

生物发酵产丁醇研究进展

华连滩 王义强* 彭牡丹 田宇 马国辉

(中南林业科技大学 生物技术实验室 湖南 长沙 410004)

摘要: 丁醇作为新一代生物燃料, 已成为世界研究的热点。利用可再生原料通过微生物发酵生产丁醇受到人们的普遍关注。目前通过发酵法产丁醇的成本较石化途径高。降低丁醇的生产成本, 可以从以下几个方面入手: 使用廉价的非粮食原料, 开发新的高产低能耗发酵工艺, 选育高产丁醇菌株。相信在不久的将来, 研究者们将研发出高经济竞争力和可持续发展的丁醇生产工艺。

关键词: 丁醇, 产丁醇菌, 木质纤维, 发酵

Butanol fermentation production

HUA Lian-Tan WANG Yi-Qiang* PENG Mu-Dang TIAN Yu MA Guo-Hui

(The Biotechnology Laboratory of Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

Abstract: Butanol, as a new generation of biofuels, has become the hot spot of the biofuel research in the world. Production of butanol from renewable feedstocks has been drawn attention to many countries. However, the cost of producing biobutanol remains significantly higher than the cost of petro-chemical derived butanol. In order to reduce costs in butanol production, the studies should be conducted as the following: using low-cost non-grain feedstocks, developing new processes with high butanol productivity and lower energy intensity breeding new strains with high butanol yield. In the near future, it is believed that the butanol production process of economic competitiveness and sustainability can be established.

Keywords: Butanol, Butanol-producing bacteria, Lignocellulose, Fermentation

在化工、塑料、有机合成、油漆等工业领域, 丙酮和丁醇作为重要的有机溶剂和化工原料得到了广泛的应用^[1-2]。乙醇发酵曾为第一大发酵过程, 而丙酮丁醇发酵仅次之^[3]。但从 20 世纪中叶起, 由于化石燃料工业喷发式的发展, 丙酮丁醇发酵工业受到强烈的冲击, 逐渐被化石燃料工业取代而导

致衰退。随着化石燃料的耗竭以及温室效应的日趋严重, 可再生能源成为人们关注的热点。丁醇为丙酮丁醇发酵的主要产物(质量分数 60%以上), 因其良好的燃料性能而使其发酵生产再一次受到高度重视。在环境污染、能源危机的今天, 生物发酵产丁醇毫无疑问具有诱人的潜力和前景。

基金项目: 国家林业局 948 项目(No. 2011-4-13)

*通讯作者: Tel: 86-731-85623077; 信箱: wangyiqiang12@163.com

收稿日期: 2013-01-11; 接受日期: 2013-04-02; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

1 丁醇的特性

作为生物燃料, 丁醇与乙醇相比有如下优点: 能量密度大, 燃烧值高, 蒸汽压较低; 与汽油配伍性好, 能以任意比例混合; 挥发性低, 可管道输送; 腐蚀性较小、水溶性低、污染轻等^[4]。因此, 生物发酵产丁醇现已成为仅次于生物发酵产乙醇的新一代可再生能源研究开发的热点与重点。

2 发酵产丁醇菌

2.1 主要产丁醇菌

丙酮丁醇发酵工业中的菌种主要是梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)。传统的丁醇发酵中使用的工业菌种繁多, 但其系统发育与分类一直模糊不清。近年来, 通过系统学^[5-6]、基因组DNA/DNA杂交和DNA指纹图谱^[5]以及发酵性能^[7]等方面的比较研究, 认为工业用的产溶剂梭菌归为4个“种”(Species), 分别是丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)、糖丁酸梭菌(*Clostridium Saccharobutylicum*)和糖乙酸多丁醇梭菌(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)。所有原来的淀粉发酵型菌株归属于单独一个种, 即丙酮丁醇梭菌。该类菌呈现较强的淀粉酶活性, 适用于玉米和谷类等淀粉质原料的发酵, 同时具有独特的系统发育特性, 与其他3个种(拜氏梭菌、糖丁酸梭菌和糖乙酸多丁醇梭菌)的亲缘关系较远^[8]。已被鉴定的糖质发酵菌株大多数属于拜氏梭菌。*Clostridium beijerinckii* BA101具有较高的淀粉糖化能力, 以葡萄糖或淀粉为原料发酵, 丙酮、丁醇和乙醇总溶剂(Acetone-Butanol-Ethanol, ABE)的质量浓度达到18–33 g/L, 同时该菌株具有较强的丁醇耐受能力(耐受丁醇19 g/L)^[9-10]。*C. beijerinckii* P260可以直接利用小麦秸秆水解液进行丁醇发酵, 发酵产量与纯糖相接近^[11-12]。江南大学以*Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864为发酵菌种进行了发酵产丁醇研究^[13], 总溶剂最高产量13.69 g/L (丁醇为8.36 g/L)。美国俄亥俄州立大学报道*Clostridium acetobutylicum* JB200产丁醇

