

丁醇萃取发酵耦联生产改良型生物柴油过程的性能优化

张龙云, 杨影, 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, 无锡 214122

摘要: 传统丙酮丁醇发酵的产物浓度太低, 蒸馏回收发酵产品大量耗能。为研究探讨直接利用发酵产品的可能性, 在 15% 高初始玉米醪浓度条件下、以地沟生物柴油为萃取剂, 探讨了生物柴油添加量、萃取液回用率、和添加微量电子供体对丁醇发酵耦联生产改良型生物柴油过程各主要性能指标的影响。通过环境条件优化, 地沟生物柴油的质量显著提高, 16 烷值由 51.4 提高至 54.4; 添加微量中性红后“丁醇实质性得率”可以达到 18%, 耗能的发酵产品回收过程有望省去; 萃取液回用率超过 50%, 有望逐步向国家所大力倡导的“节能减排”的工业生产模式靠近。

关键词: 萃取发酵, 丁醇, 节能减排, 生物柴油

Performance Optimization of Property-improved Biodiesel Manufacturing Process Coupled with Butanol Extractive Fermentation

Longyun Zhang, Ying Yang, and Zhongping Shi

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

Abstract: The products concentrations in traditional acetone-butanol (AB) fermentation are too low that large amount of energy has to be consumed in the distillation and product recovery process. Aiming at direct utilization of the fermentation products, in this study, optimization of property-improved biodiesel manufacturing process coupled with AB extractive fermentation was conducted, under the condition of using the biodiesel originated from waste cooking oil as the extractant and high concentrated corn flour medium. The effect of biodiesel/broth volume ratio, waste supernatant recycle ratio, and electronic carrier addition on the major process performance index was carefully investigated. Under the optimized condition, the biodiesel quality was improved with the cetane value increased from 51.4 to 54.4; “actual butanol yield” reached to a level of 18%, and waste supernatant recycle ratio exceeded 50%. In this way, elimination of energy-consuming product recovery process and realization of “energy-saving & waste minimization” industrial production target advocated by the state government, could be potentially expected.

Keywords: extractive fermentation, butanol, energy-saving & waste minimization, biodiesel

丁醇发酵利用严格厌氧型 *Clostridium* 种属的有孢子细菌, 以玉米粉等为原料生产丁醇、丙酮等溶剂。丁醇发酵产物抑制严重^[1], 采用原位萃取发酵的

方法, 可以减轻主产物丁醇的抑制作用, 提高发酵生产强度^[2,3]。有研究者发现, 棕榈油甲酯(生物柴油的一种)也是良好的丁醇发酵萃取剂^[4]。但是, 即便

Received: May 3, 2008; Accepted: September 3, 2008

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB714306).

Corresponding author: Zhongping Shi. Tel: +86-510-85918292; Fax: +86-510-85918296; E-mail: zpshi@jiangnan.edu.cn

国家重点基础研究发展规划项目(“973 项目”) (No. 2007CB714306)资助。

使用萃取发酵,主产物丁醇在萃取和发酵液相中的浓度依旧很低,产品蒸馏回收过程大量耗能,这实际上也是制约丁醇发酵工业恢复和发展的主要因素之一。因此,需要考虑省去耗能的产品精制回收过程而直接利用发酵产品的新方法。

