

研究报告

合成气发酵制取乙醇微生物的对比

宋安东^{1,2}, 冯新军^{1,2}, 王风芹^{1,2}, 谢慧^{1,2}, 杨大娇^{1,2}

1 河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450002

2 农业部农业微生物酶工程重点实验室, 河南 郑州 450002

宋安东, 冯新军, 王风芹, 等. 合成气发酵制取乙醇微生物的对比. 生物工程学报, 2013, 29(3): 342-349.

Song AD, Feng XJ, Wang FQ, et al. Comparison of microorganisms fermenting syngas into ethanol. Chin J Biotech, 2013, 29(3): 342-349.

摘要: 为了验证富集菌群利用合成气产乙醇的能力, 以富集培养获得的 4 种菌群 *A-fm 4*、*G-fm 4*、*LP-fm 4*、*B-fm 4* 为研究对象, 在 10% 接种量和 25% 接种量两种情况下, 与合成气发酵菌株梭状芽胞杆菌 *Clostridium autoethanogenum* 进行对比。结果表明: 10% 接种量时, *A-fm 4*、*G-fm 4*、*LP-fm 4*、*B-fm 4* 与 *C. autoethanogenum* 乙醇产量分别为 349.15、232.16、104.25、79.90 和 26.99 mg/L; 25% 接种量发酵时, 乙醇产量分别为 485.81、472.73、348.58、272.52 和 242.15 mg/L。提高接种量能增加乙醇的产量。富集菌群乙醇产量与目前报道的 *C. autoethanogenum* 最高产量 (259.64 mg/L) 相比具有显著优势, 提供了一种提高合成气发酵生产乙醇产量的方法。

关键词: 合成气, 乙醇, 富集, 发酵, 菌群

Comparison of microorganisms fermenting syngas into ethanol

Andong Song^{1,2}, Xinjun Feng^{1,2}, Fengqin Wang^{1,2}, Hui Xie^{1,2}, and Dajiao Yang^{1,2}

1 College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

2 Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: To evaluate the ability of microbial mix-culture fermenting syngas into ethanol, we studied the microbial mix-cultures A-fm 4, G-fm 4, Lp-fm 4 and B-fm 4 obtained by enrichment and compared with *Clostridium autoethanogenum* DSM10061 with 10% and 25% inoculation size. The results show that, with 10% inoculation size, the

Received: August 9, 2012; **Accepted:** November 16, 2012

Supported by: Science and Technology Cooperation Fund Projects of Henan Province (No. 102106000018).

Corresponding author: Andong Song. Tel: +86-371-63555153; Fax: +86-371-63555790; E-mail: song1666@126.com

河南省省院科技合作专项资金项目 (No. 102106000018) 资助。

ethanol production of *A-fm 4*, *G-fm 4*, *Lp-fm 4*, *B-fm 4* and *C. autoethanogenum* were 349.15, 232.16, 104.25, 79.90 and 26.99 mg/L respectively. With 25% inoculation size, the ethanol production were 485.81, 472.73, 348.58, 272.52 and 242.15 mg/L respectively. Higher inoculation size will increase the production of ethanol. The tested mix-culture exhibited a significant yield advantage compared with the maximum production of *C. autoethanogenum* reported in the literature (259.64 mg/L). This research provided a practical method to improve ethanol production from syngas.

Keywords: syngas, ethanol, enrichment incubation, fermentation, microbial mix-culture

生物质是一种丰富的可再生资源,利用生物质可以生产燃料乙醇,最主要的方法有两种,即生物化学法和热化学法,后者又包括化学合成和微生物发酵^[1]。微生物发酵合成气生产乙醇,是以生物质为原料生产乙醇的一种新技术。即将生物质完全气化,得到以 H₂、CO、CO₂、N₂ 等为主要成分的合成气,再利用一些特殊的微生物将合成气发酵为乙醇。该技术不需要昂贵的酶、酸、碱等试剂,可以将木质纤维素类生物质完全气化,微生物转化理论上可以完全利用有效气体,属环境友好型技术^[2]。

