

热纤维梭菌不同菌株的纤维素降解和酒精生产能力

方治国¹, 欧阳志云²

(1. 浙江工商大学环境科学与工程学院, 杭州 310012; 2. 中国科学院生态环境研究中心城市与区域生态国家重点实验室, 北京 100085)

摘要:以高温厌氧细菌热纤维梭菌 (*Clostridium thermocellum* LQRI 和 VPI 菌株) 和嗜热厌氧乙醇菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus* X514 和 39E 菌株) 为对象, 以不同浓度纤维素为底物, 分析了热纤维梭菌不同菌株的纤维素降解和酒精生产能力。结果表明, 在热纤维梭菌纯培养体系中, LQRI 对纤维素的降解能力明显高于 VPI, 前者约为后者的 1.2 倍, 但两者的酒精生产能力没有显著差异, LQRI 在 1% 纤维素条件下酒精终浓度约为 12 mmol/L, VPI 约为 10 mmol/L。随着底物纤维素浓度的增加 (1%、2%、5%), 两者对纤维素降解和酒精生产能力均呈明显下降趋势。在热纤维梭菌和嗜热厌氧乙醇菌混合培养体系中, LQRI 对纤维素的降解能力明显高于 VPI, 前者约为后者的 1.28~1.58 倍。随着底物浓度的增加, 两者的纤维素降解率均逐渐下降, 但热纤维梭菌对纤维素降解的绝对数值还受到其它混合培养菌种的影响。此外, LQRI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系的酒精生产能力明显高于 VPI + *Thermoanaerobacter*, 前者约为后者的 1.27~1.77 倍。随着底物浓度的增加, 混合培养体系酒精生产能力没有明显下降趋势。

关键词:纤维素酒精; 热纤维梭菌; 嗜热厌氧乙醇菌; 纤维素降解; 酒精生产能力

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)08-1926-06

Cellulose Degradation and Ethanol Production of Different *Clostridium* Strain

FANG Zhi-guo¹, OUYANG Zhi-yun²

(1. School of Environmental Science and Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012, China; 2. State Key Laboratory of Urban and Regional Ecology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: Cellulose degradation and ethanol production of two types of cellulosic materials with different concentration were evaluated in batch system of mono-cultures of cellulolytic ethanol producing strains (*Clostridium thermocellum* strain LQRI and *Clostridium thermocellum* strain VPI), and co-cultures of LQRI or VPI in combination with one of the non-cellulolytic ethanol producing strains (*Thermoanaerobacter ethanolicus* strains X514 or *Thermoanaerobacter ethanolicus* 39E). Results demonstrated that higher cellulose degradation abilities about 1.2 times were detected in LQRI mono-culture than in VPI mono-culture, while no significant difference of ethanol yields was found between the two mono-cultures. Abilities of cellulose degradation and ethanol production decreased significantly with the increasing of substrate cellulose concentration (1%, 2%, 5%). In the co-culture system, cellulose degradation abilities of LQRI were also significantly higher than VPI, the former is 1.28-1.58 times of the latter. Cellulose degradation rate of LQRI + *Thermoanaerobacter* and VPI + *Thermoanaerobacter* decreased gradually with the increasing of substrate cellulose concentration, while the absolute value of cellulose degradation was also affected by the partner *Thermoanaerobacter* strain. Additionally, the ethanol yields in the co-cultures of LQRI + *Thermoanaerobacter* were significantly higher than that in the co-cultures of VPI + *Thermoanaerobacter* with same *Thermoanaerobacter* partner, the former is 1.27-1.77 times of the latter. However, ethanol yields in the co-cultures have not significantly declined with the increasing of substrate cellulose concentration.

Key words: cellulosic ethanol; *Clostridium*; *Thermoanaerobacter*; cellulose degradation; ethanol production

纤维素酒精是以木质纤维素为原材料, 通过各种物理、化学和生物等处理方法把纤维素和半纤维素水解为葡萄糖和木糖, 然后利用微生物进行发酵生成的酒精。纤维素酒精是洁净的、可持续的和可更新的, 具有非常广阔的应用前景^[1]。并且其原材料价格低廉, 可以以广泛的纤维素生物量包括农业植物废弃物 (玉米秆、谷类稻草、甘蔗渣等)、工业废弃物 (木屑、纸浆) 和特定的能源农作物如柳枝稷为原料进行工业生产^[2-4]。在技术条件成熟的情况下, 自然界的生物量有同时满足液体交通燃料和食物、饲

