

利用丙酮丁醇发酵废水偶联乙醇发酵的研究

左文朴¹,裴建新¹,庞浩¹,黄志民¹,黎贞崇¹,韦宇拓²,黄日波^{1,2}

(1.广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心,广西 南宁 530003;

2.微生物及植物遗传工程教育部重点实验室,广西 南宁 530005)

摘要: 研究以一株从自然环境中分离得到的酿酒酵母 GXAS-BT9 作为发酵菌株,利用丙酮-丁醇发酵的废液作为乙醇发酵的配浆用水,进行乙醇发酵。结果表明,GXAS-BT9 菌株的乙醇发酵产率随着废液比例的升高而增加,使用 100% 废液作为配浆用水,玉米粉和木薯粉作为原料的乙醇产率分别达到 14.27%vol 和 14.26%vol,比对照分别提高了 14.7% 和 9.6%。将丁醇发酵与乙醇发酵偶联起来,实现了水的循环利用,同时大大减少了污水的排放量。

关键词: 综合利用; 丙酮-丁醇发酵; 废水; 乙醇发酵; 偶联

中图分类号:X797;TS262.2;TS261.4

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2010)03-0103-04

Study on Reusing Acetone-butanol Fermentation Wastewater by Coupling Alcohol Fermentation

ZUO Wen-pu¹,PEI Jian-xin¹, PANG Hao¹, HUANG Zhi-min¹, LI Zhen-chong¹, WEI Yu-tuo² and HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. National Engineering Research Center for Non-grains Biorefinery, Guangxi Academy of Science, Nan'ning, Guangxi 530003; 2. Key Lab of Microbial and Plant Genetic Engineering of Ministry of Education, Guangxi University, Nan'ning, Guangxi 530005, China)

Abstract: A *Saccharomyces cerevisiae* strain GXAS-BT9 separated from natural environment was used as fermenting strain and acetone-butanol fermentation wastewater was used as blending water for alcohol fermentation. The results showed that alcohol production rate increased with the increase of the proportion of wastewater, ethanol production rate increased by 14.7%vol as corn powder used as raw materials and by 14.26%vol as cassava powder used as raw materials, 14.7% and 9.6% increase compared with contrast group. The coupling of acetone-butanol fermentation and ethanol fermentation could realize water recycling use and reduce the sewage discharge greatly.

Key words: comprehensive utilization; acetone - butanol fermentation; wastewater; ethanol fermentation; coupling

随着世界经济发展对石油需求的不断增加,石油作为战略物资和不可再生的能源,价格不断上涨,带动了丁醇的价格不断上扬,面对化学法生产丁醇的高成本以及丁醇的旺盛需求的局面,生物发酵法生产丁醇重新具有了市场竞争优势,发展前景十分广阔^[1-3]。

然而,丁醇发酵液中丁醇浓度不高,丁醇发酵液需要经过后期提取流程把丁醇等溶剂和水分离开来,在这个过程中产生了大量的废水,每生产 1 t 溶剂约产生 45 t 废水。废水中含有高浓度的悬浮物和有机物,其 COD 值在 15000~20000 mg/L 之间。而且这个发酵废液含有有机酸、有机溶剂等物质,若直接向环境中排放,将会造成环境的极大污染^[4]。

目前,对于废水的处理方法主要有物理法、化学法、生物法等。而生物法由于没有二次污染,处理能力大,成

为国内外处理废水,特别是处理高 COD 的发酵废水的主要选择。生物法根据氧气的寻求情况,分为好氧处理和厌氧处理两种,好氧处理通过曝气池中活性污泥进行,适用于有机物浓度低于 1000 mg/L 废水的处理;厌氧处理是通过厌氧甲烷发酵的方法进行处理,厌氧反应器中 pH 值及其稳定性非常重要,产甲烷菌的有效 pH 值范围为 6.5~8.0,最适宜的 pH 值为 6.8~7.2。如果 pH 值低于 6.3 或高于 7.8,甲烷化速率降低。产酸菌的 pH 值有效范围为 4.0~7.0,在超过甲烷菌的最适 pH 值的范围,酸性发酵可能超过甲烷发酵,结果反应器内将发生“酸化”^[5-6]。