目前,已经发现的可以利用合成气合成乙醇的微生物还比较少^[3-4],主要是一些常温微生物和个别的嗜热微生物^[5]。国外一些科研工作者,陆续从动物粪便(鸡粪^[6]、兔粪^[7]等)、下水道污泥^[6]、农业泻湖^[8]、煤浆^[6]等物质中发现了一些能够利用合成气生产乙醇的微生物,开展的研究主要集中在梭状芽胞杆菌 *Clostridium ljungdahlii* 和梭状芽胞杆菌 *Clostridium carboxidivorans* 两株菌上^[9-21]。国内缺少具专利权的相关菌株,郭颖等^[22-23]以国外研究较少的 *C. autoethanogenum* 为对象进行了一些研究。

实验室在前期以羊驼、长臂猿、小熊猫、狒狒的粪便为样品进行富集培养时,得到可利用合成气发酵制取乙醇的 *A-fm 4*、*G-fm 4*、*Lp-fm 4*、*B-fm 4* 等 4 种菌群。本研究以 4 种富集菌群为

研究对象,与合成气发酵菌株 *C. autoethanogenum* 在两种接种量下发酵合成气生产乙醇的能力进行了对比。

1 材料与方法

1.1 菌株

A-fm 4、*G-fm 4*、*Lp-fm 4*、*B-fm 4* 均为本实验室富集筛选得到的菌群, *C. autoethanogenum* DSM10061 购自德国菌种保藏中心(DSMZ)。

富集菌群在前期试验中通过 PCR-DGGE 技术进行了初步鉴定,表 1 是对 4 种富集菌群中主要微生物的 16S rDNA 序列测序后的初步鉴定结果。

1.2 培养基及配制方法

DSM640 活化培养基(g/L): NH₄Cl 0.90, NaCl 0.90, MgCl₂·6H₂O 0.40, KH₂PO₄ 0.75, K₂HPO₄ 1.50, 胰蛋白胍 2.00, 酵母膏 1.00, FeCl₃·6H₂O 2.40×10⁻³, 纤维二糖 1.00, L-盐酸半胱氨酸 0.75, 木糖 5.00。纤维二糖在培养基灭菌后过滤加入,微量元素溶液 1 mL, pH 6.0。

改良培养基(g/L)^[13]: NaCl 1.20, NH₄Cl 1.50, KCl 0.15, MgSO₄·6H₂O 0.30, CaCl₂ 0.06, KH₂PO₄ 0.30, 酵母膏 0.50, 2-吗啉乙磺酸 5.00, L-盐酸半胱氨酸 0.20, 木糖 5.00。微量元素溶液添加 10 mL, 维生素溶液添加 10 mL, pH 5.75。pH 的调节应在加入 2-吗啉乙磺酸后立即进行。

表 1 富集菌群中优势微生物 16S rDNA 片段序列的比对结果

Table 1 Comparison of 16S rDNA sequences of dominant microbes by sequencing and Blast analysis

No.	Sequence length (bp)	GenBank Accession No.	Most similar strain	Maximum identity (%)
1	177	HQ659694.1	<i>Dysgonomonas</i> sp. A1(2011)	98
2	177	HQ659694.1	<i>Dysgonomonas</i> sp. A1(2011)	98
3	183	JN989551.1	<i>Enterococcus gilvus</i> strain 3	99
4	159	AB673452.1	<i>Clostridium</i> sp. cd6	98
5	186	JQ512003.1	<i>Citrobacter</i> sp.	89
6	180	HE586338.1	<i>Paenibacillus</i> sp. R-27422	98
7	184	JN989551.1	<i>Enterococcus gilvus</i> strain 3	99

发酵培养基^[23] (g/L): NH₄Cl 1.00, NaCl 1.00, MgSO₄ 0.15, KH₂PO₄ 0.10, CaCl₂ 0.04, 胰蛋白酶 2.00, 酵母膏 0.30, L-盐酸半胱氨酸 0.20, 2-吗啉乙磺酸 10.00。另矿质元素溶液 10 mL, 维生素溶液 10 mL, pH 4.5。

维生素贮液^[13] (mg/L): VB₆ 10, 硫胺素 5.00, VB₂ 5.00, 泛酸钙 5.00, 硫辛酸 5.00, 对氨基苯甲酸 5.00, 烟碱酸 5.00, VB₁₂ 5.00, 生物素 2.00, 叶酸 2.00。配好后用 0.22 μm 过滤器过滤除菌使用。