能力可以达到20 g/L^[14]。常见的产丁醇菌还有*Clostridium acetobutylicum* 824、*Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052、*Clostridium beijerinckii* ATCC 55025、*Clostridium beijerinckii* ATCC BAA-117等。这些菌种所产溶剂中3种组分(丁醇:丙酮:乙醇)的体积比均为6:3:1。提高丁醇在总溶剂中的比率, 也是提高丁醇产量的方法之一, 最近, 从自然环境分离获得丁醇发酵比率较高的新菌株gxzp-13-2^[15], 其发酵产物中, 丁醇比率达72.1%。中国科学院上海植物生理生态研究所通过土样分离和诱变筛选获得一株高丁醇比例菌株EA2018, 其发酵溶剂中3种组分(丁醇、丙酮、乙醇)的体积比为7:2:1, 且淀粉转化率比传统菌种要高5%^[16]。通过阻断该菌株丙酮合成途径, 将溶剂中丁醇的比率提高到80.05%^[17]。2011年美国杜兰大学科学家筛选出菌株TU-103, 是迄今为止首个被发现能直接用纤维素制造丁醇的细菌菌株, 并且是唯一已知的能在有氧环境下制造丁醇的梭菌菌株。从自然界筛选新菌种、菌种诱变育种是提高丁醇产量的重要方法, 进一步选育出高淀粉或纤维素利用率、高丁醇耐受性的菌株是今后育种的重要方向。

2.2 产丁醇工程菌的构建

近年来, 产丁醇工程菌构建研究主要表现在两个方面: (1) 利用基因高效表达和基因敲除技术改造丙酮丁醇菌; (2) 产丁醇大肠杆菌工程菌的构建。

在丙酮丁醇工程菌构建中, 与孢子形成、溶剂耐受性和胁迫抗性等影响溶剂产量的相关基因成为研究热点。一些基因被克隆并在产丁醇菌种中高效表达^[18], 如编码CoA转移酶的基因*ctfA*和*ctfB*。也有通过基因敲除方法将编码丁酸激酶的基因*buk*、溶剂抑制基因*solR*等敲除, 阻断丁酸、乙酸代谢支路或解除丙酮、丁醇的阻遏效应。工程菌*SoIRH*^[19](在*SoIR*缺失型丙酮丁醇梭菌*SoIRH*中克隆表达*aad*基因)产总溶剂可达28 g/L, 较大地提高了ABE的浓度; 工程菌*SoIRB*^[20](通过同源重组沉默丙酮丁醇梭菌溶剂抑制基因*SoIR*)发酵后得到的

总溶剂达26.9 g/L,说明解除抑制基因的作用能够明显提高ABE产量。提高溶剂中丁醇/丙酮比率,促使菌株发酵产物更多趋向于丁醇也是菌株改造的方向,如基因工程菌株pAADBI^[21](用asRNA技术抑制*ctfB*基因同时,构建含*add*基因的pAADBI质粒并转入丙酮丁醇菌种高效表达),发酵后得丁醇/丙酮比率达4.89,比对照1.83有较大提高。阻断菌株EA2018的丙酮合成途径,其丁醇的比率提高到80.05%^[17],较大地提高了丁醇的产量。通过基因工程技术修饰或者改造丙酮丁醇菌的一些代谢途径,提高丁醇/丙酮比率,解除产物阻遏效应,是改造丙酮丁醇菌的重要研究方向。

同时,人们开始利用基因工程技术改造大肠杆菌代谢途径,构建能够产丙酮丁醇的大肠杆菌工程菌。Atsumi、Inui等^[22-23]分别克隆了丙酮丁醇梭菌中合成丁醇途径的关键基因*thl*、*hbd*、*crt*、*bcd-ctfB-ctfA*、*adhE*,并在大肠杆菌中成功表达,发酵后分别产丁醇1.03和1.18 g/L。以菌株ATCC 824基因组为模板分别扩增丁醇合成途径关键酶基因*thil*、*adhE2*和BCS operon (*crt-bcd-ctfB-ctfA-hbd*)基因序列,构建BCS operon-*adhE2-thil*/pTrc99a/MG1655^[24](pBAT),重组菌*E. coli* pBAT中THL、HBD、CRT、BCD等酶活力显著提高,且发酵有丁醇产生。运用Red重组系统敲除大肠杆菌BW25113的*pfIB*、*frdAB*、*fnr*和*AdhE*基因,构建*pfIB*、*frdAB*、*fnr*和*AdhE* 4基因缺失突变株*E. coli* BW25113H^[25],并结合串联表达质粒pSTV29-*alaS-ilvC-ilvD-kdcA*^[26]后进行发酵,丁醇产量增加40%,结合非自身发酵途径技术使异丁醇的产量由3 g/L提升至4.2 g/L,并且该工程菌稳定性较好。Clementina等^[27]分析了微生物利用碳氢化合物分子来产生能量的过程,通过修改大肠杆菌中十几个相关基因,逆转了 β -氧化途径(β -Oxidation),通过利用一种高效代谢方式,大肠杆菌将糖类转化为丁醇的转化率较其他微生物高出10倍,并且该菌还可以产生有用的脂肪酸。目前,虽然利用大肠杆菌工程菌生产丁醇的产量不高,难度较大,但作为一种

