

## 创新实践

**编者按:**木质纤维素作为可再生的碳资源,其生物利用和转化受到全世界关注。什么样的微生物能够利用木质纤维素水解液中的糖组分,微生物能够将这些糖转化成什么产品,一直是人们普遍关心的问题。中国人民大学附属中学过泳安等8名同学与美国伊利诺伊理科高中 Mitchell Bieniek 等两名同学选择具有生物燃料潜力、目前主要是作为化学品的丁醇作为目标产品,选择若干株能够产生丁醇的丙酮丁醇梭菌和拜氏梭菌,对这些菌株在葡萄糖、木糖、纤维二糖以及实际的芒草水解液上的生长能力及产生丁醇能力进行了定量评价。研究结果反映出作者对木质纤维素水解液的主要成分获得了较系统的认识,通过比较,认识到即便是同一个种的不同菌种,对原料的利用能力以及生产目标产物的能力不尽相同。这一研究内容新颖、贴近前沿,其研究成果有较高的应用价值,并得到了本领域专家的认可,本刊特予以发表。

青年时期是人们从事科研活动的黄金时期。在科学史上有许多独创性的发明和重要的新发现都归功于富有朝气和活力的年轻人。这几位高中生的大胆尝试,与该校多年来致力于在青少年中培养拔尖创新人才的努力是分不开的。作为报道我国生物技术研究开发重要成果与国内外最新进展的中国生物工程学会会刊,刊登中学生的研究成果尚属首次。我们期望此文的发表能够鼓励热爱科研且学有余力的中学生们积极参与到科学研究项目中来,也希望本刊的作者、审者、读者以及社会各界能对培养中学生的创新能力投入更多的关注和支持!

## 可发酵糖为底物不同菌种丁醇生产能力的研究

过泳安<sup>1</sup> 滕雅群<sup>1</sup> 诸欧浩迪<sup>1</sup> 戴漪晨<sup>1</sup> 查晶晶<sup>1</sup> 朱旭<sup>1</sup> 曾晓<sup>1</sup> 邢晓雪<sup>1</sup>

Mitchell Bieniek<sup>2</sup> Garrett Flack<sup>2</sup> 吕继华<sup>1\*</sup>

(1 中国人民大学附属中学 北京 100086 2 美国伊利诺伊理科高中 美国 60506)

**摘要** 随着新一代生物质能源的研发,利用梭菌的发酵生产丁醇已成为热点。选用能生产丁醇的 *Clostridium acetobutylicum* AS1.7, *Clostridium acetobutylicum* AS1.132, *Clostridium acetobutylicum* AS1.134 和 *Clostridium beijerinckii* NCMIB 8052,在多种糖源下进行发酵培养,通过比较其在不同糖源条件下的生长情况、糖利用率、丁醇及副产物产量、对丁醇、木糖耐受能力等,综合筛选出了最适用于发酵生产丁醇的备选菌种。NCMIB8052 因具有最高产量、相对优良的耐受性及可利用多种糖源的特点,而被确定为发酵能力最强的菌种。

**关键词** 生物能源 丁醇 发酵 梭菌 木糖耐受 丁醇耐受

**中图分类号** Q815

随着社会的不断发展,能源问题显得日益严重。人们在发展风能,太阳能,地热能等能源的同时,当今科学界也正在关注新能源领域——生物质,其中尤以微生物发酵生产醇类物质最受重视。在目前的技术条件下,以粮食作物为底物生产乙醇的第一代生物燃料技术已经成熟并投入工业生产。但在生产过程当中,

第一代生物燃料暴露出了诸多问题,如对粮食作物的巨大依赖,造成了人车征粮的窘迫局面,以及乙醇与汽油的互溶性不太理想等<sup>[1]</sup>。正因如此,利用非粮食作物作为底物生产丁醇的第二代生物燃料成为当今科学界关注的焦点。丁醇与乙醇相比,具有低挥发性、低亲水性、低沸点、高热值、任意比例与汽油互溶的特点,并且可以利用当今现有的管道系统运输而不对管道造成损坏(当乙醇浓度高于15%时,必须使用腐蚀抑制剂来

收稿日期:2011-12-29 修回日期:2012-02-24

\*通讯作者,电子信箱:lvjihua@rdzf.cn

预防金属管道被腐蚀<sup>[2]</sup>)。

目前,微生物发酵法生产丁醇主要使用丙酮丁醇梭菌和拜氏梭菌。二者均为严格厌氧菌<sup>[3]</sup>,可利用多种糖源进行发酵。此领域有待突破的技术瓶颈有以下几个:一、如何利用非粮食作物(芒草、芦苇等)生产含有较高糖浓度的水解液;二、丁醇作为目标产物对梭菌的生长有抑制作用;三、非粮食作物所生产的水解液中,往往含有较高浓度的木糖,而高浓度的木糖对梭菌的生长也有抑制作用<sup>[4]</sup>。选择合适的菌种是解决后两个问题的一种有效途径,另外通过对梭菌的驯化<sup>[5,6]</sup>,也可以提高菌种对于丁醇和木糖得耐受性。

本文将对不同菌种在生产丁醇的过程中所表现出的不同能力进行较为全面的分析,从而筛选出一种具有较高生产能力,同时对丁醇和木糖有较强耐受能力的菌株,以期该菌株除了可以用作工业发酵之外,也可以作为驯化的基础菌种。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*Clostridium acetobutylicum* AS1. 7, *Clostridium acetobutylicum* AS1. 132, *Clostridium acetobutylicum* AS1. 134 和 *Clostridium beijerinckii* NCMIB 8052。