微量元素贮液^[13] (g/L): 氨三乙酸 2.00, MgSO₄ 1.00, (NH₄)₂SO₄·FeSO₄·6H₂O 0.80, CoCl₂·6H₂O 0.20, ZnSO₄·7H₂O 0.20, CuCl₂·2H₂O 0.02, NiCl₂·6H₂O 0.02, Na₂MoO₄·2H₂O 0.02, Na₂O₄Se 0.02, Na₂WO₄·2H₂O 0.02。

所有培养基按配方配制, 每 80 mL (发酵培养基为 60 mL) 分装入 300 mL 的厌氧培养瓶中, 放入厌氧培养箱, 在培养基中加入刃天青, 添加量为 0.50 mg/L。配好的培养基放置在充满合成气的厌氧培养箱内放置 24~36 h, 缓慢去除溶解氧。然后 121 °C, 1.01×10⁴ Pa 灭菌 20 min。维生素溶液和盐酸半胱氨酸采用 0.45 μm 的滤膜过滤除菌。

1.3 合成气

合成气组成为 CO 85.5%, H₂ 10%, CO₂ 4.5%, 购自河南源正科技发展有限公司。

1.4 菌种的活化

C. autoethanogenum 的活化: 首次活化, 打开安瓿瓶, 加入已灭菌的活化培养液 0.5 mL, 浸润 30 min; 用 1 mL 注射器吸取 200 μL, 注射入平板培养瓶并涂布, 维持在 37 °C。观察生长情况, 7 d 左右菌种生长良好。向平板培养瓶添加 20 mL 活化培养液, 培养 96 h。再次活化, 直接从平板培养瓶中吸取培养液, 转接到新鲜的活化培养液中, 接种量 10%, 进行培养。

富集菌群的活化: 取 *A-fm* 4、*G-fm* 4、*Lp-fm* 4 和 *B-fm* 4 的保存培养液加入活化培养基中, 添加量为 10%。

1.5 接种菌龄的确定

采用比浊法, 将活化后的菌液接入改良培养基中 (接种量 10%), 每隔一段时间 (*C. autoethanogenum* 为每 12 h, 富集菌群为每 8 h) 取一定菌液, 在 600 nm 下, 用可见分光光度计测量 OD 值, 测定至生物量增长缓慢或不再

增长为止, 绘制生长曲线, 确定生长对数期。

1.6 不同接种量的影响

10%接种量发酵: 将在改良培养基中生长至接种期的菌液转接至发酵培养液中, 接种量为 10%, 利用注射器, 向厌氧瓶内充入约 200 mL 合成气。温度 37 °C, 转速 150 r/min 的条件下培养 3 d。

25%接种量发酵: 将在改良培养基中生长至接种期的菌液完全离心, 收集菌体后用改良培养基悬浮至 12 mL, 接入 4 瓶发酵培养基 (即每瓶发酵培养基接入 3 mL), 利用注射器, 向厌氧瓶内充入约 200 mL 合成气。温度 37 °C, 转速 150 r/min 的条件下培养 3 d。

1.7 产物的测定

用注射器抽取 1.5 mL 发酵液, 于 -4 °C, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液测量乙醇浓度。测定乙醇含量采用 Agilent technologies 7890A GC System 气相色谱, 检测器采用 FID, 柱子为 30 m×0.32 mm×0.3 μm HP-FFAP, 载气为氮气, 载气流率 30 mL/min, 分流比 1:30, 色谱进样口和检测器的温度分别为 200 °C 和 250 °C。

1.8 主要设备

YX-II 厌氧培养箱, 购自上海新苗医疗器械制造有限公司, 温度设置为 37 °C, 每次使用前进行氮气置换 5~7 次, 以保证厌氧环境。

厌氧培养瓶购自海门市科仪实验仪器厂。

2 结果与分析

2.1 接种菌龄的确定

2.1.1 *C. autoethanogenum* 接种菌龄

用比浊法绘制生长曲线 (图 1)。由图 1 可以看出 *C. autoethanogenum* 在 36 h 开始进入对数生

长期, 大约 96 h 生长速度明显减慢, 逐渐进入稳定期。生长较快的时期是 60~84 h, 72 h 时生长速率达到最大。选择 72 h 为发酵接种菌龄。

2.1.2 富集菌群接种菌龄

分析图 2 可以看出 *G.-fm 4* 由 8 h 开始进入对数生长期, 大约 48 h 时菌体生长速度减缓, 进入稳定期; *A.-fm 4*、*Lp.-fm 4* 和 *B.-fm 4* 适应期不明显, 进入稳定期的时间分别在 40 h、56 h、64 h

