

丙酮丁醇梭菌发酵糖蜜生产丁醇的发酵条件优化 Butanol Yield from Sugarcane Molasses by *Clostridium acetobutylicum* and Optimization of Its Fermentation Conditions

米慧芝, 杨登峰, 关妮, 苏海锋, 黄日波*

MI Hui-zhi, YANG Deng-feng, GUAN Ni, SU Hai-feng, HUANG Ri-bo

(广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Academy of Sciences, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 运用单因素试验结合正交设计法优化丙酮丁醇梭菌发酵甘蔗糖蜜生产丁醇的发酵条件, 并进行验证试验。得到发酵条件的最优组合为 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的添加量为 0.3%, H_2NCONH_2 的添加量为 0.1%, Na_2HPO_4 的添加量为 0.5%, KH_2PO_4 的添加量为 0.5%, L-半胱氨酸盐酸盐-水物的添加量为 0.025%, 蛋白胨的添加量为 0.9%, NaH_2PO_4 的添加量为 0.1%, 优化后发酵的丁醇产量为 11.0536g/L, 比原始菌株提高了 23.58%。这对糖蜜多途径综合利用有一定的推动作用。

关键词: 丙酮丁醇梭菌 甘蔗糖蜜 丁醇 正交试验

中图分类号: TQ920.6 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2011)03-0278-05

Abstract: Using single-factor experiments combined with orthogonal design optimization the fermentation conditions, which the clostridium acetobutylicum ferment sugarcane molasses to produce butanol and verification test. The obtained optimal combination of nutrients is 0.3% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.1% H_2NCONH_2 , 0.5% Na_2HPO_4 , 0.5% KH_2PO_4 , 0.025% L-cysteine hydrochloride monohydrate, 0.9% tryptone, and 0.1% NaH_2PO_4 . The results show that the butanol yield in this optimized fermentation reaches 11.0536g/L, which increased about 23.58% compared to that obtained from the original strain. This method has the potential to improve the multi-channel utilization of sugarcane molasses.

Key words: *Clostridium acetobutylicum*, sugarcane molasses, butanol, orthogonal test

与乙醇相比, 丁醇具有如下优点: 性质更接近烃类, 与汽油调和的配伍性好; 能量密度与燃烧值高, 且具有较低的蒸汽压; 可经石油管道输送, 可在炼油厂混合; 腐蚀性小、水溶性低等。因此生物丁醇发酵已成为仅次于燃料乙醇发酵的第二大可再生能源开发研究的热点^[1, 2] 为原料生产。目前丁醇主要以淀粉质原料如玉米、小麦、黍米等生产, 原料成本高的问题十分突出^[3]。此外, 与燃料乙醇一样, 以粮食类淀粉

质原料大规模生产丁醇作为燃料, 也会引发影响粮食安全的社会问题。开发廉价的、非粮生物质原料, 是研发丁醇作为生物燃料的必然出路。

甘蔗糖蜜是以甘蔗为原料制糖的一种副产品。我国南方各省, 如广西、广东、福建、四川和台湾等均盛产甘蔗, 是我国主要的甘蔗糖厂产区。而在大量生产甘蔗糖的同时, 也产生大量的甘蔗糖蜜, 其产量约为原料甘蔗的 2.5%~3%。广西是全国最大的糖蜜生产地区, 每年有 300 万吨的标准糖蜜^[4]。基于广西糖蜜资源丰富的有利条件, 生产生物丁醇, 不仅可以缓解粮食安全问题, 对糖蜜事业发展也有一定的促进作用。本文研究丙酮丁醇梭菌发酵糖蜜生产丁醇的发酵条件, 以期利用糖蜜发酵丁醇的产业化工作提

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 米慧芝(1983-), 女, 实习研究员, 主要从事微生物技术方面的研究。

*通讯作者。

供一定的借鉴。

1 材料和方法

1.1 菌种

丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*), 本实验室选育, 于广西某糖厂附近的土壤中筛选出, 适用于甘蔗糖蜜丁醇发酵。保存于有梭菌培养基菌种冻存管中。

1.2 培养基

梭菌培养基: 酵母粉 1%, 蛋白胨 1%, 葡萄糖 0.5%, L-半胱氨酸盐酸盐-水物 0.05%, 盐溶液 4% (V/V), pH 值自然。

盐溶液: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.025%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, NaHCO_3 1%, NaCl 0.2%。