### 1.2 实验仪器

抽真空仪(实验室自制);酶标仪(SoftMax SPECTRA MAX 190);离心机(5424AJ770005 Eppendorf);高效液相色谱仪(1200 series Agilent Technologies);超净台(HDL APPARATUS);恒温培养摇床(ZHWY-2102 上海智城分析仪器制造有限公司)。

### 1.3 培养基

1.3.1 以纤维二糖为底物的培养基(g/L) 纤维二糖 40,酵母浸粉 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.75, NaCl 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 天门冬酰胺 2, 半胱氨酸盐酸盐 1。

1.3.2 以木糖为底物的培养基(g/L) 木糖 40,酵母浸粉 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.75, NaCl 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 天门冬酰胺 2, 半胱氨酸盐酸盐 1。

1.3.3 以葡萄糖和木糖为底物的培养基(g/L) 葡萄糖 30, 木糖 10, 酵母浸粉 5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.75, NaCl 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 天门冬酰胺 2,

半胱氨酸盐酸盐 1。

1.3.4 以芒草水解液为底物的培养基 取 10g 芒草干物质,加入至 100ml 去离子水中;加入 5ml 浓度为 0.15mol/L 的硫酸,混合加热 1 小时后,静置 24 小时,过滤,得到固体芒草,加入稀硫酸溶液(1%),静置 24 小时后将固体芒草滤出,所得溶液即为水解液,由于水解液 pH 较低,分别用 NaOH 或  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调至 6.5。

### 1.4 实验方法

1.4.1 培养基灭菌方法 各培养基配制完成后,分装入气密瓶中,每瓶 45ml,抽真空后充入氮气,高温灭菌。

1.4.2 菌体浓度的测定 不同菌株接种培养后(恒温摇床 35℃,每分钟 180 转),分别于 0h、24h、48h、72h 取样,用酶标仪测量 OD(波长为 600nm)。

1.4.3 丁醇及副产物的检测 分别于 0h、24h、48h、72h 取样,离心(1min, 15 000r/min),取上清液。利用高效液相色谱检测各物质含量。

液相条件为 HPX-87H,柱温 15℃,检测器为示差检测器,流动相为 0.05 mmol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,流速为 0.5 ml/L。

## 2 结果与分析

### 2.1 以纤维二糖为底物发酵生产丁醇

纤维二糖作为木质纤维降解后的主要成分之一,对于实验有较大的研究价值。所以首先使用纤维二糖做底物,用于探究各菌种生产丁醇的能力,并从中观察各菌种的生长是否会因丁醇浓度的升高而受到抑制。

2.1.1 各菌株的生长情况 图 1 为各组菌浓(OD)和丁醇浓度随时间的变化趋势,通过此图比较各菌种生长情况和丁醇耐受性。图 2 为各组各物质浓度随时间的变化趋势图,通过此图对其代谢进行分析。

在实验中,AS1.132 和 NCIMB 8052 有较稳定的生长和糖的利用率。由图 1a 和图 1d 下不难发现,当发酵时间到达 24 小时后,OD 值的增长速率有明显减缓,甚至有负增长,并在 48 小时后重新开始增长。由于酵过程中并没有向培养基内补充任何底物,可以推断菌株的生长一定受了其自身代谢产物的影响。分析图 2a 和图 2d 中显示的各种重要代谢产物随时间的变化,可以进一步确定影响菌株生长的自身代谢产物可能是浓度最高的丁醇和丙酮,或是可以改变溶液 pH 的丁酸及乙酸<sup>[7]</sup>。其中丁醇为目标产物,是必须被代谢产生的。而丙酮作为副产物,今后可以通过单菌株筛选或基因改造得到较低丙酮产量的菌株。但目前在生产丁醇的 ABE 发酵中,丙酮的产生不可避免的<sup>[8]</sup>,这更加说明了

