付保, 娄秀平, 洪嘉鹏, 等. 非离子表面活性剂对木质纤维素酶解的促进作用[J]. 化工进展,2011, 30(12): 2719.
- [16] 姚日生, 邓胜松, 齐本坤, 等. Tween80 对稻草水解及同步糖化与发酵产乳酸的影响[J]. 精细化工,2008, 25(2): 155.
- [17] MILLER G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426.

- [18] THANG V H, KOBAYASHI G. A novel process for direct production of acetone-butanol-ethanol from native starches using granular starch hydrolyzing enzyme by *Clostridium saccharoperbutyl acetonicum* N1-4[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(4): 1818-31.
- [19] ECKARD A D, MUTHUKUMARAPPAN K, GIBBONS W. The role of polymeric micelles on chemical changes of pretreated corn stover, cellulase structure, and adsorption[J]. BioEnergy Research, 2014, 7(1): 389.
- [20] SHA R, MENG Q, JIANG L. The addition of ethanol as defoamer in fermentation of rhamnolipids[J]. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2012, 87(3): 368-369.
- [21] 侯同刚, 张跃冬, 陈秀芳, 等. 非离子表面活性剂对生物丁醇发酵的影响[J]. 生物工程学报, 2014, 30(5): 784.
- [22] 陈敏, 郭倩, 姚善泾. 白腐菌 *Pleurotus eryngii*-Co007 产木质素降解酶条件的优化[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(1): 7.
- [23] CAO S, AITA G M. Enzymatic hydrolysis and ethanol yields of combined surfactant and dilute ammonia treated sugarcane bagasse[J]. Bioresource Technology, 2013, 131(3): 357.
- [24] HAHN-HÄGERDAL B, JÖNSSON B, LOHMEIER-VOGEL E. Shifting product formation from xylitol to ethanol in pentose fermentations using *Candida tropicalis* by adding polyethylene glycol (PEG)[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1985, 21(3): 173.
- [25] 杨影, 张龙云, 史仲平. 添加表面活性剂改善丁醇萃取发酵性能[J]. 生物加工过程, 2008, 6(4): 25.
- [26] DHAMOLE P B, WANG Z, LIU Y, et al. Extractive fermentation with non-ionic surfactants to enhance butanol production[J]. Biomass and Bioenergy, 2012, 40(10): 118-119.
- [27] BANIK R M, SANTHIAGU A, KANARI B, et al. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two-phase systems[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19(4): 337-338.
- [28] LI C, OUYANG F, BAI J. Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a polyethylene glycol/MgSO₄ · 7H₂O aqueous two-phase system to produce nisin[J]. Biotechnology Letters, 2000, 22(10): 843.
- [29] HAHN-HÄGERDAL B, LARSSON M, MATTIASSON B. Shift in metabolism towards ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* using alterations of the physical-chemical microenvironment[D]. Lund: Lund University, 1982.