



文章栏目：环境生物技术

DOI 10.12030/j.cjee.202101075

中图分类号 X705

文献标识码 A

袁志强, 李超, 苑荣雪, 等. 利用富乙酸剩余污泥厌氧发酵液中链脂肪酸[J]. 环境工程学报, 2021, 15(10): 3345-3358.
YUAN Zhiqiang, LI Chao, YUAN Rongxue, et al. Conversion of acetate-rich waste activated sludge anaerobic fermentation liquor into medium-chain fatty acids[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2021, 15(10): 3345-3358.

利用富乙酸剩余污泥厌氧发酵液中链脂肪酸

袁志强¹, 李超², 苑荣雪¹, 朱南文¹, 沈雁文^{1,2,✉}, 袁海平¹

1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240

2. 湖南碧臣环境能源有限公司, 长沙 410100

第一作者: 袁志强 (1996—), 男, 硕士研究生。研究方向: 微生物发酵技术。E-mail: zhiqiangyuan@sjtu.edu.cn

✉通信作者: 沈雁文 (1985—), 女, 博士, 副教授。研究方向: 环境微生物技术。E-mail: yanwenshen@sjtu.edu.cn

摘要 为实现剩余污泥的资源化利用, 探索了混菌体系中以剩余污泥为底物连续产中链脂肪酸 (MCFAs) 的可行性。本研究基于乙醇/乙酸人工配制废水, 采用热碱水解污泥-短期厌氧发酵-微生物碳链延长 (CE) 反应的“两相发酵”技术合成 MCFAs, 并逐步优化水力停留时间 (HRT) 与底物醇酸比以驯化厌氧污泥微生物。结果表明: 在为期 135 d 的连续模式 CE 过程中, 在醇酸比为 2:1 的条件下, 驯化期 (Phase I~III) 的 HRT 由 20 d 逐步缩减至 5 d 后, 典型 CE 微生物 *Clostridium sensu stricto*_12 成为优势菌种, 其相对丰度升至 65.21%, 但己酸产率仅为 775 mg·(L·d)⁻¹; 当醇酸比提高至 3:1 (Phase IV), 己酸产率升至 1 402 mg·(L·d)⁻¹, MCFAs 产物选择性明显提高。将实验期 (Phase V) 系统中的底物替换为污泥厌氧发酵液, 己酸产率依然稳定保持在 1 400 mg·(L·d)⁻¹, 表明功能微生物组的结构稳定。宏基因组分析结果显示, 逆向 β-氧化 (RBO) 和脂肪酸生物合成 (FAB) 代谢通路均参与了 CE 过程的 MCFAs 合成; 另外, 相较于乙醇/乙酸人工配制废水, 污泥发酵液可提高这 2 种代谢通路的关键酶丰度。本研究证实了污泥连续发酵产 MCFAs 的可行性, 并阐明了过程中微生物的生态功能机制, 可为污泥资源化利用提供参考。

关键词 剩余污泥; 中链脂肪酸; 厌氧发酵; 碳链延长; 污泥增值化

我国现有近 5 000 座市政污水处理厂, 年处理污水总量超 $6 \times 10^{10} \text{ m}^3$ 。市政污水经活性污泥法处理后, 其中约 1/3 的有机污染物可被完全氧化成二氧化碳 (CO₂)。而其余大部分污水有机物则经由活性污泥代谢后被转化为微生物生物质 (按污水处理量及 COD 折算约合污染物近 $1 \times 10^7 \text{ t}$), 成为市政污水处理厂产量最大的副产物——剩余污泥的主要干物质成分。剩余污泥中的有机物是生产能源、燃料和高附加值化学品的潜在原料, 可被资源化利用^[1-2], 故不宜简单地归类于亟需处理或处置的“有害废物”。

厌氧消化 (anaerobic digestion, AD) 被认为是实现剩余污泥资源化的主流技术之一^[2]。然而, 受限于停留时间长、沼气产率低、资源化产品单一等因素, 该技术的资源回收效率与资源化产品经济价值等有待进一步提升^[3]。近年来, 羧酸平台引起了国内外研究者的广泛关注, 其“构筑模块”为短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs, C1~C5)。SCFAs 可进一步转化为多种高附加值化学品, 包

收稿日期: 2021-01-12; 录用日期: 2021-04-25

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (21908144); 湖湘高层次人才聚集工程计划项目 (2019RS1069); 湖南省组织部“湖湘青年英才”计划项目 (2018RS3114); 上海高校特聘教授“东方学者”岗位计划项目 (2017 年度)

括酯类、生物塑料(聚羟基脂肪酸酯)、单细胞蛋白以及中链脂肪酸(medium-chain fatty acids, MCFAs)^[2]。SCFAs是污泥厌氧消化的中间产物。经过水解和发酵过程,污泥中的有机物(蛋白质、多糖、脂类)被代谢转化生成SCFAs,转化率可达约70%^[2,4]。相较于传统AD产甲烷过程,污泥的厌氧发酵产SCFAs过程的停留时间、稳定性及发酵产品产率等条件均更具优势。

MCFAs是指碳原子个数为6~12的饱和脂肪酸,包括己酸(C6)、庚酸(C7)、辛酸(C8)等,在精细化工中被广泛用于制作香料、医药、化妆品及增塑剂、橡胶等化工产品。MCFAs的水溶性较弱,如己酸和辛酸在常温常压条件下的水溶解度仅为 $10.82\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.68\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,易于从发酵液中分离回收。碳链延长(chain elongation, CE)是微生物合成MCFAs的重要代谢途径。该过程以SCFAs为电子受体、乙醇或乳酸为电子供体进行逆向 β -氧化(reverse β -oxidation, RBO)^[5]。近年来,利用SCFAs产MCFAs的研究已由早期的纯培养(pure culture)体系(以人工培养基为底物接种科氏梭菌*Clostridium kluyveri*)向开放式培养(open culture)体系(以未经灭菌的实际有机废水或有机废弃物为底物培养混合微生物菌种)稳步推进。AGLER等^[6]将发酵液pH稳定控制在5.5,利用玉米生物乙醇发酵液(富含乙醇、葡萄糖、酵母菌细胞及少量残留玉米粒生物质)产SCFAs同时进行碳链延长,并在发酵反应器下游设置在线液液萃取体系同步连续回收发酵液中的己酸,产率达到 $2\text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 。以此为基础,GE等^[7]在550 d的连续培养过程中将己酸产率继续提高至 $3.4\text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 。KUCEK等^[8]利用葡萄酒粗酒泥(乙醇质量分数为40%)产MCFAs,在优化条件下(pH为5.2,以COD计的有机负荷率 $5.8\text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$),己酸和辛酸的总产率为 $3.9\text{ g}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 。除了酿酒工业产生的有机废物,合成气发酵液、餐厨垃圾、乳清废水等也被报道用作产MCFAs的原料^[9-13]。综上所述,目前微生物CE技术产MCFAs的主要原料均为具有高COD且易生物降解的有机废水或废弃物,而利用市政污水处理厂剩余污泥产MCFAs的系统研究仍需深入开展。

相较于酿酒废水或餐厨垃圾,污泥的惰性组分含量较高,且经由AD过程产MCFAs的产率极低。影响污泥产MCFAs的因素包括:1)污泥水解(限速步骤)进程缓慢;2)污泥厌氧发酵累积SCFAs过程中自发产甲烷导致碳转化效率降低;3)CE微生物组驯化期较为漫长。