筛选耐受菌株的重要性。

AS1.134 在 24 小时左右便停止了生长,介于实验设置了平行组,不认为此现象为实验误差,对于此现象的详细解释,将在 2.3.2 节中展开。

AS 1.7 在 48 小时左右虽然依然有生长,但速度明显减缓,糖的消耗量也迅速减少,不过丁醇的产量却相对稳定增长。对于这一现象,将会在 2.1.2 节进行详

细讨论。

另外,综合考虑图 1,通过观察 OD 值下降的时间和其对应的丁醇浓度,丁醇可以抑制作用的初始浓度应在 0.9g/L 左右。

综上所述,AS1.132 拥有最好的生长能力,其次为 NCIMB8052。

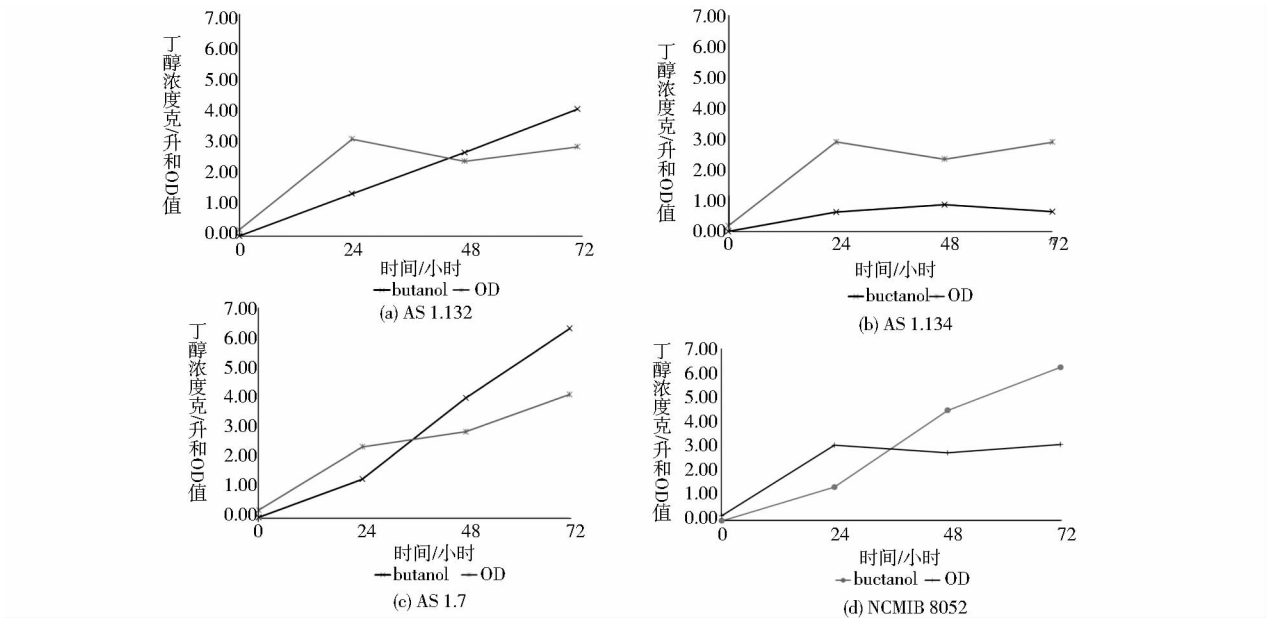


图 1 菌体浓度和丁醇浓度随时间变化

Fig. 1 The change of OD and butanol concentration verses time

2.1.2 各菌株的代谢情况 丁醇的产量是实验最为关心的部分,根据图 1,AS 1.132 和 NCIMB 8052 的丁醇终产量最高。AS1.7 的丁醇浓度增长最为稳定,基本随时间呈线性增长;另一具丁醇生产速率稳定的菌种为 AS1.132,在发酵 24h 时,丁醇产率加快并成线性增长。NCMIB8052 丁醇产率在发酵 48h 后有减缓的趋势。

在 2.1.1 中曾提及,48h 后 AS 1.7 的生长率和糖的消耗量均变缓慢,但丁醇产率仍稳定增长。对于这一现象,解释如下:

由图 2c 中的各物质变化趋势可以看出,糖消耗量的减少和生长速率的减慢与丁酸浓度的增加是同步发生的。在 ABE 发酵中,丁酸是丁醇生产的阶段性产

物<sup>[8]</sup>。注意到 AS 1.7 不同于其他各组的一显著特征是在其发酵初期产生大量丁酸,后期丁酸才缓慢减少。因此认为可能是 AS1.7 在将丁酸转换为丁醇这一代谢能力上有所缺陷,由于这一缺陷,丁酸在发酵初期大量积累,降低了培养基的 pH,抑制了梭菌的生长和代谢。这一结果说明,对于生产丁醇来说,AS 1.7 的代谢能力并不理想。

在发酵过程中,非丁醇物质的产生是不可避免的,比如乙醇。但根据图 2,各菌株的主要产物均为丁醇,乙醇含量均在 0.3g/L 内。其中 AS 1.7 有较多的丁酸滞留。