新型生产丁醇的途径,必将是研究高产丁醇的发展方向之一。

3 发酵底物研究概况

3.1 甘蔗、甜菜糖蜜等非粮食原料

大规模应用甘蔗生产乙醇已经在巴西、美国等国家实现^[28]。甘蔗是我国重要的糖类生产原料,在我国南方种植面积很大。甘蔗也是潜在的丁醇生产原料,研究发现菌株 *C. acetobutylicum* 810705利用甘蔗汁发酵产丙酮丁醇的能力较强,在最佳发酵条件下(糖浓度 7.5%、温度 37 °C、微量氧气)丙酮和丁醇的含量分别达到 4.6 和 15.4 g/L,其中丁醇含量比通常含量(12.0 g/L)提高 28%,相应的蒸馏提纯能耗大幅度降低^[29]。甜菜在我国北方种植面积广泛,也是我国重要的产糖原料。从土壤中筛选出的菌株 *Clostridium acetobutylicum* 2N^[30]适宜利用甜菜蜜糖发酵生产丁醇,在其最佳发酵条件下丁醇和总溶剂的含量分别达到 14.15 和 19.65 g/L,其中丁醇质量分数超过 70%。木薯、红薯等薯类是淀粉含量非常高的作物,在我国和世界其它地方均有大量种植。目前,单一利用薯类原料发酵产丁醇的产率较低,然而可以通过培养基和发酵条件的优化提高丁醇产率^[31],实现木薯等薯类原料对玉米粮食原料的替代。菊芋,其生态适应性非常强,块茎富含菊粉(果糖多聚物)^[32],易被酸或菊粉酶水解而生成果糖和葡萄糖的混合物,是生产果糖、果糖基产品和发酵生产生物燃料和生物基化学品等的优质原料^[33]。利用 *Clostridium acetobutylicum* L7发酵菊芋汁酸水解液生产丁醇,水解液初始糖浓度为 62.87 g/L,发酵后丁醇浓度达到 11.21 g/L,残糖浓度为 3.26 g/L^[34]。在调控 pH 的条件下,菊芋汁水解液发酵所产生的总溶剂浓度达到 23–24 g/L^[35],较大的提高了丁醇产量。多种非粮食原料的挖掘为丁醇的生产提供了广泛的原料基础。然而目前这些原料的利用率仍然偏低。因此,加大对这些非粮原料预处理和发酵条件的研究,有利于促进资源的合理利用和开发,提高丁醇生产效益。

3.2 木质纤维原料

锯木屑、废木料等所含的纤维素和半纤维素是目前公认的一种最具开发潜力的生物燃料发酵原料。木质纤维发酵产乙醇已经广泛研究, 陈介南、王义强等^[36]探讨了木质纤维生物转化乙醇中快速预处理、提高酶活性、环境综合利用等几个富有挑战性的技术问题。近年来, 国内外用木质纤维作原料发酵制备丁醇的研究也都有报道。利用 *C. acetobutylicum* C375 发酵稻草酶法水解液, 通过对氮源、生长因子、pH 等发酵条件的优化, 最终总溶剂浓度达到 12.8 g/L, 溶剂生成率为 29.9%^[37]。麦麸水解液经过 *C. beijerinckii* ATCC 55025 发酵 72 h 得丙酮和丁醇的产量分别为 2.2、8.8 g/L^[38]。麦草水解液由 *C. beijerinckii* P260 菌株在分步糖化发酵和同步糖化发酵 2 种工艺条件下, 总溶剂浓度分别达到 13.12、11.93 g/L^[11]。使用 *C. beijerinckii* BA101 菌株对玉米皮水解液发酵^[39], 所得的总溶剂浓度可达 9.3 g/L。稻谷糠壳也被用来发酵产丁醇, 得到总溶剂可达 14.62 g/L^[40]。柳枝稷(*Panicum virgatum*)和芒草(*Miscanthus giganteus*)被公认为最具开发潜力的能源植物。木质纤维资源的丰富性、普遍性、廉价性以及它的可再生性等优点, 使得利用木质纤维生产丁醇成为了生物能源研究的热点。但由于某些原料木质素含量高、预处理复杂、酶解糖化成本高以及戊糖发酵转化效率低等原因, 导致目前工业化生产丁醇还存在困难, 如何攻克这些关键技术是今后研究的重点。

4 木质纤维发酵产丁醇技术研究进展

4.1 纤维水解液成分及其对丁醇发酵的影响

产丁醇菌(丙酮丁醇梭菌和拜氏梭菌)不能直接利用麦麸、秸秆等富含纤维素、半纤维素的农业废弃物来发酵产丁醇。所以, 木质纤维原料必需经过预处理(物理法、化学法等)和纤维素酶水解成为富含单糖的糖化液, 才能发酵产丁醇; 糖化液中的单糖主要是己糖(葡萄糖和半乳糖等)和戊糖(木糖和阿拉伯糖等), 有些糖化液甚至还要经过脱毒处理后才能进一步发酵^[41]。产乙醇菌主要利用六碳

糖发酵产乙醇, 而产丁醇梭菌既可以利用六碳糖又能利用五碳糖发酵产丁醇, 较大程度上提高了原料的利用率^[42]。木质纤维原料糖化液中除糖类外还存在着很多抑制菌体生长发育和发酵过程的化合物, 糖化液中抑制物的种类及其含量与纤维原料的种类及预处理的方法密切相关^[43]。这些抑制物通常有酚类物质(香草醛、丁香醛)、酸类物质(p_2 香豆酸、甲酸、阿魏酸)以及有机或无机盐类(如乙酸钠、氯化钠和硫酸钠)等^[44-47]。