发酵培养基: 甘蔗糖蜜 (波美度 11), CaCO_3 0.5%, 自然 pH 值, 其发酵体积为 25ml。

1.3 试验试剂

1%丙醇溶液;

氮源营养盐: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,

H_2NCONH_2 、 NH_4Cl 、 $\text{NH}_4\text{CH}_2\text{COO}$ 、 NH_4NO_3 ;

磷源营养盐: KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$;

其他: 蛋白胨、酵母膏、 NaCl 、 NaHCO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、邻氨基苯甲酸、生物素、L-半胱氨酸盐酸盐-水物、硫胺。

1.4 实验方法

挑取梭菌单菌落于装梭菌培养液的厌氧瓶中, 厌氧, 37°C 静置培养。待上述培养物生长到对数中期, 取少量于显微镜下镜检, 无染菌则作为种子液; 将已检查好的种子液接入发酵培养基中, 接种量为 5%, 置于 37°C 恒温培养箱中静置培养, 至发酵结束后取样; 将取样后的样品于 $12000\text{r}/\text{min}$ 条件下离心 5min, 取上清与 1%丙醇溶液以 1:1 的比例混匀, 混匀后于高效气相色谱仪中检测其中的丁醇含量 (各试验进行 3 次重复, 取平均数值进行比较)。

1.4.1 单因素试验方法

对不同的糖蜜锤度、接种量以及用处于不同生长期的菌种作为种子液来进行试验, 看上述因素对糖蜜丁醇发酵有何影响。

在发酵培养基中添加 1.3 所述不同种类的氮源营养盐 (添加乙酸盐有助于溶剂生产^[5])、磷源营养盐与微量元素 (已有研究工作表明生物素和氨基苯甲酸是 *C. acetobutylicum* 菌体生长和溶剂生产必需的维生素^[6])。添加比例 (见表 1) 各不相同, 测定其丁醇

的产量, 看其产量是否有所提高。

表 1 各种营养盐添加的比例

Table 1 Proportion of nutrients

营养盐种类 Types of nutrients	添加比例 Adding proportion(%)			
	1	2	3	4
蛋白胨 Tryptone	0.6	0.9	1.2	1.5
酵母膏 Yeast extract	0.05	0.1	0.15	0.2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.05	0.1	0.15	0.2
H_2NCONH_2	0.05	0.1	0.15	0.2
NH_4Cl	0.05	0.1	0.15	0.2
$\text{NH}_4\text{CH}_2\text{COO}$	0.05	0.1	0.15	0.2
NH_4NO_3	0.05	0.1	0.15	0.2
KH_2PO_4	0.25	0.5	0.75	1
K_2HPO_4	0.05	0.1	0.15	0.2
NaH_2PO_4	0.25	0.5	0.75	1
Na_2HPO_4	0.25	0.5	0.75	1
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0.25	0.5	0.75	1
NaCl	0.02	0.04	0.06	0.08
NaHCO_3	0.02	0.04	0.06	0.08
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.5	0.75	1
L-半胱氨酸盐酸盐-水物 L-Cysteine-HCl · H ₂ O	0.025	0.05	0.075	0.1
邻氨基苯甲酸 O-aminobenzoic acid	0.0005	0.001	0.0015	0.002
生物素 Biotin	0.0005	0.001	0.0015	0.002
硫胺 Thiamine	0.0005	0.001	0.0015	0.002

1.4.2 正交试验方法

在单因素试验的基础上, 选取对丁醇产量影响相对较大的试验因素做正交试验, 采用 $L_{18}(3^7)$ 正交表, 共 18 个处理, 每个处理 3 个重复, 测丁醇的生成量, 取平均数。

2 结果与分析

2.1 单因素试验结果

2.1.1 发酵中所使用的糖蜜锤度

发酵时使用的糖蜜是经过稀释后才使用的, 否则糖蜜浓度过高, 菌株无法生长。对不同锤度的糖蜜进行发酵, 保持其他因素一致, 看其丁醇产量有何不同, 其测定结果如图 1 所示。

