

# Progress and prospective of acetone-butanol fermentation by microorganism

Xiaodan Wu<sup>1</sup>, Yuhuan Liu<sup>2,3\*</sup>, Erni Xu<sup>1</sup>, Roger Ruan<sup>3</sup>

1. College of Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China

2. The State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China

3. The Engineering Research Center for Biomass Conversion, MOE, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Email: liuyuhuan@ncu.edu.cn

**Abstract:** As a kind of biomass-based fuel, butanol is better than ethanol. In addition, the acetone-butanol fermentation can also take full use of various simple sugars, such as glucose, fructose, xylose, and so on. With the characterization of colony morphology of *Clostridium*, analysis of metabolic mechanism, retrospection of recent research progress of strain breeding and fermentation technology, we prospected the acetone-butanol fermentation by microorganism. Moreover, special attention was paid to the progress of acetone-butanol fermentation by using hydrolyzed product of lignocellulosic biomass.

**Keywords:** acetone-butanol; fermentation; strain breeding; process optimization; lignocellulose

## 微生物发酵法生产丙酮丁醇研究进展

巫小丹<sup>1</sup>, 刘玉环<sup>2,3\*</sup>, 徐尔尼<sup>1</sup>, 阮榕生<sup>3</sup>

南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌, 中国, 330031

南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌, 中国, 330047

生物质转化教育部工程研究中心, 南昌大学, 南昌, 中国, 330047

Email: liuyuhuan@ncu.edu.cn

**【摘要】**丁醇是优于乙醇的生物基燃料, 而且丙酮丁醇发酵可以同时充分利用五碳糖和六碳糖。从丙酮丁醇菌的菌落形态、生理生化特性和代谢机理出发, 回顾近年来国内外生产菌种选育和发酵工艺方面所取得的成就, 展望微生物发酵法生产丙酮丁醇的开发前景, 特别关注围绕以木质纤维素类生物质及其水解产物作为底物的丙酮丁醇发酵工艺的进展。

**【关键词】**丙酮丁醇; 发酵; 菌种选育; 工艺优化; 木质纤维素

## 引言

木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源, 其主要成分为纤维素、半纤维素和木质素, 其中纤维素和半纤维素的水解产物为五碳糖和六碳糖, 关于利用木质纤维素发酵生产燃料乙醇的研究受到广泛重视, 但五碳糖的利用效率低下问题制约了发酵的效率。研究发现, 丙酮丁醇梭菌利用纤维二糖和木糖的效率与利用葡萄糖的效率相当<sup>[1]</sup>, 而且丙酮、丁醇是两种非常重要的化工原料和工业溶剂, 丁醇在替代汽油作为燃料方面性能优于乙醇。目前, 微生物发酵法生产丙酮丁醇尚不具有市场竞争优势, 丁醇价格要比乙醇高一

倍以上, 主要原因除了从木质纤维素中获取还原糖的效率低下、发酵抑制物多外, 丙酮丁醇发酵液中产物浓度过低也是一个重要因素。但是以可再生的生物质资源, 特别是廉价丰富木质纤维素类生物质替代石油基原料生产丙酮、丁醇, 符合国家能源安全和粮食安全的长远战略考虑, 发展前景非常广阔。本文在分析丙酮丁醇发酵代谢途径的基础上, 结合近年来国内外优良菌株选育和发酵工艺改良成果, 提出以木质纤维素为原料, 利用微生物发酵的方法实现丙酮丁醇低成本开发、高竞争力推广的策略。

## 1 菌种

### 1.1 种类

1914年, Weizmann从谷物中分离得到 *Clostridium acetobutylicum* Weizmann, 该菌种能够发酵各种谷物原料, 为丙酮丁醇发酵的工业化奠定了基础。目前能

Supported by The Foundation of Key Technology Research Program of Biodiesel Industry in Jiangxi Province of China (2007BN12100); NSFC Projects: 30960304; Jiangxi Province NSF Projects: 2008GZH0047; Special Project for Returned Scholar in Jiangxi Enterprise Pioneer Garden 2008718

\* Corresponding author. Email: liuyuhuan@ncu.edu.cn

进行丙酮丁醇发酵的微生物主要是梭状芽孢杆菌属 (*Clostridium*), 统称丙酮丁醇梭状芽孢杆菌, 简称丙丁菌, 如 *C. acetobutylicum*、*C. beijerinckii*、*C. saccharoperbutylacetonicum* 和 *C. saccharobutylicum* 等<sup>[2]</sup>。