通过研究发现, 1.5 g/L 糠醛或 1.0 g/L 羟甲基糠醛会较强地抑制酵母菌的生长及乙醇发酵, 但是当糠醛或羟甲基糠醛的质量浓度达到 2.0 g/L 时, *C. beijerinckii* BA101 发酵产丁醇的总溶剂产量比对照组分别提高了 6%和 15%, 这有可能是发酵产丁醇菌株对糠醛和羟甲基糠醛具有一定的代谢作用^[42,48]。微生物在利用复杂碳源过程中一般都存在葡萄糖阻遏效应(CCR)^[49], 即速效碳源的快速利用对非速效碳源的代谢产生抑制作用。木质纤维原料水解液中存在的葡萄糖, 在自身代谢的同时抑制了细胞对其他糖源(木糖、阿拉伯糖等五碳糖)的有效利用, 在一定程度上降低了原料转化效率和发酵的经济性。甘蔗渣和水稻秸秆水解液在一定程度上抑制了 *C. saccharoperbutylacetonicum* 的生长^[50]; 玉米纤维水解液也对 *C. beijerinckii* BA101 的生长有抑制现象^[39]。解除产丁醇梭菌中的 CCR 效应、实现其对戊糖和己糖的同等利用是木质纤维发酵产丁醇中所需要突破的重点。敲除 ATCC 824 中的 *ccpA* 基因^[51], 可以使菌株固有的 CCR 效应得以解除, 实现了对葡萄糖-木糖混合碳源的同等利用; 上海生物丁醇协作组现已获得一株既能耐受玉米秸秆水解液中的抑制物、又能够同时利用其中葡萄糖和木糖的高产丁醇菌株^[8]。同样, 对水解液进行脱毒处理也能有效提高丁醇的产量, Claassen 等^[52]使用蒸汽爆破和酶水解处理有机生活垃圾, 得到的水解液经过脱毒处理后, 利用 *C. acetobutylicum* DSM1731 发酵产生的总溶剂量较对照提高了 3 倍。但是, 研究发现小麦秸秆经稀酸水解后, 不需要

经过任何脱毒处理即可用于丁醇发酵^[11,39]。不同的木质纤维原料采用不同的处理方式,发酵产丁醇的产率也有区别。因此,针对某一木质纤维原料,研究出廉价的、简单可行的适宜处理条件,有利于减少抑制物,促进丁醇产量的提高及其成本降低。

4.2 丁醇发酵技术

发酵技术与丁醇产量密不可分,优异的发酵工艺能够大大提高丁醇产量。丁醇的生物发酵技术可分为分批发酵和整合发酵,虽然整合发酵技术更适用于工业生产,但是整合发酵技术中也存在不少缺点,例如连续发酵中菌种易退化,易遭杂菌污染,营养物的利用率一般也低于分批培养。寻找一种高产低成本发酵工艺是目前丁醇工业生产的迫切需求。

4.2.1 分批发酵技术:传统的分批发酵是以玉米、木薯等淀粉质农副产品或甘蔗、甜菜等糖质产品作为原料,经预处理、水解等步骤得到糖化液,然后在丙酮-丁醇梭菌或者拜氏梭菌作用下,经发酵生产出丙酮、丁醇及乙醇总溶剂。以木质纤维为原料发酵产丁醇,其工艺路线包括以下步骤:(1)原料预处理和纤维素酶水解糖化;(2)糖化液经微生物发酵生成丁醇;(3)产物的蒸馏回收。早在20世纪末,就有通过碱法对甘蔗渣、稻草和小麦秸秆等进行预处理,然后再进行丁醇发酵的研究,得到的总溶剂质量浓度可达13.00–18.10 g/L^[50,53]。利用SO₂催化技术预处理松木或白杨木进行丁醇发酵,总溶剂质量浓度达到17.6–24.6 g/L,产量幅度提高显著^[54]。稻草酶法水解液(还原糖质量浓度为42.8 g/L)采用菌株*C. acetobutylicum* C375发酵,得到总溶剂质量浓度为12.8 g/L^[37],其中丁醇体积分数为65.8%。小麦秸秆经过稀酸预处理后再经纤维素酶水解,得到糖质量浓度为60 g/L的糖化液,采用*C. beijerinckii* P260对其进行发酵^[11],得到的总溶剂质量浓度为25.0 g/L,其中丁醇为12.0 g/L。Lars Angenent将玉米生产乙醇的副产物玉米纤维投入沼气池中,与不同的微生物混合后,经微生物

代谢将产生丁酸, Qureshi再利用所产的丁酸进行丁醇发酵^[55]。分批发酵虽然工艺操作简单,比较容易解决杂菌污染和菌种退化等问题,对营养物利用率也较高,但其生长周期较长、人力与物力消耗较大、生产效率较低,不利于工业化生产。

4.2.2 整合发酵技术(Integrated process):要想提高丁醇产量,在丁醇分批发酵中要解决两个主要问题:一是在发酵过程中的产物(丁醇等)对微生物细胞的毒性大而导致发酵产物对发酵过程的抑制;二是发酵菌种的延迟期较长导致丁醇的产率较低。为了解决以上2个问题,木质纤维丁醇发酵可采用萃取发酵、吸附发酵、同步糖化发酵(Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)、气提发酵等整合发酵技术来提高丁醇的产量以及设备的利用效率。

