

## 综述

# 基于重组策略的一体化生物加工过程最新进展

郑宗宝, 赵美娜, 陈涛, 赵学明

天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072

郑宗宝, 赵美娜, 陈涛, 等. 基于重组策略的一体化生物加工过程最新进展. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1354-1362.  
Zheng ZB, Zhao MN, Chen T, et al. Advances of consolidated bioprocessing based on recombinant strategy. Chin J Biotech, 2013, 29(10): 1354-1362.

**摘要:** 木质纤维素材料具有储量丰富、原料成本低及可再生等优点, 人们期望其能替代石油作为原料来生产多种燃料和化学品, 如生物柴油、生物氢、生物乙醇等, 而木质纤维素解聚过程的高成本成为实现这一过程的主要障碍。一体化生物加工过程 (Consolidated bioprocessing, CBP) 是指在不添加任何外源水解酶的情况下, 直接将木质纤维素原料一步转化为生物化学品的生物加工过程。通过基因工程, 将水解酶的生成、木质纤维素的降解和生物产品的生产等功能集成到一个生物体上。对于 CBP, 人们通常有两种策略可供选择, 即本地策略和重组策略。文中重点介绍了基于重组策略的 CBP 的原理、两种不同的应对方式、合成生物学及代谢工程对其的贡献以及未来所面临的挑战与展望。

**关键词:** 一体化生物加工过程, 木质纤维素, 重组策略, 酶复合体, 合成生物学, 代谢工程

**Received:** April 28, 2013; **Accepted:** June 21, 2013

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2011CBA00804, 2012CB725203), National Natural Science Foundation of China (No. 21176182), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (Nos. 2012AA023102B, 2012AA022103B), Natural Science Foundation of Tianjin (No. 12JCYBJC12900), Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (No. 20100032120014).

**Corresponding author:** Tao Chen. Tel/Fax: +86-22-27406770; E-mail: chentao@tju.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2011CBA00804, 2012CB725203), 国家自然科学基金 (No. 21176182), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (Nos. 2012AA023102B, 2012AA022103B), 天津市自然科学基金 (No. 12JCYBJC12900), 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20100032120014) 资助。

# Advances of consolidated bioprocessing based on recombinant strategy

Zongbao Zheng, Meina Zhao, Tao Chen, and Xueming Zhao

Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China

**Abstract:** Lignocellulosic biomass represents an abundant, low-cost and renewable source of potentially fermentable sugars. It is a candidate besides petroleum as feedstock for fuel and chemical production. Recent researches on utilizing lignocellulosics as feedstock boost development of numerous promising processes for a variety of fuels and chemicals, such as biodiesel, biohydrogen and ethanol. However, high cost in depolymerization is a primary obstacle preventing the use of lignocellulosic biomass as feedstock. Consolidated bioprocessing (CBP), refers to the bioprocess without any exogenous cellulolytic enzymes added, converting the lignocellulosic material into biochemicals directly, which could potentially avoid the cost of the dedicated enzyme generation step by incorporating enzyme-generating, biomass-degrading and bioproduct-producing capabilities into a single organism through genetic engineering. There are two CBP strategies, native strategy and recombinant strategy. We mainly introduce the recombinant strategy, including its principle, the two responding styles, the contributions of synthetic biology and metabolic engineering and the future challenges.

**Keywords:** consolidated bioprocessing, lignocellulose, recombinant strategy, enzyme complex, synthetic biology, metabolic engineering

目前随着能源危机及环境问题的日益恶化,人们对于绿色替代能源的需求越来越大,也进行了许多卓有成效的探索。其中木质纤维素材料作为世界上储量最丰富的碳源及实体能源,尤其受到人们的青睐<sup>[1]</sup>。作为一种固态物质,木质纤维素材料的能源密度较小,从而限制了其广泛应用。如果可以将其高效地转化为液体燃料,则可以在很大程度上缓解甚至彻底解决目前所面临的能源紧缺问题<sup>[2-3]</sup>。生物加工过程即是实现这一转化过程的最佳选择,但是由于木质纤维素材料的结构复杂性,其很难被微生物和酶所解构,因此对于生物加工过程而言,木质纤维素材料的转化面临巨大的挑战。

针对以上问题,人们进行了许多尝试,尤其是近年来在木质纤维素材料的生物转化上取得了许多成果,并提出了一体化生物加工过程

(Consolidated bioprocessing, CBP)<sup>[1]</sup>这一概念。要使木质纤维素材料高效地转化为生物化学品,必须依靠多学科的交叉与配合,包括生物学尤其是代谢工程和合成生物学、化学及化学工程等各领域的整合。本文将从一体化生物加工过程的概念和原理开始,主要综述基于重组策略的一体化生物加工过程,指出研究发展的目标以及基于重组策略的一体化生物加工过程所面临的机遇和挑战。