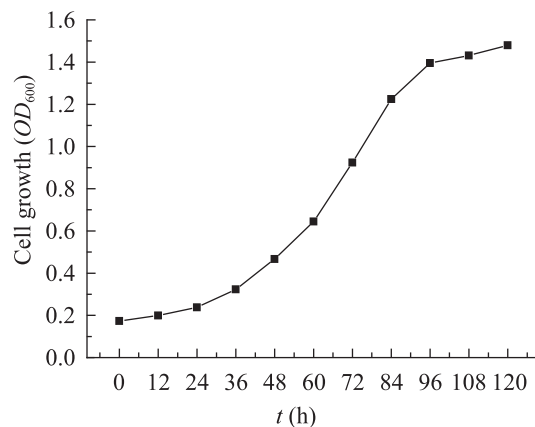


图 1 梭状芽胞杆菌生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *C. autoethanogenum*.

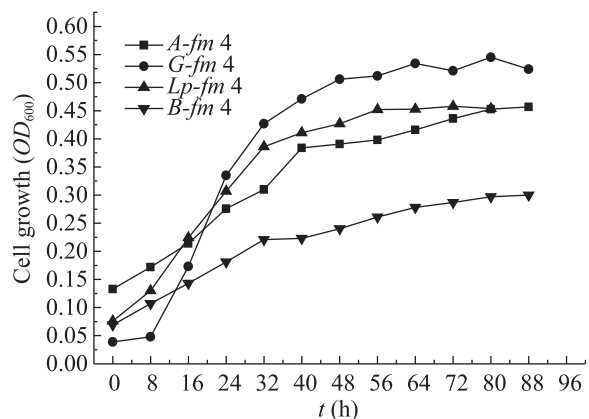


图 2 富集菌群生长曲线

Fig. 2 Growth curve of *A.-fm 4*, *G.-fm 4*, *Lp.-fm 4* and *B.-fm 4*.

左右。富集菌群生长最快的时期都在 32 h 左右, 选择 32 h 为最佳发酵接种菌龄。

对比图 1 和图 2 可以看出, 对照菌株 *C. autoethanogenum* 有 24 h 左右的生长适应期, 随后再进入对数生长期; 而富集菌群的适应期不明显, 除 *G-fm 4* 外, 接种后立即进行对数生长。但是, *C. autoethanogenum* 在 96 h 进入稳定期时的 OD_{600} 值达到 1.4 左右, 而 4 种富集菌群最大 OD_{600} 值只有 0.5 左右。

2.2 发酵时间的确定

将在改良培养基中生长至 72 h 的 *C. autoethanogenum* 以 10% 的接种量接入发酵培养基中进行发酵, 每 12 h 取一次样测乙醇产量, 得到结果如图 3 所示。

由图 3 可以看出, *C. autoethanogenum* 的乙醇产量随着发酵时间的延长有所增加, 在 72 h 时达到最高值, 72 h 后乙醇产量总体呈现降低趋势。所以将 72 h 作为发酵的最佳时间。

2.3 接种量对乙醇产量的影响

2.3.1 10% 接种量发酵的乙醇产量

由图 4 可以看出, 在 10% 接种量情况下,

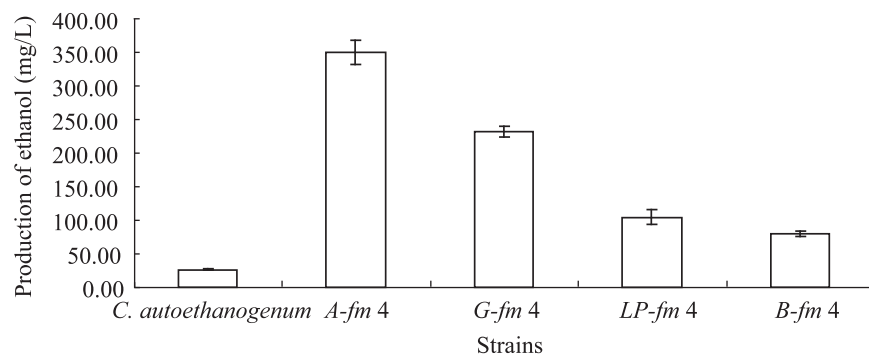


图 4 不同菌种乙醇产量比较 (10% 接种量)

Fig. 4 Comparison of ethanol production between different strains (10% inoculation size).

