

萃取耦合技术对玉米秸秆水解液发酵产丁醇的影响

王风芹, 程翔, 谢慧, 张瑞, 李传斌, 宋安东

河南农业大学生命科学学院 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 河南 郑州 450002

王风芹, 程翔, 谢慧, 等. 萃取耦合技术对玉米秸秆水解液发酵产丁醇的影响. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1515-1526.

Wang FQ, Cheng X, Xie H, et al. Butanol production from corn stover hydrolysate with in-situ liquid-liquid extraction. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1515-1526.

摘要: 本研究以玉米秸秆水解液为原料, 通过萃取发酵技术生产燃料丁醇, 以提高丁醇产量, 降低生产成本。通过对萃取剂的筛选与条件优化, 确定纤维丁醇发酵的萃取剂为油醇, 添加时间为发酵 0 h, 添加比例为 1:1 (V/V)。该条件下发酵 32 g/L 糖浓度的玉米秸秆水解液, 丁醇和总溶剂产量分别为 3.28 g/L 和 4.72 g/L, 比对照分别提高 958.1% 和 742.9%。以 D301 树脂脱毒后 5% 总糖浓度的玉米秸秆水解液进行丁醇萃取发酵, 丁醇和总溶剂产量分别达到 10.34 g/L 和 14.72 g/L, 发酵得率为 0.31 g/g, 与混合糖发酵结果相当。研究结果表明萃取发酵技术能够显著提高原料的利用率和丁醇产量, 为纤维丁醇工业化生产提供了技术支持。

关键词: 玉米秸秆, 丁醇发酵, 萃取, 脱毒

Butanol production from corn stover hydrolysate with in-situ liquid-liquid extraction

Fengqin Wang, Xiang Cheng, Hui Xie, Rui Zhang, Chuanbin Li, and Andong Song

Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: Butanol production from corn stover hydrolysates (CSH) with in-situ liquid-liquid extraction was studied to enhance the production and reduce the fermentation cost. Oleyl alcohol was selected as the suitable solvent and added at the initial fermentation time with the ratio of 1:1 (oleyl alcohol: fermentation broth, V/V). Under this condition, butanol and ABE from CSH with 32.1 g/L total sugars were 3.28 and 4.72 g/L, which were 958.1% and 742.9% higher than those of the controls, respectively. Butanol and ABE production from CSH of 49.7 g/L total sugars after detoxification by ion exchange

Received: June 27, 2013; **Accepted:** September 23, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21206033).

Corresponding author: Andong Song. Tel/Fax: +86-371-63558810; E-mail: song1666@126.com

国家自然科学基金 (No. 21206033) 资助。

resin D301 coupled with extraction fermentation were 10.34 g/L and 14.72 g/L with an ABE yield of 0.31 g/g (g ABE/g utilized sugar), which were equal to those of glucose and xylose mixture fermentation. The detoxification and extraction fermentation technology of cellulosic butanol production would provide a crucial technical support to the industrialized production of cellulosic butanol.

Keywords: corn stover, butanol production, in-situ liquid-liquid extraction, detoxification

近年来,随着能源危机和环境问题的日益加重,寻找廉价的可替代能源迫在眉睫。丁醇因具有性质更接近烃类、与汽油的配伍性好、能量密度与燃烧值高、腐蚀性小等优点,在混合汽油燃料方面性能优于乙醇^[1-4],其发酵越来越受到研究者的重视。然而,由于发酵过程中产物丙酮 (Acetone)、丁醇 (Butanol) 和乙醇 (Ethanol) (ABE, 又称总溶剂) 对微生物的生长代谢产生抑制,使得发酵液中总溶剂浓度一般维持在 23 g/L 以下,其中丁醇一般不超过 13 g/L^[5]。将萃取 (Extraction)^[6]、气提 (Gas stripping)^[7]、吸附 (Adsorption)^[8] 和渗透汽化 (Pervaporation)^[9-10] 等产物分离技术与发酵过程相耦合,可以使产物快速连续地移出发酵液,减少产物抑制现象,从而提高发酵产率,降低产物分离提纯成本^[11]。萃取与其他分离技术相比,优点在于常温操作,节省能源,不涉及固体、气体,操作方便^[12]。Tanaka 等^[13]以十二烷醇和油醇两种萃取剂分批发酵,丁醇产量最高达到 20.1 g/L。Li 等^[14]用生物柴油分批萃取发酵,丁醇和总溶剂的产量分别从 11.6 和 20.0 g/L 提高到 16.5 和 29.9 g/L。Bankar 等^[15]设计了利用甘蔗渣固定化细胞的两级萃取发酵装置,生产强度最高可达 2.5 g/(L·h)。

传统的丙酮丁醇发酵主要以淀粉、糖蜜等为原料,原料成本占发酵总成本的 60%以上,成为影响生物丁醇价格的主要因素之一^[16]。利

用木质纤维素原料生产燃料丁醇可以降低发酵原料成本,提高市场竞争力^[17]。虽然丁醇萃取发酵自上世纪 80 年代被提出后经历了 20 多年的发展,但很少有将萃取技术应用于纤维丁醇发酵的研究报道。文中以玉米秸秆水解液 (Corn stover hydrolysates, CSH) 为原料,进行纤维丁醇萃取发酵研究,以实现产物分离与发酵过程相耦合,提高丁醇产率,降低生产成本,以期纤维丁醇工业化生产提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌种

丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* CICC8016, 购自中国食品与发酵工业研究所。