综上所述,AS 1.132 和 NCIMB 8052 有较好的代谢能力,AS 1.7 的代谢能力并不理想。

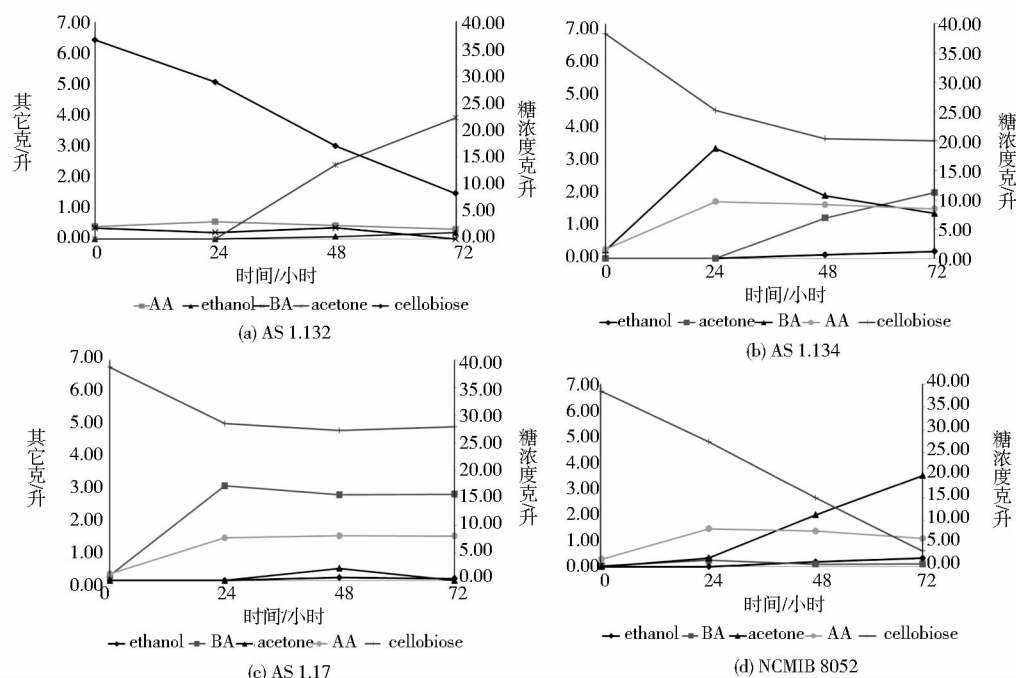


图2 其它物质浓度随时间变化

Fig2 The change of other substances concentration verses time

## 2.2 以木糖为底物发酵生产丁醇

与纤维二糖相同,木糖也是木质纤维降解后的主要成分。在发酵过程当中,木糖虽然也可以被作为碳源,但木糖对菌株的生长也存在抑制作用。实验通过使用木糖做唯一碳源,用于探究个菌种对木糖的耐受能力,并观察在受抑制条件下,不同菌种生产丁醇的能力。

2.2.1 各菌株的生长情况 图3为菌浓(OD)及木糖浓度随时间的变化趋势。通过此图比较各菌种生长情况和木糖耐受性。图4为各物质浓度随时间的变化趋势。通过此图对其代谢进行分析。

与以纤维而糖做培养基时相比,菌株在木糖做碳源的生长结果是差别极大的。

生长状况最好的是 AS1. 134。根据图 3b,其生长曲线十分接近于 S 曲线。与在在以纤维二糖中停止生长的表现不同,在以木糖做培养基的情况下,AS1. 134 的生长更为持久。对木糖的利用水平也十分的优秀。

但虽然其生长持久,碳源使用情况好,其发酵 24 小时 OD 值依旧低于其同期在以纤维二糖做培养基时的 OD 值,表明其生长依旧受到了木糖的抑制。

其余的菌种的表现均不太理想,且具有一定相似性。由图 3c 及图 3d(请注意:为更好的显示出变化趋势,这一部分使用了与别组不同的纵轴),AS1. 7 和

NCMIB8052 的生长趋势均为减速生长。由图 3a, AS1. 132 的生长趋势并不平稳。AS1. 132 和 AS1. 7 对木糖有较明显但总量偏小的利用,而 NCMIB8052 对木糖的利用虽然稳定,但是总量却过小了。

所有菌株在发酵 48h 后对于木糖的利用均有所减缓,OD 有少量负增长。介于在 48h 时丁醇浓度均大致达到在 2.1.1 中讨论的抑制作用的最低浓度(0.9g/L),认为这种现象由于丁醇的增长而导致的。

综上所述,AS1. 134 在木糖环境下拥有最好的耐受性和生长能力,其余各组均不理想。介于 1.7 在实验 2.1 与 2.2 中均不理想,在之后的实验中将不会对其进行探究和讨论。

2.2.2 各菌株的代谢情况 在实验中,由于各菌株都受到了木糖的强抑制,丁醇的产量并不理想。在以纤维二糖做底物时,产量最好的 AS1. 132 和 NCMIB8052 在高浓度木糖条件下都不能高效的产出丁醇。而在上次实验中停止生长的 AS1. 134,有最好的丁醇产出量,几乎赶超了 NCMIB8052 在纤维二糖中的丁醇产量。对于这一现象,将结合实验 1 与实验 3 的数据,在 2.3.2 小节对 AS1. 134 的代谢特征进行推论,并解释其在高浓度木糖下产量突出的原因。