生物柴油是一种绿色可再生能源,在国际油价居高不下的今天,越来越受到各国的重视。虽然生物柴油存在着与人争(食用)油的问题,但是,我国作为人口大国和生物质资源的富国,废餐饮油、地沟油等废弃生物质资源可以成为生物柴油丰富的生产原料。另一方面,生物柴油还存在许多缺点,如燃烧功率差、性价比低等^[5],特别是地沟生物柴油,其16烷值低、质量差^[5,6],这制约了生物柴油在我国的推广使用。有关燃料柴油的研究表明,向柴油中添加丁醇可以改善发动机的点火性能、改善燃烧功率,柴油丁醇混合燃料的16烷值明显高于普通柴油,它可以作为一种高品质的柴油来使用^[5]。理论上讲,前述的萃取有发酵丁醇的棕榈油甲酯就可以作为一种高品质、改良型的生物柴油而被直接使用。以生物柴油为萃取剂、通过丁醇萃取发酵耦联生产改良型生物柴油的过程至少有以下2个突出优点:1)现有生物柴油的某些主要缺点有望得到改善,提高了生物柴油替代化石柴油的现实性。2)生产改良型、高品质的生物柴油能够以节能的方式进行。我们的前期研究^[7,8]以浓度7%的玉米醪(糊化制取)为原料进行丁醇萃取发酵,但发酵结束后淀粉消耗殆尽,导致萃取发酵耦联改质生产生物柴油过程的整体性能水平不高。进一步加大初始玉米醪浓度,则由于黏度过大,导致糊化困难和发酵接种操作无法进行。实用上,可以通过少量添加液化酶先将部分固体淀粉颗粒水解为糊精和葡萄糖,降低培养基黏度,达到发酵和接种操作的需要。

本研究的主要目标是:在高浓初始玉米醪条件下,通过优化各环境条件,提高丁醇萃取发酵耦联生产改良型生物柴油过程的几个主要性能指标:1)生物柴油中的丁醇浓度或其16烷值;2)生物柴油产量;3)“实质性丁醇得率”。

1 材料与方法

1.1 菌种

丙酮丁醇梭状芽孢杆菌(*Clostridium acetobutylicum*)

ATCC824,于浓度5%的玉米醪培养基中培养成孢子液,4°C冰箱保存。活化方法参照文献[9]。

1.2 培养基和萃取剂(发酵原料和生物柴油)预处理
市售黄玉米粉40目过筛。玉米醪浓度不超过7%时,沸水浴下糊化60 min制备培养基。玉米醪浓度为15%时则通过添加液化酶(液化酶用量8 u/g淀粉,沸水浴下液化45 min)和糖化酶(糖化酶用量为120 u/g淀粉,62°C下糖化60 min)制备。pH自然,1×10⁵ Pa灭菌15 min。7%和15%玉米醪浓度条件下的DE值(以葡萄糖绝对浓度g/L计)分别为0和73。生物柴油或直接添入(实验结果表明无杂菌污染在发酵过程中产生),或在1×10⁵ Pa下灭菌15 min。

1.3 主要试剂

丁醇发酵萃取剂、即地沟生物柴油,由无锡华宏生物燃料有限公司馈赠,制备方法为化学合成法。商业化液化酶和糖化酶购于无锡杰能科生物工程有限公司。

1.4 主要仪器

发酵产物分析用气相色谱仪为GC112A(配有FID),上海精密科学仪器有限公司产。使用N2000型色谱工作站(浙大智达信息有限公司)分析数据。色谱柱为ALPHA-Col型PEG(聚乙二醇)毛细管柱(澳大利亚SGE Int'l Pty. Ltd.)。ACII-2E厌氧培养箱(用于厌氧条件下接种),美国Sheldon Manufacturing Inc公司生产。

1.5 实验方法

1.5.1 发酵方法及条件

将生物柴油按所需比例添加到装有40 mL玉米醪的100 mL厌氧瓶中,然后接入已活化好的菌种,接种量10%。抽真空2 min去除培养基中的溶氧,置37°C恒温水浴中静态培养。

图1是丁醇萃取发酵耦联制造改良型生物柴油过程的示意图。静态发酵条件下,发酵产物依靠发酵过程自产生的气体扩散到萃取液相(生物柴油相)。发酵结束后,萃取有丁醇(也包括部分丙酮)的萃取液进入改良型生物柴油储罐,然后作为高品质、改良型的生物柴油而直接使用。另外,尽可能多地利用萃余液进行下一轮发酵的原料拌料、以节约水资源。不能利用的萃余液经环保处理后向外界排放。这里,我们把“实质性丁醇得率”定义为萃取到生