1.2 培养基

5%玉米醪培养基:玉米粉加少许水调制成糊状,慢慢倒入沸水中,并不断搅拌,煮 15~20 min。将制成的浆糊状玉米醪装入 18 mm×180 mm 试管 (9 mL/支) 和三角瓶 (总容积约 130 mL,装液量 100 mL) 中,121 °C 灭菌 30 min。

玉米秸秆水解液培养基:称取一定量 10 目的玉米秸秆粉,按照液固比 8:1 (V/W) 加入 1% 的稀硫酸,121 °C 预处理 1 h,后用 10 mol/L 氢氧化钠调整 pH 至 4.8,每克干物料加入纤维素酶 15 FPU、木聚糖酶 200 U,48 °C、120 r/min 糖化 48 h,过滤后即得玉米秸秆水解液。水解液用氢氧化钠调整 pH 至 7.0,添加酵母浸粉

0.1 g/L, 115 °C 灭菌 15 min。灭菌的玉米秸秆水解液冷却后, 加入 10 mL/L 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤的缓冲液^[18]。

补料糖化水解液的制备: 玉米秸秆开始糖化后, 每 12 h 补预处理后水洗烘干的物料 5 g, 共 4 次, 每补两次物料同时补加一次酶 (纤维素酶与木聚糖酶添加量分别为 15 FPU/g 和 200 U/g), 结束糖化后用布氏漏斗经水循环真空泵抽滤, 除去秸秆残渣, 得到玉米秸秆水解液。

P2 培养基: 50 g/L 葡萄糖, 0.1 g/L 酵母浸粉, 115 °C 灭菌 15 min, 冷却后加入 10 mL/L 缓冲液。

1.3 萃取剂

正辛醇、邻苯二甲酸二甲酯 (分析纯, 购自天津市盛奥化学试剂有限公司); 苯甲酸苄酯、十二醇、十四醇 (化学纯, 购自国药集团化学试剂有限公司); 油醇 (工业级, 购自 Aladdin Industrial Corporation); 生物柴油 (本实验室制备; 将菜籽油中加入摩尔比 6:1 的甲醇, 同时以质量比 1:2 加入共溶剂正己烷, 加入菜籽油质量 1% 的 NaOH 作催化剂, 60 °C、400 r/min 处理 2 h 后冷却静置分层, 上层液体即为生物柴油^[19])。

1.4 生物柴油前处理

生物柴油制备后需要水洗才可以使用。在 500 mL 三角瓶中加入 150 mL 生物柴油和 150 mL 蒸馏水, 于 220 r/min、30 °C 摇床中振荡混合 2 h, 取出后静置分层, 最后用分液漏斗进行油水分离, 油相作为萃取剂备用^[20]。

1.5 水解液脱毒

1.5.1 离子交换树脂脱毒

离子交换树脂 D301 购自安徽三星树脂科技

有限公司。使用前经去离子水水洗、氢氧化钠碱洗、盐酸酸洗和水洗等步骤交替清洗活化和再生回用, 预处理后的树脂浸泡于去离子水中, 并装入 100 mL 蓝盖瓶中保存 (具体操作步骤见 GB/T 5476-1996)。

在 500 mL 三角瓶中加入预处理后的 D301 树脂 100 g 和玉米秸秆水解液 300 mL, 30 °C、180 r/min 处理 1 h 后用中速定性滤纸 (d=15 cm) 进行过滤, 滤液即为脱毒后的玉米秸秆水解液。

1.5.2 油醇萃取脱毒

在 500 mL 三角瓶中加入玉米秸秆水解液和油醇各 150 mL, 48 °C、120 r/min 振荡萃取 3 h, 取出后置于分液漏斗中静置分层、油水分离后测定水相中糖和抑制物含量, 并利用萃取脱毒后的水解液进行丁醇分批发酵。

1.6 菌种活化和种子液的制备

菌种活化: 取玉米醪试管菌种, 以 10% (V/V) 接种量接种到 5% 玉米醪试管培养基中, 经 100 °C 水浴热激 80 s 后急速用水冷却, 37 °C 静置培养 48 h。

种子液的制备: 取活化后的玉米醪试管, 以体积分数 10% 接种量接种到 5% 玉米醪培养基中 (300 mL 三角瓶, 总容积约 500 mL, 每瓶装液量 300 mL, 以透气塑料封瓶膜封口, 未进行充氮气等除氧处理), 37 °C 静置培养 24 h。

1.7 萃取剂分离系数的测定

在 300 mL 三角瓶中加入 100 mL 蒸馏水, 添加 2 g 丁醇、1 g 丙酮、0.3 g 乙醇、0.2 g 丁酸、0.2 g 乙酸、50 mL 萃取剂, 置于 37 °C、150 r/min 条件下处理 48 h, 测定水相中各组分的浓度并计算萃取剂的分离系数^[14]。

1.8 生物相容性试验

灭菌后的萃取剂分别与 P2 培养基以 0.2:1 的体积比加入到 100 mL 三角瓶中 (总容积约 130 mL, 装液量 100 mL), 形成互不相容的稳定的两相体系。以 10% 的接种量向下层水相 P2 培养基中接入活化的菌种, 37 °C 静置培养。每 8 h 取样, 用分光光度计测量 600 nm 下菌液 OD 值, 制作 48 h 内的菌体生长曲线^[21]。

