

研究论文

容积负荷变化模式对嗜盐混合菌发酵乙酸合成 PHB 的影响

崔有为, 张宏宇, 冀思远, 施云鹏

(北京工业大学环境与能源工程学院, 北京 100124)

摘要: 以嗜盐混合菌发酵生产 PHB 具有免灭菌程序、易提取、产量高等优势而被广泛关注。本研究集中考察了嗜盐混合菌 (MMCs) 发酵生产 PHB 过程中调整容积负荷的方式对 PHB 生产的影响。在研究中通过比较恒定接种生物量改变底物浓度以及恒定底物浓度调整接种生物量两种调整方式下 PHB 发酵生产的最大细胞含量、PHB 最大容积产率以及表观动力学, 确定了 MMCs 的最佳 OLR, 以及两种变化方式的本质差异。研究结果表明, 两种方式下随着 OLR 升高, 细胞内最大 PHB 的积累量和 PHB 容积产率也随着增加。本研究发展的嗜盐 MMCs 最佳 OLR = $0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。在相同的 OLR 下, 高的接种生物量始终具有高的碳源转化率和底物消耗速率。为此, 采用高接种生物量发酵生产 PHB 可以提高 PHB 生产效率并降低 PHB 的成本。

关键词: 聚羟基丁酸酯 (PHB); 有机容积负荷 (OLR); 污泥浓度; 底物浓度; 嗜盐混合菌

DOI: 10.11949/j.issn.0438-1157.20150287

中图分类号: X 703

文献标志码: A

文章编号: 0438—1157 (2015) 10—4177—08

Influence of organic loading rate change modes on PHB production by halophilic sludge fermenting acetate acid

CUI Youwei, ZHANG Hongyu, JI Siyuan, SHI Yunpeng

(College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: Polyhydroxybutyrate (PHB) production by halophilic mixed consortia draws a lot of attention because of its great advantages, such as no sterilization, extraction convenience and high production. In this study, halophilic mixed microbial cultures were used to investigate the influence of adjusting modes of the organic loading rate on PHB production. Two adjusting modes were applied including adjusting sludge concentration with a consistent substrate concentration and substrate concentration with a consistent sludge concentration. The maximum PHB content in cells, maximum PHB volumetric yield and kinetics were compared to confirm the optimum OLR and the key difference in the two modes. The experimental results showed that the high OLR led to a high PHB content in cells and a high PHB volumetric yield. In this study, $0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ was proved to be the optimum OLR for halophilic MMCs. On condition of identical OLR, the high sludge concentration led to high carbon source conversion ratio and substrate consumption rate. Then, a high sludge concentration can enhance PHB productivity and depress PHB production cost.

Key words: polyhydroxybutyrate (PHB); organic loading rate (OLR); sludge concentration; influence substrate concentration; halophilic mixed microbial cultures

2015-03-10 收到初稿, 2015-05-25 收到修改稿。

联系人及第一作者: 崔有为 (1977—), 男, 博士, 副教授。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51478011, 51178004); 北京市自然科学基金项目 (8132013); 北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划项目。

Received date: 2015-03-10.

Corresponding author: Dr. CUI Youwei, cyw@bjut.edu.cn

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (51478011, 51178004), Natural Science Foundation of Beijing (8132013) and the Importation and Development of High-Caliber Talents Project of Beijing Municipal Institutions.

引 言

很多微生物(包括细菌和古菌)在不平衡生长时会在体内积累聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHA)。聚合物 PHA 具有良好的物理特性、生物相容性和生物可降解性,被认为是替代以石油为原材料化工合成塑料的重要物质^[1]。PHA 替代工业塑料可以解决塑料填埋产生的污染问题,并对缓解石油等化石燃料短缺问题具有重要意义^[2-5]。但是,生物生产 PHA 从成本上无法和化学合成的塑料竞争。为此,基于生物合成 PHA 的研究都集中在如何降低成本上。目前,以混合微生物(mixed microbial cultures, MMCs)替代纯菌(pure cultures, PCs)生产 PHA 由于可以减少灭菌程序和可以使用废弃底物被认为是降低 PHA 生产成本的有效方式^[6-8]。近年来,选择富集活性污泥中具有高积累 PHA 能力的 MMCs 研究已经取得了很大的进展。采用好氧动态进料方式(aerobic dynamic feeding, ADF)下选择的活性污泥中 PHA 积累微生物比例会大大增加^[9-10]。在此基础上可以利用单一或者复合底物,甚至是废弃物合成 PHA^[6,11-12]。除了淡水 MMCs,嗜盐微生物(halophiles)被报道具有比淡水微生物更强的 PHA 积累能力^[13]。*Haloarcula marismortui*^[14], *Cupriavidus necator*^[15], *Halomonas campisalis*^[16]等嗜盐 PCs 都被报道可以储存高含量的 PHA,并且在回收细胞内 PHA 上也具有成本优势。但是,嗜盐 MMCs 的研究还未见报道。