本研究以酿酒废水厌氧塔颗粒污泥为接种物,采用混合SCFAs为电子受体、乙醇为电子供体,通过优化水力停留时间(HRT)与醇酸比进行微生物驯化以获得在代谢功能上占主导优势的CE微生物组。同时,采用碱性热水解预处理技术促进污泥破解,进而加速水解效率、提高SCFAs产率,完成从人工配制培养基溶液到真实污泥发酵液的底物转变,以“两相发酵”工艺实现污泥产MCFAs,并基于微生物多样性和宏基因组分析进一步揭示了过程中的微生态机制,以期为污泥有机质转化高附加值化学品的策略构建提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

微生物合成MCFAs厌氧发酵的接种污泥取自河南省三门峡市渑池县白酒厂废水厌氧处理塔,污泥初始pH为7.2,挥发性悬浮物质量分数(VSS)为0.9%。在驯化期(实验设置条件见1.2节)所使用的人工培养基组分包括:乙酸钠(醇酸比为2:1与3:1条件下其质量浓度分别为 $8.20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $6.15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)、乙醇(醇酸比为2:1与3:1条件下其质量浓度分别为 $15.3\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $17.3\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$)、磷酸二氢铵 $3.60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、六水氯化镁 $0.15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、七水硫酸镁 $0.20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、氯化钾 $0.15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、二水氯化钙 $0.20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、微量元素溶液 $1\text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ 。微量元素溶液的配方为(每升溶液):四水氯化亚铁 1.50 g 、氯化锌 70 mg 、四水氯化锰 100 mg 、硼酸 6 mg 、六水氯化钴 190 mg 、二水氯化铜 2 mg 、六水氯化镍 24 mg 、二水钼酸钠 36 mg ,以及25%稀盐酸 10 mL 。

用于产SCFAs的剩余污泥取自上海市闵行区水质净化厂二沉池,经过离心浓缩后(在转速为

4 000 r·min⁻¹ 条件下离心旋转 5 min)，再利用泥水分离后的上清液将污泥总固体含量调至约 3%。调整后的污泥基本理化性质如表 1 所示。

表 1 市政污水处理厂剩余污泥的基本理化性质

Table 1 Characteristics of waste activated sludge from a municipal wastewater treatment plant

| pH | TS/(g·L ⁻¹) | VS/(g·L ⁻¹) | COD/(mg·L ⁻¹) | SCOD/(mg·L ⁻¹) | TKN/(mg·L ⁻¹) | TAN/(mg·L ⁻¹) |
|-----------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 6.72±0.05 | 29.66±0.60 | 18.63±0.38 | 21 100±420 | 346±46 | 2 560±94 | 12.4±1.5 |

1.2 实验方法

CE 反应器为 5 L 连续搅拌反应器 (continuous stirred-tank reactor, CSTR)。实验中的反应体系的体积为 3 L，接种比例为 20% (体积分数)，温度、搅拌速率和 pH 分别为 30 °C、200 r·min⁻¹ 和 6.2。反应器运行采用连续模式发酵，连续运行 135 d，共分为 5 个运行周期 (见表 2)。其中，Phase I~IV 为驯化期，底物为人工配制培养基；Phase V 为实验期，底物为污泥厌氧发酵上清液。反应器运行期间，每 24 h 取 5 mL

表 2 不同运行周期的反应器运行条件

Table 2 Operational conditions of different phases of bioreactor for chain elongation

| 运行周期 | HRT/d | 醇酸比 | 运行时间/d |
|-----------|-------|-----|---------|
| Phase I | 20 | 2:1 | 0~20 |
| Phase II | 10 | 2:1 | 21~50 |
| Phase III | 5 | 2:1 | 51~90 |
| Phase IV | 5 | 3:1 | 91~120 |
| Phase V | 5 | 3:1 | 121~135 |

样品测定发酵液中的底物 (乙醇、乙酸) 及产物 (丁酸、己酸和辛酸) 浓度。

污泥厌氧发酵液的制备过程分为预处理和厌氧发酵 2 个阶段。

1) 预处理阶段：将污泥的 pH 用 NaOH 溶液 (OH⁻物质的量为 2 mol·L⁻¹) 调至 11.0，水浴加热至 90 °C 后持续进行热碱处理 2 h，待冷却降温至 37 °C 后，用 HCl 溶液 (H⁺物质的量为 2 mol·L⁻¹) 将 pH 调至 7.0。

2) 厌氧发酵阶段：采用全自动厌氧消化测试仪器 (MultiTalent203, 碧普华瑞) 进行发酵，反应器为 2 L 培养瓶，单个反应器工作体积为 1.8 L，每组可同时运行 6 台反应器；厌氧接种比为 5:1 (以 TS 计)，接种物取自本实验室稳定连续运行超过 1 a 的污泥中温厌氧消化反应罐；在发酵实验开始前通入高纯氩气 5 min 以吹脱溶氧，并添加 50 mmol·L⁻¹ 的 2-溴乙烷磺酸钠 (BES) 用于抑制产甲烷古菌的代谢活性；发酵控制条件为温度 (37 ± 1) °C、搅拌速率 120 r·min⁻¹、发酵时间 5 d；最后将发酵液进行泥水分离 (4 000 r·min⁻¹ 高速离心 5 min)，保留上清液进行高温灭菌 (121 °C, 15 min) 后，置于 4 °C 下冷藏保存待用；使用前添加适量乙醇将醇酸比调至 3:1，保存时间不超过 2 d。

1.3 组分分析方法

剩余污泥 pH 使用 FE28 标准 pH 计 (Mettler-Toledo, 瑞士) 测定；其余理化指标 (包括 TS、VS、COD、TKN、TAN)，采用国标法测定。污泥厌氧发酵液经离心 15 min (转速离心力为 12 000g) 后，取上清液过膜 (滤膜孔径 0.45 μm)，分析其 SCOD、多糖、蛋白质和 SCFAs 浓度等。多糖和蛋白质分别采用蒽酮-硫酸比色法 (以葡萄糖为标准物质) 和考马斯亮蓝法 (以牛血清蛋白为标准物质)^[14-15] 测定。SCFAs (乙酸、丙酸、正丁酸、异丁酸、正戊酸、异戊酸) 的组分和浓度采用气相色谱法测定，即在对其酸化预处理后 (添加适量 3% 磷酸溶液将样品 pH 降至 4.0 以下)，使用装配有火焰离子化检测仪 (FID) 和 DB-FFAP 型毛细管柱的 GC-7890B 气相色谱 (安捷伦, 美国) 进行定量分析。微生物连续发酵产 MCFAs 实验中的底物 (乙醇、SCFAs) 与产物 (丁酸、己酸、辛酸) 浓度的定量分析方法与 SCFAs 相同。

1.4 微生物种群多样性分析方法

在运行周期 Phase II~V(分别为反应进行 50、90、120 和 133 d) 各取发酵液 2 mL, 在 $14\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离心旋转 5 min, 撇除上清液后获得微生物混菌样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻保存, 直至进行微生物种群多样性分析。分析内容: 1) 使用 E.Z.N.A. Soil DNA 试剂盒 (Omega Bio-Tek, 美国) 抽提 DNA, DNA 浓度、纯度和完整性分别使用 TBS-380、NanoDrop2000 和 1% 琼脂凝胶电泳进行检测; 2) 采用 338F/806R 和 524F/958R 引物对分别进行细菌区 V3~V4 片段和古菌区 V4~V5 片段的 16S rRNA 扩增; 3) 桥式 PCR 扩增步骤见参考文献 [16]; 4) 高通量测序采用 Illumina MiSeq PE300 平台, 优化原始数列后, 按 97% 相似度进行 OTU 聚类, 并采用 RDP Classifier 贝叶斯算法 (Silva 数据库, 70% 置信度) 进行 OTU 聚类分析。

