

# 果糖及葡萄糖混合物为底物的丙酮丁醇发酵

邓攀<sup>1</sup>, 陈丽杰<sup>1</sup>, 辛程勋<sup>2</sup>, 白凤武<sup>1</sup>

1 大连理工大学生命科学与技术学院, 大连 116024

2 大庆九环生物新能源有限公司, 大庆 163511

**摘要:** 旨在以果糖和葡萄糖混合物模拟能源作物菊芋块茎水解液发酵生产丁醇。在培养基初始 pH 5.5, 发酵过程不控制 pH 的混合糖发酵中, 出现了发酵提前终止现象, 终点残糖浓度达 23.26 g/L, 而丁醇产量仅 5.51 g/L。进一步对比混合糖及葡萄糖、果糖不控制 pH 的发酵结果表明, 导致这一现象的原因可能是有机酸毒性太大和 pH 太低。全程控制 pH 的混合糖发酵结果表明, 高 pH 条件有利于提高糖利用率, 但产酸多, 丁醇产量较低; 而低 pH 条件下发酵残糖较多, 但丁醇产量相对较高。基于此, 文中采用阶段性 pH 调控策略, 即将发酵初期的 pH 控制在 5.5, 待菌体  $OD_{620}$  上升到 1.0 后, 解除 pH 控制, 发酵终点残糖浓度下降到 2.05 g/L, 丁醇产量也相应提高到 10.48 g/L。

**关键词:** 丙酮丁醇发酵, 混合糖, pH 调控

## Acetone-butanol fermentation from the mixture of fructose and glucose

Pan Deng<sup>1</sup>, Lijie Chen<sup>1</sup>, Chengxun Xin<sup>2</sup>, and Fengwu Bai<sup>1</sup>

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, 116024, China

2 Daqing Nine Ring Bio New Energy Co., Ltd., Daqing 163511, China

**Abstract:** A mixture of fructose and glucose was developed to simulate the hydrolysate of Jerusalem artichoke tubers, the fructose-based feedstock suitable for butanol production. With the initial pH of 5.5 without regulation during mixed-sugar fermentation, as high as 23.26 g/L sugars were remained unconverted, and butanol production of 5.51 g/L were obtained. Compared with either glucose or fructose fermentation, the early termination of mixed-sugar fermentation might be caused by toxic organic acids and the low pH. When the pH of the fermentation system was controlled at higher levels, it was found that sugars utilization was facilitated, but less butanol was produced due to the over-accumulation of organic acids. On the other hand, when the pH was controlled at lower levels, more sugars were remained unconverted, although butanol production was improved. Based on these experimental results, a stage-wise pH regulation strategy, e.g., controlling the pH of the fermentation system at 5.5 until the  $OD_{620}$  reached 1.0, and then the pH control was removed, was developed, which significantly improved the fermentation performance of the system, with only 2.05 g/L sugars unconverted and 10.48 g/L butanol produced.

**Keywords:** acetone-butanol fermentation, mixed sugars, pH regulation

Received: April 1, 2011; Accepted: June 8, 2011

Corresponding author: Lijie Chen. Tel/Fax: +86-411-84706308; E-mail: ljchen@dlut.edu.cn

丁醇是重要的大宗化工原料, 被广泛地用于丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸酯、瓷釉和涂料等化工产品的生产过程。除此之外, 作为替代能源, 丁醇还有着乙醇所不具备的独特优势<sup>[1]</sup>, 如较高的能量密度、较低的挥发性以及弱腐蚀性等。因此, 丁醇又被认为是极具前景的新一代生物燃料。目前生物丁醇主要以淀粉质和糖质为原料发酵生产, 原料成本高的问题十分突出。Jones 和 Woods<sup>[2]</sup>指出以淀粉质或糖蜜为原料的传统丙酮丁醇发酵, 其原料成本占到了丁醇生产总成本的 60%。此外, 以粮食类淀粉质原料生产丁醇还会影响到我国的粮食安全, 不适合我国国情。因此, 长期以来生物丁醇的主要研究目标之一就是寻找廉价替代原料, 以降低原料成本。

菊芋是一种相对廉价的非粮物料, 能够在不适宜于粮食和经济作物生长的盐碱地、滩涂地等边际土地上种植, 生物量产量高<sup>[3]</sup>。菊芋中的糖类主要以菊糖形式存在。菊糖是由 D-果糖经 $\beta$ -2, 1 糖苷键连接的聚合度不高的果聚糖, 末端为一个葡萄糖残基<sup>[4]</sup>。菊芋水解液为葡萄糖和果糖的混合糖体系。微生物在利用混合碳源时, 普遍存在着碳源代谢阻遏效应 (Carbon Catabolite Repression, CCR)。Ounine 等<sup>[5]</sup>在丙酮丁醇梭状芽胞杆菌 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 的葡萄糖和木糖的混合底物发酵中发现, 菌体优先利用葡萄糖, 当葡萄糖耗尽后, 才开始利用木糖。本课题组研究发现, 丙酮丁醇梭菌在葡萄糖和果糖混合体系发酵中也存在着碳源代谢阻遏效应。在不控制 pH 的混合糖发酵中, 菌体优先快速利用葡萄糖, 而果糖利用相对滞后, 并且在发酵终点处出现了残余糖浓度极高的现象。本文研究分析了导致混合糖发酵残余糖过高的原因, 并尝试采用 pH 调控策略解决残余糖问题, 从而为菊芋物料的转化利用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

