

李汉广,周秋香,李志敏,等. 丙酮丁醇梭菌 ART18 发酵葛渣水解液生产丁醇的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):302-305.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.074

丙酮丁醇梭菌 ART18 发酵葛渣水解液生产丁醇的研究

李汉广¹, 周秋香², 李志敏¹, 吴雅晴¹, 马星星¹, 张庆华¹

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院/江西农业微生物资源开发与利用工程实验室/江西省菌物资源保护与利用重点实验室,江西南昌 330045; 2. 江西农业大学医院,江西南昌 330045)

摘要:为降低传统丙酮丁醇发酵成本,以葛渣为原料进行丙酮丁醇发酵。通过研究葛渣经酸水解后残渣的有无、发酵温度、pH 值调节剂的种类和含量以及活性炭的添加量等对发酵的影响,以期提高丁醇的生产强度。试验结果表明,通过对上述试验条件进行优化,丁醇及总溶剂产量均有较大提高,且最优的发酵温度、pH 值调节剂含量及活性炭添加量分别为 37 ℃、4.0 g/L 和 3%,在最优条件下丁醇、总溶剂产量分别为 7.50、12.98 g/L。当将上述试验结果在 5 L 发酵罐进行放大培养时,丁醇产量、丁醇生产强度、总溶剂的生产强度分别达到 7.30、0.08、0.13 g/(L·h)。

关键词:葛渣;丙酮丁醇梭菌;丙酮丁醇发酵;丁醇;生产强度;优化条件

中图分类号: TQ223.12⁺4;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)21-0302-04

在全球石油消耗量逐年增加和温室效应日趋严重的今天,当务之急便是寻找一种清洁、可再生的新型能源。丁醇具有燃烧值高、腐蚀性小、疏水性强、挥发性低以及可与汽油以任意比例混合等优点,因此颇受关注且被认为是理想的第 2 代生物质能源^[1-2]。目前进行丙醇(acetone)、丁醇(butanol)、乙醇(ethanol)发酵(简称丙酮丁醇发酵或 ABE 发酵)所用的微生物主要有丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、拜氏梭菌(*C. beijerinckii*)、糖乙酸多丁醇梭菌(*C. saccharoperbutylacetonicum*)和糖丁酸梭菌(*C. saccharobutylicum*)等 4 种^[3],这 4 种生产菌均为杆状、产芽孢、具有运动特性的典型厌氧菌。丙酮丁醇产生菌的代谢过

程可分为产酸阶段和产溶剂阶段,在产酸阶段,菌体迅速生长,产生大量的气体(H₂ 和 CO₂),同时乙酸、丁酸等有机酸大量积累,因此此时发酵液的 pH 值急剧下降;当发酵液的 pH 值下降到一定值时,丁醇及其他有机溶剂逐渐产生,ABE 发酵过程进入到产溶剂阶段,乙酸和丁酸逐渐被消耗,发酵液 pH 值逐渐回升。有研究表明,当发酵液中的丁酸浓度超过 2.0 g/L 时,将导致相转型的发生,使丁酸重新被利用,发酵由此进入产溶剂阶段^[4]。

传统的 ABE 发酵主要以玉米粉等粮食作物为发酵原料,这不仅导致传统的 ABE 发酵生产成本过高,还给原本早已匮乏的粮食资源造成沉重负担。于是,利用廉价且来源广泛的生物作物作为原料进行丁醇等溶剂的生产成为各国科研工作者研究的热点^[5]。

葛根别称葛条、甘葛,为豆科葛属,有透疹、解肌退热、生津止渴、升阳止泻的功效。常用于表证发热、脾虚泄泻、项背强痛、热病口渴、麻疹不透、阴虚消渴、热泻热痢等症状。中国大部地区均有产,且主要分布在辽宁、江西、湖南、甘肃等地。

葛渣中含有丰富的纤维素、半纤维素等,是葛根提取葛根总黄酮、葛根精粉等有效成分后所产生的副产物^[6]。但由于粗纤维含量高,因此大部分被弃置,造成了资源浪费。若以葛

收稿日期:2017-09-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:21466014);江西省教育厅科学研究项目(编号:GJJ160388);江西农业大学博士启动基金(编号:9232305387);江西农业大学学生创新创业计划(编号:201710410069,201810410015)。

作者简介:李汉广(1978—),男,江西九江人,博士,副教授,主要从事微生物资源开发利用研究。E-mail:lhg7886@sohu.com。

通信作者:张庆华,博士,副教授,主要从事微生物资源开发利用研究。E-mail:zqh_net@163.com。

大利蜜蜂 *Apis mellifera* L. 为例[J]. 生态学杂志,2003,22(5):70-73.