物柴油中的丁醇量与淀粉消耗量之比。因为对于无发酵产品回收、直接利用萃取有丁醇的高品质生物柴油的过程而言, 萃取到柴油中的丁醇才是真正的“目的产物”。

1.5.2 溶剂的测定方法

气相色谱仪内标法定量测量发酵产物丁醇、丙酮和乙醇浓度, 以异丁醇为内标。

1.5.3 初始和残留淀粉/还原糖的测定方法

淀粉含量测定: 淀粉在酸作用下形成糊精, 继续水解成麦芽糖, 最后进一步水解为葡萄糖。取 2 mL 玉米醪培养基或发酵液, 用 2% HCl 稀释定容到 25 mL, 沸水浴反应 3 h, 离心得到上清液, 稀释适当倍数后测定葡萄糖含量, 再由下式计算淀粉含量: 淀粉含量=葡萄糖含量 \times 0.9。葡萄糖浓度由生物传感器((SBA-40B, 山东科学院产)测定。

1.5.4 发酵产气的测定

丁醇发酵是典型的生长耦联型发酵。玉米醪培养基的使用影响了实际菌体的测定, 但由于细胞增殖与发酵产气相耦联, 可以通过计量发酵产气来间接考察菌体的生长状况。发酵开始数小时后, 每隔 2 h~3 h、利用传统的“量筒排水置换法”测定总产气量。

1.5.5 回用萃余液的处理

发酵结束后, 离心发酵液去除固体残渣, 取上清液, 保存于 4°C 冰箱备用。

2 结果与讨论

2.1 高初始玉米醪浓度(15%)下的底物抑制探讨

丁醇发酵是典型的厌氧、产物抑制型发酵, 也存在底物抑制。图 2 是 2 种不同培养基(玉米醪浓度 7%; 15%)下的发酵产气曲线。发酵前 30 h, 两者基本一致。使用 15% 高浓玉米醪培养基时并未出现产气滞后现象, 即底物抑制没有发生。使用 7% 玉米醪培养基时, 发酵 43 h 后淀粉耗尽, 产气停止; 而使用 15% 玉米醪培养基时, 发酵产气持续到 65 h, 此时发酵总溶剂(丁醇+丙酮, 乙醇由于量少而在本研究中忽略)浓度达到 20.9 g/L, 其中丁醇浓度 13.6 g/L, 但残留淀粉浓度仍有 43.7 g/L。很显然, 发酵停止不是由于淀粉耗尽, 而是因为丁醇浓度已达到抑制水平。在以后的实验中, 我们均使用 15% 的玉米醪作为发酵培养基。

2.2 生物柴油添加量对丁醇萃取发酵性能的影响

生物柴油的添加量影响到生物柴油中的丁醇浓度(产品质量)、改良型生物柴油的产量、和总溶剂浓度等性能指标。我们按油水体积比 0.4:1、0.8:1 和 1.2:1 添加生物柴油, 并与不加柴油的传统发酵(对照)进行比较。图 3 显示了生物柴油添加量对发酵产气的影响。萃取发酵的产气初速度较对照慢, 而且生物柴油添加量越大, 产气滞后现象越严重, 说明地沟生物柴油对菌体生长具有一定的毒性。但是,