在前期的研究中采集入海口底泥利用 ADF 筛选方式成功实现了对嗜盐 MMCs 的富集和筛选^[17]。在此基础上,本研究将集中讨论影响嗜盐 MMCs 发酵生产 PHA 能力的过程因素。目前,生物生产 PHA 普遍采用两步法,即第 1 步筛选富集高 PHA 积累能力的菌群;第 2 步在限氮条件下进行 PHA 发酵生产。在两步法工艺中的第 2 步,接种富集的 MMCs 在营养物质限制的条件下发酵使 MMCs 最大程度地将外源碳合成 PHA 是决定 PHA 生产能力和产量的关键一步。在影响发酵的条件因素中,发酵使用的底物量和初始接种的生物量的比值(F/M)决定了有机物的利用速度,生物增殖速度以及溶解氧利用速率,被认为是影响发酵生产 PHA 产量的重要因素^[6-7,12,18]。在活性污泥法工艺中,F/M 是通过有机容积负荷(organic loading rate, OLR)表征的。Venkateswar 等^[7]在研究中通过改变进水有机物浓度而调整 OLR 发现 PHA 积累量和 OLR 呈正比,

即进水有机物浓度越高 MMC 积累的 PHA 越高。然而,Dai 等^[12]在利用从小黑杨水解产生的木质素材料生产 PHA 的实验中同样改变 OLR,却发现 PHB 的积累量仅仅取决于最初的糖负荷,而和反应器中的总糖浓度无关。这两个研究虽然都是基于 OLR 的探索,但是由于不同的变化 OLR 方式(Venkateswar 等的研究通过改变进水有机物浓度,Dai 等的研究通过改变污泥浓度)得出了相反的结论。这说明 F/M 作为一个综合因素,通过改变有机物浓度或者污泥浓度会对混合菌 PHA 积累产生不同的影响。在发酵阶段可以通过一次投加进水和分批投加进水方式来实现 OLR 的调控^[6-7]。分批投加底物的方式本质是固定接种微生物浓度,通过若干次改变底物浓度来实现动态的有机物浓度变化,即动态的 OLR 的调节。从这个角度看,分批投加底物本质上是若干个一次性投加底物的组合。基于此,本研究针对嗜盐 MMCs 系统采用一次性投加底物的方式研究 OLR 变化模式对 PHA 积累的影响,从操作策略层面探索利用嗜盐 MMCs 最大限度地提高 PHA 产率和提高碳源利用率的方法。

1 实验材料和方法

1.1 嗜盐 PHA 积累混合菌的选择和富集

实验中所用的嗜盐污泥采自河北省秦皇岛市某河道入海口底泥。该地为人类活动较为频繁地区。将采集的河底淤泥经过反复淘洗得到嗜盐活性污泥^[17,19],接种该污泥到间歇发酵反应器中进行 PHA 积累菌群的筛选。菌群选择反应器为双层玻璃夹心反应器,有效体积为 2 L。反应器外接恒温水浴装置保证在整个过程中温度控制在 $(30 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。发酵反应器配有曝气充氧设备和搅拌装置。在该发酵反应器中采用 ADF 方式,按照 Johnson 等^[9]提出的筛选方法进行 PHA 菌群的选择。具体筛选参数为:每天 2 个发酵周期,每个周期 12 h,包括进水 5 min,好氧曝气 11.5 h,沉淀 20 min,排水 5 min。污泥龄(sludge retention time, SRT)控制在 15 d。选择期间使用的底物中乙酸浓度为 $(863 \pm 30) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (由分析纯的乙酸钠配制)。营养物质和微量元素浓度见表 1。底物中盐度以投加 NaCl 保持稳定在 $(30 \pm 1) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,实现高盐环境以保证嗜盐微生物能够进行正常的代谢活动。同时在底物中投加硫脲($20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)以达到抑制硝化作用的目的。按照该方式连续运行 200 多个周期,完成了对 MMCs 的筛选。

表 1 合成废水组分

Table 1 Component of synthetic wastewater/mg · L⁻¹

Nutrient	Concentration	Trace elements	Concentration
NH ₄ Cl	59	FeSO ₄ · 7H ₂ O	3.0
KH ₂ PO ₄	26	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.5
KCl	7.6	CaCl ₂ · 2H ₂ O	8.0
MgSO ₄	45	MnSO ₄ · H ₂ O	1.2