[25] Ockinger E, Smith H G. Semi-natural grasslands as population sources for pollinating insects in agricultural landscapes[J]. Journal of Applied Ecology, 2007, 44(1):50-59.

[26] Nicholls C I, Altieri M A. Plant biodiversity enhances bees and other insect pollinators in agroecosystems: a review[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2013, 33(2):257-274.

[27] Carvalheiro L G, Veldtman R. Creating patches of native flowers facilitates crop pollination in large agricultural fields; mango as a case study[J]. Journal of Applied Ecology, 2012, 49(6):1373-1383.

[28] Tscheulin T, Neokosmidis L, Petanidou T, et al. Influence of

landscape context on the abundance and diversity of bees in Mediterranean olive groves[J]. Bulletin of Entomological Research, 2011, 101(5):557-564.

[29] Rollin O, Bretagnolle V, Decourtye A, et al. Differences of floral resource use between honey bees and wild bees in an intensive farming system[J]. Agriculture Ecosystems and Environment, 2013, 179(4):78-86.

[30] de Marco Jr, Coelho F M. Services performed by the ecosystem: forest remnants influence agricultural cultures' pollination and production[J]. Biodiversity and Conservation, 2004, 13(7):1245-1255.

[31] Ricketts T H, Regetz J, Steffandewenter I, et al. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? [J]. Ecology Letters, 2008, 11(5):499-515.

渣为原料进行 ABE 发酵,不仅解决了制药或食品企业废物排放等问题,而且能变废为宝生产生物燃料。

为此,本试验以实验室保存的丙酮丁醇梭菌 ART18 (*C. acetobutylicum* ART18) 为 ABE 发酵菌株,对葛渣水解液进行 ABE 发酵的可行性进行了初步的研究,同时通过研究温度、pH 调节剂的种类和含量及活性炭添加量等对丁醇及总溶剂产量的影响,以期提高 ABE (主要是丁醇) 的生产强度,为以葛渣为原料进行 ABE 发酵的工业化提供一些较为有益的初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和接种物的准备 本试验所用菌种为江西农业微生物资源开发与利用工程实验室所保存的丙酮丁醇梭菌 ART18 (*C. acetobutylicum* ART18)。将保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的甘油管中的菌种解冻后转移到新鲜的种子培养基中 (Tryptone - yeast - extrace - acetate, TYA 培养基),在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下厌氧培养 48 ~ 72 h,然后接种到发酵培养基中进行 ABE 发酵培养。

1.1.2 培养基

1.1.2.1 TYA 培养基 葡萄糖含量 60.0 g/L,可溶性淀粉含量 40.0 g/L,胰蛋白胍含量 3.0 g/L,酵母提取物含量 2.0 g/L, KH_2PO_4 含量 0.75 g/L, K_2HPO_4 含量 0.75 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 含量 0.01 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 含量 0.2 g/L,琼脂含量 20 g/L, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 含量 3.0 g/L, pH 值 6.0,蒸馏定容至 1 000 mL, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 热压灭菌 15 min。

1.1.2.2 发酵培养基 葡萄糖含量 60.0 g/L,酵母粉含量 2 g/L, KH_2PO_4 含量 0.5 g/L, K_2HPO_4 含量 0.5 g/L,对氨基苯甲酸含量 0.001 g/L,维生素 B_1 含量 0.001 g/L,生物素含量 0.000 01 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 含量 0.01 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 含量 0.2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 含量 0.01 g/L, NaCl 含量 0.01 g/L, CaCO_3 含量 3.0 g/L, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下热压灭菌 15 min^[7]。

1.1.3 主要试验设备与试剂 本试验所用主要仪器有气相色谱仪、小型中药粉碎机、高速离心机等,主要试剂有生物素、硫酸镁、硫酸亚铁、HCl、NaOH 等,以上试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 原料的预处理 将葛渣 (由江西横峰观山月葛业股份有限公司惠赠) 用机械研磨机磨成细小微粒,然后过筛选取直径为 50 ~ 100 μm 的粉末,将粉末以 200 g : 2 L 的比例浸泡于 1% 稀硫酸中,浸泡 2 ~ 3 h 后,将其置于 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下热压灭菌 60 min。冷却至室温,经 DNS 法测还原糖含量后进行浓缩,直至还原糖浓度达 60 ~ 70 g/L^[8]。