本试验室驯化保存的丙酮丁醇梭状芽胞杆菌

*Clostridium acetobutylicum* L7。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 培养基组成

种子活化培养基<sup>[6]</sup>(g/L): 葡萄糖 20, 胰蛋白胨 30, 酵母粉 10, 自然 pH 值。

葡萄糖/果糖发酵培养基 (g/L): 葡萄糖/果糖 55, 乙酸铵 2.76,  $K_2HPO_4$  0.5,  $KH_2PO_4$  0.5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.01,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01, 对氨基苯甲酸 0.01, 生物素 0.01, 酵母粉 2, 初始 pH 5.5。

混合糖发酵培养基 (g/L): 果糖 44, 葡萄糖 11 (参照菊芋水解液中果糖与葡萄糖比例 1:4), 其余成分与葡萄糖/果糖发酵培养基相同。

#### 1.2.2 培养方法

菌种活化培养: 将 1 mL 冷冻保藏的菌种接种于 20 mL 种子活化培养基中, 37 °C 厌氧培养 20 h。

摇瓶扩大培养: 将充分活化的菌种以体积比 10% 的接种量接种于 100 mL 发酵培养基中, 充无菌氮气 10 min, 37.5 °C 厌氧培养 17 h。

发酵罐培养: 预先向装有灭菌后培养基的发酵罐中通无菌氮气 30 min, 以排除发酵体系中氧气, 将经摇瓶扩大培养后菌种接入发酵罐中, 设定转速 150 r/min, 温度 37.5 °C。

#### 1.2.3 分析方法

菌体浓度测定方法: 在 620 nm 处测定菌体吸光度 ( $OD_{620}$ )。总还原糖浓度测定采用 DNS 法<sup>[7]</sup>。葡萄糖浓度使用 SBA-40C 生物传感分析仪 (山东省科学院生物研究所) 测定。果糖浓度为总还原糖浓度与葡萄糖浓度之差。发酵液中的丙酮、乙醇、丁醇浓度测定采用气相色谱方法, 色谱分离条件: 毛细管色谱柱 Agilent HP-INNOWAX (30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.50  $\mu$ m), 柱温: 100 °C, 进样口温度: 250 °C, FID 检测器温度: 300 °C,  $H_2$  流速: 40 mL/min, 空气流速: 400 mL/min, 载气  $N_2$  流速: 30 mL/min, 进样量: 0.2  $\mu$ L, 分流比: 50:1, 内标物: 异丁醇。乙酸和丁酸浓度使用 Waters1525 高效

液相色谱测定, 色谱分离条件: Aminex HPX-87H 有机酸分析柱 (300 mm×7.8 mm; Bio-Rad, Hercules), 流动相: 0.005 mol/L  $H_2SO_4$ , 流速: 0.5 mL/min, 进样量: 20  $\mu$ L, 柱温: 50  $^{\circ}C$ , 检测波长: 210 nm, 示差折光检测器温度 50  $^{\circ}C$ 。

#### 1.2.4 pH 调控策略

全程控制 pH 调控策略: 用 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  和 2 mol/L 的 NaOH, 将整个发酵过程中的 pH 都控制在一个固定值 (如 pH: 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5)。

两阶段 pH 调控策略: 将发酵初期 pH 控制在 6.0, 待菌体  $OD_{620}$  上升到 1.9, 再用 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  将发酵液 pH 下调到 4.5。

阶段性 pH 调控策略: 将发酵初期 pH 控制在—

个较高值 (如 pH 6.0 或 5.5), 待菌体  $OD_{620}$  上升到一定值 (如  $OD_{620}$  为 1.5 或 1.0) 后, 解除 pH 控制。

## 2 结果与分析

### 2.1 不控制 pH 的丙酮丁醇发酵

#### 2.1.1 以葡萄糖和果糖混合物为底物发酵生产丁醇

混合糖不控制 pH 发酵过程中出现了发酵提前终止现象。如图 1 所示, 葡萄糖在 16 h 时已经耗尽。此后的果糖代谢速率远不及葡萄糖, 菌体  $OD_{620}$  开始下降, 菌体逐渐衰亡。发酵过程中, 乙酸和丁酸浓度有短暂的回落, 但在葡萄糖耗尽后又重新开始累积, pH 值也在短暂回升后下降。至发酵结束时, 培养基中残余糖浓度达 23.26 g/L, 丁醇仅有 5.51 g/L。