1.5 宏基因组分析方法

宏基因组分析可探究污泥厌氧发酵液作为底物合成 MCFAs 对微生物 CE 代谢过程的影响。分别提取实验周期 Phase IV 和 Phase V 的发酵液, 进行 DNA 抽提和质量分析, 方法与微生物种群多样性分析相同。DNA 片段化使用 Covaris M220 超声破碎仪, 数据质控后 cleaned reads 使用 MegaHit (<http://github.com/voutcn/megahit>) 进行组装拼接 (contig), 仅保留片段长度大于 300 bp 的拼接序列进入后续拼接。在基因预测阶段, 使用 MetaGene 软件 (<http://metagene.cb.k.u-tokoyo.ac.jp>) 进行开放式阅读框 (ORFs) 预测, 长度大于 100 bp 的 ORF 被翻译为氨基酸序列。使用 CD-HIT 软件 (<http://www.bioinformatics.org/cd-hit>) 对预测出的基因组进行聚类分析 (95% 序列一致性, 90% 覆盖度), 选出每个聚类中最长序列作为代表性序列建立非冗余基因集, 使用 SOAPaligner (<http://soap.genomics.org.cn>) 计算样品的基因丰度。最后, 使用 BLASTP (v 2.2.28+, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 参考 NCBI_NR 数据库和 KEGG 数据库对比该非冗余基因集序列, 分别进行分类注释和功能注释。

2 结果与讨论

2.1 驯化期 CE 微生物产 MCFAs 的运行情况

调控反应器的 HRT 是最常见的驯化微生物菌群以产 MCFAs 策略之一。如图 1 所示, 在整个驯化期间 (0~90 d), 丁酸、己酸和辛酸是主要的微生物 CE 合成产物。在实验启动期 (Phase I), 3 种羧酸的产率均很低, 至 10~20 d 后呈现缓慢增长趋势。在启动期结束时 (20 d), 丁酸、己酸和辛酸的产率已分别达到 65 、 133 和 $82\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 。进入 Phase II (HRT=10 d), 即反应进行至 21~35 d, 丁酸和辛酸的产率基本维持不变, 而已酸的产率出现小幅下降; 在 35~40 d, 丁酸和己酸的产率均迅速增长, 其最高产率分别为 766 和 $756\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$, 而辛酸产率相较于 Phase I 发生明显增长。在 40~50 d, 己酸产率保持在 $500\sim 750\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$, 但丁酸产率逐步降低至 $200\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$, 而辛酸产率则上升至

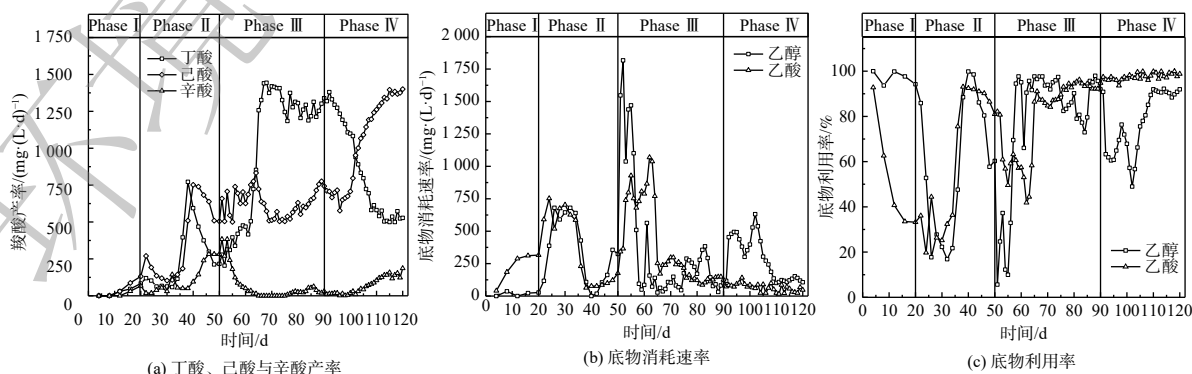


图 1 驯化期微生物碳链延长代谢表现

Fig. 1 Performance of chain elongation under varied operational conditions during acclimation period

265 mg·(L·d)⁻¹。CE 代谢过程中碳链逐级延长的现象表明“丁酸+乙醇”合成己酸与“己酸+乙醇”合成辛酸的动力学变化决定了己酸产率的动态变化。当 HRT 由 10 d 缩短至 5 d 后，在 51~60 d，丁酸和己酸的产率继续保持稳定，辛酸产率则持续下降，表明 CE 微生物代谢效率并未随着体系 OLR 增加而上升。而在 60~70 d，丁酸产率由 468 mg·(L·d)⁻¹ 急剧上升至 1 413 mg·(L·d)⁻¹，增幅达 202%；另一方面，己酸产率则维持在 500 mg·(L·d)⁻¹ 左右，辛酸的产率则出现显著下降，最终降至 25 mg·(L·d)⁻¹。直至 Phase III 结束，丁酸、己酸与辛酸的相对占比基本维持在这一水平。

底物利用率反映了微生物进行 CE 代谢过程的碳转化效率。在 Phase I，乙醇利用率达到 90% 以上，但乙酸利用率却急剧下降，最终仅保持在 30% 左右，其原因可能是由于乙醇在发酵细菌与产甲烷古菌的协同作用下被代谢转化为乙酸、CH₄ 与 CO₂。当 HRT 缩短至 10 d (Phase II)，因其自身增殖速率过低，产甲烷古菌被逐渐洗脱，而由于存在能量壁垒，导致失去了“互养搭档 (syntrophic partner)”的厌氧发酵细菌无法单独进行“乙醇→乙酸”的代谢过程 (CH₃CH₂OH + H₂O → CH₃COO⁻ + H⁺ + 2H₂, ΔG⁰ = 9.7 kJ·mol⁻¹)。这表明该周期乙醇与乙酸的利用率完全取决于 CE 微生物菌群的相对丰度与代谢活性，在 Phase II 的后半期 (35~50 d) 上升至近 100%；而在 Phase III 阶段，其变化趋势也基本与同时期丁酸与 MCFAs 的产率一致，在 CE 微生物菌群逐渐稳定之后，乙醇和乙酸的利用率基本稳定在 90%~100%。因此，导致这一时期 (65~90 d) MCFAs 产率明显低于丁酸的原因可能是醇酸比过低，乙醇被更多地用于进行乙酸 CE 反应生成丁酸，进而限制了己酸和辛酸的合成^[17-18]。