1.2.2 ABE 发酵 用 5% NaOH 或 5% HCl 将配制好的以葛渣水解液替代碳源的发酵培养基的 pH 值调至 6.0,分别装入厌氧瓶中,装液量为 100 mL,然后置于灭菌锅中在 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下热压灭菌 15 min。从 TYA 培养基中挑出单菌落,接种于上述无菌培养液中,利用输液针管通入加有体积分数为 1% 的 84 消毒液的水中,从而达到厌氧环境,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下厌氧静止培养 88 ~ 96 h。收集发酵液测定乙醇、丙酮及丁醇等溶剂的浓度。

1.2.3 ABE 扩大发酵 将 ABE 发酵放大到 5 L 发酵罐水

平。发酵原料为酸水解后的葛渣水解液,装液量为 3 L,用 5% NaOH 或 5% HCl 将培养液的 pH 值调至 6.0, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下厌氧发酵直到发酵结束。接种前后通入无菌高纯氮气,以除去培养基中残存的氧气,以保证整个发酵过程都在无氧条件下进行。在发酵过程中,无须控制发酵液 pH 值,静止培养。定期收集发酵液 (10 mL) 进行丁醇、乙醇及丙酮等溶剂浓度的测定。

1.2.4 样品的测定 取 10 mL 样品经 5 000 r/min 离心 5 min,然后取上清液与 1.21 g/L 异丁醇溶液以 1 : 4 体积比混合,将所得混合液体采用气相色谱仪 (安捷伦) 进行定量检测^[9]。色谱柱为 PEG - 20M 毛细管柱 (30 m \times 0.32 mm \times 0.4 μm),检测器温度为 $240\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样温度为 $240\text{ }^{\circ}\text{C}$,柱温为 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。以异丁醇作内标物进行定量检测,进样量为 0.4 μL 。

2 结果与分析

2.1 水解液残渣对 ABE 发酵的影响

为探究水解液残渣对 ABE 发酵的影响,本试验以未去除水解液残渣的水解液与去除水解液残渣的水解液作为碳源,研究其对 ABE 发酵的影响,试验结果如图 1 所示。

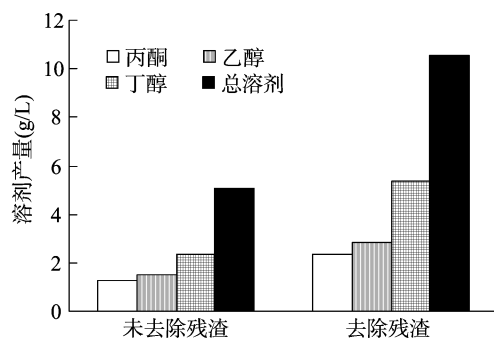


图1 水解残渣对发酵的影响

由图 1 可知,水解液残渣的去除与否对 ABE 发酵具有较显著的影响。去除水解液残渣后,丁醇、总溶剂产量分别为 5.39、10.57 g/L,与未去除水解液残渣的丁醇、总溶剂产量相比分别提高了 131.3%、108.1%。未去除残渣的发酵液处理,不仅菌体生长缓慢,而且最终丁醇等溶剂产量也较低。一方面可能是因为未去除水解液残渣的发酵液黏度较大,从而影响了菌体的扩散,进而使得营养物质的利用率下降,使菌体生长缓慢,最终导致溶剂产量较低;另一方面可能是由于水解液残渣中含有毒性物质,从而影响了菌体的生长以及代谢产物的积累。

从本试验研究结果可以得出,葛渣经酸水解后,固体残渣的除去对 ABE 发酵有着至关重要的影响,即不仅可以缩短菌体生长时间,而且可以有效提高溶剂的产量。因此,在本研究的以后试验中均以除去残渣的水解液为原料进行 ABE 发酵。

2.2 温度对 ABE 发酵的影响

温度与微生物生长繁殖和产物的积累有着密切的联系,合适的温度不仅能够使菌体迅速生长繁殖,同样也能使发酵产物在最短的时间内得到最大量的积累。为提高丁醇的产量,本试验研究了不同温度对 ABE 发酵的影响 (以除去残渣的葛渣水解液为发酵原料),试验结果如图 2 所示。