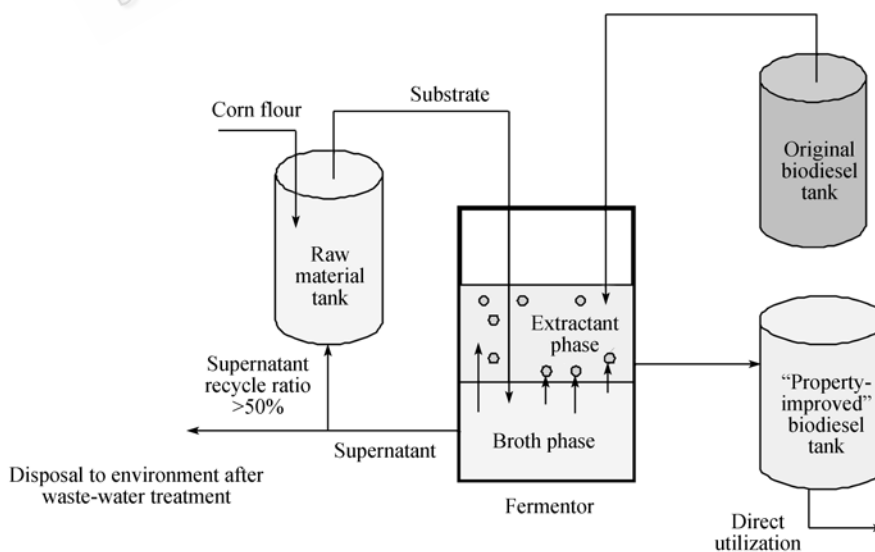


图 1 丁醇萃取发酵耦联制造改良型生物柴油的过程示意图

Fig. 1 Diagram of property-improved biodiesel manufacturing process coupled with butanol fermentation

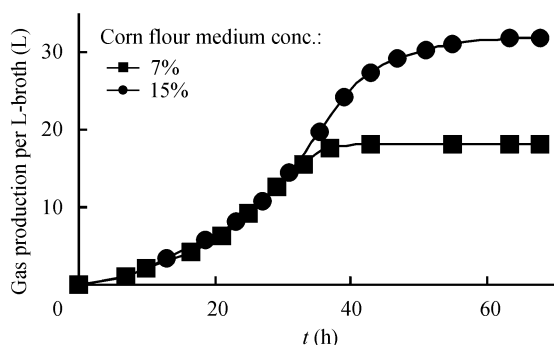


图 2 不同初玉米醪培养基浓度下的产气曲线
Fig. 2 Gas production under different initial corn flour concentrations

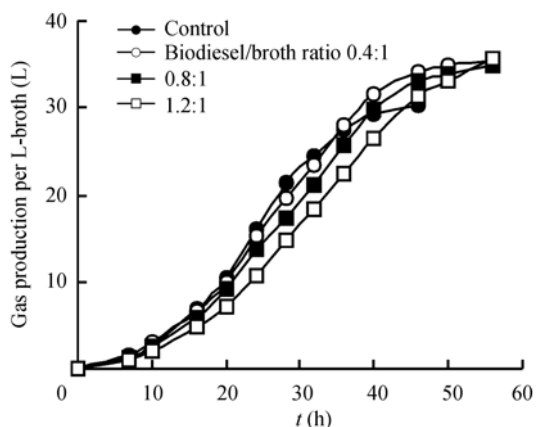


图 3 生物柴油添加量对产气的影响
Fig. 3 Effect of biodiesel/broth ratio on gas production

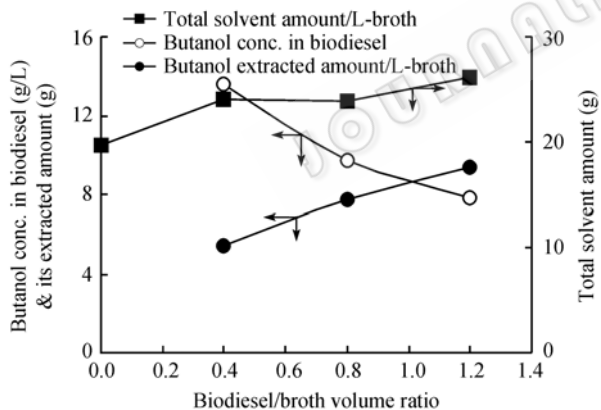


图 4 生物柴油添加量对萃取发酵性能的影响
Fig. 4 Effect of biodiesel/broth ratio on butanol extractive fermentation performance

由于生物柴油对抑制产物丁醇的萃取作用，发酵结束时，所有萃取发酵的产气量均反超了对照的产气量。生物柴油添加量对萃取发酵性能的影响如图 4 所示。添加量越大，萃取到生物柴油中的发酵丁醇的量就越多，即改良型生物柴油的产量越大。但添加量越大，油相中丁醇浓度越低。当油水体积比从 0.4:1 提高到 1.2:1 时，该浓度从 13.6 g/L 下降到