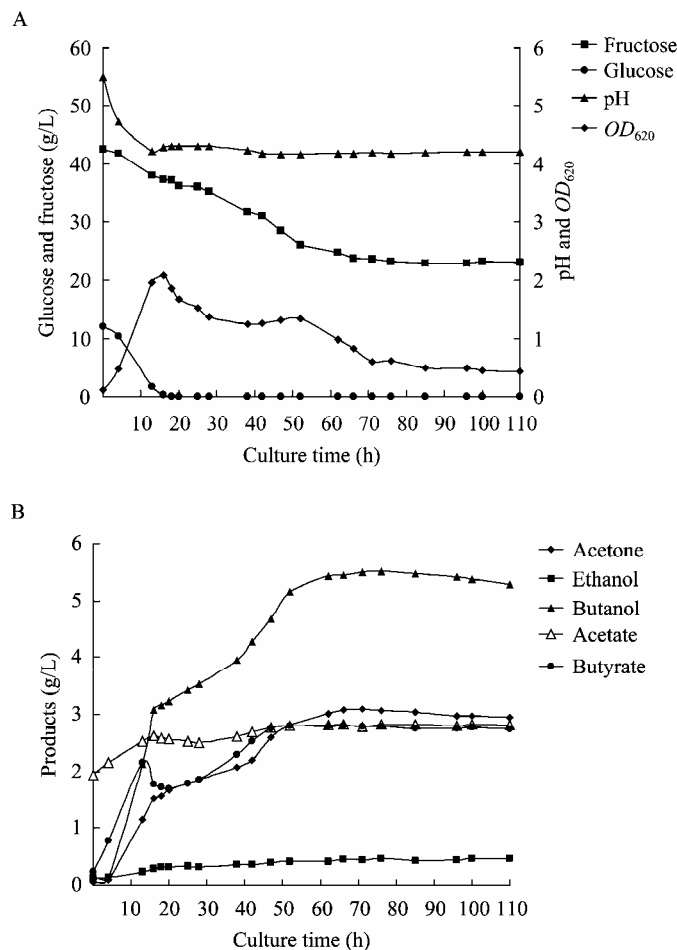


图 1 不控制 pH 条件下 *C. acetobutylicum* L7 的混合糖发酵

Fig. 1 Fermentation of the mixture of fructose and glucose by *C. acetobutylicum* L7 with initial pH of 5.5. (A)  $OD_{620}$ , pH, glucose and fructose concentration in the fermentation broth. (B) Application of fermentation products.

### 2.1.2 以葡萄糖或果糖为底物发酵生产丁醇

葡萄糖不控制 pH 发酵实验中没有出现发酵提前终止现象。如图 2 所示, 发酵在 42 h 时结束, 发酵终点处丁醇浓度为 9.60 g/L, 糖利用率达 96.71%。

果糖不控制 pH 的发酵过程中, 虽然也没有出现发酵提前终止现象, 但是在发酵中期有一段明显的

代谢缓慢过程, 我们称之为代谢调整期。如图 3 所示, 菌体  $OD_{620}$  从 52 h 开始持续回落, 在其后的约 50 h 内, 糖代谢速率极其缓慢, 有机溶剂合成速率放慢。从 96 h 开始, 菌体  $OD_{620}$  又重新开始增加, 糖代谢速率明显加快, 有机溶剂快速合成, 有机酸浓度逐渐降低。至 124 h 时, 丁醇浓度达 10.32 g/L, 残余糖仅为 1.88 g/L。

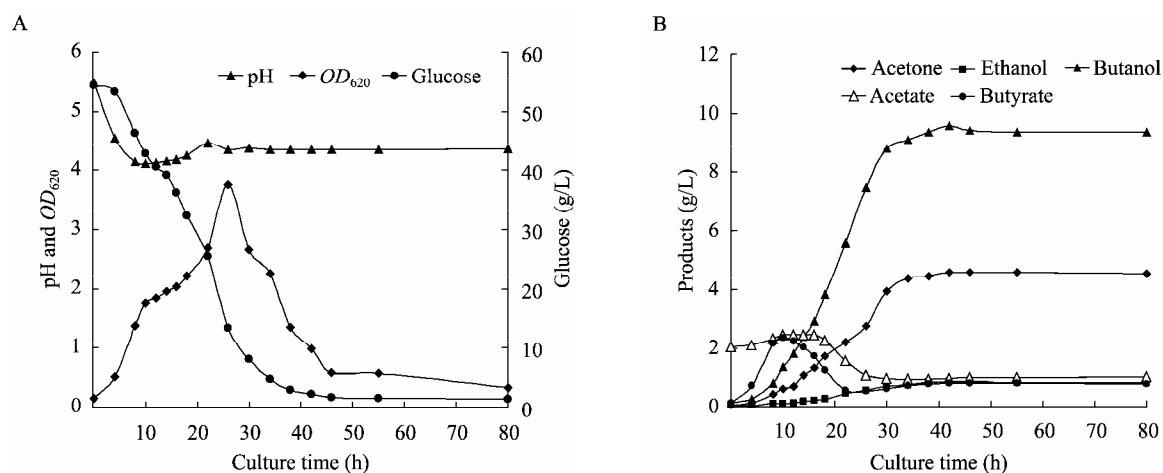


图 2 不控制 pH 条件下 *C. acetobutylicum* L7 的葡萄糖发酵

Fig. 2 Fermentation of glucose by *C. acetobutylicum* L7 with initial pH of 5.5. (A)  $OD_{620}$ , pH and glucose concentration in the fermentation broth. (B) Application of fermentation products.