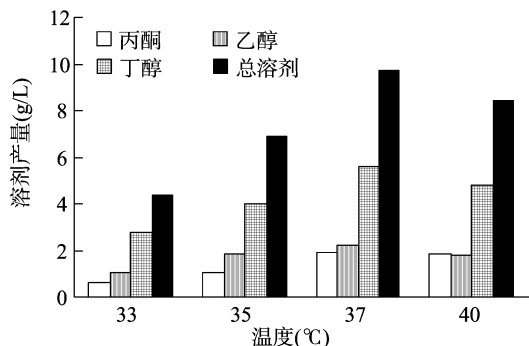


图2 温度对丙酮丁醇发酵的影响

由图2可知,在发酵过程中,低温(33℃)组的产气速度明显比其他组要慢(结果未列出),溶剂的产量随温度的升高而逐渐升高,且在37℃时达到最大;当温度进一步升高时,溶剂的产量迅速降低。在低温环境中,微生物细胞内的酶活性相对较低,菌体生长缓慢,溶剂积累少;温度过高,微生物生长迅速,溶剂迅速积累,对菌体自身产生抑制,甚至引起菌体提前衰亡,故而溶剂产量相对难以提高。在37℃时,丁醇、总溶剂的产量都达到最大,具体分别为5.59、9.70 g/L。因此,接下来的发酵试验均在37℃条件下进行。

2.3 不同种类和含量的pH值调节剂对ABE发酵的影响

王风芹等研究指出,恰当的缓冲介质可明显提高碳水化合物的利用率,从而提高丁醇产量^[10]。本试验将不同的pH值调节剂[CaCO₃ (2.0、4.0、8.0 g/L)、Na₂CO₃ (2.0、4.0、8.0 g/L)、NaHCO₃ (2.0、4.0、8.0 g/L)、KH₂PO₄ 与 K₂HPO₄ (0.50、0.75、1.0 g/L,质量比1:1)]添加到发酵培养基中,以研究不同种类和含量的pH值调节剂对ABE的影响,各组中最适添加量条件下丁醇及总溶剂产量结果如图3所示。

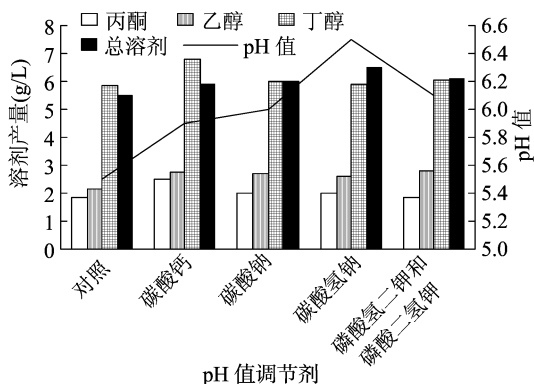


图3 不同pH值调节剂对ABE发酵的影响

试验结果表明,当碳酸钙、碳酸钠、碳酸氢钠、磷酸二氢钾与磷酸氢二钾(1:1)的添加量分别在4.0、2.0、4.0、0.75 g/L时,丁醇及总溶剂的产量在各自组中较高。添加了pH调节剂的发酵液最终pH值均高于对照组(结果未列出)。从图3的试验结果可知,当添加的碳酸钙浓度为4.0 g/L时,丁醇、总溶剂的产量在各自最优条件下最高,具体分别为6.78、12.0 g/L,与对照组相比分别提高了15.5%、21.6%。

碳酸钙的添加能明显提高丁醇和丙酮的产量,且几乎不影响乙醇的产量(与对照相比仅提高7.4%)。此外有其他研究也表明,Ca²⁺可提高丁醇的产量,其主要原因可能是由于二价离子(Ca²⁺)的存在提高了细胞膜蛋白的稳定性,从而提高

丁醇产量^[11]。

在ABE发酵过程中,当发酵液中过量地积累有机酸(乙酸与丁醇)时,ABE的发酵将受到抑制;相反,如果有有机酸积累得较少,ABE的生产强度将会提高。在本试验中,当添加了4.0 g/L碳酸钙时,发酵结束时发酵液中残存的总有机酸浓度最低,说明有较多的有机酸(特别是丁酸)重新转化成丁醇,因此,在接下来的试验中选用4.0 g/L碳酸钙作为pH调节剂。