料等的潜力^[5], 而纤维素酒精在未来交通运输能源的选择中将充当重要角色, 因此如何充分利用自然界中的纤维素生物量, 有效提高纤维素的降解效率以及纤维素酒精的生产能力至关重要, 这可为纤维素酒精与传统石油能源竞争提供技术基础。

纤维素酒精工业化生产最关键的技术是要尽可

收稿日期: 2009-10-17; 修订日期: 2009-12-08

基金项目: 浙江工商大学科研启动基金项目

作者简介: 方治国 (1977~), 男, 博士, 主要研究方向为环境微生物及生物能源与水污染处理技术, E-mail: zhgfang77@yahoo.com.cn

能提高纤维素的降解效率,为后续的发酵工作提供足够的原料,降低纤维素酒精的生产成本,提高与传统交通化石燃料的竞争力。然而,绝大部分纤维素降解菌较低的纤维素降解效率一直以来都是纤维素酒精大规模工业化生产的障碍。因此,纤维素酒精作为新燃料能源的潜在挑战是有效的更大程度地提高纤维素降解的效率^[6]。梭菌(*Clostridium*)是把木质纤维素材料转化成碳水化合物最具有应用前景的微生物^[7]。热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*)是一种高温厌氧的纤维素降解细菌,能够降解纤维素和半纤维素形成纤维二糖和纤维糊精,最后在相关酶的作用下转化成五碳糖和六碳糖。而且,热纤维梭菌还能利用纤维二糖和葡萄糖生成酒精。在能够降解纤维素的微生物中,热纤维梭菌是微生物纤维素降解和纤维素酒精大规模工业生产具有吸引力的选择^[8]。这些细菌具有以下优点:①厌氧的纤维素环境中无处不在,发酵过程中不需要氧气^[9];②能够降解很多复杂的碳水化合物(如淀粉、纤维素、半纤维素和胶质等),具有高效的胞外纤维素酶系统的纤维素体^[10,11];③细胞的产量很低,较多的底物能够转化成代谢产物如酒精等^[12];④最适的生长温度为 60℃,能够便于酒精的回收,此外,较高的生长温度能够降低污染概率^[1];⑤能够直接用于微生物的转化过程如联合生物过程^[13]。本研究主要以热纤维梭菌为对象,以不同浓度 Avicel 为底物纤维素,系统地分析和比较了热纤维梭菌不同菌株对纤维素降解和酒精生产能力,以期为提高纤维素降解效率提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 底物纤维素和化学试剂来源

实验过程中使用的纤维素主要有 Avicel PH101,购买于 Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri. Avicel PH101 为纯纤维素。实验过程中所有使用的化学试剂除特别说明之外都来源于 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。

1.2 微生物菌种来源

选择热纤维梭菌 *Clostridium thermocellum* VPI (ATCC 27405) 和 *C. thermocellum* LQRI (ATCC 35609) 为研究实验纤维素降解菌株,这两菌株购买于 ATCC (American Type Culture Collection),它们的最适合生长温度为 55~60℃,最适生长 pH 值为 7.2。*C. thermocellum* LQRI 分离于 *C. thermocellum* LQ8 的实验室污染物^[8]。选择 2 种非纤维素降解菌

株 *Thermoanaerobacter ethanolicus* X514 和 *T. ethanolicus* 39E 为实验研究糖类发酵酒精生产菌株。*T. ethanolicus* X514 是一种能以糖类(己糖和戊糖)为底物,发酵生产酒精能力较强细菌,还能够进行铁、锰、铬等金属还原,分离于 Piceance Basin, Colorado 2000 m 的地下^[14]。*T. ethanolicus* 39E 来源于 ATCC (ATCC 33233),分离于美国黄石国家公园的温泉中^[15]。购买回来的菌株经活化后加 15% 的甘油贮存于 -80℃ 的冰箱中作为实验菌种备用。