7.8 g/L。由于油相丁醇浓度是改良型生物柴油质量的直接体现，综合考虑改良型生物柴油的质量和产量，我们把油水比 1:1 设定为标准油水比。

2.3 丁醇萃取发酵萃余液的回用

萃取发酵结束后，萃余液(发酵残液)中还含有一定量的溶剂(丙酮 5 g/L~6 g/L, 丁醇 10 g/L 左右)。这里暂不考虑萃余液中残存溶剂的回收，而是从节省宝贵水资源的角度出发，将萃余液直接用于次轮发酵的拌料和培养基的配制。本试验按比例将萃余液和新鲜水混合配成了初始浓度 15%的玉米醪。由于培养基的糊化和灭菌等都要在高温下进行，萃余液中的残存溶剂会大量损失，特别是挥发性强的丙酮。但是，由于萃余液的回用主要着眼于水资源的有效利用，在此特定场合，萃余液中溶剂产物的损失不是主要问题。实验结果表明，使用萃余液的分批发酵并没有出现产气滞后现象。萃余液回用率在 25%和 50%(初始丁醇浓度约 2 g/L~4 g/L)时，最终产气量还反超了使用“新鲜培养基(萃余液回用率 0%)”时的产气量。这说明萃余液中残存的非挥发性营养物质还可以在在一定程度上促进次轮发酵的进行。但是，当萃余液回用率达到 75%时，发酵就无法正常进行。原因可能有二：一是丁醇沸点高，高温灭菌后丁醇只可能有小部分蒸出，导致初始丁醇浓度过高(接近 4 g/L~6 g/L 的水平)；二是富含萃余液的培养基经过高温处理后，萃余液中的某些物质发生了性质上的变化，细胞生长抑制出现。发酵结束后，对不同萃余液回用率下的最终发酵溶剂浓度进行了测定。结果发现，回用 50%萃余液时的丁醇和溶剂总浓度最高。回用萃余液进行萃取发酵的情况与传统发酵相似。此时，萃余液回用率与油相丁醇浓度、总发酵溶剂浓度、以及“实质性丁醇得率”之间的关系如图 5 所示。当回用率为 50%时，油相丁醇浓度、总发酵溶剂浓度和“实质性丁醇得率”最大，分别达到 11.0 g/L、32.0 g/L 和 14%。但回用率达到 75%时，萃取发酵性能急剧下降，油相丁醇浓度等指标均显著降低。

2.4 萃取有丁醇的生物柴油 16 烷值的测定

16 烷值是(生物)柴油最重要的性能指标之一。16 烷值越大、点火迟延时间就越短、燃烧效率越高、黑烟排放也越少。我们将几个丁醇含量超过 10 g/L 的地沟生物柴油试样，连同原始的地沟生物柴油，

委托给中石化金陵分公司质检中心对其 16 烷值进行实测, 以验证改良型生物柴油燃烧特性的提高情况。测定结果如下。

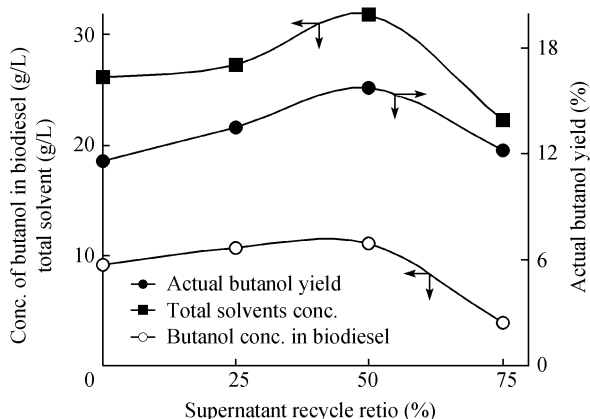


图 5 萃余液回用率对丁醇萃取发酵性能的影响
Fig. 5 Effect of fermented supernatant recycle ratio on butanol extractive fermentation