1.9 丁醇萃取发酵

将萃取剂和培养基分别于 115 °C 灭菌 15 min 后按比例混合, 以体积分数 10% 接种量接入菌种至 300 mL 三角瓶中 (总容积约 500 mL, 装液量 300 mL), 保持对照与实验组中总装液量一致, 37 °C 静置培养。发酵过程中分别取发酵液相和萃取剂相 2 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液保存于 -20 °C 冰箱中, 待测其中总溶剂 (丙酮、丁醇和乙醇) 和残糖含量。

1.10 测定方法

总溶剂测定: 采用 Agilent 7890A 高效气相色谱仪, HP-FFAP (30 m×0.32 mm×1 μm) 色谱

$$\text{萃取产量 (g/L)} = \frac{\text{发酵液中产物的浓度} \times \text{发酵液体积} + \text{萃取相产物的浓度} \times \text{萃取剂体积}}{\text{发酵液体积}}$$

$$\text{溶剂产生速率 (g/(L·h))} = \frac{\text{发酵终点总溶剂浓度} - \text{初始总溶剂浓度}}{\text{发酵时间}}$$

$$\text{发酵得率 (g/g)} = \frac{\text{发酵产生总溶剂质量}}{\text{消耗的总糖质量}}$$

2 结果与分析

2.1 萃取剂的选择

2.1.1 萃取剂分配系数的测定

7 种萃取剂对丙酮、丁醇、乙醇、乙酸和丁酸的分配系数见表 1。丁醇分配系数 (萃取能力)

柱, FID 检测器 (250 °C); 进样量 0.2 μL, 进样器温度 200 °C; N₂ 1.5 mL/min, H₂ 30 mL/min, 空气 350 mL/min; 柱箱升温程序: 45 °C 保持 1 min, 以 10 °C/min 升温至 55 °C, 保持 1 min, 再以 15 °C/min 升温至 80 °C, 保持 0.5 min, 最后以 20 °C/min 升温至 120 °C, 保持 1 min。

残糖测定: Dionex P680 高效液相色谱仪, 离子排斥色谱柱 Aminex HPx-87H, 示差折光检测器, 流动相为 0.005 mol/L H₂SO₄ (pH=2.0), 流速 0.6 mL/min, 柱温 55 °C。

抑制物测定: 采用 Waters 2695 高效液相色谱仪 (HPLC), Waters Sunfire C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm), Waters 2996 二极管矩阵检测器。流动相: A: 1% 乙酸, B: 甲醇, 梯度洗脱: 0~15 min, 72% A; 15~35 min, 53% A。流速: 0.6 mL/min, 柱温: 30 °C, 检测波长: 280 nm, 进样量: 10 μL。

1.11 分配系数、萃取效率、萃取强度、溶剂产生速率和萃取产量的计算

$$\text{分配系数 (K)} = \frac{\text{总浓度} - \text{水相中浓度}}{\text{水相中浓度}}$$

$$\text{丁醇萃取效率 (\%)} = \frac{\text{萃取相丁醇质量}}{\text{丁醇总质量}} \times 100\%$$

由高到低依次为: 正辛醇 (1-Octanol)、十二醇 (1-Dodecanol)、十四醇 (1-Tetradecanol)、油醇 (Oleyl alcohol)、苯甲酸苄酯 (Benzyl-benzoate)、生物柴油 (Biodiesel) 和邻苯二甲酸二甲酯 (Dimethyl phthalate), 且对丁醇分配系数较高的萃取剂对丁酸的萃取效果也明显较好。苯甲酸苄酯、十二醇和十四醇的熔点分别为 21 °C、

表 1 7 种萃取剂对丁醇发酵液组分的分配系数

Table 1 Distribution coefficients of 7 extractants for the components of butanol fermentation production

Extractants	Distribution coefficient				
	Butanol	Acetone	Ethanol	Acetic acid	Butyric acid
1-octanol	9.16	2.66	1.21	0.46	4.17
Dimethyl phthalate	1.08	0.96	0.00	0.10	1.09
Biodiesel	1.50	1.63	0.36	0.00	1.33
Oleyl alcohol	3.75	1.23	0.86	0.22	1.97
Benzyl benzoate	1.62	1.96	1.34	0.00	1.40
1-dodecanol	4.71	1.42	1.17	0.29	3.16
1-tetradecanol	4.63	2.26	1.47	0.47	2.73

24 °C 和 38 °C，在常温下容易凝固不利于后续操作；邻苯二甲酸二甲酯对丁醇的分配系数只有 1.08，相对较低。因此选用正辛醇、生物柴油和油醇 3 种萃取剂进行后续的发酵研究。

2.1.2 萃取剂生物相容性试验

萃取剂的生物相容性实验结果见图 1。生物柴油和油醇作为萃取剂，菌体生长量远高于对

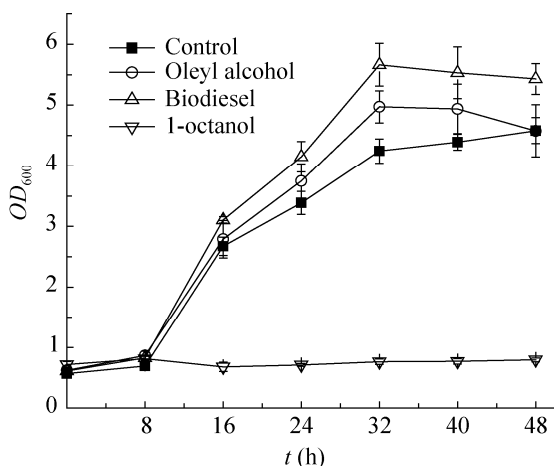


图 1 添加三种萃取剂对丙酮丁醇梭菌菌体生长的影响

Fig. 1 Growth curves of *C. acetobutylicum* CICC 8016 with oleyl alcohol, biodiesel or 1-octanol as extractant.