1.3 培养基成分和培养条件

所有实验均在 60 mL 血清瓶(VWR)中进行,瓶中分装有 30 mL 培养基和一定浓度(1%、2% 和 5%)纤维素,瓶中厌氧气体为氮气。热纤维梭菌纯培养以及热纤维梭菌和嗜热厌氧乙醇菌的混和培养的培养基成分为(1 L):NaCl 1.0 g;MgCl₂·6H₂O 0.5 g;KH₂PO₄ 0.2 g;NH₄Cl 0.3 g;KCl 0.3 g;CaCl₂·2H₂O 0.015 g;微量元素溶液 1 mL;Se/W 溶液 1 mL;复合维生素溶液 1 mL;L-半胱氨酸 0.031 g;Na₂S·9H₂O 0.048 g;NaHCO₂ 2.52 g;刃天青(0.1% 溶液) 0.25 mL。微量元素溶液(1 L)包括:HCl (25% 溶液,质量分数) 10 mL;FeCl₂·4H₂O 1.5 g;CoCl₂·6H₂O 0.19 g;MnCl₂·4H₂O 0.1 g;ZnCl₂ 70 mg;H₃BO₃ 6 mg;Na₂MoO₄·2H₂O 36 mg;NiCl₂·6H₂O 24 mg;CuCl₂·2H₂O 2 mg。Se/W 溶液(1 L)包括:Na₂SeO₄·5H₂O 6 mg;Na₂WO₄·2H₂O 8 mg;NaOH 0.5 g。复合维生素溶液(1 L)包括:生物素 20 mg;叶酸 20 mg;维生素 B₆ 100 mg;维生素 B₂ 50 mg;维生素 B₁ 50 mg;烟酸 50 mg;泛酸 50 mg;维生素 B₁₂ 1 mg;对氨基苯甲酸 50 mg;硫辛酸 50 mg。培养基 pH 值用纯二氧化碳调到 7.2。培养基配好之后分装于有一定纤维素的血清瓶(60 mL)中,用塑料塞塞好,然后用铝制 seal 卡牢,防止空气进入,保持较好的厌氧环境,随后进行灭菌。厌氧无菌的 Wolin Vitamin 在接种之前用无菌注射器和针头加入培养基中。

LQRI 或 VPI 纯培养实验就是分别接种相同数量处于指数生长期的 LQRI 或 VPI 菌液于含一定浓度纤维素的培养基中,*Clostridium* + *Thermoanaerobacter* 混和培养实验是同时接种相同数量的处于指数生长期的纤维素降解菌(LQRI 或 VPI)和非纤维素降解酒精生产菌(X514 或 39E)于一定浓度纤维素的培养基中,然后在发酵过程中每天取样测定酒精的浓度和产物的分布情况。细胞生长通过 D_{600} (20D + 分光光度计)来测定。所有的实验均为 3 个重复,在 60℃ 的条件下进行培养。

1.4 分析测定方法

酒精定量主要用 6890 N Network GC 系统 (Agilent Technologies), 检测器为 FID (Flame Ionization Detector). 载气为氦气, 流速为 6.0 mL/min. 终产物乙酸和乳酸用 HPLC (Agilent 1200 Series SL 系统) 测定, 柱子为 Aminex 87 P (Bio-Rad Laboratories), 柱子温度保持在 55℃, 检测器为 RID (refractive index detector). 液体流动相为 0.025% 硫酸, 流速为 0.6 mL/min, 在用 GC 和 HPLC 分析样品之前, 所有的样品都必须进行预处理. 首先以终浓度 0.025% 的硫酸进行酸化, 10 000 r/min 离心 10 min, 然后用 0.20 μm 的滤膜过滤^[16], 滤液用来测定酒精、乙酸和乳酸浓度. 纤维素主要测定过程为煮沸、过滤、干燥、称量^[17].

2 结果与分析

2.1 LQRI 和 VPI 纯培养对不同浓度纤维素的降解能力

分别以 1%、2% 和 5% 的 Avicel 为底物, 研究了 LQRI 和 VPI 纯培养对不同浓度底物纤维素的降解能力. 结果表明, 无论底物浓度如何变化, LQRI 纯培养对纤维素的降解率明显高于 VPI ($**p < 0.01$). 随着底物纤维素浓度的增加, LQRI 和 VPI 纯培养对底物纤维素的降解率明显降低, 且底物浓度从 1% 增加到 2% 时的纤维素降解率下降趋势明显高于底物浓度从 2% 增加到 5% ($**p < 0.01$). 以 1% 纤维素为底物, LQRI 和 VPI 纯培养对 Avicel 的降解率分别为 79.8% 和 62.8%, 前者约为后者的 1.27 倍. 而以 5% 纤维素为底物, LQRI 和 VPI 纯培养对 Avicel 的降解率分别为 6.27% 和 5.24%, 前者约为后者的 1.20 倍 (图 1). 此外, LQRI 纯培养对底物纤维素降解的绝对数值明显高于 VPI 纯培养 ($*p < 0.05$), 并且随着底物纤维素浓度的增加, LQRI 和 VPI 纯培养对底物纤维素降解的绝对数值也呈明显下降趋势. 以 1% 纤维素为底物, LQRI 和 VPI 纯培养对 Avicel 的降解绝对数值分别为 0.24 g 和 0.19 g, 以 5% 纤维素为底物, LQRI 和 VPI 纯培养对 Avicel 的降解绝对数值分别为 0.09 g 和 0.08 g. 因此, 热纤维梭菌纯培养体系中, LQRI 对纤维素的降解能力明显高于 VPI, 且随着底物浓度的增加, 两者对纤维素的降解能力呈下降趋势.