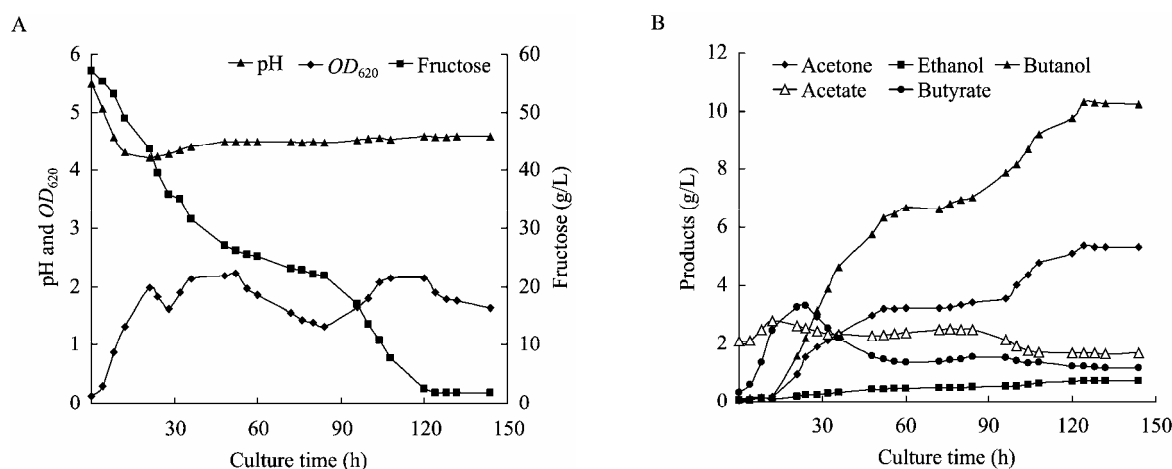


图 3 不控制 pH 条件下 *C. acetobutylicum* L7 的果糖发酵

Fig. 3 Fermentation of fructose by *C. acetobutylicum* L7 with initial pH of 5.5. (A)  $OD_{620}$ , pH and fructose concentration in the fermentation broth. (B) Application of fermentation products.

丁酸对菌体有解偶联作用<sup>[8-9]</sup>,其分子态形式能够透过细胞膜,影响菌体的 ATP 供应链,降低菌体内 ATP/ADP 比值。丙酮丁醇梭菌的胞内 pH 要高于其胞外 pH,并且菌体胞内外 $\Delta$ pH 的维持是需要 ATP 的,解偶联剂的存在会降低菌体维持胞内外 $\Delta$ pH 的能力<sup>[10-11]</sup>,导致菌体胞内 pH 下降。过强的有机酸毒性会引发“酸崩溃”现象<sup>[12]</sup>,使得发酵在残余糖浓度还极高的情况下提前终止。如图 4 所示,对比葡萄糖、果糖以及混合糖发酵过程中的分子态丁酸浓度后,我们发现葡萄糖及果糖发酵中的分子态丁酸浓度在丁酸毒性表现后都呈现快速下降趋势,并且在之后的发酵过程中一直都保持在相对较低水平;而混合糖发酵中分子态丁酸浓度虽也有短暂的下降过程,但其后又逐步回升到高浓度水平。除此之外,混合糖发酵中的 pH 在短暂的回升后又出现了持续下降的现象,pH 甚至降低到葡萄糖发酵后期都不曾达到的 4.17,这也就大大增加了菌体维持胞内外 $\Delta$ pH 的压力。

*Bacillus subtilis* 中的 CCR 调控是基于转录抑制蛋白的负调控机理,速效碳源的存在会抑制迟效碳源代谢相关基因的表达<sup>[13]</sup>。*C. acetobutylicum* ATCC 824 的碳源代谢阻遏效应调控机制与 *B. subtilis* 相似<sup>[14]</sup>。在混合糖发酵体系中,由于 CCR 效应的存在,菌体会优先利用葡萄糖,并在这一过程中积累大量有机酸,且发酵液 pH 急剧降低。酸毒性显现后,由于此时的葡萄糖还未耗尽,有机酸的重吸收得以实现,pH 也有短暂回升。而当葡萄糖彻底耗尽后,由于发酵前期葡萄糖的抑制作用导致的果糖代谢相关酶的不足,此时的菌体果糖代谢能力非常有限,菌体可能出现供能不足问题。为维持能量供给,菌体不得不重新开启曾因酸毒性而受到抑制的有机酸代谢通路,这使得分子态丁酸浓度再度升高,发酵液 pH 逐渐下降到极低值。在高强度的酸毒性条件下,菌体 ATP 供应量将逐步减少,菌体维持胞内外 $\Delta$ pH 的能力逐步减弱,加之此时的胞外 pH 已经下降到极低值,胞内 pH 将逐步下降,菌体由此走向衰亡。