丁醇发酵过程产生的废水中有机质和各种有害物质成分复杂,含量高,为达到彻底的净化污水,往往联合使用好氧和厌氧处理工艺。通过前期厌氧、后期好氧的两阶

基金项目 桂科转(09321071) 桂科攻(0992022-1) 微生物及植物遗传工程教育部重点实验室开放课题基金(J0804)。

收稿日期:2009-12-31

作者简介 左文朴(1983-),男,硕士,研究方向:发酵工程。

通讯作者 黄日波 教授,博士生导师,Email: priboh@gxu.edu.cn。

段处理工艺实现发酵废水的净化^[7]。这样的处理工艺需要高额的处理设备的投资,处理设备的运行和维护费用也非常高昂。在丁醇发酵废水的实际处理使用中,由于丁醇发酵过程产酸,发酵液的 pH 值达到 5.0 以下,这样的酸性条件造成丁醇发酵废水处理的困难。这些因素在一定程度上制约了丁醇发酵废水处理工业的发展。

针对这一问题,本研究尝试通过将丁醇发酵与乙醇发酵偶联起来,实现了水的循环利用,以达到减少污水排放的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 购于美国典型培养物收藏中心 (American Type Culture Collection)。

TYA 培养基^[8-9]:葡萄糖 40 g,牛肉膏 2 g,胰蛋白胨 6 g,酵母膏 2 g,醋酸铵 3 g,磷酸二氢钾 0.5 g,七水硫酸镁 0.2 g,七水硫酸铁 0.01 g,用水定容到 1000 mL,pH 6.5。

丙酮丁醇梭菌玉米粉发酵培养基为:质量百分比为 8%的玉米粉溶液。

丙酮丁醇梭菌木薯粉发酵培养基为:质量百分比为 8%的木薯粉溶液。

酵母 YPD 培养基:每升培养基含 20 g 葡萄糖,20 g 蛋白胨,10 g 酵母膏。

1.2 主要仪器

上海亚荣生化仪器厂旋转蒸发器 RE6000,Agilent6890 气相色谱仪。

1.3 实验方法

1.3.1 酿酒酵母菌株的筛选、鉴定及进化树构建

1.3.1.1 采样

采样:广西农科院葡萄园腐烂的葡萄、广西大学甘蔗实验田土样、南宁宝山米酒厂酒糟、葡萄干、腐烂马蹄、苹果渣总共 20 份样品。

1.3.1.2 富集培养

取混合样品 10 g,加入到装有 100 mL YPD 液体培养基的三角瓶中,放置 30 °C 摇床培养 24 h。然后吸取 1 mL 培养液转接于另一瓶含 10%乙醇的 YPD 液体培养基中,同样条件培养。再转接 15%乙醇的 YPD 液体培养基培养 24 h。

1.3.1.3 酵母菌的分离

吸取最后一代培养的酵母培养液 1 mL,以 10 倍稀释法稀释至 10^{-7} ,分别涂在含 12%乙醇的 YPD 固体平板上,于 30 °C 培养 48 h。

1.3.1.4 酵母菌的选择、纯培养及保存

根据酵母菌的菌落特征(乳白色、光滑、凸起)和制片镜检特征,对平板上长出的单菌落进行挑选,用接种环挑取不同类型菌落和特征的酵母菌画在 YPD 固体平板上,倒置于 30 °C 培养 48 h^[10]。必要时进行多次的转接以保证纯培养。将纯培养的单菌落酵母菌用接种针接种于 YPD 固体斜面,于 30 °C 培养 48 h 后,于 4 °C 条件下保存。

1.3.1.5 菌株的鉴定及进化树构建

提取菌株的总 DNA 作为 PCR 反应的模板,利用 18S rDNA 引物、26S rDNA 引物以及 ITS 引物序列扩增得到 18S rDNA、26S rDNA、ITS 序列,测序分析后将获得的序列在 GenBank 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov)中进行比对分析鉴定菌株。

18S rDNA 引物序列:18s1:5'-TCCTCTAAATGAC-CAAGTTT-3';18s2:5'-GCAGGTTACCTACGGA-3'。

26S rDNA 引物序列:NL1:5'-GCATAT-CAATAAGCGGAGGAA3AAG-3';NL4:5'-GGTCCGT-GTTTCAAGACGG-3'。

ITS 引物序列:ITS1:5'-AACAAGGTTTCCGTAG-GTGA-3';ITS2:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