C. autoethanogenum、*A-fm 4*、*G-fm 4*、*LP-fm 4* 和 *B-fm 4* 的实验结果分别为 26.99、349.14、232.16、104.25 和 79.90 mg/L。富集菌群的乙醇产量普遍高于 *C. autoethanogenum* 的实验结果, *A-fm 4* 产量远远超过 *C. autoethanogenum* 报道的最高值 259.64 mg/L。

2.3.2 25% 接种量发酵的乙醇产量

由图 5 可以看出, 在 25% 接种量发酵中, *C. autoethanogenum*、*A-fm 4*、*G-fm 4*、*LP-fm 4* 和 *B-fm 4* 的实验结果分别为 242.15、485.81、472.73、348.58 和 272.52 mg/L。富集菌群普遍高于对照菌株 *C. autoethanogenum*, *A-fm 4*、*G-fm 4*、*LP-fm 4*、*B-fm 4* 的乙醇产量分别比

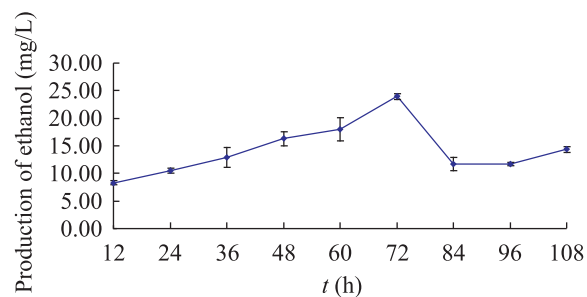


图 3 不同发酵时间乙醇产量

Fig. 3 Ethanol production at different time.

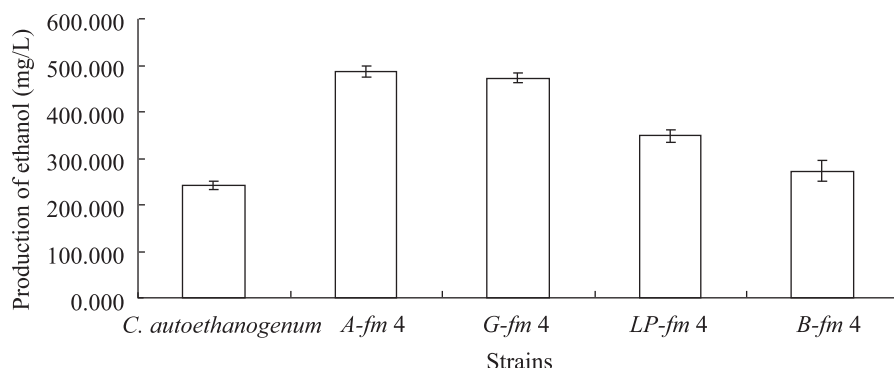


图5 不同菌种乙醇产量比较 (25%接种量)

Fig. 5 Comparison of ethanol production between different strains (25% inoculation size).

C. autoethanogenum 高 100.62%、95.20%、44.00%和 12.50%，均超过了 *C. autoethanogenum* 报道的最高值。

比较图 4 和图 5 可以看出，25%接种量发酵可以明显提高乙醇产量，与 10%接种量的乙醇产量相比，*C. autoethanogenum* 和 4 种富集菌群提高量分别为 797.36%、39.14%、103.62%、234.37%和 241.08%。

3 结论与讨论

10%接种量发酵，富集菌群 *A-fm 4*、*G-fm 4*、*LP-fm 4*、*B-fm 4* 乙醇产量分别为 349.15、232.16、104.25 和 79.90 mg/L，均高于 *C. autoethanogenum* 的 26.99 mg/L，*A-fm 4* 的产量高于报道的 *C. autoethanogenum* 最高产量 259.64 mg/L。25%接种量发酵，富集菌群产量分别为 485.81、472.73、348.58 和 272.52 mg/L，普遍高于对照菌株 *C. autoethanogenum* 的 242.15 mg/L 及其报道最高值。在相同的生长环境下，发酵实验接种时富集菌群的菌体密度小于 *C. autoethanogenum*，乙醇产量却高于后者，表明富集菌群利用合成气