用 A、B、C 分别代表原始地沟生物柴油试样, 萃取有 10.8 g/L 丁醇的地沟生物柴油试样, 和萃取有 12.0 g/L 丁醇的地沟生物柴油且经 1.6% (W/V) 无水硫酸钠混合 1 h 进行简单脱水处理的试样。检测结果表明, 试样 A、B、C 的 16 烷值分别为 51.4、51.4 和 54.4。相比于试样 A, 试样 B 的 16 烷值并没有提高。原因可能是在利用生物柴油进行萃取发酵的过程中, 有少量水分混入到生物柴油中, 对 16 烷值产生了负面影响, 萃取丁醇和水分混入的效果正负抵消。但是, 对萃取有 12.0 g/L 丁醇的地沟生物柴油进行简单的脱水处理(试样 C)后, 其 16 烷值提高了 3 个单位, 提高幅度还是得到相关生物柴油燃烧标准/文献普遍认可的^[4,10]。另外, 我们对经脱水处理和未脱水的原始生物柴油也进行了比较, 结果发现两者的 16 烷值没有差异。

2.5 加入微量电子供体提高“实质性丁醇得率”

由于地沟生物柴油对丁醇的液液萃取系数不高^[7], 因此“实质性丁醇得率”通常只有 13%~14% 的较低水平。直接回用部分萃余液, 对“废弃”萃余液中的发酵溶剂不做蒸馏回收, 理论上符合“节能减排”的工业生产模式。但这又与“吃干榨尽”的原料利用原则相违背, 因为“废弃”萃余液中毕竟还有一定的溶剂产品。所以需要降低萃余液中的溶剂浓度、提高“实质性丁醇得率”, 尽量同时满足“节能减排”和“吃干榨尽”原则的新方法。

有研究报道^[11]表明, 在丁醇发酵中添加微量的电子供体物质, 如中性红等, 可改变发酵代谢流、强化还原力(NADH), 提高最终丁醇浓度达 30% 以上、降低丙酮浓度 50% 左右。丁醇发酵代谢途径表明, 在乙酰乙酰辅酶 A 节点处, 主碳流开始“分流”: 一路在 CoA 转铁酶/乙酰乙酸羧基酶的作用下生成丙酮; 一路则在还原力 NADH、H₂、以及其他多个 NADH 依存型辅酶的作用下, 生成主产物丁醇。从该分叉点开始, 丁醇发酵有以下突出的特征: 丙酮生产不需要任何 NADH、也不需要消耗 EMP 途径所产生的 H₂; 而丁醇生产则必须消耗大量的 NADH 和 H₂。胞内 NADH 主要有 2 个来源: 一部分来源于 EMP 途径本身; 一部分则来源于胞内的铁氧化还原蛋白(Fd 还原态/氧化态)与 Fd-NAD 还原酶/NADH-Fd 还原酶所构成的电子往复穿梭传递系统。添加电子供体物质、强迫质子过量, 其结果可使质子与 Fd-NAD 还原酶强行作用, 过量生产 NADH, 强化丁醇生成, 但这也进一步地加剧了丁醇的产物抑制。如果将选择性丁醇萃取发酵与强化利用还原力相耦联, 有望可以构建一个更高效的丁醇萃取发酵耦联制造改良型生物柴油系统。

添加中性红后会引发发酵总产气量的减少, 且中性红添加量越大、丙丁梭菌对 H₂ 的利用率越大、总产气量也下降的越多, 产气下降是发酵还原力提高的表现。最终, 我们根据中性红添加量梯度和发酵产气曲线变化的关系(数据未给出), 以 0.1% (W/V) 作为中性红的标准添加量。表 1 是通过添加 0.1% 的中性红, 同时利用地沟生物柴油选择性地萃取丁醇的“复合型”发酵的性能指标结果。与对照(无中性红添加)相比, 生物柴油中的丁醇浓度和“实质性丁醇得率”分别从 11.3 g/L 和 13.8% 增加到 13.4 g/L 和 18.1%, 提高幅度分别达到 19% 和 31%, 同时萃余液相中的丙酮浓度也降低了 28%。但是, “实质性丁醇得率”的提高幅度和萃余液中丙酮浓度的降低幅度, 即“高丁醇/低丙酮”的发酵特征还没有达到人们所期望的程度。另外, 中性红等作为色素, 在萃取发酵过程中会溶解到生物柴油中去, 使生物柴油的颜色发生改变。因此, 此时发酵产品还存在褪色处理的问题。