萃取发酵是指采用萃取和发酵相结合的方法,使用萃取剂将代谢产物从发酵液中萃取出来,控制发酵液中发酵产物丁醇的浓度,使其小于丁醇菌生长的抑制浓度,从而达到减轻或消除发酵过程的产物对菌种代谢的抑制。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,当初始葡萄糖浓度为110 g/L时,经丁醇菌发酵后折合水相总溶剂浓度达到33.63 g/L,葡萄糖的利用率为98.0%^[56]。以甲基化的天然棕榈油作为萃取剂进行丙酮丁醇萃取发酵^[57],47%左右的溶剂被萃取到棕榈油层中,葡萄糖的消耗率由62%提高到83%,丁醇产量由15.4 g/L提高到20.9 g/L。以生物柴油^[58-59]作为萃取剂,进行丙酮丁醇萃取发酵,丁醇产率达到0.213 g/(L·h),比对照提高了10.9%,总溶剂产量比对照提高54.88%。在萃取发酵产丁醇过程中,萃取剂的选择很关键。适宜的萃取剂应对菌株无毒、与水互不相溶,同时具有粘度较低、对ABE有较高的分配系数和较大的沸点差等特性。一种良好的萃取剂选择,可以大大降低丁醇的生产成本。

吸附发酵主要是指在发酵的同时添加硅藻土、活性炭、聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinylpyrrolidone, PVP)

等作为吸附剂, 将发酵产生的丙酮-丁醇吸附, 进一步促进发酵进程。吸附-发酵耦合工艺能够大大提高总溶剂的产量、产率及糖的利用率。与传统分批发酵相比, 采用 PVP 吸附-发酵耦合工艺, 总溶剂浓度及生产率分别提高 54% 和 130%, 糖利用率达到 73.3 g/L^[60], 较大幅度的提高了 ABE 产量。吸附发酵虽然具有高效、低能耗等优点, 但是 ABE 与吸附剂间的吸附关系通常是非线性的, 在实际应用中工作量较大, 不易实现流加操作。

气提技术的原理是在一定温度的稀释液中, 利用发酵过程中产生的 H₂ 和 CO₂ 或者惰性气体作为载气, 使其在动力作用下进入发酵体系, 溶液组分被气提到气相中, 从而达到发酵产物的及时分离, 然后在冷凝器内收集^[61-62]。在间歇发酵中, 气提发酵可以利用 199 g/L 的葡萄糖, 得到 69.7 g/L^[63] 的总溶剂, 远远高于非气提发酵。上海生物丁醇协作组通过 *C. acetobutylicum* EA 2018 批式玉米醪发酵-气提耦合技术^[7] 将 ABE 发酵产物的浓度提高至 30 g/L, 其中丁醇 20 g/L。Ezeji 等^[64] 研究了 *C. beijerinckii* BA101 利用高浓度的 P2 合成培养基, 采用补料与气提技术整合发酵 ABE, 结果表明该整合技术 ABE 的产生速率 1.16 g/(L·h) 比对照提高了 4 倍, 消耗 500 g 葡萄糖产生总溶剂 232.8 g (其中丁醇 151.7 g), 其产率为 0.47 g/g。气提受到气泡大小、流速、消泡剂等影响, 在发酵中需要平衡气泡大小和消泡剂的添加量。汽提耦合发酵对培养基无毒害, 不需要移出中间产物, 能有效的降低产物抑制, 适用于不同的底物和不同的发酵方式, 适用范围较广。

同步糖化发酵法 (SSF) 是指将糖化和发酵这两个不同的工艺过程在同一个生物反应器中同时进行。由于纤维素水解产物纤维二糖对纤维素酶活性有抑制作用, 葡萄糖对其也有轻微的抑制作用, 所以要提高纤维素酶水解纤维素的效率, 必须解除纤维素酶的反馈抑制。同步糖化发酵法解决了这一问题, 其特点是将纤维素酶对纤维素的水解和产丁醇菌发酵生成丁醇的过程在同一容器内连续进行, 酶水解的产物——葡萄糖等由于产丁醇菌的发酵而

不断被利用, 消除了葡萄糖浓度过高对纤维素酶的反馈抑制。同步糖化发酵法具有以下几个优点: (1) 通过转化抑制纤维素酶活性的糖, 提高了水解速度, 降低了酶的用量; (2) 葡萄糖提前利用产丁醇, 反应时间较短, 丁醇产率高; (3) 酶解与发酵在同一生物反应器中进行, 降低设备成本。利用新型的蒸汽爆破玉米秸秆膜循环酶解耦合发酵系统进行丁醇发酵^[65], 每克纤维素和半纤维素产丁醇达 0.14 g, 最大丁醇产率达到 0.31 g/(L·h)。纤维素和半纤维素的转化率分别为 72% 和 80%, 单位纤维素酶所产生的丁醇达 3.9 mg, 是分步水解批次发酵的 1.5 倍。虽然同步糖化发酵过程优点很多, 但是同步糖化发酵同样面临几个问题需要克服: (1) 水解和发酵温度之间的矛盾; (2) 产丁醇菌对丁醇的耐受性^[66]; (3) 丁醇等发酵产物对酶的抑制作用。解决这些问题可以通过低温水解酶的选择, 耐受性菌株的选育, 发酵产物及时提取等方面入手。

固定化技术是将细胞固定在载体上, 利用细胞内酶来实现酶催化反应, 它的本身是多酶体系将梭菌细胞固定在藻酸钠胶体颗粒上, 进行生物化学反应, 产物以丁醇为主, 丁醇产率至少可保持 1 周不变。何景昌^[67] 采用正交试验优化固定化细胞发酵条件, 得到最佳的固定化件: PVA、SA 和氯化钙浓度分别为 9.0%、1.1% 和 4.0%, 固定化 4 h, 固定化细胞发酵溶剂产量达到 10.82 g/L。与传统发酵法相比, 其具有反应速度快、产率高、重复利用性高、原料和能量消耗少、设备投资少及控制方便等优点。