产乙醇的能力较高。利用合成气发酵生产乙醇的微生物种类偏少，国内针对此类微生物的筛选还未见报道。由以上数据可知，4 种富集菌群能够利用合成气合成乙醇，对国内在该领域的研究具有重要意义。

25%接种量发酵可以明显提高乙醇产量，与 10%接种量的乙醇产量相比，*C. autoethanogenum* 和 4 种富集菌群提高量分别为 797.36%、39.14%、103.62%和 234.37%，241.08%。鉴于以上结果，高接种量发酵可以作为一种提高乙醇产量的措施。不同菌种发酵时具有不同的最佳接种量，本文只是对 10%接种量和 25%接种量两个梯度进行了对比研究，后续研究应设计多个梯度进行对比试验，确定最佳接种量。

富集菌群的产量明显高于 *C. autoethanogenum*，且与文献报道的产量相比具有显著优势。但是文献所使用的合成气组分为 CO/CO₂ (95/5, V/V)，与本试验使用合成气气体成分有一定差别。本实验中 *C. autoethanogenum* 生长曲线与文献报道的相似，表明本实验所用合成气对 *C. autoethanogenum* 生长没有明显影响，而对乙醇代谢有一定影响。

Kan Liu 等以嗜碱菌 *Alkalibaculum bacchi* 为研究对象, 利用两种不同成分的合成气进行发酵, 发现合成气的成分不同会影响乙醇产量^[24]。

本试验进行发酵时, 发酵原料来源于罐装气体, 生物质合成气中除了可利用气体如 CO、CO₂、H₂ 等, 还含有硫化物、焦油等不可利用甚至有毒物质, 这些组分会对微生物利用合成气发酵产物产生影响。郭颖等^[25]研究证明生物质合成气中所含的甲苯、苯酚和焦油在一定量情况下可以提高 *C. autoethanogenum* 乙醇的产量。Asma Ahmed 等^[26]研究证明合成气中存在 NO 时, 梭状芽胞杆菌 *Clostridium carboxidivorans* P7^T 的代谢会受到抑制。合成气的通入方式也会对发酵结果产生影响, Vel Berzin 等^[27]以梭状芽胞杆菌 *Clostridium* sp. MTEtOH550 为研究对象采用连续通气法, 乙醇产量由 11.5 g/L 提高到 27.2 g/L。后续试验需要对这些因素可能造成的影响进行研究。

REFERENCES

- [1] Munasinghe PC, Khanal SK. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: opportunities and challenges. *Bioresour Technol*, 2010, 101(13): 5013–5022.
- [2] Song AD, Feng XJ, Xie H, et al. Comparative analysis on the two technologies of ethanol production from syngas. *Chin J Bioprocess Eng*, 2012, 10(5): 72–78 (in Chinese).
宋安东, 冯新军, 谢慧, 等. 合成气制取乙醇 2 种技术比较分析. *生物加工过程*, 2012, 10(5): 72–78.
- [3] Zhang LB, Liu JK, Li D, et al. Study on the Microbiology for syngas ethanol fermentation. *Renewable Energy Resour*, 2007, 25(3): 27–30 (in Chinese).
张兰波, 刘继开, 李东, 等. 合成气乙醇发酵的微生物研究. *可再生能源*, 2007, 25(3): 27–30.
- [4] Song AD, Feng XJ, Xie H, et al. Biomass-derived syngas fermentation into fuel ethanol: research progress. *Food Ferment Indus*, 2011, 37(6): 130–136 (in Chinese).
宋安东, 冯新军, 谢慧, 等. 生物质合成气发酵制取燃料乙醇研究进展. *食品与发酵工业*, 2011, 37(6): 130–136.
- [5] Henstra AM, Sipma J, Rinzema A, et al. Microbiology of synthesis gas fermentation for biofuel production. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18(3): 200–206.
- [6] Hurst KM, Lewis RS. Carbon monoxide partial pressure effects on the metabolic process of syngas fermentation. *Biochem Eng J*, 2010, 48(2): 159–165.
- [7] Vega JL, Prieto S, Elmore BB, et al. The biological production of ethanol from synthesis gas. *Appl Biochem Biotech*, 1989, 20-21(1): 781–797.
- [8] Liou JS, Balkwill DL, Drake GR, et al. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(5): 2085–2091.
- [9] Gaddy JL, Clausen EC. *Clostridium ljungdahlii*, an anaerobic ethanol and acetate producing microorganism: US, 5173429. 1992-12-22.
- [10] Najafpour G, Younesi H. Ethanol and acetate synthesis from waste gas using batch culture of *Clostridium ljungdahlii*. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 38(1/2): 223–228.
- [11] Younesi H, Najafpour G, Mohamed AR. Ethanol and acetate production from synthesis gas via fermentation processes using anaerobic bacterium, *Clostridium ljungdahlii*. *Biochem Eng J*, 2005, 27(2): 110–119.
- [12] Ahmed A, Lewis RS. Fermentation of biomass-generated synthesis gas: effects of nitric oxide. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(5): 1080–1086.