照，而以正辛醇作为萃取剂的处理，菌体基本没有生长，表明正辛醇对菌体毒性较大，即生物相容性较差。因此选用生物柴油和油醇作为萃取剂进行丁醇萃取发酵。

2.1.3 玉米秸秆水解液丁醇萃取发酵

将生物柴油和油醇以 0.2:1 的比例添加到玉米秸秆水解液培养基中进行萃取发酵，发酵结果见图 2。未加萃取剂的对照 (图 2A) 和以生物柴油 (图 2B) 作为萃取剂的处理丁醇和总溶剂产量均于发酵 48 h 达到最高，其中对照的丁醇和总溶剂产量分别为 0.31 g/L 和 0.56 g/L，生物柴油作为萃取剂的处理丁醇和总溶剂产量分别达到 0.55 g/L 和 1.00 g/L。以油醇作为萃取剂的处理在发酵 84 h 时丁醇和总溶剂产量达到最高，分别为 2.05 g/L 和 2.83 g/L (图 2C)，比对照分别提高 561.3% 和 405.4%。从萃取效率来看，添加油醇的发酵萃取效率 (71.2%) 是添加生物柴油 (23.6%) 的 3 倍。

未加萃取剂的对照、以生物柴油和油醇作为萃取剂的处理葡萄糖利用率分别为 53.9%、61.3% 和 98.9%，木糖利用率分别为 12.4%、

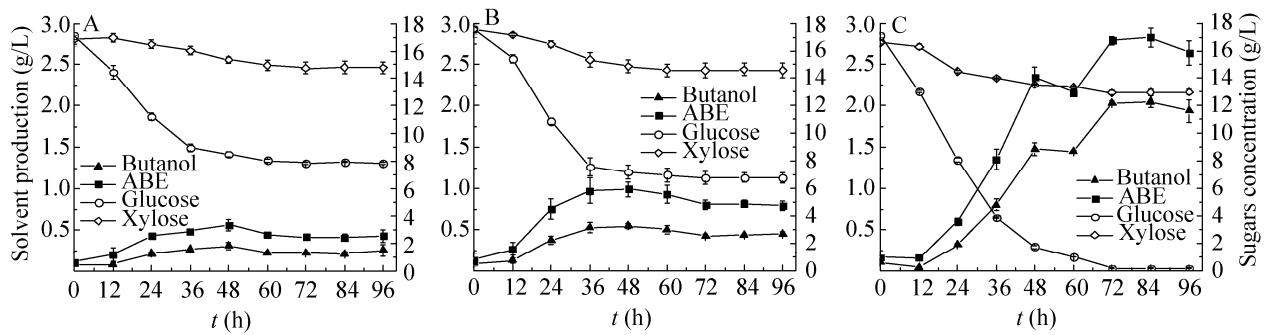


图 2 添加生物柴油和油醇的丁醇萃取发酵结果(A 为无萃取发酵, B 为生物柴油萃取发酵, C 为油醇萃取发酵)
Fig. 2 Butanol fermentation from CSH with biodiesel or oleyl alcohol as extractant. (A) Control. (B) Biodiesel extraction fermentation. (C) Oleyl alcohol extraction fermentation.

16.9%和 22.0%。以生物柴油和油醇作为萃取剂的处理总溶剂发酵得率分别为 0.047 g/L 和 0.138 g/g, 比对照的 0.028 g/g 分别提高了 67.9% 和 392.9%。

由于水解液中抑制物的影响, 使得传统纤维丁醇发酵效果较差^[22], 糖的利用率和溶剂的产率都较低。通过萃取发酵可以显著提高溶剂产量, 而油醇的萃取效果要明显优于生物柴油。相对于生物柴油而言, 油醇对于葡萄糖和木糖

的利用起到明显的促进作用。综合考虑这两方面因素, 在进一步优化萃取发酵条件过程中, 主要以油醇作为萃取剂进行试验。

2.2 玉米秸秆水解液丁醇萃取发酵条件优化

2.2.1 油醇添加时间对丁醇萃取发酵的影响

设置 0 h、24 h 和 48 h 三个时间点研究油醇添加时间对玉米秸秆水解液丁醇发酵的影响, 发酵 72 h 后测定发酵液和萃取剂中的丙酮、丁醇和乙醇的产量及残糖的浓度, 结果见表 2。萃

表 2 油醇添加时间对丁醇萃取发酵的影响

Table 2 Butanol fermentation with oleyl alcohol as extractant added at different fermentation time

		Adding time		
		0 h	24 h	48 h
Acetone (g/L)	Aqueous phase	0.64±0.13	0.62±0.18	0.32±0.02
	Oil phase	0.19±0.01	0.22±0.01	0.11±0.01
Ethanol (g/L)	Aqueous phase	0.10±0.04	0.05±0.01	0.02±0.01
	Oil phase	0.02±0.01	0.03±0.01	0.01±0.00
Butanol (g/L)	Aqueous phase	1.58±0.16	1.37±0.06	0.40±0.05
	Oil phase	4.33±0.31	3.84±0.20	1.88±0.23
Residual glucose (g/L)		1.56±0.04	4.68±0.25	4.94±0.05
Residual xylose (g/L)		10.67±0.23	12.97±0.13	9.06±0.45
Total ABE (g/L)		2.47±0.40	2.11±0.54	1.14±0.09
Total butanol (g/L)		1.69±0.24	1.39±0.32	0.78±0.09