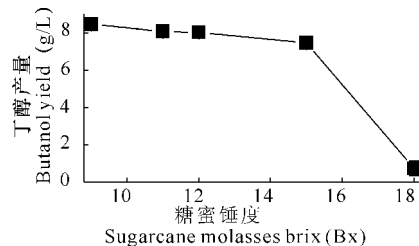


图 1 不同锤度的糖蜜对丙酮丁醇梭菌发酵糖蜜生产丁醇的影响

Fig. 1 Effects of different hammer degrees on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

从图1可见,随着糖蜜锤度的上升,丁醇的产量也越来越低,所以应该尽量选取低锤度的糖蜜来发酵;但糖蜜的锤度下降伴随着劳动成本的上升,因此本试验采用糖蜜的锤度为11Bx。

2.1.2 种子液的菌龄及发酵接种量的确定

使用处于对数生长期的不同阶段的丙酮丁醇梭菌来进行糖蜜发酵结果如图2所示。在对数生长期,随着菌体浓度的增加丁醇产量相应提高,因此试验选用处于 $OD_{540} = 1.4$ 左右生长期的丙酮丁醇梭菌作为种子液(不再增加菌体浓度,是考虑到菌体生长需要一定时间,会加大投入资本);而图3曲线说明随着接种量的加大,丁醇产量也逐渐增加,接种量加大到5%后丁醇产量增加得比较平缓,因此发酵接种量选用5%的接种量。

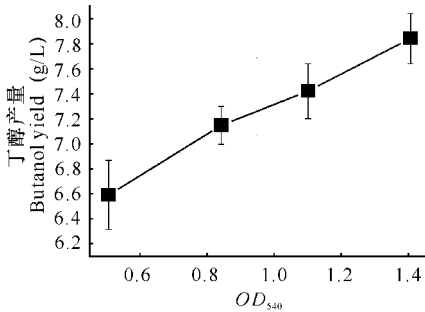


图2 不同生长期的丙酮丁醇梭菌对糖蜜丁醇发酵的影响

Fig. 2 Effects of different growing periods on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

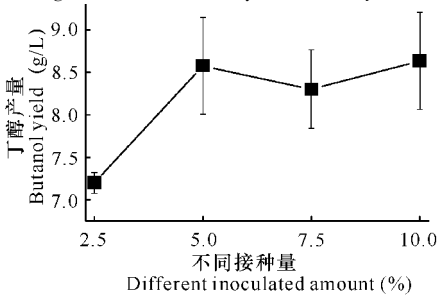


图3 不同接种量的丙酮丁醇梭菌对糖蜜丁醇发酵的影响

Fig. 3 Effects of different inoculation quantities on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

2.1.3 糖蜜中添加营养盐对试验的影响

使用11Bx的糖蜜,处于 $OD_{540} = 1.4$ 左右生长期的种子液以及5%的接种量,对添加营养盐的糖蜜的进行发酵,添加不同的氮源、磷源及其它营养盐。

图4~10的结果表明,添加不同营养盐对糖蜜丁醇发酵的产量都有所提高,需要特别深入讨论的是图7和图8,添加了 KH_2PO_4 、硫酸的糖蜜发酵丁醇的产量变化。添加了 KH_2PO_4 、硫酸的糖蜜发酵丁醇的产量比无添加成分的糖蜜发酵丁醇的产量要低,说明 KH_2PO_4 与硫酸对糖蜜丁醇发酵有一定的抑制作用,可是随着 KH_2PO_4 、硫酸的添加量增加,其丁醇产量又有一定的提高,其作用机理为何如此,需进一步

研究。

根据提高比例的高低,最终选定 $(NH_4)_2HPO_4$ 、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、L-半胱氨酸盐酸盐-水物、 H_2NCONH_2 与蛋白胨为较高影响因素,作为正交试验的试验因素(添加 $(NH_4)_2HPO_4$ 的糖蜜丁醇产量比原始菌提高了32.67%,其他提高比例依次如下: NaH_2PO_4 , 30.43%; Na_2HPO_4 , 24.46%; KH_2PO_4 , 18.74%; L-半胱氨酸盐酸盐-水物, 12.75%; H_2NCONH_2 , 11.97%; 蛋白胨, 11.80%)。