## 2.2 全程控 pH 混合糖发酵生产丁醇

为缓解有机酸毒性,我们将混合糖发酵中 pH 分别控制在 pH 6.5、6.0、5.5、5.0、4.5。结果如表 1 所示。在 pH 为 6.5、6.0、5.5 的条件下,残余糖浓度虽明显降低,但发酵终点处的丁醇产量仍然极低,高 pH 条件在有利于菌体生长的同时,也有利于有机酸的生成,菌体在整个发酵过程中都未有明显的酸重吸收过程。而在全程控制 pH 5.0 及 4.5 的混合糖发酵过程中,与高 pH 发酵相比,虽然丁醇产量有所提升,但远未达到葡萄糖或果糖发酵时水平,且终点处残余糖浓度极高。

全程控制 pH 调控策略虽未能解决混合糖发酵中问题,但仍然给我们许多启示。如图 5 所示,随着发酵控制 pH 的逐渐降低,发酵终点处的丁醇产量将逐步提高。高 pH 有利于缩短发酵周期,降低残余糖浓度;低 pH 有利于提高丁醇产量。两者兼顾,也许能同时解决混合糖发酵过程中的残余糖浓度过高及丁醇产量过低问题。此外,发酵过程中的丁酸和乙酸的比值与发酵过程的 pH 相关。随着发酵液 pH 控制水平的升高,丁酸与乙酸的比例逐步增大。

## 2.3 pH 分段调控混合糖发酵生产丁醇

文献表明<sup>[15]</sup>,菌体的最佳生长 pH 和最佳产溶剂 pH 并不重合。Marchal 等<sup>[16]</sup>在研究中也强调了 pH 调控对于丙酮丁醇发酵的重要性。针对丙酮丁醇梭菌的这一特性,我们将通过 pH 分段调控手段调节菌体的代谢状况,在提高糖利用率的同时保证丁醇产量。

### 2.3.1 两阶段 pH 调控混合糖发酵生产丁醇

在两阶段 pH 调控实验中,我们将发酵初期 pH 控制在 6.0,以促进菌体的快速生长,缩短菌体对数生长时间,使菌体  $OD_{620}$  迅速达到 1.9。此后,为促进菌体进入产溶剂期,我们将发酵液 pH 下调到 4.5。结果如图 6 所示,发酵初期菌体在控 pH 6.0 条件下快速生长, $OD_{620}$  在 12 h 达到 1.9,比不控制 pH 发酵缩短了 2 h,而当把 pH 下调后,菌体逐步衰亡,

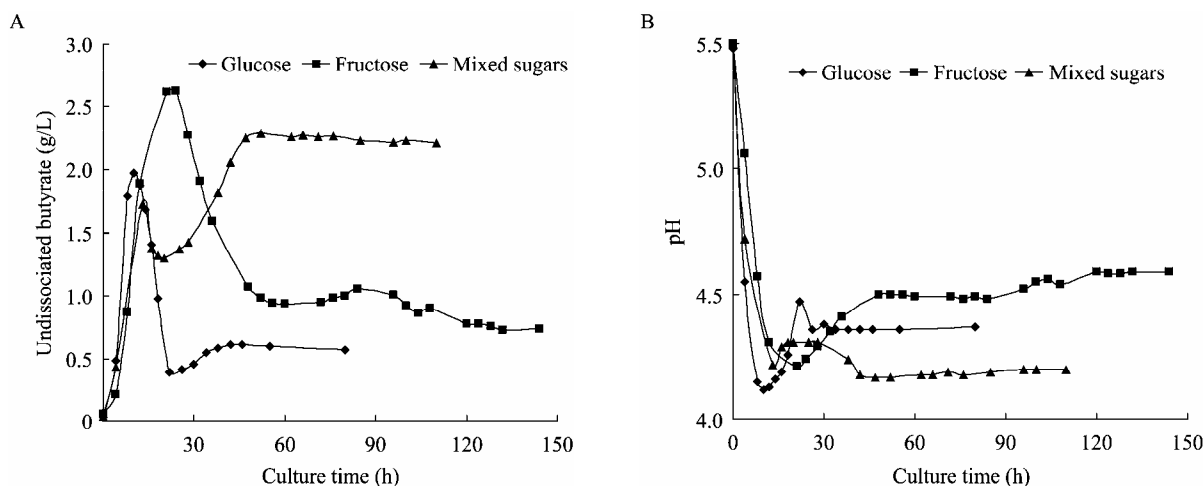


图 4 不控制 pH 条件下葡萄糖、果糖和混合糖发酵分子态丁酸浓度 (A) 及 pH (B) 变化

Fig. 4 Time-courses of undissociated butyrate (A) and pH (B) of the fermentations of glucose, fructose and the mixed-sugar by *C. acetobutylicum* L7 with initial pH of 5.5.