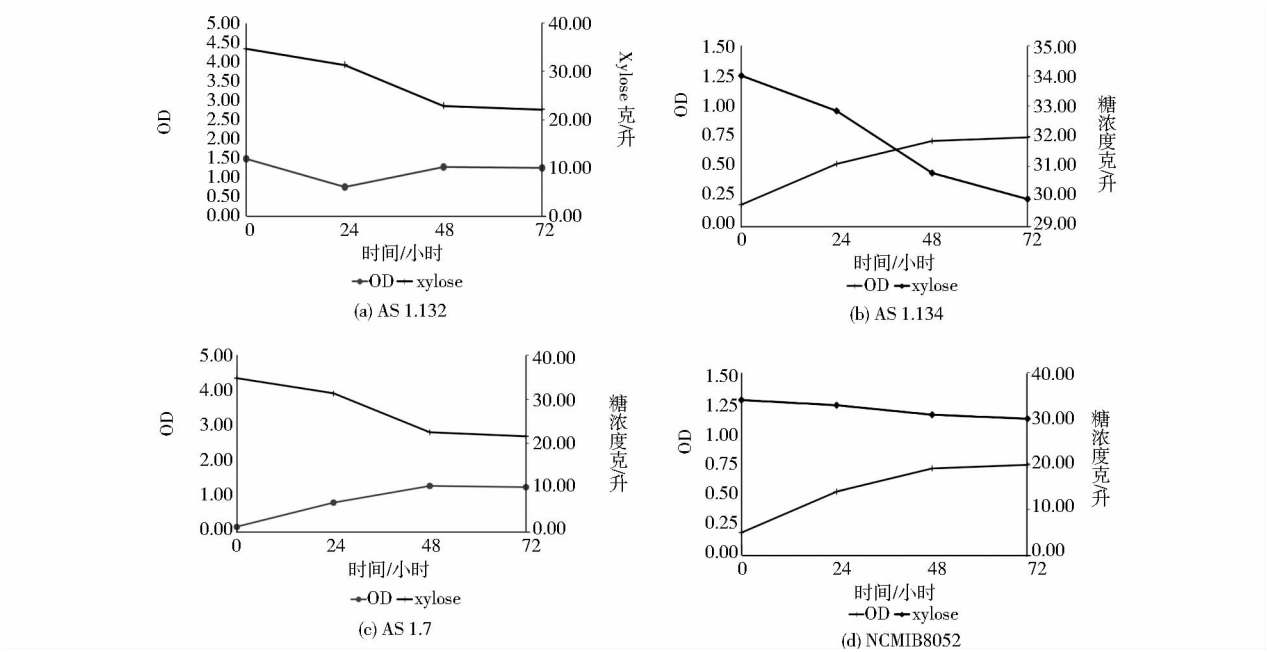


图3 菌体浓度和丁醇浓度随时间变化

Fig3 The change of OD and xylose concentration verses time

与其他菌种在纤维二糖组中的发酵结果类似, AS1. 134 在木糖条件下, 其余各物质浓度均控制在 1g/L 以下, 另外, 随着丁醇的产出, 丙酮浓度也有显著增长。

由图 1a, 图 1c 和图 1d 可以发现, AS1. 132, AS1. 7 和 NCMIB 在以木糖为碳源的发酵中, 其产物随时间的变化有较高的相似性。其主要产物均为丁酸, 在 0 ~ 72 小时的发酵时间内, 丁酸浓度始终为减速增长(从正到负), 丁醇大约在 24 小时左右开始产出。伴随丁醇有少量丙酮产出。在以纤维二糖为底物的试验中, AS1. 7 具有相同的代谢变化趋势。但对于 AS1. 132 和 NCMIB8052 来说便不尽然。观察图 4a 和图 4d, AS1. 132 和 NCMIB8052 在未受抑制的条件下, 其丁酸浓度始终保持在 0. 5g/L 之下。而在 2. 1. 2 中的讨论曾提及, AS1. 7 的这种变化趋势是由于不能顺利将丁酸转化为丁醇导致的。也就是说, AS1. 132 和 NCMIB8052 不仅受到了木糖在生长上的阻碍, 同样也受到了其在代谢作用上的干扰。

综上所述, AS1. 134 在木糖环境下丁醇产量较高且较理想。其余各组因受到了丁醇的生长和代谢抑制作用, 均不能高效的生 产丁醇。

2.3 以葡萄糖和木糖为底物发酵生产丁醇

在上一小节中讨论中我们发现。木糖在生长抑制

和丁醇产率等不同方面均对梭菌造成了影响。但其影响程度因为菌种的特性不同也有很大差别。在实际生产中, 木糖并不是水溶液当中唯一可用的糖源, 其一般也含有非常适于微生物使用的糖源—葡萄糖。本小节将使用人工配制的培养基, 模拟多糖源环境, 研究不同菌种的不同表现。

2.3.1 各菌株的糖利用情况 图 5 是培养基各物质浓度随时间的变化趋势(糖浓度参照次坐标轴)。通过此图比较各菌种生长情况和木糖耐受性。

通过图 5(关于 AS1. 134 会在稍后的讨论中提及)不难看出, 当葡萄糖和木糖共同存在于培养基中的时候, 菌株基本上不使用木糖作为糖源, 而是用葡萄糖作为糖源。NCMIB8052 虽说对更倾向使用葡萄糖, 但是依旧对木糖有较稳定的持续利用。也就是说, 即使在葡萄糖存在的情况下, NCMIB8052 也会利用木糖作为糖源。简而言之, 在给定时间内, NCMIB8052 可以更有 效的利用培养基中的碳源。