当醇酸比调至 3:1 后 (Phase IV)，初期 (90~100 d) 己酸与辛酸的产率相较于 Phase III 时无明显变化，而丁酸产率则开始逐渐降低；乙酸利用率仍接近 100%，而乙醇利用率则下降至 60% 左右。上述结果表明，微生物未能立即利用富余乙醇作为电子供体进行 CE 反应，其原因可能是发酵液乙醇浓度骤升所引起的轻微胁迫效应^[17]。在 100~120 d，丁酸产率由 1 074 mg·(L·d)⁻¹ 降至 528 mg·(L·d)⁻¹，降幅为 50.8%，而已酸产率则由 701 mg·(L·d)⁻¹ 增至 1 402 mg·(L·d)⁻¹，辛酸产率也由 18.2 mg·(L·d)⁻¹ 增至 200 mg·(L·d)⁻¹。在此期间，乙醇利用率稳步上升，并保持在 88.1%~92.3%，表明乙醇经由逆向 β-氧化代谢路径用于微生物 CE 过程生成 MCFAs。有文献报道，当醇酸比为 2:1 时，以科氏梭菌 *Clostridium kluyveri* 为优势菌的微生物菌群进行 CE 反应的主要产物为丁酸，将醇酸比提高至 3:1 或 4:1，可促使丁酸进一步转化为己酸^[7, 17, 19]。在逆向 β-氧化过程中，乙醇既是电子供体提供还原当量 NADH，也在被氧化时为代谢提供 ATP，每 5 mol 参与 CE 反应的乙醇对应 1 mol 被氧化为乙酸的乙醇 (5C_xH_{2x-1}O₂⁻ + 6CH₃CH₂OH → 5C_{x+2}H_{2x+3}O₂⁻ + CH₃COO⁻ + H⁺ + 4H₂O + 2H₂)，因此，较高的醇酸比使得乙醇更多参与丁酸的 CE 反应而非厌氧氧化，从而提高了己酸产率^[7]。在本研究中，考虑到醇酸比为 3:1 的条件下乙醇利用率始终未达到 100%，故未进一步提高培养基中的醇酸比，以避免发酵液中乙醇浓度过高而产生底物胁迫效应^[18]。WU 等^[20] 发现，当醇酸比从 3:1 增至 5:1 时，尽管己酸产率在短期内有所提高，但发酵液中的残留乙醇会明显抑制 CE 微生物的代谢活性。

总烷基量 (total alkyl groups, TAL)、平均碳链长度 (average chain length, ACL) 与 CE 过程碳效率 (carbon conversion efficiency, CCE) 是评价微生物产 MCFAs 的重要指标，其计算公式如式 (1)~(3) 所示。

$$\text{TAL} = (3 \times C_{\text{丁酸}}) + (5 \times C_{\text{己酸}}) + (7 \times C_{\text{辛酸}}) \quad (1)$$

$$\text{ACL} = \frac{\text{TAL}}{C_{\text{丁酸}} + C_{\text{己酸}} + C_{\text{辛酸}}} + 1 \quad (2)$$

$$\text{CCE} = \frac{C_{\text{丁酸}} + C_{\text{己酸}} + C_{\text{辛酸}}}{C_{\text{乙醇}} + C_{\text{乙酸}}} \quad (3)$$

式中：C_{丁酸} 为丁酸的浓度，mmol·L⁻¹；C_{己酸} 为己酸的浓度，mmol·L⁻¹；C_{辛酸} 为辛酸的浓度，mmol·L⁻¹；C_{乙醇} 为乙醇的浓度，mmol·L⁻¹；C_{乙酸} 为乙酸的浓度，mmol·L⁻¹。

因为 MCFA 的水溶性随着碳链长度增加而降低, 所以 TAL 与 ACL 与发酵液中 MCFAs 的可分离性能呈线性相关。如表 3 所示, 除启动期 Phase I 之外, 其余运行周期内 MCFAs 的可分离性较好, 仅在 Phase III 有所降低, 其主要原因在于丁酸的大量生成, 而已酸、辛酸的产量不足。CCE 反映了乙醇与乙酸参与 CE 过程被转化为 C4~C8 羧酸的效率。由于在 Phase I 阶段产甲烷古菌代谢活性较高, CCE 仅为 33.4%, 但在 Phase II 至 IV 期间骤增至 62.1%~72.9%, 表明 CE 代谢过程的碳利用效率较高。

己酸选择性变化趋势与己酸产率保持一致, 证明了提高醇酸比有利于 CE 微生物合成己酸。

2.2 CE 微生物产 MCFAs 的运行情况

如图 2(a) 所示, 空白组 (CK) 与热碱预处理组 (THALK) 的剩余污泥厌氧发酵过程均在 5 d 后达到稳定。发酵液 SCFAs 的最终质量浓度 (以 COD 计) 分别为 $(4\ 240\pm 157)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $(7\ 000\pm 240)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这表明热碱预处理对污泥絮体的破壁溶胞作用释放 SCOD 可明显提升 SCFAs 产率。对上清液成分进行分析后可知, CK 组与 THALK 组污泥发酵液的 SCFAs 成分结构类似, 主要为乙酸, 分别占总 SCFAs 的 51.0% 与 56.2%, 其余为丙酸、正丁酸和正戊酸 (图 2(b))。其中, 碳原子个数为偶数的 SCFAs (乙酸、丁酸) 占比达到 73.3%, 表明污泥厌氧发酵液可作为底物合成 MCFAs, 特别是己酸和辛酸。

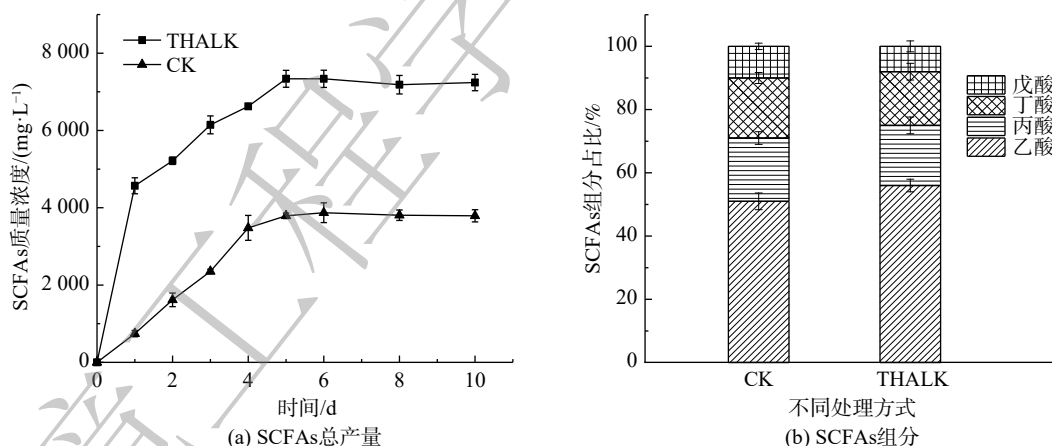


图 2 空白组与热碱预处理组的污泥厌氧发酵产 SCFAs 情况

Fig. 2 Anaerobic fermentation of waste activated sludge for control group and thermal-alkaline pretreatment group

如图 3 所示, Phase V 阶段的运行条件 (HRT=5 d, 醇酸比为 3:1) 与 Phase IV 阶段保持一致, 当底物由人工配制培养基溶液替换为污泥发酵液后, 丁酸、己酸和辛酸的合成情况并未出现明显变化, 其平均产率分别为 534 、 $1\ 380$ 和 $141\text{ mg}\cdot(\text{L}\cdot\text{d})^{-1}$ 。另外, 乙醇与乙酸的转化利用情况也与 Phase IV 阶段时基本相同, 利用率保持在 92.4%~98.2%。Phase V 阶段的 TAL、ACL 和 CCE 和己酸选择性分别达到 $519.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、6.47 和 63.3%, 与 Phase IV 阶段基本持平。因此, 尽管污泥发酵液中存在蛋白质 (以 COD 计, 质量浓度 $946.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、多糖 (以 COD 计, 质量浓度 $1\ 566.6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 及其他包括腐殖质在内的 DOM (以 COD 计, 质量浓度 $3\ 122.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。然而, 这些 DOM 并未影响 CE 微生物合成 MCFAs 的过程。由此可见, 当反应器内微生物保持稳定的菌群多样性结构和代谢活性时, 利用