取发酵的丁醇和总溶剂产量及葡萄糖和木糖的利用率均随油醇添加时间的延迟而逐渐降低, 发酵 48 h 后添加油醇的处理总溶剂产量仅为 1.14 g/L。因此萃取发酵油醇的添加时间为发酵 0 h。

2.2.2 油醇添加比例对丁醇萃取发酵的影响

油醇添加比例对丁醇发酵的影响见表 3。随着油醇添加比例的增加, 总溶剂和丁醇的产量也不断增加, 体积比为 1:1 时丁醇和总溶剂的产量分别为 3.28 g/L 和 4.72 g/L。同时, 糖的利用率从体积比 0.1:1 时总糖利用率的 58% 提高到体积比 1:1 时的 74.8% (表 3)。

2.3 脱毒-萃取丁醇发酵

玉米秸秆水解液经 D301 树脂脱毒后, 以油醇:发酵液为 0.2:1 (V/V) 的比例进行萃取发酵研究, 结果见表 4。经脱毒后的丁醇萃取发酵产量 (丁醇 3.48 g/L, 总溶剂 4.74 g/L) 远高于直接萃取发酵结果 (丁醇 1.61 g/L, 总溶剂 2.51 g/L),

但低于脱毒后直接发酵的结果 (丁醇 4.65 g/L, 总溶剂 6.9 g/L)。玉米秸秆水解液脱毒后进行萃取发酵的处理葡萄糖和木糖利用率与脱毒但非萃取发酵处理相当, 均在 99% 以上。萃取发酵产量较低的原因可能是因为糖浓度较低, 使萃取发酵的优势没充分体现; 同时萃取发酵过程可能将部分丁酸萃取到油相中导致溶剂产量减少。因此, 有必要进行高浓度水解糖条件下的丁醇萃取发酵研究。

利用补料糖化方法将水解液中糖浓度提高并经 D301 树脂脱毒 (29.6 g/L 葡萄糖, 19.4 g/L 木糖), 油醇:发酵液为 1:1 (V/V) 的比例添加进行丁醇萃取发酵研究。发酵 96 h 后丁醇和总溶剂产量分别达到 10.34 g/L 和 14.72 g/L (如图 3), 葡萄糖和木糖的利用率分别为 99.5% 和 92.8%。与低浓度水解糖的萃取发酵相比, 总溶剂发酵得率从 0.18 g/g 提高到 0.31 g/g。

表 3 油醇添加比例对玉米秸秆水解液丁醇萃取发酵的影响

Table 3 CSH Butanol fermentation with different amount of oleyl alcohol as extractant

		Adding ratio (Oleyl alcohol/broth)			
		0.1:1	0.2:1	0.5:1	1:1
Acetone (g/L)	Aqueous phase	0.57±0.04	0.75±0.01	0.65±0.1	1.00±0.00
	Oil phase	0.18±0.04	0.14±0.02	0.14±0.01	0.23±0.03
Ethanol (g/L)	Aqueous phase	0.09±0.01	0.12±0.00	0.52±0.02	0.18±0.00
	Oil phase	0.02±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01
Butanol (g/L)	Aqueous phase	0.82±0.06	0.88±0.03	0.47±0.08	0.54±0.01
	Oil phase	3.76±0.08	3.58±0.06	3.03±0.11	2.75±0.09
Residual glucose (g/L)		3.22±0.15	1.52±0.02	0.79±0.02	0.36±0.02
Residual xylose (g/L)		10.26±0.25	9.87±0.02	8.57±0.1	7.74±0.11
Total ABE (g/L)		1.82±0.04	2.51±0.00	2.80±0.26	4.72±0.11
Total butanol (g/L)		1.19±0.07	1.61±0.02	1.96±0.13	3.28±0.08

*Initial glucose and xylose were 16.8 g/L and 15.3 g/L, respectively.

表 4 D301 树脂脱毒后添加油醇萃取丁醇发酵结果

Table 4 Butanol production from CSH with detoxification-extraction technology

		Detoxification with D301	Extraction fermentation with oleyl alcohol	Detoxification with D301 + Extraction fermentation with oleyl alcohol
Initial sugars	Glucose (g/L)	13.10±0.06	16.80±0.12	13.1±0.03
	Xylose (g/L)	11.60±0.28	15.30±0.03	11.8±0.05
Acetone (g/L)		1.75±0.28	0.77±0.01	1.07±0.26
Ethanol (g/L)		0.51±0.09	0.13±0.00	0.18±0.03
Butanol (g/L)		4.65±0.98	1.61±0.02	3.48±1.00
Total ABE (g/L)		6.90±1.37	2.51±0.00	4.74±1.29
Glucose utilization (%)		99.4	90.9	99.2
Xylose utilization (%)		99.1	35.6	99.1
ABE productivity (g/(L·h))		0.09	0.04	0.06
ABE yield (g/g)		0.26	0.12	0.18