综上所述, 各种菌对糖的使用均有强选择性, NCMIB8052 可以在混合糖源的条件 下较稳定的使用木糖。

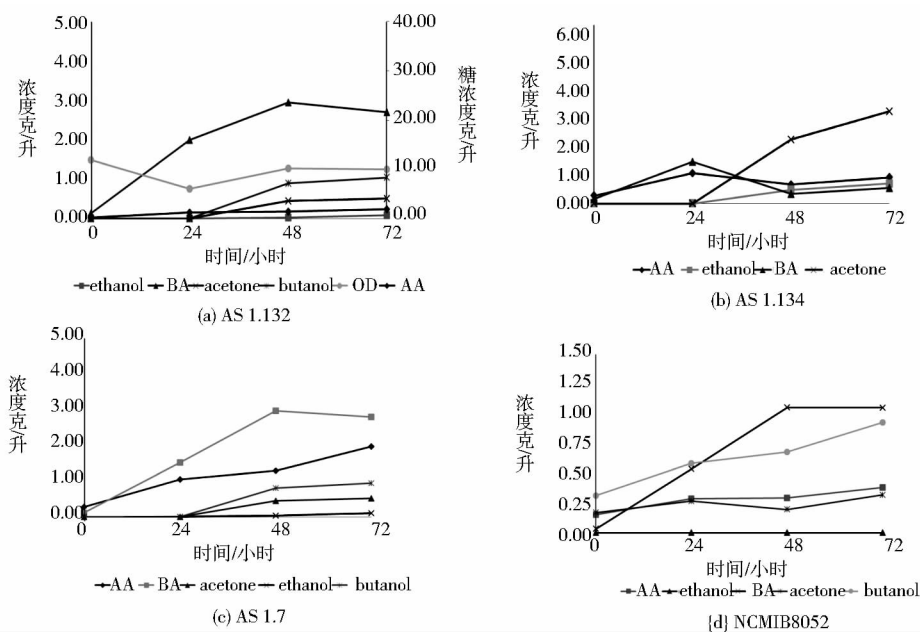


图4 其它物质浓度随时间变化

Fig4 The change of other substances concentration verses time

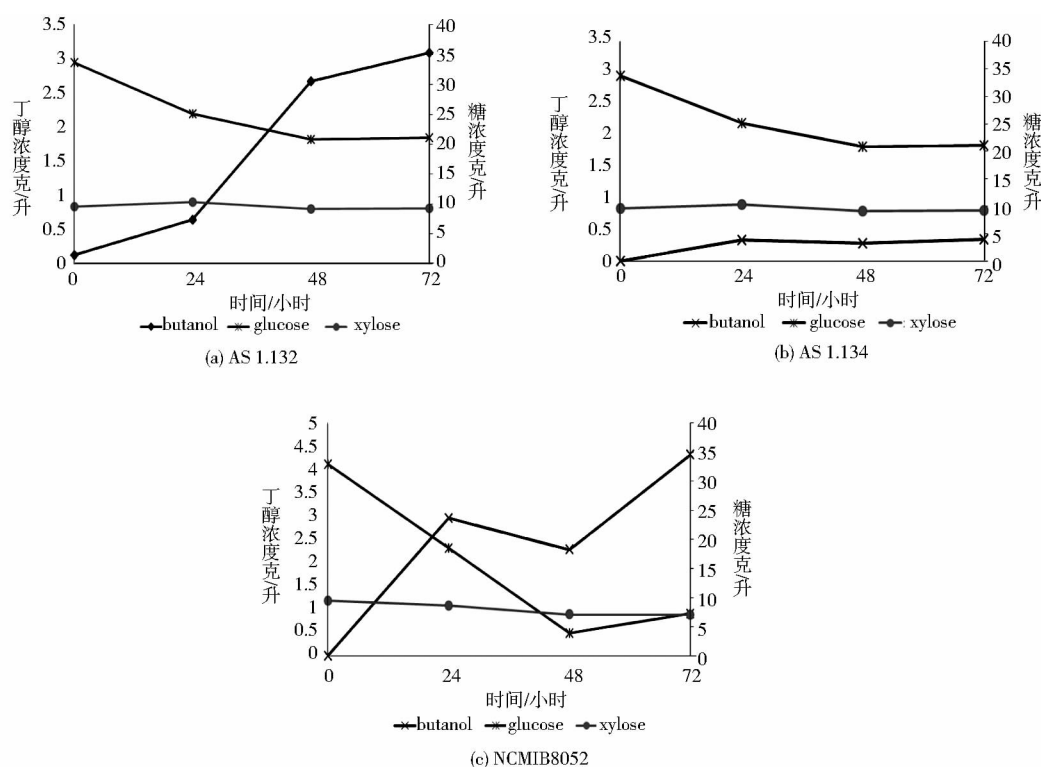


图5 糖浓度和丁醇浓度随时间变化

Fig5 The change of sugar concentration and xylose concentration verses time

2.3.2 各菌株的代谢情况 图6为各物质浓度随时间的变化趋势。通过此图对其代谢进行分析。

通过比较图6,在这三个菌种当中,产量最高为

NCMIB8052,其次为AS1.132。

AS1.134在实验中表现极为不理想。综合图5b和图6b,该菌种在发酵24小时后便停止代谢。介于此现

象存在于所有平行对照中,所以可认为此现象不是实验误差导致的。对比图 2b 与图 6b,可以发现这两者的共同点是在发酵初期,丁酸产量极高,且当丁酸浓度在到达 3.5g/L 左右时,该菌种代谢停止。所以可以认为,AS1.134 与 AS1.7 类似,能大量快速的产出丁酸,但无法快速的将发酵初期所产生丁酸转换成丁醇。另一方面,与 AS1.7 不同,AS1.134 对酸耐受性更差,于是在高浓度酸的情况下便不再生长了。这一结论也可以解释 AS1.7 在木糖组实验(实验 2.2)中的表现。首先,在发酵前 24 小时,由于受到木糖的抑制,菌株生长代谢均较为缓慢(在发酵 24h 时,AS1.7 在木糖中增长的 OD 只有在纤维二糖中的三分之一左右)。根据图 5a,虽然发酵初期,AS1.134 主要的代谢产物依然是丁酸,但是其浓度只是 1.5g/L 左右,不足以对 AS1.134 的生长造成较大影响。发酵 24 小时后,丁酸浓度开始减少,而与其同步发生的 OD 和丁醇浓度的显著增长。这一现象符合刚刚得到的对于 AS1.134 的代谢特点的

讨论。即初期大量产酸,不适于酸性环境。另外,从结果来看,AS1.134 在未被酸性条件抑制的条件下,其丁醇产量非常理想。换句话说,AS1.134 是可以受益于木糖抑制性的菌种。

另一方面,比较 AS1.132 与 NCMIB8052 在纯纤维二糖做糖源中的表现,发现有以下几种变化:

- (1)在代谢过程当中,丁酸浓度明显增长;
- (2)丁醇产量下降。

认为这是和葡萄糖更便于利用有关,初期代谢速率过快,使得菌株大量产酸。丁酸的产生抑制了菌株的代谢和生长(这一点也可以由菌株对糖的利用率在较低丁醇浓度下便开始减缓这一现象得以佐证),使得最终的产量下降。同样,根据实验 2 的结论,木糖的存在,也使得菌种不能将丁酸快速转换成丁醇。