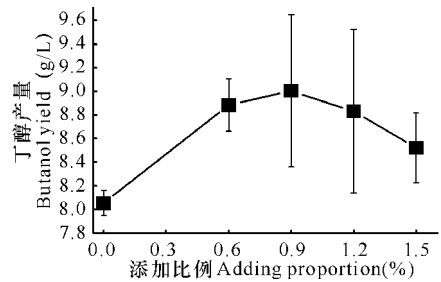


图4 蛋白胨对丙酮丁醇梭菌发酵甘蔗糖蜜生产丁醇的影响

Fig. 4 Effects of tryptone on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

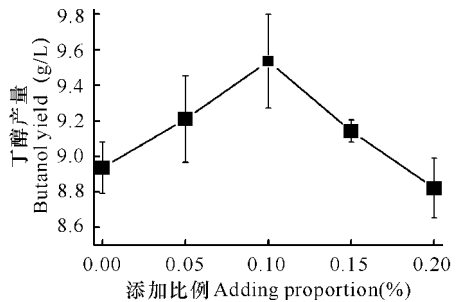


图5 酵母膏对丙酮丁醇梭菌发酵甘蔗糖蜜生产丁醇的影响

Fig. 5 Effects of yeast extract on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

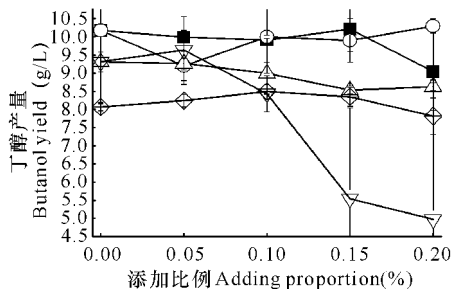


图6 氮源对丙酮丁醇梭菌发酵甘蔗糖蜜生产丁醇的影响

Fig. 6 Effects of nitrogen sources on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

■: $(NH_4)_2SO_4$; ○: H_2NCONH_2 ; △: CH_3COONH_4 ; ▽: NH_4Cl ; ◇: NH_4NO_3 .

Guangxi Sciences, Vol 18 No 3 August 2011

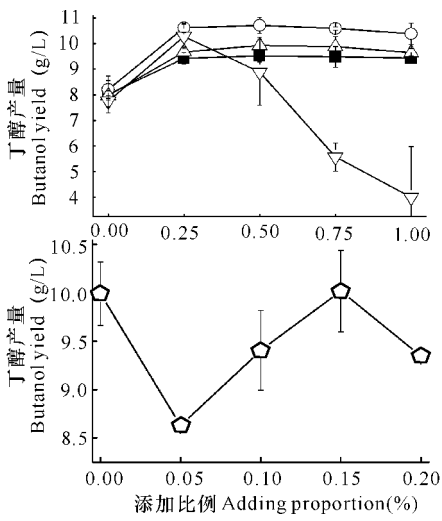


图7 磷源对丙酮丁醇梭菌发酵甘蔗糖蜜生产丁醇的影响
Fig. 7 Effects of phosphorus sources on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

■: KH_2PO_4 ; ○: NaH_2PO_4 ; △: Na_2HPO_4 ;
▽: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; ◇: K_2HPO_4 .

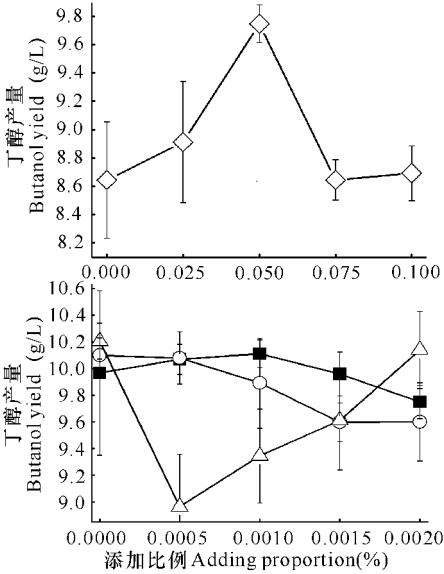


图8 维生素对丙酮丁醇梭菌发酵甘蔗糖蜜生产丁醇的影响
Fig. 8 Effects of vitamins on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

◇: L-cysteine-HCl · H₂O; ■: O-aminobenzoic acid;
○: biotin; △: Thiamin.