1.2 OLR 变化方式对嗜盐 MMC 生产 PHB 影响实验

OLR 变化方式对嗜盐 MMC 生产 PHB 影响实验是针对两步法生产 PHA 中的第 2 步发酵过程而开展的实验。即采用富集的 MMC 进行发酵生产 PHA, 考察发酵中 OLR 对该菌群发酵生产 PHA 能力。实验中通过固定污泥浓度改变进水底物浓度和固定进水底物浓度改变污泥浓度两种变化方式调整了 4 个 OLR 梯度, 即 0.55, 0.75, 0.95, 1.50 kg · (kg · d)⁻¹。具体实验参数见表 2。固定进水乙酸浓度改变 MLVSS 实验中, 发酵底物进水乙酸浓度保持在 (2500 ± 100) mg · L⁻¹, 通过调节污泥浓度改变 OLR; 固定污泥浓度改变发酵底物乙酸浓度实验中的 MLVSS 保持在 (1400 ± 100) mg · L⁻¹, 通过调节进水底物浓度改变 OLR。8 组实验的连续发酵时间均为 48 h。每组实验都设置 1 组平行实验, 两次实验的平均值作为最终结果。根据报道两步法生产 PHA 的第 2 步要求严格限制氮氮的投加从而抑制微生物的生长实现 PHA 在细胞内的最大积累^[20]。因此, 在发酵实验中的发酵底物只含有乙酸和营养元素, 不含有氮氮。除氮氮外, 其他营养元素和微量元素浓度同表 1。

1.3 分析方法

氮氮、MLSS 和 MLVSS 采用标准方法进行测定^[21]。乙酸含量的测定采用气相色谱分析法 (Agilent 7890A 气相色谱仪)^[21]。PHA 含量在样本经过前处

表 2 批次实验参数设置

Table 2 Parameter applying in batch experiments

Batch experiments	Mean acetate acid /mg · L ⁻¹	Mean MLVSS /mg · L ⁻¹	OLR /kg · (kg · d) ⁻¹
a	2509	2391	0.56
b	2472	1766	0.75
c	2417	1410	0.91
d	2422	865	1.49
e	1410	1404	0.54
f	2005	1411	0.76
g	2417	1410	0.91
h	3992	1453	1.47

理后采用内标法进行气相色谱分析^[22]。样品前处理具体操作过程如下: 从反应器中取出 40 ml 泥水混合物, 4000 r · min⁻¹ 离心后弃去上清液, 加入 1 ml 次氯酸钠消毒液以使微生物失活, 水洗两遍后冷冻干燥。称取冻干后的污泥样品约 25 mg 于具塞消解管中, 依次加入 2 ml 氯仿、2 ml 苯甲酸钠溶液, 于 105℃ 消解 20 h, 冷却后加入 1 ml 去离子水, 摇匀、离心, 取下层有机相于盛有 0.5 g 左右无水硫酸钠的 2 ml 塑料离心管中, 摇匀。8000 r · min⁻¹ 转速下离心 5 min, 随后取有机相进行气相色谱分析。由于实验采用单一乙酸作为底物, 嗜盐混合污泥合成的 PHA 是单一的聚羟基丁酸酯 (polyhydroxybutyrate, PHB)^[23], 未在 PHA 中测量检出其他单体组分。

1.4 表观参数的计算

PHA 容积产率

$$V_{\text{PHA/S}} = m \cdot \text{PHA}_{\text{max}} \quad (1)$$

细胞内 PHA 浓度

$$f = W_p / \text{CDW} \quad (2)$$

碳源的 PHA 转化率

$$Y_{\text{PHA/S}} = (\text{PHA}_{\text{max}} - \text{PHA}_0) / (S_f - S_0) \quad (3)$$

PHA 比合成速率

$$q_p = (\text{PHA}_{\text{max}} - \text{PHA}_0) / X_a T \quad (4)$$

底物比吸收速率

$$q_s = (S_f - S_0) / X_a T \quad (5)$$

式中, W_p 为 PHA 质量, mg; m 为 PHA 分子量, 其中 PHB 为 21.5 mg · (mmol C)⁻¹; CDW 为细胞干重 (cell dry weight), mg; T 为达到 PHA 积累最大值时长, h; PHA_0 为初始细胞内的 PHA 含量, mmol C · L⁻¹; PHA_{max} 为细胞内的 PHA 含量最大值, mmol C · L⁻¹; S_0 为初始乙酸浓度, 多次投加时为投加乙酸浓度的总和, mmol C · L⁻¹; S_f 为 PHA 含量最大时乙酸浓度, mmol C · L⁻¹; X_a 为反应器中生物量, mmol C · L⁻¹。

2 实验结果与讨论

2.1 改变污泥浓度调整 OLR 对 PHB 积累的影响

由于在发酵反应中氮素被限制而微生物无法增殖^[24], 因此在整个发酵过程中, 微生物浓度和初始接种在发酵反应中的生物量一致。根据以往报道^[12], 在 PHA 合成混合菌系统中, 普通发酵 OLR 在 0.9 kg · (kg · d)⁻¹ 左右。为充分验证变化 OLR 方式对发酵的影响规律的重现性, 实验从低到高设置 4 个 OLR 梯度。本实验恒定底物浓度为 (2500 ± 100)