综上所述,各菌株都因使用葡萄糖而大量产酸,而抑制了生长与代谢。木糖在其中也导致了酸的滞留。

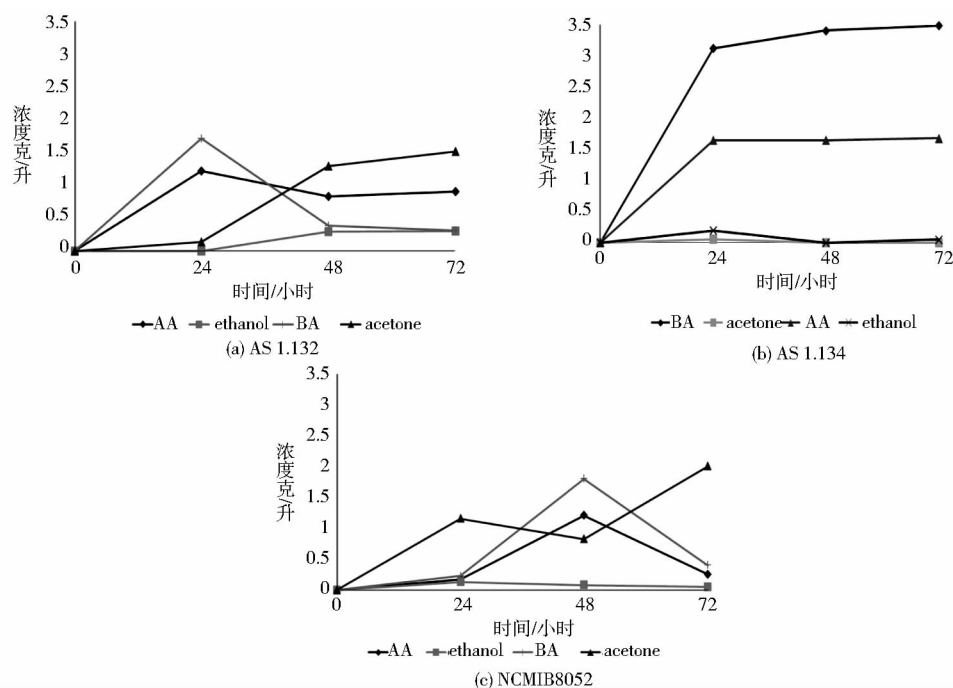


图 6 其它物质浓度随时间变化

Fig6 The change of other substances concentration verses time

#### 2.4 以芒草水解液为底物发酵生产丁醇

在一番筛选过后,利用 AS1.132, AS1.134 和 NCMIB8052,以水解液为培养基,进行了验证性实验。

此水解液中含有的主要糖源有阿拉伯糖,木糖和葡萄糖,其浓度及所占百分比参见图 7。

水解液样品由美国伊利诺伊数理高中(IMS A)提供。

初始水解液的 pH 过低,便分组加入了 NaOH 和  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  进行了处理。旨在消除加入过量金属离子而造成的对实验结果的干扰。

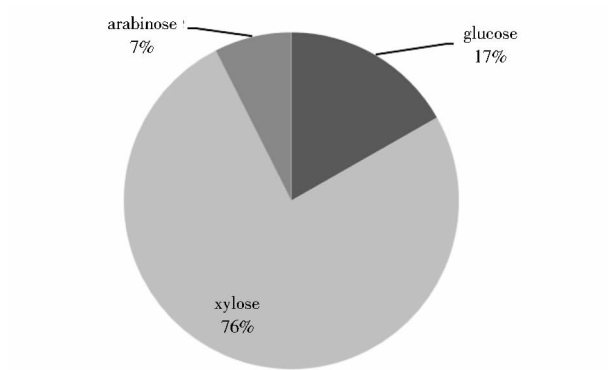


图7 水解液用糖分所占比例示意图

Fig. 7

作为验证性实验,本节实验将不讨论物质浓度随时间的变化,而重点关于和比较发酵 24 小时后,不同菌种在不同处理的水解液中的终产物的区别。

图 8 为发酵结果,图 8a NaOH 处理后的水解液的发酵结果,图 8b 为  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  处理后的水解液的发酵结果。在比较终产物时,重点关注四项物质:乙醇(目标产物相似副产物)、丁酸(阶段性产物)、丙酮(ABE

发酵副产物)和丁醇(目标产物)。

观察图 8,在用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  做酸处理的试验中,只有 NCMIB8052 产出了丁醇,进行了 ABE 发酵,认为可能是溶液中过多的钙离子对其有干扰作用。但是,图 8 中二者都反映了一个相似的现象,也就是在水解液中的发酵中,各菌都是以产酸为主的。这一现象符合在先前木糖组实验中各菌的表现。但是 NCMIB8052 在水解液的溶液中表现突出,并没有出现在木糖组试验中生长代谢缓慢的情况,可认为这是由于水解液中木糖浓度较低,不足以对 NCMIB8052 产生想在实验 2 中的高强度抑制,而对 AS1.132 来说,8g/L 左右的木糖浓度足以抑制其生长了。这也说明 NCMIB8052 比 AS1.132 有更好的木糖耐受性。而对于 AS1.134 来说,其产酸的原因来自于溶液中存在的葡萄糖或阿拉伯糖,而当这两种糖耗尽之后,其不能很快适应只有木糖的环境,从而不能对其进行有效利用。结合图 7,溶液中各糖源的比例和对糖的过强选择,也正是 AS1.134 虽然在其他实验中产酸最多,却在此实验中产酸最少的原因。