## 1 一体化生物加工过程原理

对于木质纤维素材料的生物转化过程而言,一般首先需要通过一系列物理、化学方法(如酸水解、超声处理、离子液体预处理等)对木质纤维素材料进行预处理<sup>[4]</sup>。预处理可以在一定程度上解构木质纤维素材料,利于随后进一步的生物水解及

转化。但预处理后，木质纤维素材料的纤维素聚合程度并没有显著降低，必须通过酶水解才能将其解聚成为微生物可利用的单糖类底物，进而实现其对生物化学品的转化。

经预处理的木质纤维素材料向生物化学品的转化共需 4 步生物过程，即水解酶的生产、木质纤维素材料的酶解、纤维素水解物即己糖的发酵以及半纤维素水解物即戊糖的发酵。以上 4 个过程可以分步进行，也可以进行局部或全过程的整合。分别糖化发酵 (Separate hydrolysis and fermentation, SHF) 是将这 4 步独立进行，相应地需要多种生物催化剂参与各个过程。同时糖化发酵 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) 则整合了木质纤维素材料的水解和纤维素水解物的发酵这两个过程，同时糖化共发酵 (Simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF) 整合了木质纤维素材料的水解、己糖的发酵以及戊糖的发酵过程 (图 1A)。由于需要复杂的纤维素酶生产步骤，使得这种多步骤生物加工过程在经济性上并不占优势<sup>[5]</sup>。而一体化生物加工过程作为一种高度整合的生物加工过程，与其他几种方法不同，它不需要独立的水解酶生产过程，而是将 4 个生物过程集成为一步，在一个反应器中同时进行水解酶的生产、木质纤维素材料的水解、己糖的发酵以及戊糖的发酵等 4 步生物过程 (图 1B)，因此是一种非常有潜力的低成本、高效率的生物加工方法。尽管 CBP 这一概念在广义上是指一切“直接生物转化过程”，但随着目前木质纤维素水解的研究受到日益关注，该概念已被更多地在木质纤维素的生物转化过程方面所使用。与那些需要独立步骤进行水解酶生产的生物过程相比，CBP 由于减少了与之相关的设备投资及运营成本，因此可以显著降低生物加工过程的成本。事实上，这样的一体化生物加工过

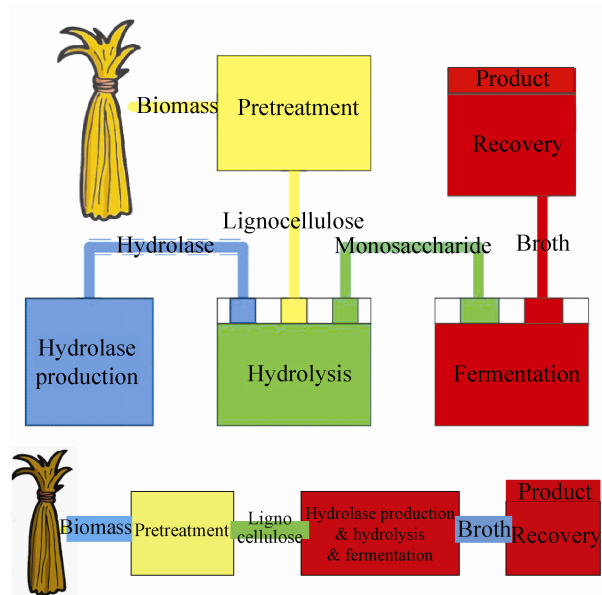


图 1 分别糖化发酵过程 (A) 和一体化生物加工过程 (B) 进行木质纤维素材料的生物转化的过程示意图

Fig. 1 Processes of separated saccharification and fermentation process (A) and consolidated bioprocess (B) for bioconversion of lignocellulosic materials.

程已被公认为是低成本水解和纤维素生物质发酵的最终配置<sup>[5]</sup>。其中，高活力的水解酶的高效生产以及菌株的高效转化是实现一体化生物加工过程的关键。

## 2 一体化生物加工过程的两种菌株改造策略

作为 CBP 微生物，必须可以在工业条件下同时高效地水解木质纤维素材料和高转化率地生产高浓度的目的产品。事实上，目前还没有在自然界中发现同时具备这两个特性的微生物，因此需要利用遗传工具来进行微生物菌株的改造以实现 CBP。对于 CBP 菌株的构建，主要有两个不同的策略，即所谓的“本地策略” (Native strategy) 以及“重组策略” (Recombinant strategy)<sup>[5-6]</sup>。前者