- [13] Rajagopalan S, Datar RP, Lewis RS. Formation of ethanol from carbon monoxide via a new microbial catalyst. *Biom Bioen*, 2002, 23(6): 487–493.
- [14] Datar RP, Shenkman RM, Cateni BG, et al. Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 86 (5): 587–594.
- [15] Liou JSC, Balkwill DL, Drake GR, et al. *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55:2085–2091.
- [16] Lewis RS, Frankman RS, Allyson T, et al. Ethanol via biomass-generated syngas. *Int Sugar J*, 2008, 110(1311): 150–155.
- [17] Ahmed A, Cateni BG, Huhnke RL, et al. Effects of biomass-generated producer gas constituents on cell growth, product distribution and hydrogenase activity of *Clostridium carboxidivorans* P7^T. *Biom Bioen*, 2006, 30(7): 665–672.
- [18] Cotter JL, Chinn MS, Grunden AM. Influence of process parameters on growth of *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* on synthesis gas. *Enzyme Microb Technol*, 2009, 44(5): 281–288.
- [19] Cotter JL, Chinn MS, Grunden AM. Ethanol and acetate production by *Clostridium ljungdahlii* and *Clostridium autoethanogenum* using resting cells. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2009, 32(3): 369–380.
- [20] Köpke M, Held C, Hujer S, et al. *Clostridium ljungdahlii* represents a microbial production platform based on syngas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(29): 13087–13092.
- [21] Ukpong MN, Atiyeh HK, De Lorme MJ, et al. Physiological response of *Clostridium carboxidivorans* during conversion of synthesis gas to solvents in a gas-fed bioreactor. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(11): 2720–2728.
- [22] Guo Y, Xu JL, Xu HJ, et al. Medium optimization for the growth of *Clostridium autoethanogenum*. *Renewable Energy Resour*, 2011, 29(1): 53–56 (in Chinese).
郭颖, 许敬亮, 徐惠娟, 等. *Clostridium autoethanogenum* 的生长培养基优化. *可再生能源*, 2011, 29(1): 53–56.
- [23] Guo Y, Xu JL, Zhang Y, et al. Medium optimization for ethanol production with *Clostridium autoethanogenum* with carbon monoxide as sole carbon source. *Bioresour Technol*, 2010, 101(22): 8784–8789.
- [24] Liu K, Atiyeh HK, Tanner RS, et al. Fermentative production of ethanol from syngas using novel moderately alkaliphilic strains of *Alkalibaculum bacchi*. *Bioresour Technol*, 2012, 104: 336–341.
- [25] Guo Y, Xu JL, Xu HJ, et al. Study on composition effects of syngas and medium on ethanol production with *Clostridium autoethanogenum*. *Acta Energ Solar Sin*, 2011, 32(9): 1370–1374 (in Chinese).
郭颖, 许敬亮, 徐惠娟, 等. 合成气和培养基组分对 *C. autoethanogenum* 发酵产乙醇的影响研究. *太阳能学报*, 2011, 32(9): 1370–1374.
- [26] Ahmed A, Lewis RS. Fermentation of biomass-generated synthesis gas: effects of nitric oxide. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(5): 1080–1086.
- [27] Berzin V, Kiriukhin M, Tyurin M. Elimination of acetate production to improve ethanol yield during continuous synthesis gas fermentation by engineered biocatalyst *Clostridium* sp. MTEtOH550. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 167(2): 338–347.

(本文责编 陈宏宇)