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降低接种生物量调整 OLR 分别达到 0.56, 0.75, 0.91 和 $1.49 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。图 1 (a) ~ (d) 分别是发酵期间 4 个 OLR 反应器内的底物利用和 PHA 合成情况。从图中可以看出 OLR 从 $0.56 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 增长至 $0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, PHB 积累的最大细胞含量从 23.3% 逐渐增加到 37.2%, 而 PHB 的容积产率从 $557.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 逐渐下降到 $524.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由于微生物在限制氮素的条件下无法进行细胞增殖, 为此 PHB 的容积产率直接由最大的 PHB 细胞含量和微生物量决定。尽管 PHB 最大细胞含量随着相对外源碳源供给量的增加而逐渐增加, 但是生物量仍然是 PHB 容积产率的决定因素。OLR 影响 PCs 发酵最大 PHA 积累已被报道^[25], 本研究结果也表明在 MMCs 体系内, 相对高的碳源供给量促进微生物内 PHB 的积累。但是, 继续增加

OLR 到 $1.49 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 时, 细胞内 PHB 最大含量却下降至 23.6%, 而 PHB 的容积产率也下降至 $204.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验结果表明采用过小的生物接种量, 虽然可以极大地提高碳源的可利用性, 但是最终却没有提高细胞内最大 PHB 积累量和最大的 PHB 产量。造成这种现象的原因可能是由于过低的生物量会导致底物利用速率的下降, 致使利用乙酸合成能量只能维持生物存活, 而无法将外源有机物持续转化成内源 PHB。此外, 由于过低的 PHB 细胞含量不利于 PHB 的提取, 所以综合 4 个 OLR 实验结果可以确定最优的 $\text{OLR} = 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。从图 1 还可以看出降低接种生物量提高 OLR 还会影响到 PHB 积累和底物降解的同步性。4 个 OLR 下发酵细胞达到最大 PHB 含量的时间依次是 10, 10, 12 和 24 h, 乙酸降解完成时间分别是 8, 12,