表 3 驯化期不同运行条件下的总烷基量、平均碳链长度与碳效率

Table 3 Total alkyl groups, average chain length and carbon conversion efficiency of microbial chain elongation process under different operational conditions during the acclimation period

| 运行周期 | 总烷基量/(mmol·L ⁻¹) | 平均碳链长度 | 碳效率/% |
|-----------|------------------------------|--------|-------|
| Phase I | 291.8 | 6.82 | 33.4 |
| Phase II | 543.4 | 6.83 | 62.1 |
| Phase III | 507 | 5.63 | 72.9 |
| Phase IV | 535.6 | 6.51 | 64.8 |

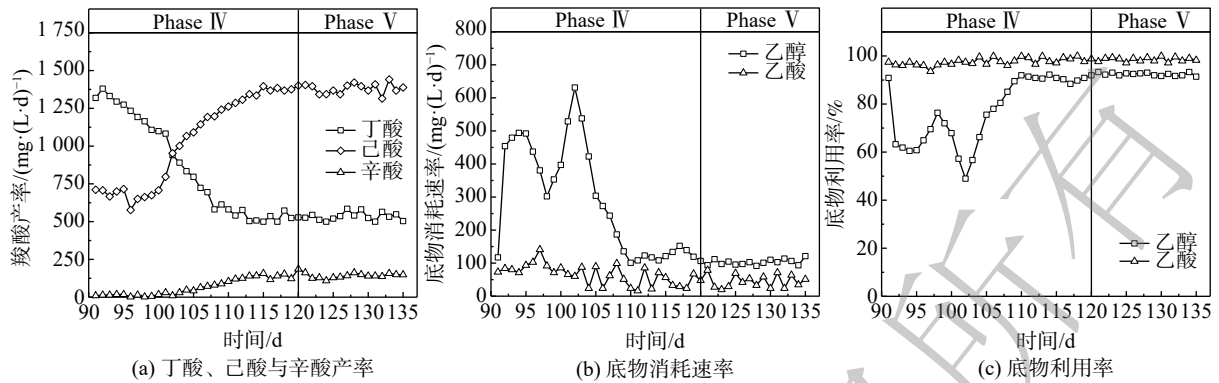


图 3 驯化期 (Phase IV) 向实验期 (Phase V) 转变期间的微生物碳链延长代谢表现

Fig. 3 Performance of chain elongation from the acclimation period to the test period

污泥发酵液产 MCFAs 是可行的。值得注意的是, 尽管污泥厌氧发酵液中含有丙酸 (C3) 和正戊酸 (C5), 但奇数碳链 MCFAs (如 C5 戊酸、C7 庚酸等) 产率极低, 这与 HAN 等^[21] 的研究结果一致。产生以上现象的主要原因为如下 2 个机制。1) CE 微生物的底物选择性: 在长达 90 d 的驯化期间, CE 微生物始终以乙酸 (C2) 作为电子受体, 并且 Phase V 期污泥发酵液的 SCFAs 也是以偶数碳链羧酸为主要组分 (乙酸 56.2%, 正丁酸 17.1%), 使得 CE 微生物更倾向于利用乙酸和丁酸为电子受体与乙醇生成偶数碳链的 MCFAs。2) 逆向 β -氧化过程的能量代谢机制: 在电子受体为奇数碳链羧酸 (如 C3 丙酸) CE 过程中, 每 5 mol 乙酰辅酶 A 生成戊酸 (C5) 的同时, 有 1 mol 乙酰辅酶 A 会被氧化成 1 mol 乙酸以用于合成 ATP 提供细胞代谢能量, 从而使得乙酸会在下一轮 CE 过程中, 与丙酸竞争电子供体 (乙醇) 以生成相应的碳链延长羧酸, 故理论上奇数碳链 MCFAs 产物选择率仅为 83.33%。已有研究表明, 即使仅丙酸为电子供体, 奇数碳链 MCFAs (C5 戊酸、C7 庚酸) 的产物选择率也仅为 35%~66%^[22-24]。

综上所述, 在优化条件 (醇酸比为 3:1、HRT=5 d) 下, 总含固率为 3% 的剩余污泥己酸和辛酸产率分别为 1.38、0.14 kg·(L·d)⁻¹, 以我国市政污泥年产量 5×10^7 t (含水率 80%) 进行估算, 以污泥定向发酵产己酸和辛酸的年产量可分别达到 46×10^4 t 与 4.7×10^4 t。

2.3 微生物群落结构变化

图 4 展示了反应器不同运行周期的微生物在属水平的菌群多样性结构。Phase II 阶段的优势微生物包括甲烷杆菌 *Methanobacterium*、木里菌 *Muribaculaceae* 及乳酸杆菌 *Lactobacillus*, 其相对丰度分别为 13.3%、8.7% 和 8.2%。其中, *Methanobacterium* 是氢营养型产甲烷古菌, 与厌氧发酵细菌共生以克服热力学能量壁垒, 将乙醇和 VFAs 降解代谢为甲烷。有文献报道, *Methanobacterium* 与 CE 微生物菌群形成的底物竞争关系是导致反应器启动期间 MCFAs 产率较低的微生物机制^[7, 25]。Phase III 阶段的微生物群落结构较 Phase II 阶段改变明显, 狭义梭菌 *Clostridium sensu stricto*_12 成为优势菌 (相对丰度 55.0%), 其他优势菌属包括醋杆菌 *Acetobacter* (9.9%)、理研菌科属 *Rikenellaceae* RC9 (8.9%)、鲁梅尔芽胞杆菌 *Rummeliibacillus* (6.2%), 而 *Methanobacterium* 几乎未被检测到 (相对丰度 <0.1%), 故缩短 HRT 是消除产甲烷古菌底物竞争的有效策略。值得注意的是, 根据美国国家生物技术信息中心 NCBI 数据库的 BLAST 比对结果分析, *Clostridium sensu stricto*_12 的 OTU 序列与 CE 模式微生物 *Clostridium kluyveri* 的 OTU 序列相似度大于 99%^[5, 26-27], 故优势菌 *Clostridium sensu stricto*_12 是发酵液中合成 MCFAs 的核心功能细菌。Phase IV 阶段的微生物群落结构与 Phase III 阶段的相似, *Clostridium sensu stricto*_12 的相对丰度进一步上升至 64.9%, 但 *Acetobacter* 的相对丰度降至 2.5%, 表明提高醇酸比有利于富集 CE 微生物 *Clostridium*。由于 Phase V 阶段的底物为污泥发酵上清液, 微生物菌群结构发生了明显变化, 尽管此时 *Clostridium sensu stricto*_12 仍为优势菌之一,