表 1 不同 pH 值条件下 *C. acetobutylicum* L7 混合糖发酵的实验结果

Table 1 Results of the mixed-sugar fermentation by *C. acetobutylicum* L7 under different pH conditions

pH	Culture time (h)	Residual sugars (g/L)	Butanol (g/L)	Acetone (g/L)	Ethanol (g/L)	Acetate (g/L)	Butyrate (g/L)
6.5	28	5.04	1.58	0.06	0.61	4.18	12.83
6.0	24	4.41	1.66	0.14	0.61	5.00	14.57
5.5	48	2.96	1.75	0.39	0.52	6.39	13.63
5.0	72	17.60	2.61	0.82	0.36	5.66	8.41
4.5	72	24.49	4.26	1.72	0.33	3.33	3.67

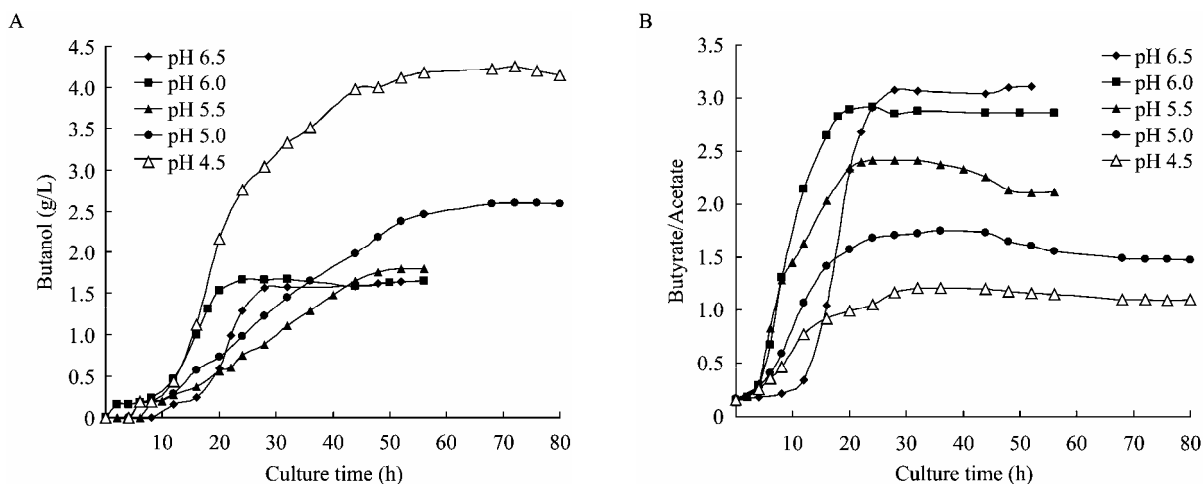


图 5 不同 pH 条件下 *C. acetobutylicum* L7 混合糖发酵过程丁醇产量 (A) 及丁酸/乙酸比例 (B)

Fig. 5 Butanol production (A) and butyrate/acetate (B) during the mixed-sugar fermentation by *C. acetobutylicum* L7 under different pH conditions.

糖利用率迅速降到零，有机溶剂及有机酸浓度也基本无变化，菌体代谢停止。实验表明，快速下调 pH 将使得菌体快速死亡，不利于发酵。

2.3.2 阶段性 pH 调控混合糖发酵生产丁醇

由于快速下调 pH 是不可行的,而让菌体长期处于高 pH 又是不利于产丁醇的。为此我们将尝试使用阶段性 pH 调控策略。

首先将初始发酵 pH 控制在 6.0，待菌体  $OD_{620}$  快速达到 1.5 左右后，解除 pH 控制。如表 2 所示，发酵在 145 h 结束,此次发酵最终得到 5.88 g/L 丁醇，残余糖浓度为 15.67 g/L。本次实验的残余糖浓度已经明显降低，丁醇产量也有所提高，但有机酸积累仍过多。

为进一步减少酸积累,我们将初始发酵 pH 控制

在 5.5，同样待菌体  $OD_{620}$  达到 1.5 左右后，解除控制。至 97 h 发酵结束时 (表 2),丁醇浓度达 8.89 g/L，残余糖浓度仅为 6.57 g/L,这说明我们的调控已经起到了明显的作用，但残余的糖和有机酸浓度仍相对较高，调控策略还需要进一步优化。