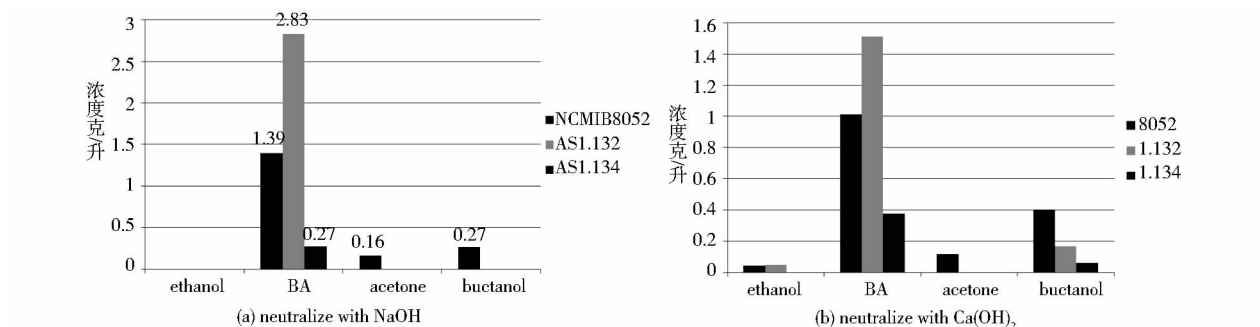


图8 以水解液为底物的发酵结果

Fig8 The fermentation result with hydrolysate as substrate

### 3 结 论

综合考虑以上所有实验,可以认为 NCMIB8052 是所有菌株中发酵能力最强的。其生长能力较好;在多糖条件下及水解液条件下丁醇产量最高。另外,其对多种糖源均有较强的利用能力,在被抑制的情况下仍可稳定使用木糖。虽说对木糖耐受力并不突出,但在代谢过程当中不易被自身产生的丁酸所抑制。适于在工业生产中使用。

**致谢** 中科院微生物所李寅研究员给予学术指导并提供实验设备,中科院微生物所张天瑞老师等给予

技术指导,中国人民大学附属中学刘彭芝校长给予支持,美国伊利诺伊理科高中 Max McGee 校长等给予支持。在此谨表感谢!

### 参考文献

- [1] 吴瑕,顾丽莉,申立中,等. 燃料乙醇和车用乙醇汽油的发展动态研究. 应用化工, 2009,38(7):1059-1063.  
Wu X, Gu L L, Shen L Z, et al. Study on the developing trend of fuel ethanol and ethanol gasoline for motor vehicles. Applied Chemical Industry, 2009, 38(7): 1059-1063.
- [2] 梅允福. 国内外节能清洁车用乙醇汽油的应用现状及发展前景. 甘肃化工, 2003,17(2):9-12.  
Mei Y F. Gansu Chemical Industry, 2003, 17(2), 9-12.



- [3] Johnson J L, Toth J, Santiwatanakul S, et al. Cultures of “*Clostridium acetobutylicum*” from Various Collections Comprise *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, and two other distinct types based on DNA-DNA reassociation. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997,47(2): 420-424.
- [4] Gu Y, Li J, Zhang L, et al. Improvement of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum* via expression of the talA gene encoding transaldolase from *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 2009,143(4): 284-287.
- [5] 苏海锋, 杨登峰. 拜氏梭菌 *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 在木薯发酵中耐高浓度丁醇的菌株筛选. 酿酒科技, 2010(9): 36-39.
- Su H F, Yang D F. Screening of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 strains with high concentration butanol tolerance in cassava fermentation. Liquor-Making Science & Technology, 2010, (9): 36-39.
- [6] Isar J, Rangaswamy V. Improved n-butanol production by solvent tolerant *Clostridium beijerinckii*. Biomass and Bioenergy, 2012,37: 9-15.
- [7] Maddox I S, Steiner E, Hirsch S, et al. The Cause of “Acid Crash” and “Acidogenic Fermentations” During the Batch Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation Process. J Mol Microbiol Biotechnol, 2000, 2(1): 95-100.
- [8] Thaddeus Chukwuemeka Ezeji, Nasib Qureshi, Hans Peter Blaschek. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. Current Opinion in Biotechnology 2007, 18:220-227.

## Study on the Ability of Butanol Production of Different Bacteria with the Fermentable Sugar

GUO Yong-an<sup>1</sup> TENG Ya-qun<sup>1</sup> ZHU Ouhaodi<sup>1</sup> DAU Yi-chen<sup>1</sup> ZHA Jing-jing<sup>1</sup> ZHU Xu<sup>1</sup>  
ZENG Xiao<sup>1</sup> XING Xiao-xue<sup>1</sup> Mitchell Bieniek<sup>2</sup> Garrett Flack<sup>2</sup> LV Ji-hua<sup>1</sup>

(1 The High School Affiliated to Renmin University of China, Beijing 100080, China)

(2 Illinois Mathematics and Science Academy, Illinois 60506, U. S. A)

**Abstract** With the development of the new generation of biomass energy, it has become a popular topic that to use fermentable sugar and *Clostridia* to produce butanol. The study is going to use *Clostridium acetobutylicum* AS1.7, *Clostridium acetobutylicum* AS1.132, *Clostridium acetobutylicum* AS1.134 and *Clostridium beijerinckii* NCMIB 8052, which can produce butanol in various sources of sugar by fermentation. By comparing growth behaviors, ratio of using sugars, yield of butanol and by-product, and endurance of butanol and xylose, we are going to find out the most suitable *Clostridium*, which can be used to the industrial. In the experiment, NCMIB8052 is the most outstanding *Clostridium* as it has the highest yield, relative high endurance and the ability using multiple sugars.

**Key words** Biomass Butanol Fermentation *Clostridium* Endurance Xylose