进化树利用 MEGA 4.1 软件进行构建。方法选择 Neighbor-Joining (邻接法),利用 Bootstrap 进行分析,Bootstrap 参数选择 1000 次重复,模型选择 nucleotide→Maximum Composite Likelihood。

1.3.2 丙酮丁醇发酵

丙酮丁醇梭菌菌株的厌氧培养基利用亨盖特滚管技术在 TYA 培养基上活化菌株,挑取单菌落至盛有玉米粉及木薯粉发酵培养基的试管中,37 °C 静止培养,作为种子液使用。将种子液转接至 1 L 三角瓶中,接种量 10%,于 37 °C 静止发酵 60 h。

1.3.3 发酵醪的蒸馏

发酵醪前处理:将发酵醪 6000 r/min,离心 10 min,去除发酵废渣。1 L 发酵醪溶液中加入 500 mL 蒸馏水进行蒸馏。蒸馏条件为:油浴温度为 105 °C,旋转速度为 45 r/min。蒸馏进行到蒸馏液体积剩余为 1 L 时,停止蒸馏。

1.3.4 丁醇的测定方法

样品前处理:于 12000 r/min 离心 10 min,取上清液 200 μL,加入等体积 1%(质量分数)的正丙醇作为内标;色谱柱:phenomen ZB-WAXplus;色谱条件:柱温:100 °C 1 min,20 °C/min 升温至 130 °C,50 °C 升温至 200 °C;进样量:0.2 μL;进样口压力 10.27 psi,分流比 50:1。

1.3.5 乙醇的发酵

菌株经平板活化后,挑取单菌落至装 100 mL 培养

基的三角瓶中,30℃,220 r/min 摇床培养 16 h 作为种子液。木薯粉发酵培养基:按丁醇发酵废液比例配制乙醇发酵培养基,共做 4 组试验,废液:水分别为 0:100、40:60、70:30、100:0。在 250 mL 的三角瓶中装酵母发酵培养基 100 mL,加入 60 μ L 液化酶,于 90℃ 液化 1 h,然后加 80 μ L 糖化酶,60℃ 糖化 1 h;接种量为 10%,发酵条件:30℃,100 r/min 发酵 48 h。

1.3.6 乙醇的测定方法

样品前处理:于 12000 r/min 离心 1 min,取上清液 200 μ L,加入等体积 1%(质量分数)的乙腈作为内标。色谱柱:phenomen ZB-WAXplus;色谱条件:柱温:100℃,3 min;进样口压力 16.92 psi,分流比 50:1。

2 结果与分析

2.1 酿酒酵母菌株的筛选、鉴定及进化树的构建

通过对 20 个样品进行混合富集培养和分离纯培养,获得 160 株酵母菌菌株,经葡萄糖发酵筛选,共获得 7 株在发酵糖基质产酒精方面有较优特性的酵母菌。选择其中耐渗透压(耐葡萄糖)、发酵性能较好的 9 号,编号为 GXAS-BT9,进行发酵实验。

将 GXAS-BT9 菌株的 18S rDNA、26S rDNA、ITS 序列在 GenBank 中进行同源比对分析,发现它与 *Saccharomyces cerevisiae* 具有 99% 的同源性。初步鉴定该菌株为 *Saccharomyces cerevisiae*。

利用它的 18S rDNA 序列构建进化树,结果见图 1 所示。

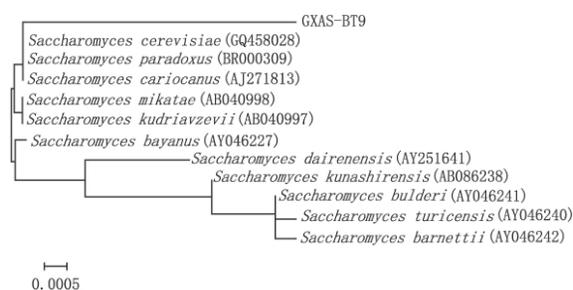


图 1 基于 GXAS-BT9 菌株 18S rDNA 序列的进化树构建分析

目前,GXAS-BT9 菌株保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为 CCTCC M209227。