2.2 LQRI 和 VPI 纯培养对不同浓度纤维素的酒精生产能力

分别以 1%、2% 和 5% Avicel 为底物, 研究

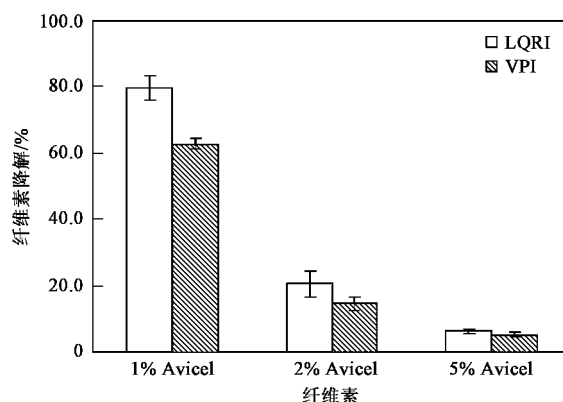


图 1 LQRI 和 VPI 纯培养对不同浓度纤维素的降解率

Fig. 1 Cellulose degradation rate under different concentration cellulose in LQRI and VPI mono-cultures

LQRI 和 VPI 纯培养对不同浓度底物纤维素的酒精生产能力. 结果表明, 其它外源条件相同的情况下, LQRI 和 VPI 纯培养对纤维素酒精的生产能力没有显著差异 ($p > 0.01$). 随着底物纤维素浓度的增加, LQRI 和 VPI 纯培养的酒精终浓度呈明显下降趋势, 且底物浓度从 1% 增加到 2% 时的酒精浓度的下降趋势明显高于底物浓度从 2% 增加到 5% ($**p < 0.01$). 以 1% 纤维素为底物酒精浓度最高, LQRI 酒精浓度约为 12 mmol/L, VPI 酒精浓度约为 10 mmol/L (图 2). 因此, 纯培养体系中, LQRI 的酒精生产能力与 VPI 没有显著差异, 随着底物浓度的增加, 两者的酒精生产能力逐渐下降.

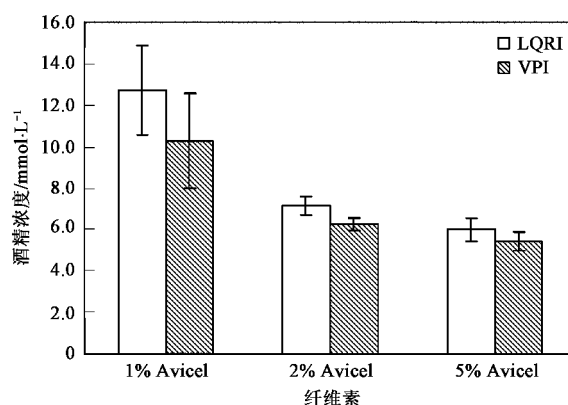


图 2 LQRI 和 VPI 纯培养对不同浓度纤维素的酒精终浓度

Fig. 2 Ethanol production under different concentration cellulose in LQRI and VPI mono-cultures