## 1.2 细胞、菌落特征

丙丁菌是一类严格厌氧的微生物, 属革兰氏阳性, 细胞呈梭状, 细胞大小 $(0.6\sim 0.9)\mu\text{m}\times(2.4\sim 4.7)\mu\text{m}$ 。芽孢卵圆形, 次端生。表面菌落圆形、突起, 直径3~5mm, 边缘不规则, 色灰白, 半透明, 表面有光泽。

## 1.3 代谢途径分析

丙酮丁醇发酵分为产酸期和产溶剂期两个阶段。发酵初期产生大量的有机酸如乙酸、丁酸等, pH 值迅速下降; 当达到一定酸度后, 进入产溶剂期, 有机酸被还原, 产生大量溶剂, 主要产物丁醇、丙酮和乙醇的比例为 6:3:1。丙丁菌的代谢支路较多, 分析其代谢途径, 对调整代谢方向、控制发酵产物的比例(如提高丁醇的比例)具有重要的意义。

产酸期: 葡萄糖经过糖酵解(EMP)途径产生丙酮酸; 五碳糖通过磷酸戊糖途径(HMP), 转化为 6-磷酸果糖和 3-磷酸甘油醛, 进入 EMP 途径产生丙酮酸。丙酮酸和 CoA 在丙酮酸-铁氧还蛋白氧化还原酶的作用下生成乙酰~CoA。乙酰~CoA 在磷酸酰基转移酶(PTA)的作用下生成酰基磷酸酯, 接着在乙酸激酶(AK)的催化下生成乙酸。乙酰~CoA 在一系列酶的催化下生成丁酰~CoA, 然后经磷酸丁酰转移酶(PTB)催化生成丁酰磷酸盐, 最后丁酰磷酸盐经丁酸激酶(BUK)去磷酸化, 生成丁酸。在该阶段中, 有大量  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2$  产生, 同时 NADH 的大量积累为丁醇和乙醇的生成提供了大量的还原力。

产溶剂期: 产酸阶段产生的乙酸和丁酸经过乙酰乙酰~CoA: 乙酸/丁酸: CoA 转移酶的催化作用分别形成乙酰~CoA 和丁酰~CoA, 乙酰~CoA 在硫激酶的作用下形成乙酰乙酰~CoA, 乙酰乙酰~CoA 再经过乙酰乙酰~CoA 转移酶的催化作用转化为乙酰乙酸, 乙酰乙酸脱羧形成丙酮。丁酰~CoA 在丁醛脱氢酶和丁醇脱氢酶催化下, 经过两步还原生成丁醇。

## 2 代谢调控策略

### 2.1 乙酰~CoA

乙酰~CoA 在溶剂的生成过程中起着关键的作

用, 既可以转化成乙酸、乙醇, 又可以与乙酰基结合生成乙酰乙酰~CoA, 生成丙酮和丁醇<sup>[3]</sup>。为了使代谢流更多流向丙酮和丁醇, 发酵过程中可往培养基中添加乙酸钠, 使乙酸钠中的乙酰基与 CoA 结合, 生成乙酰~CoA, 提高乙酰~CoA 浓度, 生成大量的乙酰乙酰~CoA。另外, 据 Husemann 等<sup>[4]</sup>的研究表明乙酸钠还对丙丁菌细胞内酸碱度有缓冲作用。因此, 可以通过流加乙酸钠实现对代谢流的调控。

### 2.2 NADH

产酸阶段 NADH 的积累量直接影响代谢的方向, 当 NADH 不充足时, 乙酰乙酰~CoA 通过乙酰乙酰~CoA 转移酶和乙酰乙酸脱羧酶生成丙酮; 当 NADH 充足时, 乙酰乙酰~CoA 则通过 NADH 的一步还原生成丁醇。因此在生产中要着力提高代谢途径中 NADH 的量, 以便有足够多的还原力使代谢流流向丁醇。而 NADH 的积累主要在 EMP 途径, 通过加大该过程的代谢流量, 可以积累较多的 NADH。因此提高 EMP 途径中起关键作用的  $\alpha$ -淀粉酶的活力可以实现代谢流流向丁醇<sup>[5]</sup>。