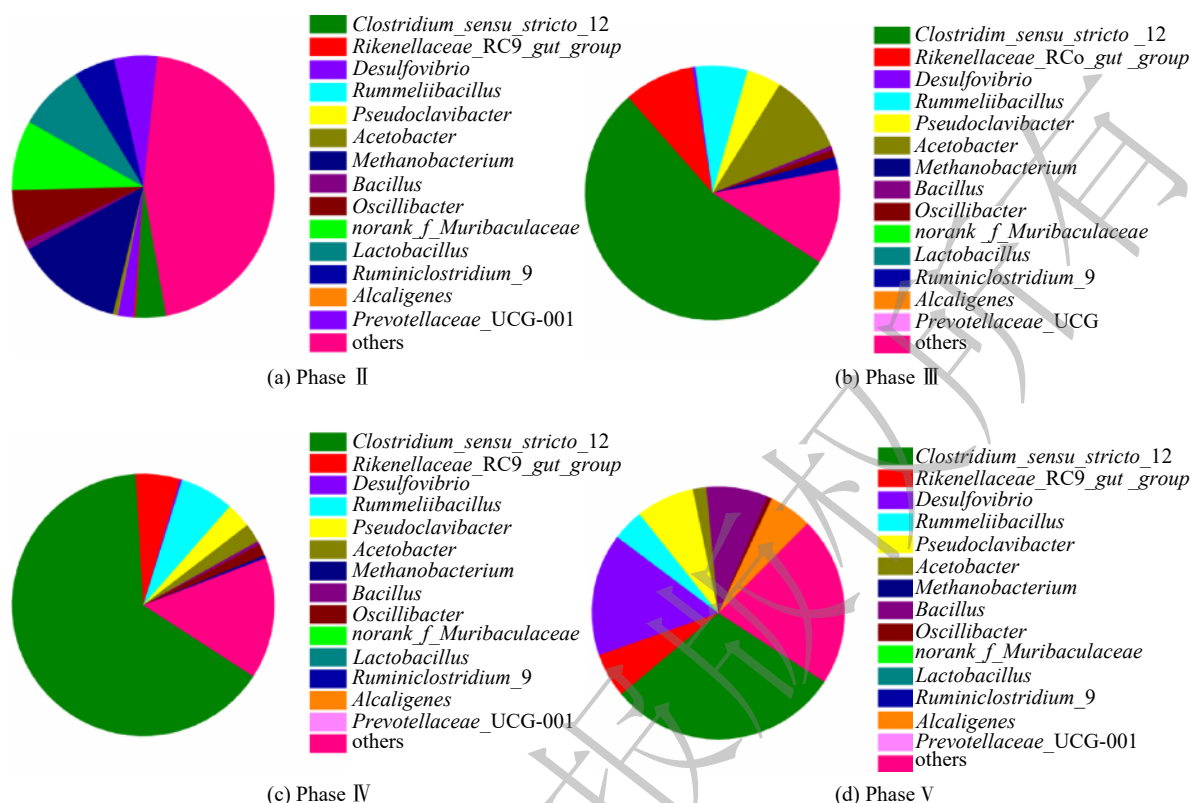


图4 不同周期的微生物在属水平上的群落结构

Fig. 4 Genus-level microbial community during different operational phases

但其相对丰度已降至 29.7%。其他相对丰度较高的微生物包括脱硫弧菌 *Desulfovibrio*(15.6%)、假假苍黄菌 *Pseudoclavibacter*(7.5%)、芽孢杆菌 *Bacillus*(7.8%)。这些微生物未被证明是 CE 微生物，但广泛存在于市政污水处理厂的活性污泥中，因此，引入污泥发酵液会不可避免地提高这些微生物 DNA 水平上的相对丰度。DE VRIEZE 等^[28]发现，相较于 DNA 水平上的总微生物群落(包括活性与非活性)，RNA 水平上的微生物群落结构(即活性微生物)能更准确反映厌氧生态体系的状况。微生物属水平的主成分分析(PCA)结果如图 5 所示，成分因子 1(PC1)与成分因子 2(PC2)对数据点差异性贡献率之和达到 94.28%。从象限分布来看，Phase III 阶段和 Phase IV 阶段的微生物群落结构较为相似，与 Phase II 及 Phase V 阶段的群落结构差异明显。

2.4 宏基因组分析结果

宏基因组分析过程中，Phase IV 和 Phase V 阶段的发酵液样品原始 reads 数分别为 67 758 922 和 69 750 096。经数据质控和拼接组装后，ORF 的总长度为 345 493 103 bp。2 组样品在 KEGG 功能水平上共享代谢通路 260 个，共享率为 97%(见 图 6(a))。这说明底物由人工培养基替换为污泥厌氧发酵液并未使得微生物种类和功能层面产生明显差异。Phase IV 和 Phase V 阶段的微生物组主要参与氨基酸合成、ABC 转运、碳代谢和双组分系统等代谢过程(见 图 6(b))，但这些代谢过程的基因丰度

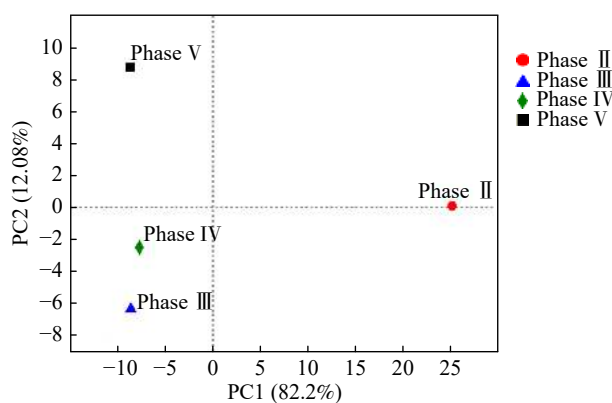


图5 不同周期微生物群落结构的主成分分析结果

Fig. 5 The principal component analysis (PCA) of the microbial communities during different operational phases

表4 碳链延长(CE)过程涉及到的关键酶及其在Phase IV和Phase V阶段微生物组中的丰度

Table 4 Key enzymes involved in chain elongation pathways and their abundance in Phase IV and V

| 关键酶的名称 | 缩写 | EC [#] | 功能描述 | 不同周期酶丰度 | |
|-----------------------------|-----|-----------------|--|----------|---------|
| | | | | Phase IV | Phase V |
| Thiolase | TLA | 2.3.1.16 | Acetyl-CoA C-acyltransferase | 1 356 | 5 220 |
| Ketoacyl-CoA reductase | KCR | 1.1.1.36 | Acetyl-CoA reductase | 536 | 4 902 |
| Hydroxyacyl-CoA dehydratase | HCD | 1.1.1.157 | 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase | 19 452 | 16 412 |
| | | 1.1.1.35 | 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase | 5 686 | 15 354 |
| | | 2.3.1.16 | Acetyl-CoA C-acyltransferase | 1 356 | 5 220 |
| | | 4.2.1.17 | Enoyl-CoA hydratase | 13 918 | 15 978 |
| Enoyl-CoA reductase | ECR | 5.1.2.3 | 3-hydroxybutyryl-CoA epimerase | 666 | 4 922 |
| Thioesterase | TES | 3.1.2.23 | 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase | 2 740 | 1 968 |
| Acetyl-CoA carboxylase | ACC | 6.3.4.14 | Biotin carboxylase | 21 802 | 12 782 |
| | | 6.4.1.2 | Acetyl-CoA carboxylase | 40 616 | 33 858 |
| Malonyltransferase | MAT | 2.3.1.39 | [acyl-carrier-protein]S-malonyltransferase | 15 826 | 17 026 |
| Ketoacyl-ACP synthase | KAS | 2.3.1.41 | β -ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I | 5 360 | 11 046 |
| | | 2.3.1.179 | β -ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II | 20 000 | 26 892 |
| | | 2.3.1.180 | β -ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III | 32 110 | 30 154 |
| Ketoacyl-ACP reductase | KAR | 1.1.1.100 | 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase | 32 462 | 40 198 |
| Hydroxyacyl-ACP dehydratase | HAD | 4.2.1.59 | 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase | 8 812 | 7 466 |
| Enoyl-ACP reductase | EAR | 1.3.1.9 | enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH) | 14 468 | 16 656 |
| | | 1.3.1.10 | enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADPH, Si-specified) | 1 448 | 6 510 |

2.3.1.180(β -酮脂酰-[酰载体蛋白]合成酶Ⅲ)、EC 6.3.4.14(生物素羧化酶)及 EC 6.4.1.2(乙酰辅酶A 羧化酶)。关键酶丰度的变化证实了转化底物后微生物新陈代谢的变化,但从宏观角度而言,进入Phase V 阶段后, MCFAs 产率并没有随微生物代谢和转录出现波动。事实上, CE 过程中发酵体系内多种微生物可能共同具备关键酶,很难将某种特定酶与特定微生物相对应。因此,只要具备转录翻译功能的微生物拥有足够活性,就能够促进合成 MCFAs。