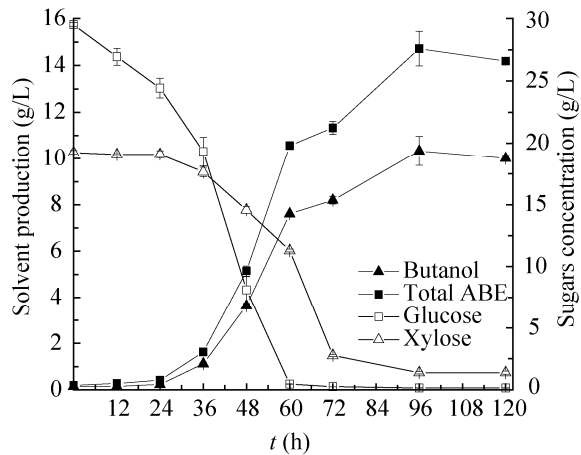


图 3 高浓度水解糖 D301 树脂脱毒后油醇萃取发酵结果

Fig.3 Butanol fermentation of high hydrolysed sugars with detoxification-extraction technology (extractant: fermentation broth=1:1)

表 5 所示为萃取发酵、脱毒-萃取发酵与纯糖发酵结果对比。3.2%糖浓度的玉米秸秆水解液丁醇萃取发酵过程中木糖利用率 (49.4%)、丁醇和总溶剂产量均显著低于 3%混合糖丁醇发酵结果。5.7%糖浓度 (补料糖化) 的玉米秸秆水解液经 D301 脱毒处理后进行丁醇发酵, 丁醇和总溶剂的产量分别为 7.87 和 11.4 g/L, 葡萄糖和木糖的利用率分别为 98.1%和 60.2%。采用脱毒-萃取联合技术进行丁醇发酵, 丁醇和总溶剂的产量分别达到 10.34 和 14.72 g/L; 木糖的利用率由混合糖的 74.9%提高至 92.8%, 总溶剂得率 (0.31 g/g) 与混合糖丁醇发酵 (0.33 g/g) 相当; 总溶剂产生速率为 0.15 g/(L·h), 略低于混合糖发酵的 0.16 g/(L·h)。表明脱毒-萃取联合技术可以显著提高纤维丁醇发酵的效果。

表 5 油醇萃取发酵与混合糖发酵动力学参数

Table 5 Kinetic parameters of oleyl alcohol extractive fermentation compared to sugar mixture fermentation

Methods	Sugar concentration (g/L)	Butanol (g/L)	Total ABE (g/L)	Glucose utilization (%)	Xylose utilization (%)	ABE yield (g/g)	ABE productivity (g/(L·h))
CSH extraction fermentation*	32.1	3.28±0.11	4.72±0.08	97.9	49.4	0.20	0.07
Mixture sugars fermentation (Glucose:xylose=1:1) [#]	27.3	5.26±0.09	7.79±0.18	99.7	99.8	0.29	0.11
CSH detoxification-extraction fermentation*	49.7	10.34±0.63	14.72±0.74	99.5	92.8	0.31	0.15
CSH detoxification fermentation	56.9	7.87±0.29	11.4±0.38	98.1	60.2	0.24	0.13
Mixture sugar fermentation (Glucose:xylose=1.5:1) [#]	53.7	11.01±0.34	16.02±0.62	100.0	74.9	0.33	0.16

*The adding ratio of extraction fermentation was 1:1 (V/V). [#]Using the mixture of chemically pure glucose and xylose as carbon source.

3 讨论

本文以玉米秸秆水解液为底物对木质纤维素原料的脱毒与丁醇萃取发酵进行了系统性研究。与传统丁醇发酵相比, 试验中添加油醇的萃取发酵效果显著, 总糖浓度在 32.1~56.9 g/L 的油醇萃取发酵均可增加丁醇产率, 提高底物利用率。分析其原因发现, 大多数有机溶剂能够吸附水解液中部分抑制物, 降低其对发酵的抑制作用。如以乙醚、乙酸乙酯、乙酰乙酸乙酯以及丙酮这 4 种有机挥发性溶剂作为脱毒萃取剂, 可以去除玉米秸秆蒸汽爆破后产生的醛类和酚类抑制物^[23]; 而利用一些油性萃取剂, 如三烷基胺、正辛醇和煤油等也有类似作用。朱均均等^[24]利用络合萃取剂(三烷基胺、正辛醇和煤油)对玉米秸秆稀酸水解液进行脱毒试验, 对乙酸、糠醛和 5-HMF 的去除率分别达到 52.33%、100%和 27.78%。将玉米秸秆水解液和油醇按照 1:1 (V/V) 的比例进行混合, 于 48 °C、120 r/min 萃取 3 h 后进行油水分离, 测定水相中抑制物的含量, 结果表明水解液中糠

醛、5-羟甲基糠醛、香草醛和香豆酸的含量分别降低了 56.98%、12.93%、58.21%和 44.75%, 葡萄糖和木糖的损失率分别为 5.02%和 4.43% (表 6)。因此, 油醇萃取发酵过程中, 油醇不仅对丁醇起到萃取作用, 减少了产物对菌体生长的抑制; 同时对于玉米秸秆水解液中的部分抑制物也产生了萃取作用, 从这两方面使得发酵产量大幅度提高。

萃取脱毒后的水解液进行丁醇发酵, 丁醇和总溶剂产量于发酵的 48 h 达到最高, 分别为 0.80 和 1.31 g/L (图 4), 高于对照 (0.31 g/L 和 0.56 g/L) (图 2), 但远低于丁醇萃取发酵的产量 (发酵 72 h 时丁醇和总溶剂产量分别为 3.28 g/L 和 4.72 g/L) (表 3)。萃取脱毒丁醇发酵过程中葡萄糖和木糖的利用率分别为 70.9%和 30.0%, 高于对照的 53.9%和 12.4% (图 2), 但低于丁醇萃取发酵的 97.9%和 49.4% (表 3)。说明丁醇萃取发酵过程使萃取脱毒与萃取发酵相耦合, 不仅可以缩短丁醇发酵时间, 提高糖类利用率, 而且可以大幅度提高丁醇和总溶剂的发酵产量, 在生产上更具有操作和经济可行性。