## 3 菌种选育和改造

### 3.1 建立高产菌株快速筛选方法

丙酮丁醇是小分子挥发性物质, 且难以用染料进行颜色标记, 这给高产菌株的筛选带来很大困难。Palmer 等<sup>[6]</sup>利用溴甲酚绿平板筛选到产酸能力强的丙酮丁醇高产菌株。Adler 等<sup>[7]</sup>通过平板菌落形态来筛选高产菌株, 菌落直径小、中间呈黑色、产孢子多<sup>[8]</sup>、菌落周边不圆滑的菌株为高产菌株。Bassam 等<sup>[9]</sup>根据菌株淀粉酶活性和丙酮丁醇发酵产量之间存在一定的关系, 用 2-脱氧-D-葡萄糖平板筛选丙酮丁醇高产菌。因为 2-脱氧-D-葡萄糖是常用的淀粉降解阻遏物, 若突变株可以在 2-脱氧-D-葡萄糖培养基上生长, 说明其解除了淀粉酶的阻遏抑制而促进淀粉酶的过量表达。上述方法都属于间接的筛选方法, 效率较低。根据丙酮丁醇发酵先产酸后产溶剂及强还原力可将代谢流向丙酮和丁醇的特点, 靳孝庆等<sup>[10]</sup>建立了简便、快捷、高效的丙酮丁醇发酵生产菌复合平板(淀粉降解阻遏物 2-脱氧-D-葡萄糖、酸碱指示剂溴甲酚绿和还原力指示剂刃天青三级筛选平板)筛选方法。

### 3.2 高产菌株的育种

菌种改良是提高丙酮丁醇发酵经济竞争力的关键

手段之一。选育方向的选择决定着选育的成败，菌体的生长能力和产物量是比较常见的选育指标。

在厌氧发酵过程中，梭菌菌体密度低，产物浓度低，因此提高丁醇产生菌的耐氧能力是实现菌体高密度的一个思路<sup>[11]</sup>。王风芹等<sup>[12]</sup>分离得到一株好氧分离平板上可以良好生长而且丁醇发酵能力较强的芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)，为高密度、高强度丁醇发酵提供了宝贵的菌种资源。当发酵液中丁醇质量浓度达 5 g/L 时，发酵就会受影响，超过 10 g/L 时，菌的生长就会受到抑制<sup>[13]</sup>，因此耐受高浓度丁醇菌株的筛选成为提高丁醇产量的又一个思路<sup>[14]</sup>。

### 3.2.1 诱变育种

目前，诱变育种是主要的菌种选育手段。Annous 等<sup>[15]</sup>用亚硝基胍做诱变剂，以 2-脱氧-D-葡萄糖作为抗代谢阻遏物筛选到淀粉酶活性大大提高的 *C. acetobutylicum* BA 101，其间歇发酵条件丁醇含量可以达到 19 g/L，比出发菌株提高约 100%。张益葵等<sup>[16]</sup>用亚硝基胍和甲基磺酸乙酯先后处理，筛选到高丁醇比例的丙酮丁醇梭菌，百吨发酵罐试验中，丁醇比例达到 71.9%，比原始菌株高 10%左右。

### 3.2.2 细胞融合技术

细胞融合技术可使常规方法难以实现的育种成为可能，使得不同种属之间生物的杂交成为可能。随着芽孢杆菌产丙酮丁醇能力的发现，细胞融合技术为培育高性能丙酮丁醇发酵菌株开辟一种新途径。Reilly 等<sup>[17]</sup>的研究发现，在基本培养基中添加  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  可以提高丙酮丁醇梭菌原生质体的稳定性，添加水解酪蛋白或者丙酮丁醇梭菌的自溶物可以提高再生率，这为原生质体育种奠定了基础。

### 3.2.3 基因工程改造技术

基因工程改造技术是实现发酵法生产丙酮丁醇生物能源低成本化的关键。研究手段主要为基因敲除和强化基因表达。

基因敲除方案，一为敲除代谢主流关键基因，研究结果表现为目的产物产量的显著下降。如，Green 等<sup>[18]</sup>通过基因敲除方法使醛/醇脱氢酶(*adhE*)基因失活，结果抑制丙酮生成，并使丁醇产量降低了 85%，说明 *adhE* 在丁醇形成中起到重要作用。二为敲除代谢支流关键基因，使得代谢流向我们所期待的方向，研究结果表现为目的产物产量的提高。如，通过基因敲除，切断乙醇、乙酸、丁酸生成代谢途径。Green 等<sup>[19]</sup>通过基因敲除方法发现 *pta* 基因的失活降低了磷酸乙酰基转移酶、乙酸激酶的活性和乙酸产量；*buk* 基