2.3 LQRI 和 VPI 分别与 *Thermoanaerobacter* 混合培养对不同浓度纤维素的降解能力

分别以 1%、2% 和 5% Avicel 为底物, 研究了 LQRI 和 VPI 分别与 *Thermoanaerobacter* 混合培养

(LQRI + X514、LQRI + 39E、VPI + X514、VPI + 39E) 对不同浓度底物纤维素的降解能力. 结果表明, 无论底物浓度如何变化, LQRI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中 LQRI 对纤维素的降解率明显高于 VPI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中 VPI 对纤维素的降解率 (** $p < 0.01$), 前者约为后者的 1.28 ~ 1.58 倍. 随着底物浓度的增加, 混合培养体系中 LQRI 和 VPI 对纤维素的降解率明显降低. 以 1% Avicel 为底物, LQRI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中 LQRI 对纤维素的降解率均高于 90%, 而 VPI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中 VPI 对纤维素的降解率均低于 77%; 以 5% 纤维素为底物, LQRI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中 LQRI 对纤维素的降解率均高于 25%, 而 VPI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中 VPI 对纤维素的降解率均低于 23% (图 3). 此外, 随着底物 Avicel 浓度从 1% 增加到 2% 再到 5%, *Clostridium* + X514 混合培养体系中热纤维梭菌对底物纤维素降解的绝对数值逐渐增加, 而 *Clostridium* + 39E 混合培养体系中热纤维梭菌对底物纤维素降解的绝对数值先增加后降低. 因此, 混合培养体系中, LQRI 对纤维素的降解能力也明显高于 VPI, 随着底物浓度的增加, 两者的纤维素降解率均呈明显下降趋势, 但热纤维梭菌对纤维素降解的绝对数值还受到其它混合培养菌种的影响.

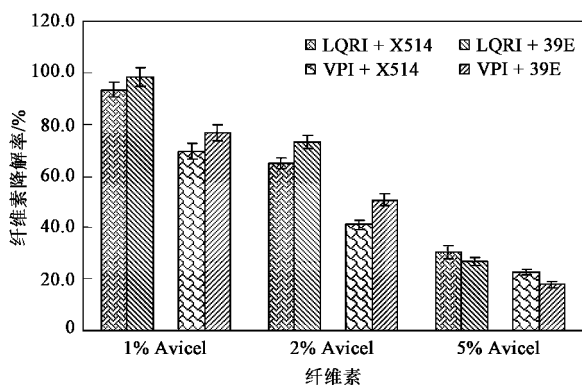


图 3 LQRI 和 VPI 分别与 *Thermoanaerobacter* 混合培养对不同浓度纤维素的降解率

Fig. 3 Cellulose degradation rate under different concentration cellulose in the co-cultures of LQRI + *Thermoanaerobacter* and VPI + *Thermoanaerobacter*

2.4 LQRI 和 VPI 分别与 *Thermoanaerobacter* 混合培养对不同浓度纤维素的酒精生产能力

分别以 1%、2% 和 5% Avicel 为底物, 研究了

LQRI 和 VPI 分别与 *Thermoanaerobacter* 混合培养对不同浓度底物纤维素的酒精生产能力. 结果表明, 其它外源条件相同的情况下, LQRI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系的酒精生产能力明显高于 VPI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系 (** $p < 0.01$), 前者约为后者的 1.27 ~ 1.77 倍, 且无论底物纤维素浓度如何变化, LQRI + X514 是 4 种混合培养体系 (LQRI + X514、LQRI + 39E、VPI + X514、VPI + 39E) 中酒精生产能力最强的组合. 与热纤维梭菌纯培养不同, 随着底物纤维素浓度的增加, 热纤维梭菌与 *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中的酒精终浓度呈稳定状态, 没有明显下降趋势 (图 4). 因此, 混合培养体系中, LQRI + *Thermoanaerobacter* 的酒精生产能力明显高于 VPI + *Thermoanaerobacter*, 随着底物浓度的增加, 混合培养体系酒精生产能力没有明显下降趋势.

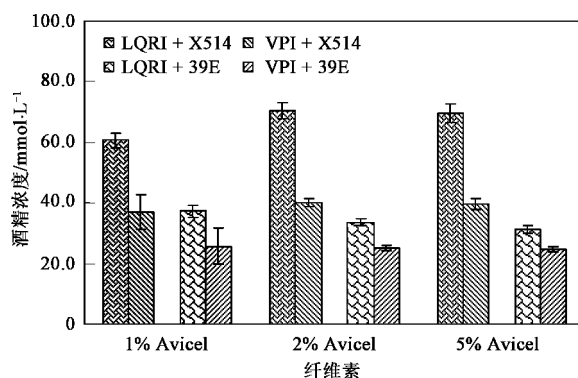


图 4 LQRI 和 VPI 分别与 *Thermoanaerobacter* 混合培养对不同浓度纤维素的酒精终浓度

Fig. 4 Ethanol production under different concentration cellulose in the co-cultures of LQRI + *Thermoanaerobacter* and VPI + *Thermoanaerobacter*