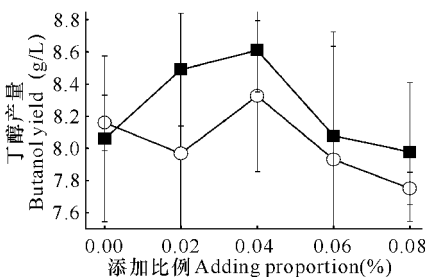


图9 钠盐对丙酮丁醇梭菌发酵甘蔗糖蜜生产丁醇的影响
Fig. 9 Effects of sodium salt on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

■: NaCl; ○: NaCO₃.

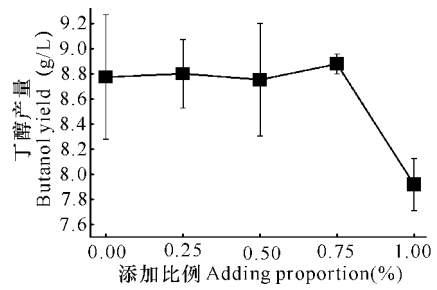


图10 镁盐对丙酮丁醇梭菌发酵甘蔗糖蜜生产丁醇的影响

Fig. 10 Effects of magnesium sulfate on butanol yield from sugarcane molasses by *C. acetobutylicum*

2.2 正交试验结果

上述单因素试验结果表明, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、L-半胱氨酸盐酸盐-水物、 H_2NCONH_2 与蛋白胨对丙酮丁醇梭菌发酵糖蜜丁醇影响较大。采用以上因素做正交试验,其因素水平见表2,试验结果见表3,方差分析见表4。

根据方差分析可知,正交试验各因素对试验的影响都极显著,而从直观分析表中可出: $R_F > R_A > R_D > R_C > R_G > R_B > R_E$,说明 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 对丁醇产量影响最大, NaH_2PO_4 对丁醇产量影响最小。得到最优组合为 $F_3 A_1 D_3 C_3 G_2 B_3 E_1$,即 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 的添加量为0.3%, H_2NCONH_2 的添加量为0.1%、 Na_2HPO_4 的添加量为0.5%, KH_2PO_4 的添加量为0.5%,L-半胱氨酸盐酸盐-水物的添加量为0.025%,蛋白胨的添加量为0.9%、 NaH_2PO_4 的添加量为0.1%。

表2 发酵条件优化正交试验因素水平*

Table 2 Levels and factors of orthogonal test on optimization fermentation conditions

水平 Levels	因素 Factors						
	A	B	C	D	E	F	G
1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.01
2	0.2	0.6	0.3	0.3	0.3	0.2	0.025
3	0.3	0.9	0.5	0.5	0.5	0.3	0.05

* A: H_2NCONH_2 (g/100ml); B: Tryptone (g/100ml); C: KH_2PO_4 (g/100ml); D: NaH_2PO_4 (g/100ml); E: Na_2HPO_4 (g/100ml); F: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (g/100ml); G: L-Cysteine-HCl · H₂O (g/100ml).

2.3 验证试验结果

由于所得的最优工艺参数组合不在正交试验设计的18组内,因此需要进行验证试验。在正交试验最优组合工艺参数条件下,进行平行验证试验。在此条件下,最终丁醇的产量可达到11.0536g/L,比原始菌株提高了23.58%。

表 3 发酵条件优化正交试验结果与分析

Table 3 Results and analysis of orthogonal test on optimization of fermentation conditions

因素水平、 试验号 Factors levels test number	A (H ₂ NCONH ₂)	B 蛋白胨 (Typtone)	C (KH ₂ PO ₄)	D (Na ₂ HPO ₄)	E (NaH ₂ PO ₄)	F (NH ₄) ₂ HPO ₄)	G L-半胱氨酸盐酸盐-水物 (L-Cysteine-HCl·H ₂ O)	平均丁醇产量 Average yield of butanol(g/L)
1	1	1	1	1	1	1	1	9.509
2	1	2	2	2	2	2	2	9.98
3	1	3	3	3	3	3	3	10.2725
4	2	1	1	2	2	3	3	9.4825
5	2	2	2	3	3	1	1	9.6875
6	2	3	3	1	1	2	2	9.902
7	3	1	2	1	3	2	3	9.616
8	3	2	3	2	1	3	1	10.161
9	3	3	1	3	2	1	2	9.783
10	1	1	3	3	2	2	1	10.3015
11	1	2	1	1	3	3	2	10.0685
12	1	3	2	2	1	1	3	9.7435
13	2	1	2	3	1	3	2	9.9615
14	2	2	3	1	2	1	3	9.3343
15	2	3	1	2	3	2	1	9.614
16	3	1	3	2	3	1	2	10.0275
17	3	2	1	3	1	2	3	10.058
18	3	3	2	1	2	3	1	10.1325
K ₁	9.979	9.816	9.753	9.760	9.889	9.681	9.901	
K ₂	9.664	9.882	9.854	9.835	9.836	9.912	9.954	
K ₃	9.963	9.908	10.000	10.011	9.881	10.013	9.751	
R	0.315	0.092	0.247	0.251	0.053	0.332	0.203	