因的失活降低了丁酸激酶活性和丁酸产量，而丁醇终浓度增加近 15%。

强化基因表达方案，一为构建含关键基因的质粒，将此质粒转化丙丁菌，提高目的产物的产量。如，Green 等<sup>[20]</sup>在突变株 PJC4BK 中过量表达基因 *adhE1*，摇瓶实验中，该菌株的丁醇、丙酮和乙醇产量分别达 16.7 g/L、4.4 g/L 和 2.6 g/L。Mermelstein 等<sup>[21]</sup>构建了含有乙酰乙酸脱羧酶基因 *adc*、CoA 转移酶 A 基因 *ctfA*、CoA 转移酶 B 基因 *ctfB* 的质粒 pFNK6，转化 *C. acetobutylicum* ATCC 824 后，丙酮、丁醇和乙醇的产量分别提高了 95%、37%和 90%，乙酸和丁酸的浓度则减少了 5%。二为构建含关键基因的质粒，将此质粒转化工程菌（如大肠杆菌、酵母等）<sup>[22]</sup>，提高工程菌产丙酮丁醇的能力。Lourde 等<sup>[23]</sup>将 *C. acetobutylicum* ATCC 824 中编码乙酰乙酸脱羧酶基因 *adc*、CoA 转移酶基因 *ctfAB* 和硫激酶基因 *thl* 构建到载体 pACT 中，转化 *Escherichia coli* 后，发现其丙酮产量存在一定的差异性。该项研究效果虽然不是很显著，但是大肠杆菌的快速增殖有助于实现高密度培养，为提高产物提供了可行性方向。

## 4 工艺改进

传统的丙酮丁醇发酵主要以间歇发酵和蒸馏提取的方式进行，目前产量一般只有 15~18 g/L。生产工艺改进（如萃取发酵、气提发酵、渗透蒸发等）可实现产物的及时分离、解除底物的抑制作用，降低产物的分离成本等。

### 4.1 原位萃取发酵

原位萃取技术可解除丁醇的抑制作用，提高发酵强度，提高原料的利用率，而且直接使用生物柴油萃取丁醇既可以省去回收发酵产物所需的蒸馏能耗，提高丁醇发酵的经济性，又可以改善原有生物柴油的许多缺点（如输出功率低、黑烟多等），提高生物柴油的质量和竞争力。杨立荣等<sup>[24]</sup>以油醇和混合醇（油醇和硬脂醇的混合物）作为丙酮丁醇发酵的萃取剂，发酵后总溶剂浓度达 33.63 g/L，丁醇浓度达 16.27 g/L，葡萄糖利用率达 98.0%，总溶剂产率达 31.2%。Ishizaki 等<sup>[25]</sup>以甲基化的天然棕榈油为萃取剂进行丙酮丁醇萃取发酵，发现 47%左右的溶剂被萃取到棕榈油层中，葡萄糖的消耗率因此由 62%提高到 83%，丁醇产量由 15.4 g/L 提高到 20.9 g/L。胡翠英等<sup>[26]</sup>以 4 种生物柴油作为丙酮丁醇发酵的萃取剂，丁醇的生产强度最高可

以达到 0.213 g/(L·h)，比对照提高了 10.9%。杨影等<sup>[27]</sup>以地沟生物柴油为萃取剂，添加 0.14%吐温-80 后，丁醇体积分数提高了 21.2%，总溶剂生产强度也提高了 16.5%。

## 4.2 气提发酵

气提技术是以发酵过程中产生的 H<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub> 或惰性气体为载气，使其在动力作用下进入发酵体系并带走有机溶剂，于冷凝器内收集有机溶剂，而气体再次进入反应器作为载气循环使用<sup>[28]</sup>的发酵过程，可实现发酵产物的及时分离，提高发酵强度<sup>[29]</sup>。Ezeji 等<sup>[30]</sup>研究了气提分离工艺对丙酮丁醇发酵的影响，与间歇发酵相比较，气提分离工艺溶剂产率和产量分别提高 200% 和 118%。Ezeji 等<sup>[31]</sup>的研究表明以 H<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 为载气，采用半连续发酵和气提产物回收耦联的工艺，发酵 201 h，溶剂产率提高 400%，总溶剂产量可达 232.8 g/L。