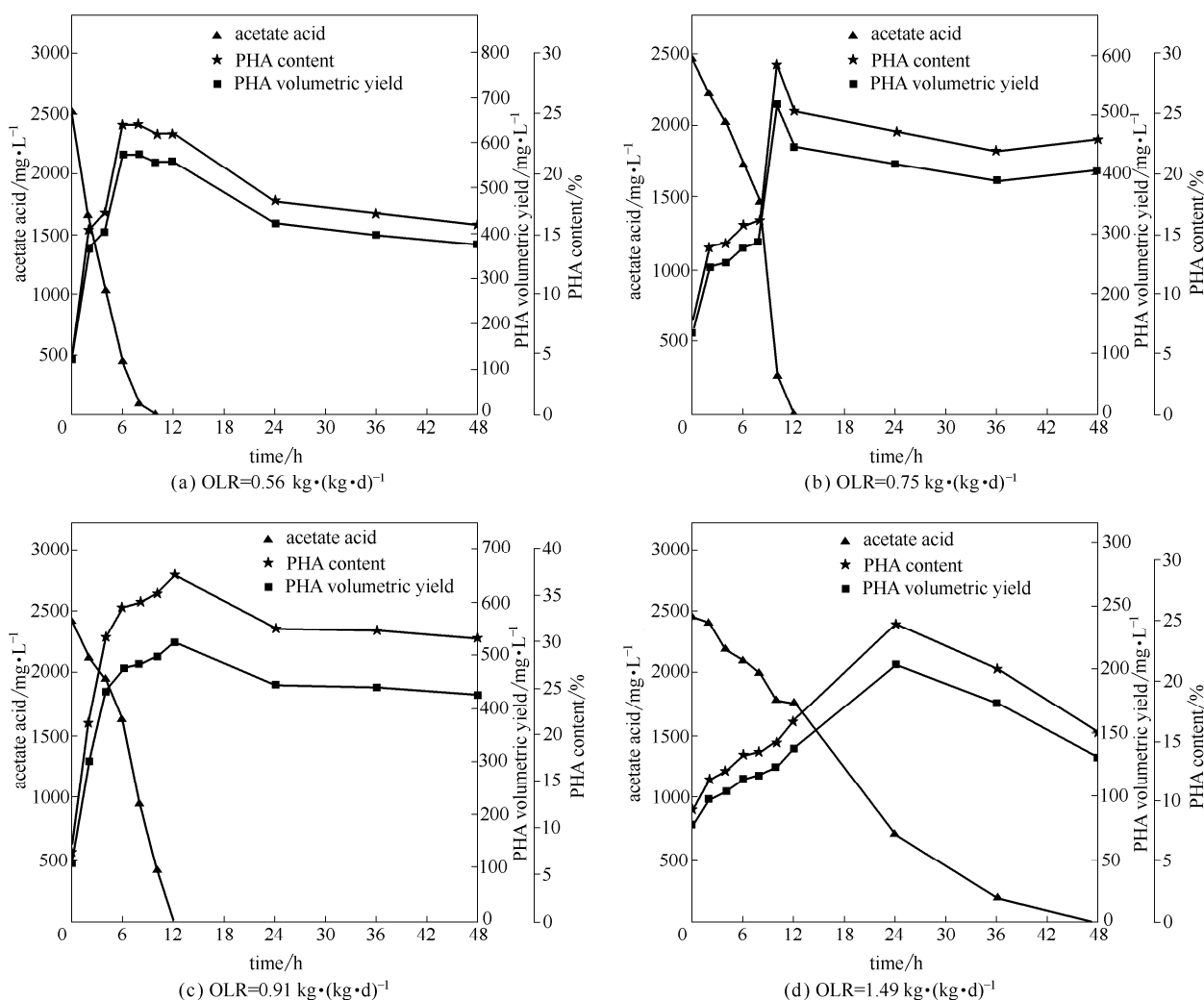


图 1 调节污泥浓度改变嗜盐活性污泥系统 OLR 实验的 PHB 生产能力及其碳源利用情况

Fig.1 PHB production capability and carbon source utilization in batch experiments of changing OLRs by adjusting halophilic activated sludge concentrations

12 和 48 h。在 $OLR = 0.56 \sim 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 范围内, 乙酸降解完成时间均和细胞内 PHA 积累最大时刻同步发生。说明乙酸被微生物充分利用而合成 PHB。但是, 在 $OLR = 1.49 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 下, PHB 积累结束时间早于乙酸降解完成时间达到 24 h。这种现象证明相对过高的碳源供给不利于 PHB 的积累。

2.2 改变底物浓度调整 OLR 对 PHB 积累的影响

恒定初始接种生物量[$MLVSS = (1400 \pm 100) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$], 通过改变底物中乙酸浓度使 OLR 达到 0.54、0.76、0.91 和 $1.47 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。图 2 (a) ~ (d) 分别是发酵期间 4 个 OLR 反应器内的底物利用和 PHB 合成情况。从图中可以看出, OLR 由 $0.54 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 增加至 $0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 时, 随着发

酵底物中有机酸量的增加, 细胞内最大 PHB 的积累量也随着增加, 分别为 14.7%、21.6%、37.2%。同时, 发酵的 PHB 容积产率也逐渐增加, 分别是 205.9, 305.4 和 $524.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以 PHB 产率和 PHB 细胞含量作为指标分析 $OLR = 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 为最优的 OLR。但是, 持续增加底物供给量至 $OLR = 1.47 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, 发酵获得的细胞内最大 PHB 的积累量和 PHB 容积产率都降低。这样的变化规律和恒定底物浓度改变接种量的实验趋势基本相同。此外, 过高的底物供给也导致了 PHB 积累先于底物降解完成的情况。在 $OLR = 0.54 \sim 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 下, 乙酸的降解完成的时间和细胞 PHB 积累最大所需的时间一致, 分别为 6、8、