表 4 正交试验方差分析

Table 4 Variance analysis of orthogonal test

方差来源 Sources of variation	平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	F 值 F value	显著性 Significance
A	0.379	2	2.071	极显著 Highly significant
B	0.027	2	0.148	极显著 Highly significant
C	0.186	2	1.016	极显著 Highly significant
D	0.198	2	1.082	极显著 Highly significant
E	0.010	2	0.055	极显著 Highly significant
F	0.348	2	1.902	极显著 Highly significant
G	0.133	2	0.727	极显著 Highly significant
误差 Error	1.28	14		

3 结束语

本试验采用单因素和正交试验设计对目的菌株的发酵条件进行优化研究, 得出影响甘蔗糖蜜发酵丁醇的主次因素 (NH₄)₂HPO₄ > H₂NCONH₂ >

Na₂HPO₄ > KH₂PO₄ > L-半胱氨酸盐酸盐-水物 > 蛋白胨 > NaH₂PO₄, 即 (NH₄)₂HPO₄ 的添加量为 0.3%, H₂NCONH₂ 的添加量为 0.1%, Na₂HPO₄ 的添加量为 0.5%, KH₂PO₄ 的添加量为 0.5%, L-半胱氨酸盐酸盐-水物的添加量为 0.025%, 蛋白胨的添加量为 0.9%, NaH₂PO₄ 的添加量为 0.1%, 优化后发酵的丁醇产量为 11.0536g/L, 比原始菌株提高了 23.58%。

利用糖蜜发酵生产丁醇比采用玉米、小麦等淀粉质原料生产具有节约粮食, 易实现生产的连续化、管道化, 成本低等优点, 并可在糖蜜发酵生产酒精工艺的基础上进行, 只需改换发酵菌种和有相应的工艺条件即可。这样, 选育出适合糖蜜发酵生产丁醇的高效菌种和寻求最佳工艺条件就成为了需要。本试验采用的菌株适用于甘蔗糖蜜发酵, 采用的发酵工艺使得最终丁醇的产量可达到 11g/L, 相对其他同类研究来说有一定提高, 但寻求更高的丁醇产量是试验的宗旨, 下一步考虑对该试验菌株进行分子方面的改造以及使用其他设计方案(比如响应面设计等)对甘蔗糖蜜发酵进行更进一步研究。另外, 因为糖蜜含有成份相对比较复杂, 容易发生污染杂菌等问题有待于深入研究^[7]。

(下转第 288 页 Continue on page 288)

物 97 种, 隶属 40 科 75 属, 其中乔木层 35 种, 隶属 23 科 30 属; 灌木层 85 种, 隶属 36 科 65 属; 草本层 9 种, 隶属 7 科 9 属; 层间植物不发达, 仅 2 科 2 种。

(3) 经长期的人为干扰, 红鳞蒲桃季雨林已失去了原来多层次结构的特征, 无分层或分为 2 层, 优势种明显, 红鳞蒲桃占绝对优势。

(4) 从群落的垂直结构和径级结构分析, 红鳞蒲桃群落以低高度级和小胸径级的个体数占优势, 但是红鳞蒲桃基本分布在高高度级和大胸径级里, 无小径级的后续个体补充, 随着演替的发展, 它将逐渐从群落中衰退, 被其他优势种取代。

(5) 因红鳞蒲桃群落为村边片林, 受人畜的影响大, 物种多样性指数低, 群落不稳定。

(6) 红鳞蒲桃种群幼苗幼树仅生存 0.5~2 年就被破坏致死或采割作薪, 一般林下没有幼苗、幼树, 加之人为决定树木去留, 形成以中树和大树占优势的年龄结构, 种群结构类型为单峰型, 其天然更新受阻, 种群发展趋势属于衰退类型。

(7) 广西滨海的红鳞蒲桃季雨林已处于濒危状态, 建议马上保护、恢复或重建, 大力发展为本地防护林树种和城市绿化树种, 充分发挥其优良的生态学特性。

参考文献:

[1] 王献溥, 李俊清, 李信贤. 广西酸性土地区季节性雨林的分类研究[J]. 植物研究, 2001, 21(3): 481-503.