## 4.3 渗透蒸发

渗透蒸发是利用膜对液体混合物中各组分的渗透扩散能力不同，在膜两侧组分的蒸汽分压差作用下，对液体混合物进行部分蒸发，从而实现组分分离的一种膜分离技术，能实现丁醇的高效分离浓缩<sup>[32,33]</sup>。该技术分离效率高，操作简单且能耗低，无污染，易与其他技术耦合，具有良好的应用前景。

## 4.4 吸附发酵

常见吸附剂有硅藻土、活性炭、聚乙烯吡咯烷酮等。吸附-发酵耦合工艺可实现丙酮丁醇发酵的高产量、高产率、高糖利用率，而且吸附-发酵耦合工艺可以降低传统发酵分离工艺的能耗，另外，吸附剂可以重复利用（如硅藻土经过热处理后可重复利用）<sup>[34]</sup>。

# 5 低成本发酵原料开发

## 5.1 传统原料

丙酮丁醇发酵最常用的原料基质是玉米粉和糖蜜。该传统原料成本高昂，约占丙酮丁醇发酵总成本的 60%<sup>[35]</sup>。因此选择合适的原料作为碳源能在很大程度上提高发酵法生产丙酮丁醇的竞争力。

## 5.2 植物汁液

甜高粱秸秆具有较高生物量和糖含量。利用甜高粱秸秆汁生产燃料乙醇，在国内外已有广泛报道。程

意峰等<sup>[36]</sup>以甜高粱秸秆汁作为生产丙酮丁醇的发酵原料，以 *Bacillus acetobutylicum* Bd3 作为试验菌株，丁醇产量达到 10.29 g/L。

## 5.3 木质纤维素

木质素作为生物质醇类燃料的可再生性资源，围绕如何从其中获取还原糖的研究很广泛。尽管目前木质纤维素燃料开发都还存在预处理过程能耗高、污染重，产生较多的小分子有机酸、呋喃衍生物、酚类等发酵抑制物，以及纤维素酶类成本高等不利条件，但还是取得了一定成绩。Qureshi 等<sup>[37,38,39]</sup>以小麦秸秆水解液为原料发酵生产丁醇，采用分批式发酵工艺，获得总溶剂浓度、生产率和转化率分别达 25 g/L、0.6 g/(L·h)、0.42 g/g（葡萄糖）。陈守文等<sup>[40]</sup>利用 *C. acetobutylicum* C375 发酵还原糖浓度为 4.28% 的稻草水解液时，总溶剂为 12.8 g/L，丁醇：丙酮：乙醇为 65.8：23.8：10.4。此外，现代基因工程技术的发展对丙酮丁醇发酵中纤维素的利用具有显而易见的重要意义。Kim 等<sup>[41]</sup>将 *C. cellulorans* 的内切葡聚糖酶基因 *eng B* 导入 *C. beijerinckii* 中，结果显示其内切葡聚糖酶活力比原始菌株提高了 4 倍。

为了避免传统的木质纤维素乙醇发酵五碳糖利用率低的弊端，利用性能优良的丙丁工程菌并辅以先进的原位萃取发酵、气提发酵、混菌发酵技术等，可实现木质纤维素类生物物质的高效利用，开辟丙酮丁醇发酵工业的新局面。

## 展望

与化工合成工艺相比，以淀粉或糖蜜为原料的间歇丙酮丁醇发酵工艺还缺乏竞争力。但随着石化资源过度消费及其温室气体效应的危害，利用非粮生物物质资源为原料的微生物发酵法生产丙酮丁醇又备受关注。丙酮丁醇发酵工艺的产业化要解决几个关键的问题：一为发酵工艺，常规发酵工艺底物浓度虽然低，但产物抑制效应仍然影响着发酵的强度和进程，通过菌种选育和发酵产物的及时有效分离可以大大提高发酵的性能；二为产物分离能耗，发酵产物的回收费用较高，采用合适的工艺可改进降低回收费用；三为原料来源，应该通过菌种的选育和改造等措施拓宽丙酮丁醇菌的作用底物范围，如数量庞大的可再生性木质纤维素类生物物质。在国家及相关科研人员的高度重视下，加上国内丙酮丁醇发酵具有悠久历史，原有的丙酮丁醇生产厂家具有成熟的工艺与丰富的经验，发酵