3 讨论

在热纤维梭菌纯培养体系中, LQRI 对底物纤维素的降解率明显高于 VPI (** $p < 0.01$), 这说明 LQRI 对纤维素具有较强的水解能力. 然而, LQRI 和 VPI 纯培养体系中的酒精终浓度没有显著差异. 为了阐明其原因, 测定了 1% Avicel 条件下的其它代谢产物 (乙酸、乳酸和还原性糖) 的浓度. 结果表明, LQRI 纯培养体系中乙酸和还原性糖的终浓度明显高于 VPI 纯培养体系 (** $p < 0.01$), 而两者的乳酸浓度没有显著差异 ($p > 0.01$) (未发表资料). 从这些数据中可以得出, LQRI 纯培养体系中有较多降解的纤维素被转化成乙酸和还原性糖, 导致了两者纯

培养体系中酒精终浓度没有显著的差异.

在混合培养体系中, LQRI 对纤维素的水解能力也明显高于 VPI, 且 LQRI + *Thermoanaerobacter* 培养体系的酒精生产能力明显高于 VPI + *Thermoanaerobacter*, LQRI + X514 混合培养体系的酒精终浓度大约是 VPI + X514 的 2 倍, LQRI + 39E 混合培养体系的酒精终浓度大约为 VPI + 39E 的 1.5 倍. 一方面, LQRI 对纤维素的水解能力明显高于 VPI, 同样的条件下 LQRI + *Thermoanaerobacter* 体系中有更多的纤维素被水解成还原性糖, 可为后续嗜热厌氧乙醇菌的发酵提供充足的基质; 另一方面, VPI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中乳酸和还原性糖浓度明显高于 LQRI + *Thermoanaerobacter* ($p < 0.01$), 而两者的乙酸浓度没有显著差异 ($p > 0.01$) (未发表资料). 这说明在 LQRI + *Thermoanaerobacter* 混合培养体系中有较多的还原性糖进一步被 *Thermoanaerobacter* 转化成酒精和其它代谢产物, 从而导致 LQRI + *Thermoanaerobacter* 混合体系中酒精终浓度明显高于 VPI + *Thermoanaerobacter*.

在热纤维梭菌纯培养体系中, 随着纤维素浓度从 1% 增加到 2% 再到 5%, 体系的纤维素降解能力和酒精生产能力呈明显下降趋势. 一方面, 在营养状态良好的情况下, 热纤维梭菌生长也是比较缓慢, 其最大生长的 D 值也很低. 培养基中较高浓度的初始底物纤维素能够抑制热纤维梭菌的生长, 降低其对纤维素的水解作用, 从而导致高浓度底物条件下酒精终浓度的下降^[8]. 另一方面, 纯培养体系水解纤维素形成还原性糖, 而热纤维梭菌的酒精生产能力较弱, 导致体系中有较高浓度的还原性糖, 从而抑制热纤维梭菌对纤维素的进一步水解作用^[18]. 在混合培养体系中, 随着底物纤维素浓度从 1% 增加到 2% 再到 5%, 虽然体系的纤维素降解率呈下降趋势, 但在 *Clostridium* + X514 体系中纤维素降解的绝对数值呈上升趋势, *Clostridium* + 39E 体系中纤维素降解的绝对数值先增加后减少, 导致体系的酒精终浓度在不同底物纤维素的条件下没有显著差异. 混合培养体系水解纤维素形成的还原性糖会迅速被 X514 或 39E 发酵生成酒精和其它代谢产物, 降低了还原性糖对热纤维梭菌的抑制作用, 从而促进其对纤维素的进一步水解作用.

4 结论

(1) 无论纯培养体系还是混合培养体系, 热纤

维梭菌 LQRI 对底物纤维素的水解能力明显强于 VPI, 这可为将来纤维素酒精生产过程中纤维素降解菌株的选择提供指导作用.

(2) 在热纤维梭菌纯培养体系中, LQRI 和 VPI 的酒精生产能力没有显著差异; 在混合培养体系中, LQRI + *Thermoanaerobacter* 的酒精生产能力明显高于 VPI + *Thermoanaerobacter*, 这可为高温厌氧细菌在纤维素酒精生产过程中的应用提供理论意义.