为进一步降低残余糖及提高丁醇产量，我们还将初期发酵 pH 控制在 5.5，待菌体  $OD_{620}$  值上升到 1.0 后，解除 pH 控制。结果如图 7 所示，发酵终点处丁醇浓度高达 10.48 g/L，而残余糖仅 2.05 g/L。我们的 pH 调控策略最终使得混合糖发酵中的糖利用率由 57.30% 上升到 96.55%，丁醇得率也由调控前的 0.10 提高到 0.18。在葡萄糖为底物的发酵中，丁醇得率为 0.18。经阶段性 pH 调控后，混合糖发酵的丁醇得率与葡萄糖发酵相当。

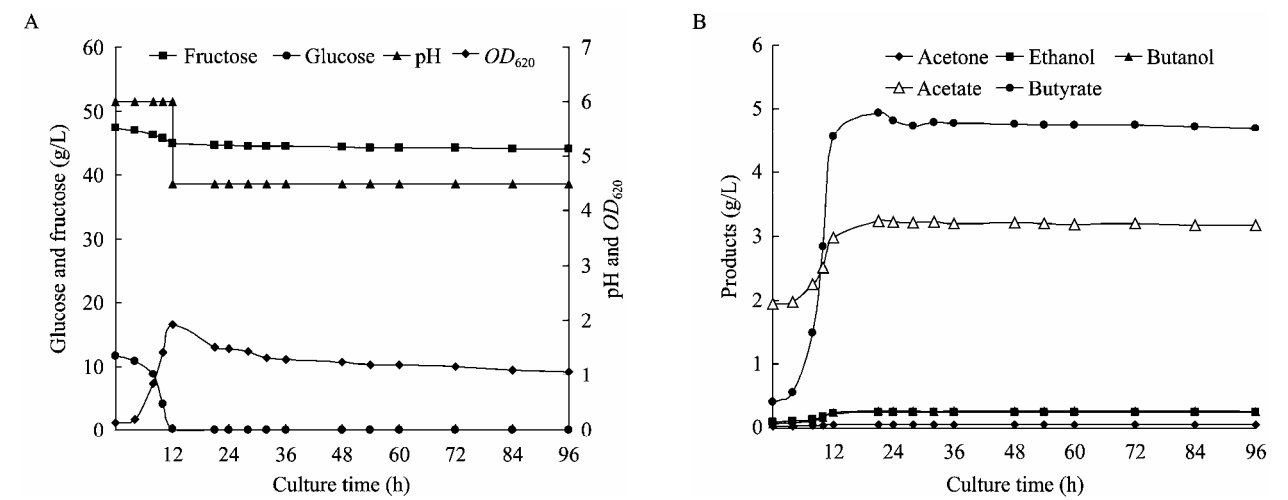


图 6 两阶段 pH 调控混合糖发酵生产丁醇  
Fig. 6 Butanol production from the mixed-sugars by *C. acetobutylicum* L7 with the two-step pH regulation. (A)  $OD_{620}$ , pH, glucose and fructose concentration in the fermentation broth. (B) Application of fermentation products.

表 2 阶段性 pH 调控混合糖发酵生产丁醇

Table 2 Mixed-sugar fermentation by *C. acetobutylicum* L7 with the stage-wise pH regulation

Condition	Culture time (h)	Residual sugars (g/L)	Butanol (g/L)	Acetone (g/L)	Ethanol (g/L)	Acetate (g/L)	Butyrate (g/L)
Control pH 6.0 until $OD_{620}$ 1.5	145	15.67	5.88	2.40	0.47	5.03	5.52
Control pH 5.5 until $OD_{620}$ 1.5	97	6.57	8.89	4.20	0.62	4.58	2.49
Control pH 5.5 until $OD_{620}$ 1.0	97	2.05	10.48	5.21	0.96	2.86	1.97