法生产丙酮丁醇一定能够获得长足的发展，生物质基丁醇燃料产业化生产指日可待。

## References (参考文献)

- [1] Ounine K, Petitdemange H, Raval G, et al. Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 49 (4), P874-878.
- [2] 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 Microbiology*, 2001, 51, P2095-2103.
- [3] Jones D T, Woods D R. Acetone-butanol fermentation revisited[J]. *Microbiology Reviews*[J]. 1986, 50, P484-524.
- [4] Husemann M H, Papoutsakis E T. Effects of propionate and acetate additions on solvent production in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5), P1497-1500.
- [5] Chojecki A, Blaschek H P. Effect of carbohydrate source on alpha-amylase and glucoamylase formation by *Clostridium acetobutylicum* SA-1[J]. *Journal Industrial Microbiology*, 1986, 1(1), P63-67.
- [6] Rogers P, Palosaari N. *Clostridium acetobutylicum* mutants that produce butyraldehyde and altered quantities of solvents[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(12), P2761-2766.
- [7] Adler H I, Crow W. A technique for predicting the solvent-producing ability of *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(10), P2496-2499.
- [8] Scotcher M C, Bennett G N. SpoIIE regulates sporulation but does not directly affect solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187, P1930-1936.
- [9] Annous B A, Blaschek H P. Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amyolytic activity [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(9), P2544-2548.
- [10] Jin Xiaoqing, Zhou Hua, Wu Xueming, et al. A rapid screening method of producing strain in acetone-butanol fermentation[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2008, 8(6), P1185-1189(Ch).  
靳孝庆, 周华, 吴薛明, 等. 丙酮-丁醇发酵生产菌的快速筛选方法[J]. *过程工程学报*, 2008, 8(6), P1185-1189.
- [11] Hillmann F, Fischer R J, Saint-Prix F, et al. PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Molecular Microbiology*, 2008, 68(4), P848-860.
- [12] Wang Fengqin, Xie Hui, Chu Leran, et al. Screening and identification of a *Bacillus* strain producing butanol[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(1), P7-11(Ch).  
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), P7-11.
- [13] CHEN Taosheng. Technology of acetone-butanol fermentation[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1991, 238-239.  
陈驹声. 发酵法丙酮和丁醇生产技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991, 238-239.
- [14] Knoshaug E, Zhang M. Butanol tolerance in a selection of microorganisms[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 153(1-3), P13-20.
- [15] Annous B A, Blaschek H P. Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amyolytic activity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(9), P2544-2548.
- [16] Zhang Yifen, Chen Jun, Yang Yunliu, et al. Breeding of high-ratio butanol strains of *Clostridium acetobutylicum* and application to industrial production[J]. *Industrial Microbiology*, 1996, 3(4), P1-6(Ch).  
张益霖, 陈军, 杨蕴刘, 等. 高丁醇比丙酮丁醇梭菌的选育与应用[J]. *工业微生物*, 1996, 3 (4), P1-6.
- [17] Reilly P M, Rogers P. Regeneration of cells from protoplasts of *Clostridium acetobutylicum* B643[J]. *Journal of Industrial Microbiology*, 1987, 1(5), P329-334.
- [18] Green E M, Bennett G N. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 57-58(1), P213-221.
- [19] Green E M, Boynton Z L, Harris L M, et al. Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. *Microbiology*, 1996, 142(8), P2079-2086.
- [20] Green E M, Bennett G N. Genetic manipulation of acid and solvent formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, 58(2-3), P215-221.
- [21] Mermelstein L D, Papoutsakis E T, Petersen D J, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for increased solvent production by enhancement of acetone formation enzyme activities using a synthetic acetone operon[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42(9), P1053-1060.
- [22] Nielsen D R, Leonard E, Yoon S H, et al. Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria[J]. *Metabolic Engineering*, 2009, 11(4-5), P262-273.
- [23] Bermejo L L, Welker N E, Papoutsakis E T. Expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 genes in *Escherichia coli* for acetone production and acetate detoxification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(3), P1079-1085.
- [24] Yang Lirong, Cen Peilin, Zhu Ziqiang. Study on acetone/butanol fermentation with in-situ solvent extraction[J]. *Journal of Zhejiang University(Natural Science)*, 1992, 26(4), P388-398(Ch).  
杨立荣, 岑沛霖, 朱自强. 丙酮/丁醇间歇萃取发酵[J]. *浙江大学学报*, 1992, 26(4), P388-398.
- [25] Ishizaki A, Michiwaki S, Crabbe E, et al. Extractive acetone-butanol-ethanol fermentation using methylated crude palm oil as extractant in batch culture of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564)[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87(3), P352-356.
- [26] Hu Cuiying, Du Yiping, Yang Ying, et al. Preliminary study on coupling between biodiesels and acetone-butanol fermentation[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2007, 5(1), P27-32.  
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[J]. *生物加工过程*, 2007, 5(1), P27-32.
- [27] Yang Ying, Zhang Longyun, Shi Zhongping. Improvement of extractive fermentation performance of butanol by adding surfactants into fermentation medium[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2008, 6(4), P25-30.  
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[J]. *生物加工过程*, 2008, 6(4), P25-30.
- [28] Ezeji T C, Qureshi N, Blaschek H P. Process for continuous solvent production[P]: US Patent: 20050089979, 2005-4-28.
- [29] Ezeji T C, Karcher P M, Qureshi N, et al. Improving performance of a gas stripping-based recovery system to remove butanol from *Clostridium beijerinckii* fermentation[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2005, 27(3), P207-214.
- [30] Ezeji T C, Qureshi N, Blaschek H P. Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping[J]. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 2003, 19(6), P595-603.
- [31] Ezeji T C, Qureshi N, Blaschek H P. Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping[J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2004, 63(6), P653-658.
- [32] Liu F, Liu L, Feng X. Separation of acetone-butanol-ethanol(ABE) from dilute aqueous solutions by pervaporation[J]. *Separation and Purification Technology*, 2005, 42(3), P273-282.