2.2 丙酮丁醇发酵废水偶联乙醇发酵的发酵结果

2.2.1 丙酮丁醇梭菌玉米粉发酵废水偶联乙醇发酵

丙酮丁醇梭菌玉米粉发酵醪液在经过蒸馏后,气相色谱检测到丁醇,醪液中残余的丁醇量为 0.5%。将回收的废醪液与水的比例按 0:100、40:60、70:30、100:0 的比例配比后进行发酵,发酵结果见图 2。

由图 2 可看出,乙醇产率随着废液比例的升高以及发酵时间的增加而增加。即使完全使用废液作为配浆用

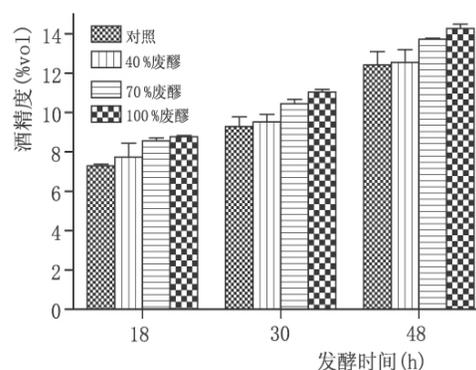


图 2 丙酮丁醇梭菌玉米粉发酵废水偶联乙醇发酵

水,也没有对乙醇的发酵造成抑制,反而促进了 GXAS-BT9 菌株的乙醇生成。这表明,丙酮丁醇梭菌玉米粉发酵废水不仅不会降低偶联的乙醇发酵的乙醇产量,相反地,它能够促进菌株 GXAS-BT9 的乙醇发酵产量。48 h 100%丙酮丁醇梭菌玉米粉发酵废水偶联乙醇发酵的产量最高,达到 14.27%,比对照的 12.44%提高 14.7%。

2.2.2 丙酮丁醇梭菌木薯粉发酵废水偶联乙醇发酵

丙酮丁醇梭菌木薯粉发酵醪液在经过蒸馏后,气相色谱检测到丁醇,醪液中残余的丁醇含量为 0.5%。将回收的废醪液与水的比例按 0:100、40:60、70:30、100:0 的比例配比后进行发酵,发酵结果见图 3。

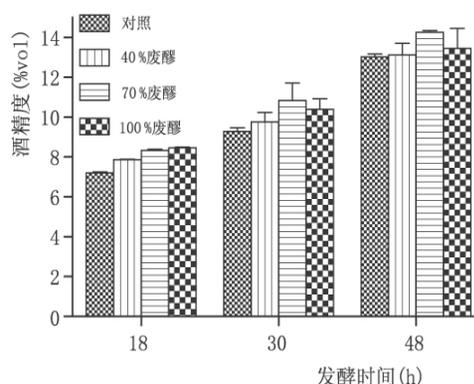


图 3 丙酮丁醇梭菌木薯粉发酵废水偶联乙醇发酵

由图 3 可以看出,乙醇产率随着废液比例的升高以及发酵时间的增加而增加。同样的,在 GXAS-BT9 的木薯粉发酵中,废液的使用没有对乙醇发酵造成抑制。这表明,丙酮丁醇梭菌木薯粉发酵废水能够促进菌株 GXAS-BT9 的乙醇发酵产量。48 h 70%丙酮丁醇梭菌木薯粉发酵废水偶联乙醇发酵的产量最高,达到 14.26%,比对照的 13%提高 9.6%。

3 结论

本研究表明,以 GXAS-BT9 作为丙酮丁醇发酵废水偶联乙醇发酵的出发菌株进行的发酵是可行的。将丙酮丁醇发酵的废水直接进行发酵效果很好,甚至比直接使

用自来水效果更优。推测这可能与GXAS-BT9菌株能够耐受丙酮丁醇发酵废水中的有机物,并且能够利用废水中剩余的营养成分作为其乙醇发酵的营养来源有关,从而更为有效地促进了该菌的代谢乙醇产量的积累。

当前,有一些生产企业同时拥有丙酮丁醇发酵以及乙醇发酵的两条生产线,而这两条生产线之间没有任何联系,若能够将本研究中的技术应用于企业当中,将丙酮丁醇发酵的废水与乙醇发酵用水偶联起来,将在很大程度上降低生产成本,同时降低环保压力,提高企业的竞争力,为实现可持续发展打下坚实的基础。

参考文献:

- [1] Schwarz W. H., Gapes J. R. . Butanol - rediscovering a renewable fuel [J]. Bio World Europe, 2006, 16-19.
- [2] Zverlov V., Berezina O., Velikodvorskaya G., et al. Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: Use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(5): 587-597.
- [3] Knoshaug Eric, Zhang Min. Butanol tolerance in a selection of microorganisms [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2008.
- [4] Lee S. Y., Park J. H., Jang S. H., et al. Fermentative butanol production by *Clostridia* [J]. Biotechnol Bioeng, 2008, 101(2): 209-228.
- [5] 王凯军, 秦人伟. 发酵工业废水处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [6] 王宇新, 刘学选. 光合细菌法综合处理丙酮-丁醇发酵废水[J]. 水处理技术, 1995, 21(5): 291-294.
- [7] 周忙扣, 赵传义. 厌氧-好氧生物法治理酒精醪液 [J]. 江苏环境科技, 2000, 13(4): 10-12.
- [8] Keis S., Bennett C. F., Ward V. K., et al. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing *Clostridia* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(4): 693-705.
- [9] 陈陶声, 陆祖祺. 发酵法丙酮和丁醇生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991.
- [10] Kurtzman C. P., Fell J. W. The Yeasts, a Taxonomic Study, 4th Ed [M]. Amsterdam: Elsevier Scientific, 1998.

“中国国际食品和饮料展”将在上海举行

本刊讯:由法国爱博展览集团和(中国)商业发展中心共同举办的第十一届中国国际食品和饮料展览会(SIALChina2010)将于2010年5月19日在上海浦东新国际博览中心开幕。据了解,2010年第十一届中食展将突出展示食品行业的技术创新,葡萄酒和烈性酒,健康和营养食品。国内展区将继续按产品类别推出专业展区,包括酒及饮料专区、乳制品专区、糖果休闲食品专区、调味品及食品添加剂专区、咖啡及咖啡用品专区、餐饮展示及供应品专区等,还将新增健康食品专区、肉类专区、进口食品专区及出口食品专区。

展会同期还将组织家乐福、麦德龙、古美达、西诺迪斯等国际连锁、零售、供应集团的现场采购洽谈会,国际食品大趋势和新产品评比会,国际食品安全研讨会,中国国际葡萄酒和烈酒品酒会,亚洲国际橄榄油大赛,烹饪趋势展示区等多项商务活动。而由法国爱博展览集团和中国包装和食品机械总公司、中国食品和包装机械工业协会共同主办的第十届中国上海国际包装和食品加工技术展(CHINAPACK-TECH&FOODTECH2010)也将于本展同期同地展出。(小小)

安琪酵母 酿酒领域的持续创新者 ——新推出安琪酿酒曲、安琪新型酒曲

本刊讯:从中国到全球,安琪在酵母领域创造了多项奇迹,2009年,在金融危机不利背景下,安琪逆势而上,各项经营业绩再次突飞猛进。

作为国内唯一的酵母技术研究推广中心,安琪在酿酒和酒精工业领域内创造多项专利,推动了中国乃至全球酿酒工业的技术进步,成为名副其实的“酵母技术专家”。

1990年,由安琪研发投放市场的安琪耐高温酿酒高活性干酵母及其应用技术,为白酒和酒精行业的节能降耗、安全度夏、平稳生产做出了突出贡献,解决中国传统酿造中的重大技术难题,创造了巨大的经济效益和社会效益。

此后,安琪又陆续推出了一系列广泛适用于白酒企业和用户的产品:白酒王、耐高温白酒专用、生香酵母、酿酒曲、根霉菌曲、营养剂等,获得市场广泛认可。

进入新世纪,安琪推出的超级酿酒酵母及浓醪发酵技术,在全球酒精工业领域形成了强大竞争力。

近年来,安琪更加紧密地跟随市场脉动,追求广大白酒企业所关注的质和量的平衡、香味和口感的协调以及生产过程的标准化、生产指标的可控性,减少波动,追求稳定。顺势开发的安琪酿酒曲以及安琪新型酒曲,集合了传统酒曲微生物丰富的特点,汇集专业发酵予以补助。新产品在问世以来,已经在大型酿酒企业和许多区域市场获得不错反响。

安琪坚信,只有专注于微生物发酵领域,才能更好地服务酿酒领域!
(赵发)