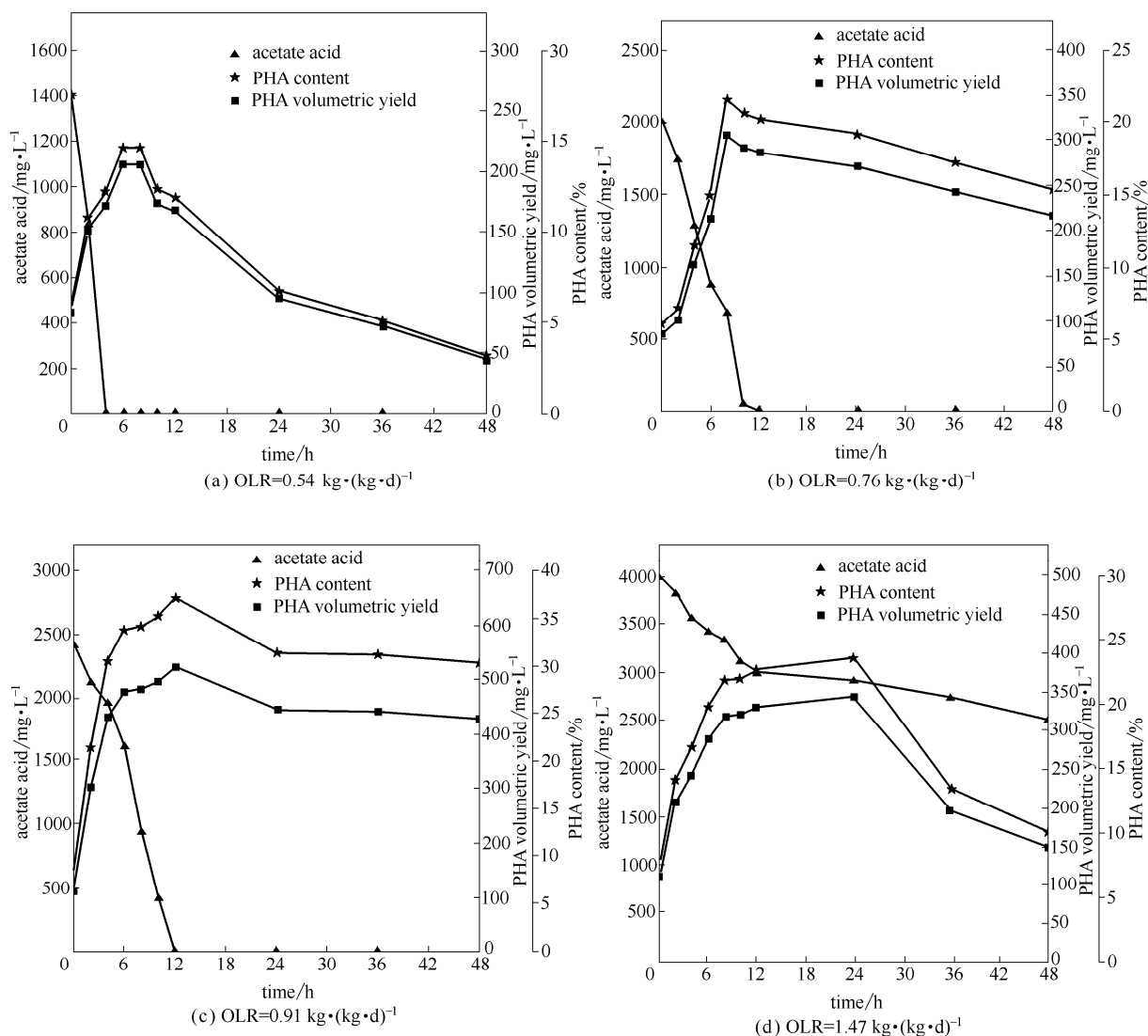


图 2 调节进水底物浓度改变嗜盐活性污泥系统 OLR 实验的 PHB 生产能力及其碳源利用情况

Fig.2 PHB production capability and carbon source utilization in batch experiment of changing OLR by adjusting influent substrate concentration in halophilic system

12 h。然而当 OLR 增加到 $1.47 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 时, 细胞内 PHB 达到积累最大所需的时间也延长至 24 h。在发酵的 48 h 内乙酸持续被利用, 乙酸总消耗量仅为约 2700 mg, 低于 $\text{OLR} = 0.54 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 时乙酸消耗量 (2800 mg)。造成这种现象的原因可能是由于过高的发酵底物浓度抑制了微生物活性, 同时也抑制生物的 PHA 合成。

2.3 不同 OLR 改变方式发酵 PHB 的表观动力学比较

根据生物积累 PHB 的线性模型^[26], OLR 会影响 PHB 积累和底物利用, 而在相同 OLR 下同时改变污泥浓度和底物浓度也可能会引起底物利用及 PHB 积累量的改变。批次实验结果的表观动力学分析见表 3。在恒定进水底物浓度、降低污泥浓度提高 OLR 发酵实验中, OLR 从 $0.56 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 升高至 $0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 时, 底物利用速率没有明显变化, 但 PHB 合成速率 q_p 逐渐增加。说明在此范围内降低污泥浓度提高 OLR, 不会改变碳源转化成 PHB 的比率和底物的利用速率, 但是却加快了储存速率。所以, 在 $\text{OLR} = 0.56 \sim 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 范围内尽管 OLR 的增加会导致 PHB 积累速率的增加, 但由于碳源转化率不变, 等量的碳源投加不会改变 PHB 总产量。当 OLR 增加到 $1.49 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 时, q_p 与 q_s 明显下降, 碳源的转化率也随之降低。因此污泥浓度降低导致的 OLR 过高抑制了微生物对底物的摄取速率, 从而减缓了 PHB 合成速率, 并且对微生物细胞存储 PHB 能力有抑制作用。恒定污泥浓度、增加进水底物浓度提高 OLR 发酵实验中, $\text{OLR} = 0.54 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 、 $\text{OLR} = 0.76 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 和 $\text{OLR} = 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 时底物消耗速率差异不明显, PHB 合成速率有明显的上升趋势, 从 0.018

$\text{mmol C} \cdot (\text{mmol C} \cdot \text{h})^{-1}$ 增加到 $0.030 \text{ mmol C} \cdot (\text{mmol C} \cdot \text{h})^{-1}$ 。同时, 碳源的转化率也随之上升。所以 OLR 在 $0.54 \sim 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 范围内, 污泥浓度恒定时 PHB 合成速率和产量与底物浓度呈正相关, 底物增加促进微生物将更多的碳源用于存储合成 PHB。