- [33] Luo Jianquan, Yi Shouliang, Su Yi, et al. Separation and concentration of butanol from acetone-butanol-ethanol mixed solution by pervaporation[J]. *Chemical Engineering(China)*, 2010, 38 (2), P43-46(Ch).  
罗建泉, 伊守亮, 苏仪, 等. 渗透汽化法从丙酮-丁醇-乙醇中分离浓缩丁醇[J]. *化学工程*, 2010, 38 (2), P43-46.
- [34] Qureshi N, Hughes S, Maddox I S, et al. Energy-efficient recovery of butanol from model solutions and fermentation broth by adsorption[J]. *Bioprocess Biosystems Engineering*, 2005, 27(4), P215-222.
- [35] Madihah M S, Ariff A B, Sahaid K M, et al. Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2001, 17(6), P567-576.
- [36] Cheng Yifeng, Li Shijie, Huang Jinpeng, et al. Production of acetone and butanol by fermentation of sweet sorghum stalk juice[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2008, 24(10), P177-180(Ch).  
程意峰, 李世杰, 黄金鹏, 等. 利用甜高粱秸秆汁发酵生产丁醇、丙酮[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(10), P177-180.
- [37] Qureshi N, Saha B C, Cotta M A. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2007, 30(6), P419-427.
- [38] Qureshi N, Saha B C, Hector R E, et al. Butanol Production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium Beijerinckii*: Part I -Batch fermentation[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2008, 32(2), P168-175.
- [39] Qureshi N, Saha B C, Cotta M A, et al. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium Beijerinckii*: Part II - Fed-batch fermentation[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2008, 32 (2) , P176-183.
- [40] Chen Shouwen, Ma Xin, Wang Lisui, et al. Acetone-butanol fermentation of Rice Straw Enzymatic Hydrolysate[J]. *Industrial Microbiology*, 1998, 28(4), P30-34(Ch).  
陈守文, 马昕, 汪履绶, 等. 稻草酶法水解液的丙酮丁醇发酵[J]. *工业微生物*, 1998, 28(4), P30-34.
- [41] Kim A Y, Attwood G T, Holt S M, et al. Heterologous expression of endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Clostridium cellulovorans* in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 following transformation of the engB gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(1), P337-340.