丁醇发酵技术中, 还有渗透萃取和渗透汽化技术、细胞再循环技术等均得到了很好的应用, 但在以纤维质原料进行发酵的工业生产中, 一些工艺可能由于成本和技术原因还不能得到较好的应用。Qureshi 等^[11-12,39] 研究了 *C. beijerinckii* P260 以小麦秸秆稀酸水解液为原料, 采用多种整合发酵技术进行丁醇发酵, 由各种整合发酵技术的产量比较 (表 1) 可知, 整合气提发酵技术可以大大提高总溶剂的产量。

表 1 *C. beijerinckii* P260 利用小麦秸秆水解液进行丁醇发酵工艺比较^[68]
Table 1 Comparisons of different types of butanol fermentation processes using wheat straw hydrolysate by *C. beijerinckii* P260^[68]

发酵工艺 Fermentation processes	ABE 产量 The yield of ABE (g/L)	丁醇产量 The yield of butanol (g/L)	ABE 得率 The yield of ABE (g/g)	ABE 产生速率 The productivity of ABE [g/(L·h)]	原料水解率 Hydrolysis rate of raw materials (%)
SHF	13.38	8.09	0.32	0.14	100
SSF	11.93	7.40	0.42	0.27	75
SSF-gas stripping	21.42	NA	0.41	0.31	95
SSF-Fed-batch fermentation-gas stripping	190.0	NA	0.44	0.36	100

注: SHF 工艺条件为体积分数 1% 的稀 H₂SO₄ 于 121 °C 预处理 1 h, 糖化条件为纤维素酶、β-葡萄糖苷酶和木聚糖酶在 pH 5、45 °C 水解 72 h, 发酵温度为 35 °C, pH 6.5; SSF 工艺条件为 pH 6.5、温度 35 °C; SSF-gas stripping 工艺条件为以 CO₂ 和 H₂ 为载气进行同步糖化发酵与产物提取; SSF-Fed-batch fermentation-gasstripping 工艺条件为 pH 6.5、温度 35 °C, 发酵过程中流加糖并通过气提技术提取产物; NA: Not available.

Note: SHF: Wheat straw was pretreated by 1% (V/V) sulfuric acid at 121 °C for 1 h, and was hydrolyzed with Cellulase, β-glucosidase and Xylanase at 45 °C, pH 5 for 72 h, then the hydrolysate of wheat straw was fermented at 35 °C, pH 6.5; SSF: It was conducted at pH 6.5, 35 °C; SSF-gas stripping: Using CO₂ and H₂ as carrier for producing ABE in SSF; SSF-Fed-batch fermentation-gas stripping: Hydrolysates were added continuously in fermentation at 35 °C, pH 6.5, and the products were withdrawn by gas stripping; NA: Not available.

此外, 还有一种发酵技术值得参考, 即基因工程多菌种共发酵技术^[69-70]。木质纤维水解产物主要包括六碳糖和五碳糖, 产丁醇菌一般是优先利用六碳糖, 在同步糖化共发酵的过程中, 加速对酶解产物的利用, 解除产物对酶的抑制效应, 可以加快生产丁醇的速率, 通过基因工程或诱变选育获得优先利用五碳糖的菌株, 实现多菌种发酵, 可以提高丁醇的生产效率。

5 展望

丁醇作为一种重要的化工原料和新一代的生物燃料, 其生物发酵制备方法已经成为全球研究热点。当前迫切需要解决的问题是提高生物发酵丁醇产量及进一步降低其生产成本。依据以上综述与分析, 我们可以从以下 3 个方面找到突破点: (1) 高耐受性丁醇菌的选育, 大大提高菌种对丁醇等产物的耐受性; (2) 高产丁醇菌的选育、高产丁醇工程菌的构建以及高丁醇比例菌种的选育, 显著提高丁醇产量; (3) 发酵与高效低能耗产物回收工艺的耦合优化, 着力降低丁醇生产成本, 提高生产效益。

目前, 国内科研院所和一些相关生产企业已经

着手丁醇发酵的深度研究开发, 如中国科学院上海植物生理生态研究所、中南林业科技大学生物技术实验室、河南天冠集团子公司上海天之冠可再生能源有限公司、华北制药公司、河北冀州溶剂厂等, 其中上海天之冠可再生能源有限公司和中国科学院上海植物生理生态研究所关于发酵法生产丙酮丁醇的项目已经申请了国家“973”、国家“863”计划以及中国科学院计划, 项目的重点是构造高产、高底物选择性的丙酮丁醇菌种和开发新的发酵工艺, 包括纤维质原料发酵生产丙酮丁醇、溶剂抽提耦联发酵技术以及先进的发酵过程装备研制等。我国作为传统丁醇发酵生产大国, 有大量的丁醇发酵装置, 丰富的非粮作物资源(如木薯、废糖蜜、植物秸秆、林木纤维等), 随着丁醇高薪技术研发的突破与应用, 我国丁醇发展前景将十分广阔。

参考文献

- [1] 闫永亮, 刘宏娟, 张建安. 代谢工程在生物丁醇生产中的应用及研究进展[J]. 现代化工, 2012, 32(4): 25-29.
- [2] 沈佩芝, 任诚. 丁醇、辛醇生产技术与市场需求预测[J]. 化工进展, 2005, 24(2): 216-220.
- [3] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Acetone-butanol-ethanol production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch

- technique and product inhibition by gas stripping[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 63(6): 653-658.
- [4] 黄格省, 李振宇, 张兰波, 等. 生物丁醇的性能优势及 技术进展[J]. 石化技术与应用, 2012, 30(3): 254-259.
- [5] Keis S, Bennett CF, Ward VK, et al. Taxonomy and phylogeny of industrial solvent-producing clostridia[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1995, 45(4): 693-705.
- [6] Johnson JL, 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 reassocation[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47(2): 420-424.
- [7] Shaheen R, Shirley M, Jones DT. Comparative fermentation studies of industrial strains belonging to four species of solvent-producing clostridia[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2000, 2(1): 115-124.
- [8] 顾阳, 蒋宇, 吴辉, 等. 生物丁醇制造技术现状和展望 [J]. 生物工程学报, 2010, 26(7): 914-923.
- [9] Chen CK, Blaschek HP. Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52: 170-173.
- [10] Parekh M, Formanek J, Blaschek HP. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 using a low cost fermentation medium based on corn steep water[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51: 152-157.
- [11] Qureshi N, Saha BC, Cotta MA. Butanol production from wheat straw hydrolysate using *Clostridium beijerinckii*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2007, 30: 419-427.
- [12] Qureshi N, Sahaa BC, Hector RE, 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): 168-175.
- [13] 夏子义, 倪晔, 孙志浩, 等. 利用 *Clostridium saccharobutylicum* DSM 13864连续发酵生产丁醇[J]. 化工进展, 2013, 32(1): 156-160.
- [14] Lu CC, Zhao JB, Yang ST, et al. Fed-batch fermentation for n-butanol production from cassava bagasse hydrolysate in a fibrous bed bioreactor with continuous gas stripping[J]. Bioresource Technology, 2012, 104: 380-387.
- [15] 裴建新, 左文朴, 庞浩, 等. 高产生物丁醇新菌株的筛选、鉴定及发酵研究[J]. 可再生能源, 2011, 29(5): 99-102.
- [16] Chiao JS, Sun ZH. History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: development of continuous production technology[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2007, 13(1/3): 12-14.
- [17] Jiang Y, Xu CM, Dong F, et al. Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio[J]. Metabolic Engineering, 2009, 11(4): 284-291.
- [18] Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, et al. The ClosTron: A universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 70(3): 452-464.
- [19] Harris LM, Blank L, Desai RP, et al. Fermentation characterization and flux analysis of recombinant strains of *Clostridium acetobutylicum* with an inactivated *solR* gene[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2001, 27(5): 322-328.
- [20] Nair RV, Green EM, Waston DE. Regulation of the *sol* locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(1): 319-330.
- [21] Tummala SB, Junne SG, Papoutsakis ET. Antisense RNA downregulation of coenzyme A transferase combined with alcohol-aldehyde dehydrogenase overexpression leads to predominantly alcoholic *Clostridium acetobutylicum* fermentations[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(12): 3644-3653.
- [22] Atsumi S, Cann AF, Connor MR, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production[J]. Metabolic Engineering, 2008, 10(6): 305-311.
- [23] Inui M, Suds M, Kimura S, et al. Expression of *Clostridium acetobutylicum* butanol synthetic genes in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 77(6): 1305-1316.
- [24] 张艳, 周鹏鹏, 王丕祥, 等. 丁醇合成途径关键酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达[J]. 微生物学报, 2012, 52(5): 588-593.
- [25] 郭媛, 林丽华, 郭玲, 等. 基因敲除提高大肠杆菌工程菌生产异丁醇产量的研究[J]. 生物技术通报, 2012(7): 170-175.
- [26] 林丽华, 郭媛, 庞浩, 等. 产异丁醇大肠杆菌工程菌的构建[J]. 生物技术通报, 2011(8): 208-212.
- [27] Dellomonaco C, Clomburg JM, Miller EN, et al. Engineered reversal of the β -oxidation cycle for the synthesis of fuels and chemicals[J]. Nature, 2011, 476(7360): 355-359.
- [28] Mendes R, Araujo L, Raaijmakers M. Diversity of cultivated endohytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates[J]. Applied Environmental Microbiology, 2007, 73: 7259-7267.
- [29] 彭万峰, 熊莲, 陈新德, 等. 甘蔗汁发酵生产丙酮丁醇的研究[J]. 太阳能学报, 2010, 31(8): 937-941.
- [30] 范俊辉, 冯文亮, 邸胜苗, 等. 利用甜菜糖蜜补料发酵生产丁醇[J]. 生物加工过程, 2010, 8(6): 6-9.
- [31] Gu Y, Hu S, Chen J, et al. Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2009, 36(9): 1225-1232.