2.4 活性炭脱毒处理对ABE发酵的影响

分别使用1%、3%、5%活性炭对葛渣水解液进行脱毒处理,比较各处理的还原糖含量以及ABE发酵的结果,试验结果如图4所示。

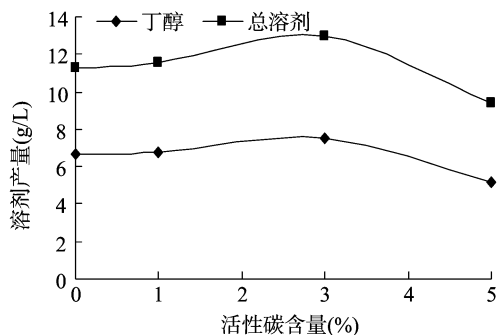


图4 活性炭脱毒对酸水解液丙酮丁醇发酵的影响

从图4可以看出,葛渣酸水解液经活性炭脱毒处理后进行ABE发酵,3%活性炭的脱毒效果最好,此时丁醇、总溶剂产量为7.75、12.98 g/L,与对照组相比分别提高了11.9%、14.9%。若活性炭浓度进一步增加,溶剂浓度却随活性炭添加量的增加而减少。由此可推测,葛渣水解液中也存在较高浓度的发酵抑制物,而加入的活性炭可以吸附部分抑制物,从而提高ABE的发酵性能。然而,过高浓度的活性炭会造成还原糖的损失,因而降低溶剂的产量。接下来的试验均采用3%活性炭进行脱毒处理。

2.5 ABE扩大发酵

为在更大规模上验证上述试验结果,在5 L发酵罐中进行扩大发酵。发酵起始条件:去除水解液残渣的葛渣水解液为发酵原料,温度37℃,用3%活性炭对水解液进行脱毒处理,另外向发酵液中添加4.0 g/L碳酸钙,厌氧静置培养88 h,发酵过程无须进行pH值控制。

发酵结束时,总溶剂的浓度达到11.50 g/L,其中包括2.50 g/L乙醇、1.70 g/L丙酮和7.30 g/L丁醇。此时,总溶剂、丁醇的生产强度分别为0.13、0.08 g/(L·h)。从上述试验可知,在5 L发酵罐水平利用葛渣为主要发酵原料能顺利地进行ABE发酵,因此本试验的研究结果可为以葛渣为原料工业化发酵产丁醇提供有益的初步探索。

3 讨论与结论

葛渣作为葛等相关产业的副产物,一般作为工业废弃物进行处理,由于其主要由纤维素、半纤维素及木质素等成分组成,若通过一定的前处理使之成为ABE的发酵原料,必将对拓宽ABE发酵的原料谱系以及降低原料成本有着重要的意义。为此本试验对以葛渣水解液为发酵原料进行ABE发酵

的可行性进行了初步探究,在探索葛渣经酸水解后的固体残渣对 ABE 发酵的影响时发现,水解结束后去除未水解的固体残渣能缩短菌体生长时间,同时还可以有效提高溶剂产量。当研究发酵温度对 ABE 的影响时发现,在低温环境中,微生物细胞内的酶活性相对较低,菌体生长缓慢,溶剂积累少;温度过高,微生物生长迅速,溶剂迅速积累,因此对菌体自身产生抑制作用,容易引起菌体提前衰亡,故而溶剂产量相对难以提高。在 37 ℃ 时,丁醇、总溶剂的产量均达到最大,具体分别为 5.59、9.70 g/L。

王风芹等研究指出,恰当的缓冲介质可明显提高碳水化合物的利用率,从而提高丁醇产量^[10]。在本试验中,当添加了 4.0 g/L 碳酸钙时,发酵结束时发酵液中残存的总有机酸浓度最低,说明有较多的有机酸(特别是丁酸)重新转化成丁醇,而且在此条件下,丁醇、总溶剂的产量最高,具体分别为 6.78、12.0 g/L,与对照组相比分别提高了 15.5%、21.6%,碳酸钙中含有 CO_3^{2-} ,当将碳酸钙加入到发酵液中 CO_3^{2-} 可以起到 pH 值调节剂的作用,从而可有效防止发酵液 pH 值快速下降。同时,有研究表明 Ca^{2+} 能够提高细菌膜蛋白的稳定性,从而能增强细胞的抗逆能力,在本试验中加入碳酸钙能提高 ABE 的发酵性能,这一结果与 Han 等的研究结果^[12-13] 一致。在对纤维素原料进行水解时往往伴随着剧烈的物理与化学反应,在这一过程中会产生一定的对菌体生长有抑制作用的物质,如糠醛、醛类、酚类化合物、乙酸等,因此在以纤维素为 ABE 发酵原料时,在水解完成后往往还需要一个有效的脱毒过程,以提高菌体的发酵性能^[14]。在本研究中发现,以 3% 活性炭的脱毒效果最好,此时丁醇、总溶剂产量分别为 7.50、12.98 g/L,与对照组相比分别提高了 11.9%、14.9%。若活性炭浓度进一步增加,溶剂浓度随活性炭添加量的增加而减少。由此可推测,葛渣水解液中也存在较高浓度的发酵抑制物,而加入的活性炭可以吸附部分抑制物,从而提高 ABE 的发酵性能。然而,过高浓度的活性炭会造成还原糖的损失,因而降低溶剂的产量。为在更大规模上研究以葛渣为原料进行 ABE 发酵的可行性,本研究在 5 L 发酵罐内进行放大培养(最优条件下),经研究发现此时丁醇、总溶剂的生产强度分别达 0.08、0.13 g/(L·h)。