(3) 在热纤维梭菌纯培养体系中, 随着底物纤维素浓度的增加 (1%、2%、5%), LQRI 和 VPI 对纤维素降解和酒精生产能力均呈明显下降趋势. 在混合培养体系中, 随着底物浓度的增加, LQRI + *Thermoanaerobacter* 和 VPI + *Thermoanaerobacter* 的纤维素降解率均逐渐下降, 但两体系中热纤维梭菌对纤维素降解的绝对数值还受到其它混合培养菌种的影响; 此外, 随着底物纤维素浓度的增加, 混合培养体系的酒精生产能力没有明显下降趋势. 这可为纤维素酒精生产过程中适合底物浓度的选择提供理论指导.

致谢: 研究过程中得到美国 University of Oklahoma 周集中教授课题组和中国科学院生态环境研究中心欧阳志云研究员课题组的帮助, 在此表示感谢.

参考文献:

- [1] Demain A L, Newcomb M, Wu J H D. Cellulase, clostridia, and ethanol [J]. *Microbiol Mol Biol R*, 2005, **69**: 124-154.
- [2] Hamelinck C N, Van Hooijdonk G, Faaij A P C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term [J]. *Biomass Bioenergy*, 2005, **28**: 384-410.
- [3] Berndes G, Azar C, Kaberger T, et al. The feasibility of large-scale lignocellulose-based bioenergy production [J]. *Biomass Bioenerg*, 2001, **20**: 371-383.
- [4] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2006, **69**: 627-642.
- [5] Tilman D, Hill J, Lehman C. Carbon-negative biofuels from low-input high-diversity grassland biomass [J]. *Science*, 2006, **314**: 1598-1600.
- [6] Sun Y, Cheng J Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review [J]. *Bioresour Technol*, 2002, **83**: 1-11.
- [7] Desvaux M. *Clostridium cellulolyticum*: model organism of mesophilic cellulolytic clostridia [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, **29**: 741-764.
- [8] Ng T K, Benbassat A, Zeikus J G. Ethanol-production by thermophilic bacteria: Fermentation of cellulosic substrates by cocultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium*

- thermohydrosulfuricum [J]. Appl Environ Microbiol, 1981, **41**: 1337-1343.
- [9] Leschine S B. Cellulose Degradation in Anaerobic Environments [J]. Annu Rev Microbiol, 1995, **49**: 399-426.
- [10] Bayer E A, Chanzy H, Lamed R, et al. Cellulose, cellulases and cellulosomes [J]. Curr Opin Struc Biol, 1988, **8**: 548-557.
- [11] Schwarz W H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria [J]. Appl Microbiol Biot, 2001, **56**: 634-649.
- [12] Mitchell W J. Physiology of carbohydrate to solvent conversion by Clostridia [J]. Adv Microbiol Physiol, 1998, **39**: 31-130.
- [13] Lynd L R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, economics, the environment, and policy [J]. Annu Rev Energ Env, 1996, **21**: 403-465.
- [14] Roh Y, Liu S V, Li G S, et al. Isolation and characterization of metal-reducing *Thermoanaerobacter* strains from deep subsurface environments of the Piceance Basin, Colorado [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 6013-6020.
- [15] Zeikus J G, Benbassat A, Hegge P W. Microbiology of Methanogenesis in Thermal, Volcanic Environments [J]. J Bacteriol, 1980, **143**: 432-440.
- [16] Sommer P, Georgieva T, Ahring B K. Potential for using thermophilic anaerobic bacteria for bioethanol production from hemicellulose [J]. Biochem Soc T, 2004, **32**: 283-289.
- [17] Park W S, Ryu D D Y. Cellulolytic Activities of *Clostridium thermocellum* and its carbohydrate-metabolism [J]. J Ferment Technol, 1983, **61**: 563-5.
- [18] Klinker H B, Thomsen A B, Ahring B K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass [J]. Appl Microbiol Biot, 2004, **66**: 10-26.

《环境科学》荣获“新中国 60 年有影响力的期刊”称号

2009 年 12 月 22 日“第四届中国期刊创新年会”公布了“新中国 60 年有影响力的期刊”评选结果,《环境科学》荣获“新中国 60 年有影响力的期刊”称号. 此次评选,全国共有 9 000 多种参评期刊,最终有 161 种期刊入选. 该评选活动是中国期刊协会、中国出版科学研究所为纪念新中国成立 60 周年,表彰和鼓励在政治、经济、文化、科技和社会发展领域中起到重要作用的期刊而举办的.