- [32] 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[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(2): 300-306.
- [33] Denoroy P. The crop physiology of *Helianthus tuberosus* L: a model orientated view[J]. *Biomass and Bioenergy*, 1996, 11: 11-32.
- [34] 陈丽杰, 辛程勋, 邓攀, 等. 丙酮丁醇梭菌发酵菊芋汁生产丁醇[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 991-996.
- [35] Marchal R, Blanchet D, Vandecasteele JP. Industrial optimization of acetone-butanol fermentation: a study of the utilization of Jerusalem artichokes[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1985, 23(2): 92-98.
- [36] 陈介南, 王义强, 何钢, 等. 木质纤维生产燃料乙醇的生物转化技术[J]. *林业科学*, 2007, 43(5): 99-105.
- [37] Chen SW, Ma X, Wang LS, et al. Acetone-butanol fermentation of rice straw enzymatic hydrolysate[J]. *Industrial Microbiology*, 1998, 28(4): 30-34.
- [38] Liu ZY, Ying Y, Li FL, et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii* ATCC 55025 from wheat bran[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 37(5): 495-501.
- [39] Qureshi N, Ezeji TC, Ebener J, et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 9(13): 5915-5922.
- [40] 张良, 袁永俊, 杨攀. 超微粉碎稻谷糠壳发酵产燃料丁醇的研究[J]. *西华大学学报*, 2012, 31(6): 92-97.
- [41] Ho NW, Chen Z, Brainard AP. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(5): 1852-1859.
- [42] Ezeji T, Qureshi N, Blaschek HP. Butanol production from agricultural residues: impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol fermentation[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(6): 1460-1469.
- [43] Taherzadeh MJ, Niklasson C, Liden G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzate[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 69(3): 330-338.
- [44] Qureshi N, Lolas A, Blaschek HP. Soymolasses as fermentation substrate for production of butanol using *Clostridium beijerinckii* BA101[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2001, 26(5): 290-295.
- [45] Lin B, Zhao XQ, Ge XM, et al. The effects of dilute acid hydrolysate by-products of corn stover on ethanol fermentation of xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* 6508-127[J]. *China Biotechnology*, 2007, 27(7): 61-67.
- [46] Giovani BMC, Solange IM, Elisangela JC, et al. Comparison of different procedures for the detoxification of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for use in fermentative processes[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, 81(2): 152-157.
- [47] Ezeji T, Blaschek HP. Fermentation of dried distillers' grains and solubles (DDGS) hydrolysates to solvent and value-added products by solventogenic clostridia[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(12): 5232-5242.
- [48] Nigam JN. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2001, 87(1): 17-27.
- [49] Gorke B, Stulke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2008, 6(8): 613-624.
- [50] Soni BK, Das K, Ghose TK. Bioconversion of agro-wastes into acetone butanol[J]. *Biotechnology Letters*, 1982, 4(1): 19-22.
- [51] Ren C, Gu Y, Hu S, et al. Identification and inactivation of pleiotropic regulator CcpA to eliminate glucose repression of xylose utilization in *Clostridium acetobutylicum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2010, 12(5): 446-454.
- [52] Claassen PA, Budde MA, López-Contreras AM. Acetone, butanol and ethanol production from domestic organic waste by solventogenic *Clostridia*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2000, 2(1): 39-44.
- [53] Marchal R, Rebeller M, Vandecasteele JP. Direct bioconversion of alkali-pretreated straw using simultaneous enzymatic hydrolysis and acetone butanol production[J]. *Biotechnology Letters*, 1984, 6(8): 523-528.
- [54] Parekh SR, Parekh RS, Wayman M. Ethanol and butanol production by fermentation of enzymatically saccharified SO₂-pre-hydrolysed lignocellulosics[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1988, 10(11): 660-668.
- [55] Qureshi N, Ezeji TC. Butanol, 'a superior biofuel' production from agricultural residues (renewable biomass): recent progress in technology[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2008, 2(4): 319-330.
- [56] 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): 388-398.
- [57] 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): 352-356.
- [58] 胡翠英, 堵益平, 杨影, 等. 生物柴油藕联丙酮丁醇发酵的初步研究[J]. *生物加工过程*, 2007, 5(1): 27-32.
- [59] 史仲平, 杨影, 张龙云. 丁醇萃取发酵耦联生产改良型生物柴油过程的性能优化[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(11): 1943-1948.
- [60] 童灿灿, 杨立荣, 吴坚平, 等. 丙酮-丁醇发酵分离耦合技术的研究进展[J]. *化工进展*, 2008, 27(11): 1782-1788.
- [61] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Process for continuous solvent production: US, 2005089979[P]. 2005-04-28.
- [62] 李款, 刘宏娟, 张建安. 气提耦合发酵技术在生物丁醇生产中的应用及研究进展[J]. *现代化工*, 2009, 29(2): 22-26.
- [63] Qureshiand N, Blaschek HP. Recovery of butanol from fermentation broth by gas stripping[J]. *Renewable Energy*, 2001, 22(4): 557-564.
- [64] Ezeji TC, Qureshi N, Blaschek HP. Acetone-butanol-ethanol production from concentrated

- substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch technique and product inhibition by gas stripping[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 63(6): 653-658.
- [65] 李冬敏, 陈洪章. 汽爆秸秆膜循环酶解耦合丙酮-丁醇发酵[J]. *过程工程学报*, 2007, 7(6): 1212-1216.
- [66] 毛绍名, 章怀云. 丙酮丁醇梭菌丁醇耐受性[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(9): 118-124.
- [67] 何景昌. 丙酮丁醇高产菌株的选育及其发酵新工艺的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2009: 48-63.
- [68] 王凤芹, 楚乐然, 谢慧, 等. 纤维燃料丁醇研究进展[J]. *生物加工过程*, 2009, 7(1): 1-6.
- [69] Chen JN, Zhang WT, Wang YQ, et al. Optimization of metabolic pathways for bioconversion of lignocellulose to ethanol through genetic engineering[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(5): 593-598.
- [70] 王瑾璨, 王义强. 蒸汽爆破杨木多菌种共发酵制备燃料乙醇不同工艺的研究[J]. *林业实用技术*, 2010(6): 66-68.

(上接 p.74)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>