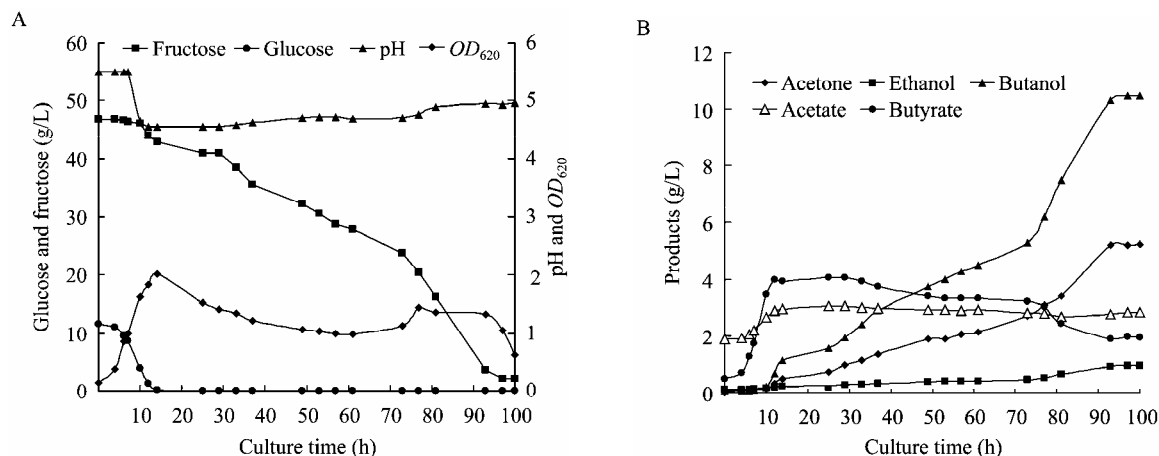


图 7 控制发酵 pH 5.5 至  $OD_{620}$  1.0 的混合糖发酵

Fig. 7 Mixed-sugar fermentation by *C. acetobutylicum* L7 with the pH controlled at 5.5 until the  $OD_{620}$  reached 1.0. (A)  $OD_{620}$ , pH, glucose and fructose concentration in the fermentation broth. (B) Application of fermentation products.

### 3 结论

对于混合糖不控制 pH 发酵过程中发酵提前终止现象可能的解释是: CCR 效应的存在使菌体优先利用葡萄糖, 而果糖代谢受到抑制; 当葡萄糖耗尽后, 可能是由于果糖代谢相关酶的不足, 菌体供能不足而不得不重新开启产酸通路, 分子态丁酸浓度再度升高, 胞外 pH 逐渐下降; 在酸性极强、胞外 pH 极低的条件下, 菌体 ATP 供给逐步减少, 胞内 pH 逐步降低, 由此菌体逐步衰亡, 发酵提前终止。全程控制 pH 的结果表明, 高 pH 有利于提高糖利用率, 但产酸极多, 丁醇产量相对较少; 而低 pH 有利于产丁醇, 但残余糖浓度较高。高 pH 下利于降糖, 低 pH 下利于产丁醇, 两者的结合正是阶段性 pH 调控策略的关键。阶段性 pH 调控策略的发酵初期 pH 控制, 使得整个混合糖发酵过程中的 pH 都保持在一个相对较高的水平, 这有利于增强菌体在糖类代谢转变过程中维持胞内 pH 的能力; 其后的 pH 控制解除, 又使得有机酸毒性得以表达, 确保菌体能够实现由产酸向产溶剂的转变, 从而保证了丁醇产量。阶段性 pH 调控策略成功地解决了混合糖发酵中的糖利用率及丁醇产量过低问题, 为菊芋物料的利用奠定了基础。

### REFERENCES

- [1] Durre P. Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol J*, 2007, 2: 1525–1534.
- [2] Jones DT, Woods DR. Acetone-butanol fermentation revisited. *Microbiol Rev*, 1986, 50: 484–524.
- [3] Long XH, Liu ZP, Wang L, et al. Effects of seawater irrigation on yield composition and ion distribution of different varieties of *Helianthus tuberosus* in coastal mudflat of semiarid region. *Acta Pedolog Sin*, 2007, 44: 300–306.  
隆小华, 刘兆普, 王琳, 等. 半干旱地区海涂海水灌溉对不同品系菊芋产量构成及离子分布的影响. *土壤学报*, 2007, 44: 300–306.
- [4] Ninness KR. Inulin and oligofructose: what are they? *J Nutr*, 1999, 129: 1402–1406.
- [5] Ounine K, Petitdemange H, Raval G, et al. Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 49: 874–878.
- [6] Annous BA, Blaschek HP. Regulation and localization of amylolytic enzymes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(8): 2559–2561.
- [7] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, 31: 426–428.
- [8] Herrero AA, Gomez RF, Snedecor B, et al. Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic



- acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, 22: 53–62.
- [9] Huesemann M, Papoutsakis ET. Effect of acetoacetate, butyrate, and uncoupling ionophores on growth and product formation of *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol Lett*, 1986, 8: 37–42.
- [10] Huang L, Gibbins LN, Forsberg CW. Transmembrane pH gradient and membrane potential in *Clostridium acetobutylicum* during growth under acetogenic and solventogenic conditions. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 50(4): 1043–1047.
- [11] Baronofsky JJ, Scherurs WJA, Kashket ER. Uncoupling by acetic acid limits growth of and acetogenesis by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 48(6): 1134–1139.
- [12] Maddox IS, 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.
- [13] Boris Görke, Jörg Stülke. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*, 2008, 6: 613–624.
- [14] Tangney M, Galinier A, Deutscher J. Analysis of the elements of catabolite repression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2003, 6: 6–11.
- [15] Nishio N, Biebl H, Meiners M. Effect of pH on the production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a minimum medium. *J Ferment Technol*, 1983, 61: 101–104.
- [16] Marchal R, Blanchet D, Vandecasteele JP. Industrial optimization of acetone-butanol fermentation: a study of the utilization of *Jerusalem artichokes*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1985, 23: 92–98.