本研究的结果较前期工作有了很大改善, 但整体性能指标依旧不尽人意。今后, 还要从以下几个

表 1 添加中性红提高油相丁醇浓度和“实质性丁醇得率”

Table 1 Improvement of butanol content in biodiesel and “actual butanol yield” by adding neutral red

Operation mode	Acetone conc. (g/L)		Butanol conc. (g/L)		Total solvent conc. (g/L)	Butanol/Acetone yield	Actual butanol yield (%)	
	Phases	Oil	Broth	Oil				Broth
Biodiesel extraction (1:1)		2.87	7.78	11.29	8.29	30.23	1.84	13.83
Biodiesel extraction (1:1) + 0.1% neutral red addition		2.25	5.64	13.41	10.04	31.34	2.97	18.13

Note: fermentation time 81 h

方面进一步提高过程的整体性能。1)改良型生物柴油的产量; 2)改良型生物柴油质量, 即进一步提高生物柴油中的丁醇浓度和其 16 烷值; 3)“实质性丁醇得率”。4)期望发酵萃余液总量的 70%以上得到循环利用, 减少环境污染和废水的排放量。

3 结论

1) 初始玉米醪浓度 15%下无底物抑制。

2) 最优操作条件下, 柴油中的丁醇浓度和“实质性丁醇得率”可达 14 g/L 和 18%的水平。

3) 萃取有超过 10 g/L 以上丁醇的生物柴油的 16 烷值比原始生物柴油提高 3 个单位, 其可作为“高品质”生物柴油而被直接使用得到实验验证。

4) 回用 50%萃余液于次轮发酵拌料, 既可取得较佳的发酵性能, 还可以节省宝贵的水资源。

REFERENCES

- [1] Chen TS, Lu ZQ. Fermentative acetone-butanol production technique. Beijing: Chemical Industry Press, 1991, 238-239.
陈驹声, 陆祖祺. 发酵法丙酮和丁醇生产技术. 北京: 化学工业出版社, 1991, 238-239.
- [2] Roffler SR, Blanch HW, Wilke CR, *et al.* In-situ recovery of butanol during fermentation. *Bioproc Eng*, 1987, **2**: 1-12.
- [3] Taya M, Ishii S, Kobayashi T. Monitoring and control for extractive fermentation of *Clostridium acetobutylicum*. *J Ferment Technol*, 1985, **63**(2): 181-187.
- [4] Carbbe E, Hipolito CN, Kobayashi G, *et al.* Biodiesel production from crude palm oil and evaluation of butanol extraction and fuel properties. *Process Biochem*, 2001, **37**: 65-71.
- [5] Demirbas A. Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energ Convers Manage*, 2003, **44**: 2093-2109.
- [6] Qureshi N, Blaschek HP. ABE production from corn: a recent economic evaluation. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, **27**: 292-297.
- [7] Hu CY, Du YP, Yang Y, *et al.* Preliminary study on coupling between biodiesels and acetone-butanol fermentation. *Chin J Bioproc Eng*, 2007, **5**(1): 27-32.
胡翠英, 堵益平, 杨影, 等. 生物柴油耦联丙酮丁醇发酵的初步研究. 生物加工过程, 2007, **5**(1): 27-32.
- [8] Yang Y, Zhang LY, Shi ZP. Improvement of extractive fermentation performance of butanol by adding surfactants into fermentation medium. *Chin J Bioproc Eng*, 2008, **6**(4): 25-30.
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. 生物加工过程, 2008, **26**(4): 25-30.
- [9] Sun ZH, Wang S, Wu Y. The production of acetone-butanol with immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Chin J Ind Microbiol*, 1987, **17**(6): 18-22.
孙志浩, 王舒, 吴燕. 固定化细胞连续发酵玉米粉生产丙酮丁醇的初步研究. 工业微生物, 1987, **17**(6): 18-22.
- [10] GB/T 386-91. Measurement of ignition quality of diesels (cetane number, CN).
GB/T 386-91. 柴油着火性质测定法(十六烷值法).
- [11] Girbal L, Vasconcelos I, Saint-Amans S, *et al.* How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol Rev*, 1995, **16**: 151-162.