逆向 β -氧化过程(reverse β -oxidation, RBO)和脂肪酸合成(fatty acid biosynthesis, FAB)是微生物混菌体系经CE过程合成MCFAs的主要代谢途径(见图7(a))^[5,21]。相较于FAB途径,RBO途径的步骤更少,且ATP净消耗量更小,故可认为RBO更加高效。本研究中RBO和FAB途径所涉及的关键酶均被检出。RBO途径关键酶的总丰度为65 980(Phase IV)和10 630(Phase V),而FAB途径关键酶的总丰度则达到192 904(Phase IV)和202 588(Phase V)。FAB的总丰度高于RBO表明MCFAs可能更多地经由FAB途径合成,这与HAN等^[21]的研究结果一致。相较于Phase IV,Phase V的微生物组RBO途径中的TLA、KCR、HCD、ECR酶丰度分别增加了285.0%、814.6%、40.9%、78.9%,仅有TES酶丰度降低28.2%;FAB途径中的MAT、KAS、KAR和EAR酶丰度分别增加了7.6%、18.5%、23.8%和45.6%,而ACC的酶丰度则降低25.3%。上述结果表明,中间产物乙酰辅酶A的后续代谢可能有部分从FAB转入RBO途径(见图7(b))。综上所述,在其他发酵条件(HRT、醇酸比)相同的情况下,以乙醇为电子供体,使用富SCFAs污泥发酵液为电子受体比单独使用乙酸更有利于合成MCFAs。

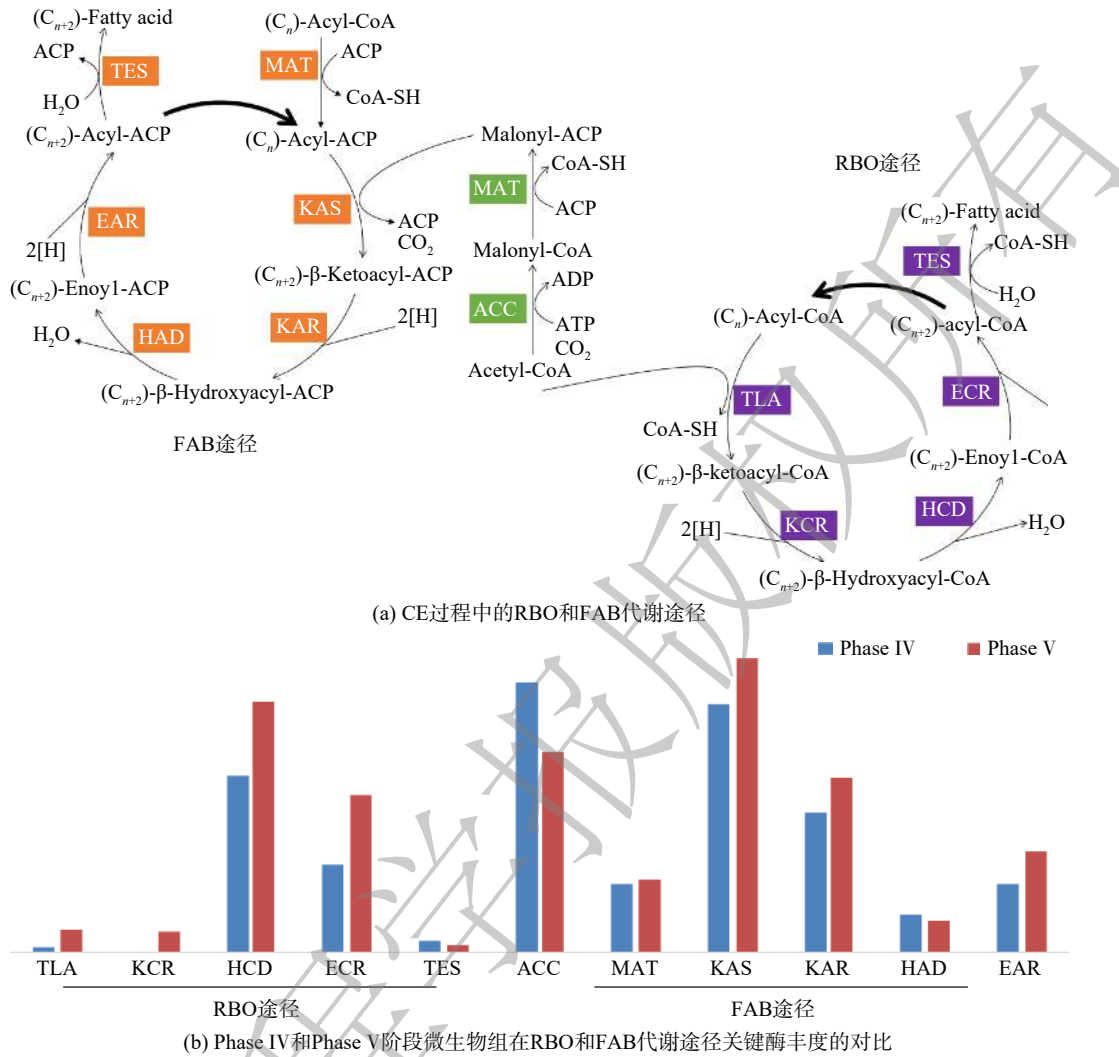


图 7 RBO 途径与 FAB 途径代谢对比

Fig. 7 Metabolism comparison of RBO pathway and FAB pathway

3 结论

1) 当 HRT 由 20 d 优化至 5 d, 醇酸比保持在 2:1 时, 发酵体系中 *Methanobacterium* 的丰度明显降低, 而关键产 MCFAs 菌 *Clostridium sensu stricto*_12 丰度为优势菌种, 最大丰度为 64.89%。然而, 此时体系内堆积大量丁酸, 证明通过 HRT 调整可洗脱污泥内竞争性产甲烷菌, 对体系内微生物起到良好的驯化作用, 但醇酸比偏低会导致电子供体不足, 不能使丁酸进一步延长为己酸。

2) 当 HRT 为 5 d 时, 将醇酸比由 2:1 提升至 3:1 后, 乙醇作为电子供体促使丁酸进一步转化为己酸, 此时己酸产率达到 $1400 \text{ mg} \cdot (\text{L} \cdot \text{d})^{-1}$ 。同时, 体系内微生物群落结构变化并不明显, 说明乙醇含量并未对微生物造成抑制。

3) 将底物由人工配制特定培养基转为热碱预处理污泥发酵液后, 丁酸、己酸和辛酸的产率并未发生明显变化。尽管此时 *Clostridium sensu stricto*_12 丰度下降, 但宏基因组学分析发现, 体系内关键代谢通路 RBO、FBA 关键酶依旧保持较高丰度, 说明体系具备一定的抗冲击能力, 可连续高效生产 MCFAs。