从 2.1 节和 2.2 节的数据可以看出, 两种变化 OLR 的方式似乎对 PHB 最大细胞积累含量的影响趋势趋同, 即 OLR 在 $0.55 \sim 0.95 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 范围内 PHB 最大细胞积累含量随着 OLR 的增加而有所提高。这种不同调节 OLR 方式产生的影响趋同, 其本质上是由于相对过量的外源碳源会促进 PHB 的积累导致的^[25]。但是, 这两种 OLR 调整方式在动力学水平上却存在着显著的差异。在相同的 OLR 下, 高的接种生物量始终具有高的碳源转化 $Y_{\text{PHA/S}}$ 和底物消耗速率 q_s 。在进行发酵生产 PHB 的过程中, 高的 $Y_{\text{PHA/S}}$ 是发酵生产的目标, 它意味着高的 PHB 生产效率和低的 PHB 成本。此外, 根据 2.1 节和 2.2 节的数据, 在相同的 OLR 下, 高污泥接种量还会显著提升 PHB 的容积产率和产量。为此, 在使用相同 OLR 发酵生产 PHB 过程中, 提高生物接种量会提高碳源的利用率及其 PHB 产量, 对于降低 PHB 生产成本是有益的。本研究确定的嗜盐 MMCs 发酵最佳 $\text{OLR} = 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$, 对应的接种生物量为 $1410 \text{ mg MLVSS} \cdot \text{L}^{-1}$, 底物乙酸浓度为 $2400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3 结 论

本研究以筛选的嗜盐 MMCs 作为对象, 集中研究了发酵生产 PHB 中 OLR 的影响。研究表明以嗜盐 MMCs 发酵生产 PHB, 不同调节 OLR 方式会对

表 3 不同调节方式下改变 OLR 时 PHB 合成的表观动力学参数

Table 3 Parameters of observed kinetics under different adjusting method to change OLR

Batch experiment	Kinetic parameters		
	$q_s/\text{mmol C} \cdot (\text{mmol C} \cdot \text{h})^{-1}$	$q_p/\text{mmol C} \cdot (\text{mmol C} \cdot \text{h})^{-1}$	$Y_{\text{PHA/S}}/\text{mmol C} \cdot (\text{mmol C})^{-1}$
a	0.10	0.023	0.28
b	0.10	0.027	0.28
c	0.10	0.030	0.29
d	0.06	0.007	0.12
e	0.13	0.018	0.14
f	0.13	0.023	0.18
g	0.10	0.030	0.29
h	0.02	0.008	0.35

PHB 发酵生产产生影响。在 $OLR = 0.54 \sim 0.91 \text{ kg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 内, 提高 OLR 会提高 PHB 最大细胞积累含量和 PHB 容积产率。在相同的 OLR 下, 高生物接种量具有高的 PHB 积累速率 q_p 、碳源转化率 $Y_{\text{PHA/S}}$ 和 PHB 容积产率。污泥浓度一定, 提高进水底物浓度会提升微生物细胞内 PHB 的积累量和反应器中 PHB 的总产量, 并会提高底物向 PHB 的转化率。在相同负荷下, 提高接种生物量可以促进嗜盐 MMCs 发酵的效率, 降低 PHB 生产成本。研究也证明了采用嗜盐 MMCs 在开放性的环境下生产 PHA 是可行的。同时, MMCs 对 OLR 表现出很好的适应性。与 PCs 相比, MMCs 有无需灭菌、底物负荷适应范围广、易于工程实现等优势。