表 6 油醇萃取脱毒对玉米秸秆水解液中糖及有毒物质的去除效率

Table 6 Removal ratio of sugars and microbial inhibitors from corn stover hydrolysate with oleyl alcohol extraction detoxification

	Sugars (g/L)		Microbial inhibitors (mg/L)			
	Glucose	Xylose	Furfural	5-HMF*	Vanillic aldehyde	Coumaric acid
CK	16.94±0.56	16.82±0.25	39.75±0.004	10.51±0.03	13.21±0.35	99.60±3.25
Detoxification	16.09±0.69	16.08±0.31	17.10±0.004	9.15±0.03	5.52±0.32	55.03±2.12
Removal rate (%)	5.02	4.43	56.98	12.93	58.21	44.75

* 5-HMF: 5-hydroxymethylfurfural. # Extraction detoxification with oleyl alcohol.

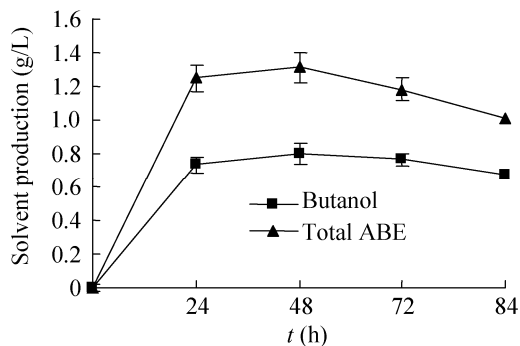


图 4 油醇萃取脱毒对玉米秸秆水解液丁醇发酵的影响

Fig. 4 Butanol fermentation from corn stover hydrolysate with oleyl alcohol extraction detoxification.

D301 树脂对水解液的脱毒过程可以使玉米秸秆水解液更好地应用于丁醇萃取发酵；同时在较高浓度的水解液（总糖浓度为 49.4 g/L）条件下，发酵产量（丁醇浓度 10.34 g/L）基本达到纯糖水平（总糖浓度 53.7 g/L，丁醇浓度 11.01 g/L），说明脱毒与萃取发酵技术联合使用具有一定的优势。但是，试验中玉米秸秆水解液初始糖浓度依然较低，丁醇产量低于淀粉、糖蜜类生物丁醇工业生产过程的发酵产量（丁醇产量为 13~14 g/L^[25]）。同时，在脱毒和萃取过程中存在的水解糖损失、树脂再利用成本较高、废水污染严重以及蒸馏油醇获得丁醇过程中能耗增加

的问题也不可避免。因此，尚需对如下问题进行深入研究：1) 进一步提高玉米秸秆水解液中可发酵糖类的含量，提高丁醇发酵性能；2) D301 树脂脱毒条件研究，通过较低的树脂使用量、较多的树脂使用次数减少废水排放和降低树脂购买成本；3) 油醇回用方式与回用次数研究，以降低油醇使用成本；4) 油醇萃取后发酵液的利用研究，充分利用高糖水解液中的可发酵糖类；5) 油醇蒸馏丁醇的生产成本研究，以现有技术设计蒸馏器，开发能耗较低的油醇-丁醇蒸馏设备。通过这些研究尽量减少脱毒萃取丁醇发酵过程的成本投入，突破现有的瓶颈，为纤维丁醇的工业化生产提供技术支持，推动纤维丁醇的发展。

4 结论

通过对萃取剂的筛选，得出油醇为玉米秸秆水解液丁醇萃取发酵过程的最适萃取剂。经过进一步对油醇添加时间和添加比例的优化，确定了油醇萃取丁醇发酵的最优条件为：发酵 0 h 添加油醇、添加比例 1:1 (V/V)，此时总溶剂产量为 4.72 g/L，丁醇产量为 3.28 g/L；与传统发酵过程相比二者产量分别提高 905.5% 和

881.4%；葡萄糖和木糖利用率分别为 97.9%和 49.4%。经过 D301 脱毒后 5%水解糖浓度进行油醇萃取发酵（油醇添加比例为 1:1），丁醇和总溶剂产量分别达到 10.34 g/L 和 14.72 g/L，发酵得率为 0.31 g/g。