参考文献

- [1] MEERBURG F A, BOON N, VAN WINCKEL T, et al. Optimizing retention times in high-rate contact stabilization for maximal recovery of organics from wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(17): 9781-9790.
- [2] ALLOUL A, GANIGUE R, SPILLER M, et al. A three-step approach for the valorization of sewage organics as commodities[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(12): 6729-6742.
- [3] ANGENENT L T, USACK J G, XU J, et al. Integrating electrochemical, biological, physical, and thermochemical process units to expand the applicability of anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247(9): 1085-1094.
- [4] CAGNETTA C, COMA M, VLAEMINCK S E, et al. Production of carboxylates from high rate activated sludge through fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 217(3): 165-172.
- [5] ANGENENT L T, RICHTER H, BUCKEL W, et al. Chain elongation with reactor microbiomes: open-culture biotechnology to produce biochemicals[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(6): 2796-2810.
- [6] AGLER M T, SPIRITO C M, USACK J G, et al. Chain elongation with reactor microbiomes: Upgrading dilute ethanol to medium-chain carboxylates[J]. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5(8): 8189-8192.
- [7] GE S J, USACK J G, SPIRITO C M, et al. Long-term n-caproic acid production from yeast-fermentation beer in an anaerobic bioreactor with continuous product extraction[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(13): 8012-8021.
- [8] KUCEK L A, XU J J, NGUYEN M, et al. Waste conversion into n-caprylate and n-caproate: Resource recovery from wine lees using anaerobic reactor microbiomes and in-line extraction[J]. *Frontiers In Microbiology*, 2016, 7: 1892.
- [9] VASUDEVAN D, RICHTER H, ANGENENT L T. Upgrading dilute ethanol from syngas fermentation to n-caproate with reactor microbiomes[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 151(9): 378-382.
- [10] RICHTER H, MOLITOR B, DIENDER M, et al. A narrow pH range supports butanol, hexanol, and octanol production from syngas in a continuous co-culture of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium kluyveri* with in-line product extraction[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1773.
- [11] LIU C, LUO G, LIU H P, et al. CO as electron donor for efficient medium chain carboxylate production by chain elongation: Microbial and thermodynamic insights[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 390: 124577.
- [12] LI X, CHEN Y G, ZHAO S, et al. Efficient production of optically pure L-lactic acid from food waste at ambient temperature by regulating key enzyme activity[J]. *Water Research*, 2015, 70(11): 148-157.
- [13] XU J J, HAO J X, GUZMAN J J L, et al. Temperature-phased conversion of acid whey waste into medium-chain carboxylic acids via lactic acid: No external e-donor[J]. *Joule*, 2018, 2(2): 280-295.
- [14] LE C C, STUCKEY D C. Colorimetric measurement of carbohydrates in biological wastewater treatment systems: A critical evaluation[J]. *Water Research*, 2016, 94: 280-287.
- [15] LE C C, KUNACHEVA C, STUCKEY D C. "Protein" measurement in biological wastewater treatment systems: A critical evaluation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(6): 3074-3081.
- [16] LÜ C X, SHEN Y W, LI C, et al. Redox-active biochar and conductive graphite stimulate methanogenic metabolism in anaerobic digestion of waste-activated sludge: Beyond direct interspecies electron transfer[J]. *Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(33): 12626-12636.
- [17] LIU Y H, LÜ F, SHAO L M. Alcohol-to-acid ratio and substrate concentration affect product structure in chain elongation reactions initiated by unacclimatized inoculum[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 1140-1150.
- [18] LONKAR S, FU Z H, HOLTZAPPLE M. Optimum alcohol concentration for chain elongation in mixed-culture fermentation of cellulosic substrate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2016, 113(12): 2597-2604.
- [19] STEINBUSCH K J J, HAMELERS H V M, PLUGGE C M, et al. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: Fuel and chemical production from low grade biomass[J]. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(1): 216-224.
- [20] WU S L, WEI W, SUN J, et al. Medium-chain fatty acids and long-chain alcohols production from waste activated sludge via two-stage anaerobic fermentation[J]. *Water Research*, 2020, 186: 116381.
- [21] HAN W H, HE P J, SHAO L M, et al. Metabolic interactions of a chain elongation microbiome[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(22): 01614-01618.
- [22] GROOTSCHOLTEN T I, STEINBUSCH K J, HAMELERS H V, et al. High rate heptanoate production from propionate and ethanol using chain elongation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 136: 715-718.
- [23] GANIGUE R, NAERT P, CANDRY P, et al. Fruity flavors from waste: A novel process to upgrade crude glycerol to ethyl valerate[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289: 121574.
- [24] CANDRY P, ULCAR B, PETROGNANI C, et al. Ethanol: Propionate ratio drives product selectivity in odd-chain elongation with *Clostridium kluyveri* and mixed communities[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 313: 123651.
- [25] AGLER M T, SPIRITO C M, USACK J G, et al. Development of a highly specific and productive process for n-caproic acid production:

- Applying lessons from methanogenic microbiomes[J]. *Water Science and Technology*, 2014, 69(1): 62-68.
- [26] SEEDORF H, FRICKE W F, VEITH B, et al. The genome of *Clostridium kluyveri*, a strict anaerobe with unique metabolic features[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(6): 2128-2133.
- [27] WU S L, SUN J, CHEN X M, et al. Unveiling the mechanisms of medium-chain fatty acid production from waste activated sludge alkaline fermentation liquor through physiological, thermodynamic and metagenomic investigations[J]. *Water Research*, 2020, 169: 115218.
- [28] DE VRIEZE J, REGUEIRO L, PROPS R, et al. Presence does not imply activity: DNA and RNA patterns differ in response to salt perturbation in anaerobic digestion[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 244.
- [29] 李雷, 卫科科, 姜卫红, 等. 细菌双组分系统应答调控蛋白调控策略的多样性[J]. *中国科学:生命科学*, 2017, 47(5): 462-469.
- (责任编辑: 靳炜)

Conversion of acetate-rich waste activated sludge anaerobic fermentation liquor into medium-chain fatty acids

YUAN Zhiqiang¹, LI Chao², YUAN Rongxue¹, ZHU Nanwen¹, SHEN Yanwen^{1,2,*}, YUAN Haiping¹

1. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2. Hunan BISEN Environmental & Energy Co. Ltd., Changsha 410100, China

*Corresponding author, E-mail: yanwenshen@sjtu.edu.cn

Abstract To determine the feasibility of producing medium-chain fatty acids (MCFAs) from waste activated sludge in mixed culture, this study firstly optimized bioreactor parameters, i.e. hydraulic retention time (HRT) and ethanol : acid ratio, to assimilate anaerobes and later adopted the “two-stage fermentation” strategy, in which alkaline pretreated sludge was subjected to short-term acidogenesis and microbial chain elongation. The results showed that during the 135-day chain elongation (CE) over the long term, with ethanol:acid ratio=2:1, when HRT was shortened from 20 d to 5 d (Phase I~III), the CE functional microbe, *Clostridium sensu stricto_12*, evolved as the dominant genus (relative abundance 65.21%). However, the maximal productivity of n-caproate was merely 775 mg·(L·d)⁻¹. Subsequently, with ethanol:acid ratio increased to 3:1 (Phase IV), the productivity of n-caproate boosted to 1 402 mg·(L·d)⁻¹, demonstrating an increased product selectivity towards MCFAs. In Phase V (test phase), during which the substrate swamped from synthetic ethanol/acetate wastewater to sludge fermentation liquor (SFL), the n-caproate productivity maintained at 1 400 mg·(L·d)⁻¹. Based on the metagenomics analysis, both reverse β -oxidation (RBO) and fatty acid biosynthesis (FAB) pathways were involved in microbial chain elongation for MCFAs production. Moreover, as compared to synthetic ethanol/acetate wastewater, SFL increased the relative abundance of some key functional enzymes for the RBO and FAB pathways. The present study provided the practical evidence for continuous production of MCFAs from waste activated sludge, and more importantly, it elucidated the microbial and ecological mechanisms. Taken together, it shed a light on the sludge-derived value-added chemicals for its valorization.

Keywords waste activated sludge; medium-chain fatty acids; anaerobic fermentation; chain elongation; sludge valorization