References

- [1] Braunegg G, Lefebvre G, Genser K F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects [J]. *Journal of Biotechnology*, 1998, **65** (2/3): 127-161.
- [2] Zhu C J, Chiu S, Nakas J P, Nomura C T. Bioplastics from waste glycerol derived from biodiesel industry [J]. *Journal of Applied Polymer Science*, 2013, **130** (1): 1-13.
- [3] Numata K, Abe H, Iwata T. Biodegradability of poly(hydroxyalkanoate) materials [J]. *Materials*, 2009, **2** (3): 1104-1126.
- [4] Snell K D, Peoples O P. PHA bioplastic: a value-added coproduct for biomass biorefineries [J]. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, 2009, **3** (4): 456-467.
- [5] Suriyamongkol P, Weselake R, Narine S, Moloney M, Shah S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants—a review [J]. *Biotechnology Advances*, 2007, **25** (2): 148-175.
- [6] Campanari S, eSilva A, Bertin L, Villano M, Majone M. Effect of the organic loading rate on the production of polyhydroxyalkanoates in a multi-stage process aimed at the valorization of olive oil mill wastewater [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, **71**: 34-41.
- [7] Venkateswar R M, Venkata M S. Effect of substrate load and nutrients concentration on the polyhydroxyalkanoates (PHA) production using mixed consortia through wastewater treatment [J]. *Bioresource Technology*, 2012, **114**: 573-582.
- [8] Sakai K, Miyake S, Iwama K, Inoue D, Soda S, Ike M. Polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation potential and PHA-accumulating microbial communities in various activated sludge processes of municipal wastewater treatment plants [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, **118** (1): 255-266.
- [9] Johnson K, Jiang Y, Kleerebezem R, Muyzer G, van Loosdrecht M C. Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity [J]. *Biomacromolecules*, 2009, **10** (4): 670-676.
- [10] Chen Zhiqiang, Guo Zirui, Wen Qinxue, Huang Long, Bakke R, Du Maoan. A new method for polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulating bacteria selection under physical selective pressure [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2015, **72**: 1329-1334.
- [11] Kumar P, Mehariya S, Ray S, Mishra A, Kalia V C. Biodiesel industry waste: a potential source of bioenergy and biopolymers [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2015, **55** (1): 1-7.
- [12] Dai Jing, Gliniewicz K, Settles M L, Coats E R, McDonald A G. Influence of organic loading rate and solid retention time on polyhydroxybutyrate production from hybrid poplar hydrolysates using mixed microbial cultures [J]. *Bioresource Technology*, 2015, **175**: 23-33.
- [13] Quillaguamán J, Guzmán H, Van-Thuoc D, Hatti-Kaul R. Synthesis and production of polyhydroxyalkanoates by halophiles: current potential and future prospects [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, **85** (6): 1687-1696.
- [14] Pramanik A, Mitra A, Arumugam M, Bhattacharyya A, Sadhukhan S, Ray A, Haldar S, Mukhopadhyay U K, Mukherjee J. Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui* [J]. *Folia Microbiologica*, 2012, **57** (1): 71-79.
- [15] Wong Y M, Brigham C J, Rha C, Sinskey A J, Sudesh K. Biosynthesis and characterization of polyhydroxyalkanoate containing high 3-hydroxyhexanoate monomer fraction from crude palm kernel oil by recombinant *Cupriavidus necator* [J]. *Bioresource Technology*, 2012, **121**: 320-327.
- [16] Kulkarni S O, Kanekar P P, Jog J P, Patil P A, Nilegaonkar S S, Sarnaik S S, Kshirsagar P R. Characterisation of copolymer, poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHB-co-PHV) produced by *Halomonas campisalis* (MCM B-1027), its biodegradability and potential application [J]. *Bioresource Technology*, 2011, **102** (11): 6625-6628.
- [17] Cui Y W, Ding J R, Ji S Y, Peng Y Z. Start-up of halophilic nitrogen removal via nitrite from hypersaline wastewater by estuarine sediments in sequencing batch reactor [J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2014, **11** (2): 281-292.
- [18] Fang Fang (方芳), Bao Xiaojing (鲍晓静), Jiang Hui (江慧), Cao Jiashun (操家顺). Influence of F/M on intracellular storage, and nitrogen and phosphorus removal in activated sludge [J]. *Journal of Hohai University: Natural Sciences* (河海大学学报: 自然科学版), 2013, (2): 125-129.
- [19] Cui Youwei (崔有为), Ding Jieran (丁洁然), Lu Pengfei (卢鹏飞), Peng Yongzhen (彭永臻). Performance and influencing factors of halophilic activated sludge in denitrifying of nitrite [J]. *CIESC Journal* (化工学报), 2012, **63** (8): 2584-2591.
- [20] Johnson K, van Geest J, Kleerebezem R, van Loosdrecht M C M. Short- and long-term temperature effects on aerobic polyhydroxybutyrate producing mixed cultures [J]. *Water Research*, 2010, **44** (6): 1689-1700.
- [21] APHB. Standard methods for the examination of water and wastewater [S]. 1995.
- [22] Oehmen A, Keller-Lehmann B, Zeng R J, Yuan Z G, Keller E. Optimisation of poly-beta-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, **1070** (1/2): 131-136.

- [23] Salehizadeh H, van Loosdrecht M C M. Production of polyhydroxyalkanoates by mixed culture: recent trends and biotechnological importance [J]. *Biotechnology Advances*, 2004, **22** (3): 261-279.
- [24] Johnson K, Kleerebezem R, van Loosdrecht M C M. Influence of ammonium on the accumulation of polyhydroxybutyrate (PHB) in aerobic open mixed cultures [J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, **147** (2): 73-79.
- [25] Ciggin A S, Rossetti S, Majone M, Orhon D. Extent of intracellular storage in single and dual substrate systems under pulse feeding [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, **20** (3): 1225-1238.
- [26] Dias J M L, Oehmen A, Serafim L S, Lemos P C, Reis M A M, Oliveira R. Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures [J]. *BMC Systems Biology*, 2008, **2**: 59.