REFERENCES

- [1] Liu Y, Liu HJ, Zhang JA, et al. Research progress in new biofuel. *Modern Chem Ind*, 2008, 28(6): 28–31 (in Chinese).
刘娅, 刘宏娟, 张建安, 等. 新型生物燃料-丁醇的研究进展. *现代化工*, 2008, 28(6): 28–31.
- [2] Qureshi N, Badal CS, Ronald EH, et al. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-Batch fermentation. *Biomass Bioener*, 2008(32): 168–175.
- [3] Wang FQ, Chu LR, Xie H, et al. Progress and prospective of cellulosic butanol biofuel. *Chin J Bioprocess Eng*, 2009, 7(1): 2–6 (in Chinese).
王风芹, 楚乐然, 谢慧, 等. 纤维燃料丁醇研究进展. *生物加工过程*, 2009, 7(1): 2–6.
- [4] Schwarz WH, Gapes R. Butanol-rediscovering a renewable fuel. *BioWorld Eur*, 2006, 1: 16–19.
- [5] Gao K, Li Y, Yang XS. The state art if view of influenciabile main factors in acetone-butanol fermentation and proposed solutions. *Biomass Chem Eng*, 2011, 2(45): 45–50 (in Chinese).
高凯, 李云, 杨秀山. 影响丙酮丁醇发酵的主要因素及解决方案的研究进展. *生物质化学工程*, 2011, 2(45): 45–50.
- [6] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(3): 220–227.
- [7] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. *Chem Record*, 2004, 4(5): 305–314.
- [8] Tong CC, Yang LR, Wu JP, et al. Progress of acetone-butanol fermentation coupled with separation. *Chem Ind Eng Prog*, 2008, 27(11): 1782–1788 (in Chinese).
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. *化工进展*, 2008, 27(11): 1782–1788.
- [9] Zhang PX. How pervaporation membrane separation technique mskes effect in production of fuel ethanol. *Mod Chem Ind*, 2008, 28(Suppl 2): 144–146 (in Chinese).
张鹏霞. 渗透汽化膜分离技术如何在燃料乙醇的生产中发挥作用. *现代化工*, 2008, 28(Suppl 2): 144–146.
- [10] Wang FQ, Cheng X, Xie H, et al. Progress in biobutanol production coupled with pervaporvaton. *Chem Bioeng*, 2013, 30(1): 1–6 (in Chinese).
王风芹, 程翔, 谢慧, 等. 渗透汽化技术在生物丁醇生产中的应用进展. *化学与生物工程*, 2013, 30(1): 1–6.
- [11] Jin WQ, Liu GP, Xu NP. Progress of pervaporation in bio-butanol production from ABE fermentation. *Membr Sci Technol*, 2011, 31(3): 25–31 (in Chinese).
金万勤, 刘公平, 徐南平. 渗透汽化在丙酮-丁醇发酵制备燃料丁醇中的研究进展. *膜科学与技术*, 2011, 31(3): 25–31.
- [12] Roffler SR, Blanch HW, Wilke CR. In-situ recovery of butanol during fermentation, part1: batch extractive fermentation. *Bioprocess Eng*, 1987, 2(4): 1–12.
- [13] Tanaka S, Tashiro Y, Kobayashi G, et al. Membrane-assisted extractive butanol fermentation by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 with 1-dodecanol as the extractant. *Bioresour Technol*, 2012, 116: 448–452.
- [14] Li Q, Cai H, Hao B, et al. Enhancing *Clostridial* acetone-butanol-ethanol (ABE) production and improving fuel properties of ABE-enriched biodiesel by extractive fermentation with biodiesel. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 162(8): 2381–2386.
- [15] Bankar SB, Survase SA, Singhal RS, et al.

- Continuous two stage acetone-butanol-ethanol fermentation with integrated solvent removal using *Clostridium acetobutylicum* B 5313. *Bioresour Technol*, 2012, 106: 110–116.
- [16] Wang FQ, Yuan H, Chu LR, et al. Optimization of butanol fermentation condition with corn straw hydrolyze as raw material. *Food Ferment Indus*, 2010, 10(36): 79–83 (in Chinese).
王凤芹, 原欢, 楚乐然, 等. 玉米秸秆水解液燃料丁醇发酵条件优化研究. *食品与发酵工业*, 2010, 10(36): 79–83.
- [17] Cheng YF, Li SJ, Huang JP, et al. Production of acetone and butanol by fermentation of sweet sorghum stalk juice. *Trans CSAE*, 2008, 24(10): 177–180 (in Chinese).
程意峰, 李世杰, 黄金鹏, 等. 利用甜高粱秸秆汁发酵生产丁醇、丙酮. *农业工程学报*, 2008, 24(10): 177–180.
- [18] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(6): 1460–1469.
- [19] Zeng HZ, Jiang HL, Guo HZ. Alkali-catalyzed transesterification of soybean oil for production of biodiesel. *Soybean Sci*, 2007, 26(4): 583–587 (in Chinese).
曾红舟, 蒋惠亮, 郭宏珍. 强碱催化大豆油脂交换制备生物柴油. *大豆科学*, 2007, 26(4): 583–587.
- [20] Yang Y. Study on acetone-butanol extraction fermentation with biodiesel [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2008 (in Chinese).
杨影. 以生物柴油为萃取剂的丙酮丁醇发酵研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2008.
- [21] Wang XX. Preliminary study on coupling between extraction and acetone-butanol fermentation to increase butanol production. *J Agric Univ Hebei*, 2008, 31(6): 62–64 (in Chinese).
王鑫昕. 原位萃取发酵耦合工艺高产丁醇的初步研究. *河北农业大学学报*, 2008, 31(6): 62–64.
- [22] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(6): 1460–1469.
- [23] Jin XC, Song AD, Su TF, et al. Impact of detoxification of steam exploded corn straw on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation by different organic solvents. *Fine Chem*, 2012, 29(2): 126–129 (in Chinese).
金显春, 宋安东, 苏同福, 等. 溶剂脱毒汽爆玉米秸秆对酶解以及发酵的影响. *精细化工*, 2012, 29(2): 126–129.
- [24] Zhu JJ, Yong Q, Xu Y, et al. Detoxification of dilute acid pretreated corn stover prehydrolyzate by two methods. *J Nanjing Forest Univ: Natl Sci Ed*, 2011, 35(6): 71–76 (in Chinese).
朱均均, 勇强, 徐勇, 等. 玉米秸秆稀酸预水解液两种脱毒方法的研究. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2011, 35(6): 71–76.
- [25] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. *Chem Rec*, 2004, 4(5): 305–314.

(本文责编 郝丽芳)