[2] 顾克潇, 赖家业, 汪洋. 红鳞蒲桃开花物候特性研究[J]. 广西农业科学, 2009, 40(5): 552-555.

[3] 夏江林, 袁仁庚, 胡七乔. 园林树种红鳞蒲桃的培育[J]. 林业实用技术, 2005(3): 40.

[4] 招礼军, 李森, 谢伟东. 2 种培养基质红鳞蒲桃苗木的光

合生理日变化初探[J]. 中国农学通报, 2010, 26(2): 141-144.

[5] 苏小青, 陈世品, 董建宁. 福建主要树种的分布与气候条件关系的研究[J]. 福建林学院学报, 2001, 21(4): 371-375.

[6] 李蕾鲜. 广西海岸带的红鳞蒲桃现状、问题和建议[J]. 大众科技, 2008(9): 162-163.

[7] 苏志, 余纬东, 黄理, 等. 北部湾海岸带的地理环境及其对气候的影响[J]. 气象研究与应用, 2009, 30(3): 44-47.

[8] 孙儒泳, 李庆芬, 牛翠娟, 等. 基础生态学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.

[9] 马克平. 生物群落多样性的测度方法: Ia 多样性的测度方法(上)[J]. 生物多样性, 1994, 2(3): 162-168.

[10] 马克平, 刘玉明. 生物群落多样性的测度方法: Ia 多样性的测度方法(下)[J]. 生物多样性, 1994, 2(4): 231-239.

[11] 中国植被编辑委员会. 中国植被[M]. 北京: 科学出版社, 1980.

[12] 达良俊, 杨永川, 宋永昌. 浙江天童国家森林公园常绿阔叶林主要组成种的种群结构及更新类型[J]. 植物生态学报, 2004, 28(3): 376-384.

[13] 张志祥, 刘鹏, 刘春生, 等. 浙江九龙山南方铁杉 (*Tsuga tchekiangensis*) 群落结构及优势种群更新类型[J]. 生态学报, 2008, 28(9): 4547-4558.

[14] 梁士楚, 刘镜法, 梁铭忠. 北仑河口国家级自然保护区红树植物群落研究[J]. 广西师范大学学报, 2004, 22(2): 70-76.

[15] 彭少麟, 周厚诚, 陈天杏, 等. 广东森林群落的组成结构数量特征[J]. 植物生态学与地植物学学报, 1989, 13(1): 10-17.

[16] 金则新. 浙江天台山七子花种群结构与分布格局研究[J]. 生态学杂志, 1997, 16(4): 15-19.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 282 页 Continue from page 282)

参考文献:

[1] Blaschek H P. Butanol: A second generation[R]. Biofuel 2006.

[2] Schwarzw H, Gapes R. Butanol rediscovering a renewable fuel[J]. BioWorld Europe, 2006 (1): 16-19.

[3] Jones D T, Woods D R. Acetone-butanol fermentation revisited[J]. Microbiol Rev, 1986, 50: 484-524.

[4] 南宁(中国-东盟)商品交易所.《NCCE 甘蔗糖蜜交易操作手册》. <http://www.ncce.biz/up/do/>《NCCE 甘蔗糖蜜交易操作手册》.

[5] Chen C K, Blaschek H P. Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium*

beijerinckii BA101 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 170-173.

[6] Soni B K, Soucaille P, Goma G. Continuous acetone-butanol fermentation: influence of vitamins on the metabolic activity of *Clostridium acetobutylicum* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 27: 1-5.

[7] 马光庭, 韦珂, 李伏生. 糖蜜发酵生产丙酮丁醇菌种筛选及其发酵条件的选择[J]. 广西轻工业, 1999 (1): 24-26, 30.

(责任编辑: 尹 闯)