生产成本过高一直是阻碍生物丁醇工业化的主要障碍之一,传统的发酵原料如玉米、小麦及马铃薯等淀粉类粮食作物价格逐年攀升,若大规模应用于发酵工业,必将会给原本早已匮乏的粮食资源造成沉重负担,我国已明令禁止利用玉米等粮食作物作为发酵原料进行生物质能源生产^[15]。因此,选用廉价、易得的非粮作物或农业种植废弃物作为原料进行生物炼制业已成为生物质能源领域的研究热点。通过本试验的开展,证明了丁醇产生菌(丙酮丁醇梭菌 ART18)可以利用葛渣水解液进行 ABE 发酵,而且通过对水解产物进行脱毒等处理以及对发酵条件进行优化可提高丙酮丁醇梭菌 ART18 的 ABE 发酵性能,本研究结果可为工业化以葛渣为原料进行

ABE 发酵提供一些有益的初步探索。

参考文献:

- [1] Schwarz W H, Gapes J R, Schwarz W H, et al. Butanol – rediscovering a renewable fuel[J]. BioWorld Europe, 2006, 1: 16 – 19.
- [2] 米慧芝, 杨登峰, 关 妮, 等. 丙酮丁醇梭菌发酵糖蜜生产丁醇的发酵条件优化[J]. 广西科学, 2011, 18(3): 278 – 282.
- [3] Keis S, Shaheen R, Jones D T. Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. Nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. Nov. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(6): 2095 – 2103.
- [4] Li H G, Ofosu F K, Li K T, et al. Acetone, butanol, and ethanol production from gelatinized cassava flour by a new isolates with high butanol tolerance[J]. Bioresource Technology, 2014, 172: 276 – 282.
- [5] Li H G, Ma X X, Zhang Q H, et al. Enhanced butanol production by solvent tolerance *Clostridium acetobutylicum* SE25 from cassava flour in a fibrous bed bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2016, 211: 412 – 418.
- [6] 贺榆霞, 贺建超, 李峻志, 等. 葛渣栽培食用菌试验初报[J]. 中国食用菌, 2009, 28(3): 65 – 66.
- [7] Loyarkat S, Cheirsilp B, Umsakul K. Direct conversion of sugars and organic acids to biobutanol by non – growing cells of *Clostridium* spp. incubated in a nitrogen – free medium[J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2013, 171(7): 1726 – 1738.
- [8] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426 – 428.
- [9] Mann M S, Dragovic Z, Schirmacher G, et al. Over – expression of stress protein – encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(9): 1643 – 1649.
- [10] 王风芹, 谢 慧, 楚乐然, 等. 产丁醇芽孢杆菌的分离、筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 7 – 11.
- [11] Woods D R. The genetic engineering of microbial solvent production [J]. Trends in Biotechnology, 1995, 13(7): 259 – 264.
- [12] Han B, Ujor V, Lai L B, et al. Use of proteomic analysis to elucidate the role of calcium in acetone – butanol – ethanol fermentation by *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 79(1): 282 – 293.
- [13] Richmond C, Han B, Ezeji T. Stimulatory effects of calcium carbonate on butanol production by solventogenic *Clostridium* species [J]. Continental Journal of Microbiology, 2011, 5(1): 18 – 28.
- [14] 李汉广. 高产丁醇菌株选育及其耐受丁醇机制研究[D]. 无锡: 江南大学, 2014.
- [15] 龙 飞, 靳艳玲, 赵 云, 等. 丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* CICC8012 发酵鲜芭蕉芋生产丁醇[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(1): 54 – 60.