是以能天然利用不溶性纤维素生物质成分的微生物作为出发菌株,而后者则是以不能天然利用不溶性纤维素生物质成分的微生物作为出发菌株。

本地策略的瓶颈在于水解单糖向生物化学品的转化。尽管这些菌株天然就具备水解木质纤维素材料的能力,但是受基因改造工具及方法的限制,对于这些菌株的代谢改造比较困难,水解单糖不能有效地向目的产品进行转化<sup>[7-10]</sup>。目前利用本地策略进行 CBP 菌株构建的工作多集中于乙醇生产<sup>[11-12]</sup>。对于本地策略而言,当前的主要挑战在于基因改造工具的开发及应用<sup>[11,13]</sup>,以及对菌株代谢网络的分析与研究等<sup>[14]</sup>。

重组策略的瓶颈则是多种类型纤维素酶和/或半纤维素酶的足量表达分泌,高效地水解经预处理的木质纤维素材料,以供给菌体生长和目的化学品的转化<sup>[15]</sup>。采用重组策略改造的菌株大都是模式微生物,如大肠杆菌、枯草芽胞杆菌以及酿酒酵母等,这些微生物的基因改造工具较为完备,基因工程方法也较为成熟,因此可以很容易地通过代谢工程改造或结合合成生物学方法使水解单糖以较高的得率转化为目的产品<sup>[15]</sup>。因此对于重组策略而言,当前主要的挑战在于高活性水解酶的表达与分泌<sup>[16]</sup>。

随着生物技术的不断进步,尤其是合成生物学领域取得的众多成就,使得人们对于微生物特别是那些模式微生物的改造越来越容易。在重组策略中,人们可以通过合成生物学手段赋予出发菌株本不存在的特性或代谢通路,模拟能天然进行木质纤维素材料水解的微生物的水解酶系统,从而使其可以完成从木质纤维素材料到生物化学品的有效转化<sup>[17]</sup>。

### 3 模拟游离酶系统的重组策略

在自然界中,纤维素水解菌的水解酶系统主

要有两种,其中之一是以里氏木霉 *Trichoderma reesei* 为代表的好氧真菌的游离水解酶系统<sup>[18]</sup>。这些菌株可以向胞外分泌不同类型的游离水解酶,通过这些酶的相互协同作用,实现木质纤维素材料的有效水解。

对于游离酶系统而言,木质纤维素材料的水解效率与培养液中的总酶活力密切相关,而后者又取决于不同类型的水解酶在胞外环境的分泌水平,各种酶的比活力以及酶系统各组分的配比等,因此模拟游离酶系统的重组策略的研究重点在于如何提高水解酶的分泌效率、比活力以及探究合适的酶配比,以求能更好地水解木质纤维素材料。由于这种水解酶系统只是单纯地将细胞所生产的水解酶以游离的形式分泌到胞外,易于模拟,因此目前有多种微生物通过模拟游离酶系统来实现重组策略的 CBP 改造,包括大肠杆菌、枯草芽胞杆菌以及酿酒酵母。

大肠杆菌是最常规的实验室模式微生物和最优良的蛋白表达宿主之一,但是受其分泌能力的限制,无法高效地将水解酶运输到胞外。Shin 等<sup>[19]</sup>通过敲除大肠杆菌外膜蛋白 Lpp 编码基因,使大肠杆菌的外膜结构发生改变,从而可以将胞内表达的半纤维素酶高效地分泌到胞外,通过一个共培养体系的建立,在不添加外源水解酶的情况下,大肠杆菌可以将 63% 的桦木木聚糖转化为乙醇,实现了由木质纤维素材料向生物燃料的转化。由于采用的是添加木聚糖的 LB 复合培养基,因此在一定程度上该 CBP 过程缺乏说服力。Steen 等<sup>[20]</sup>则通过构建大肠杆菌胞外蛋白 OsmY 与半纤维素酶的融合蛋白,将两种木聚糖酶在 OsmY 的协助下运输到胞外,从而使大肠杆菌可以以桦木木聚糖为底物生成 FAEE。在此基础上, Bokinsky 等<sup>[21]</sup>进一步改造大肠杆菌,使其同时表达葡聚糖内切酶、木聚糖内切酶、葡萄糖苷酶以及木糖苷酶,

并通过采用大肠杆菌的内源启动子对其表达水平进行优化,使其能够以经离子液体预处理过的柳枝稷为底物进行生长,同时转化纤维素和半纤维素组分,得到3种生物燃料产品。以上两篇报道均为Keasling课题组所完成,他们成功地实现了在不添加外源水解酶和复合营养物质的前提下,以大肠杆菌为CBP发酵菌株,以木质纤维素材料为底物直接进行生物化学品的转化,具有里程碑式的意义。本课题组<sup>[22]</sup>同样是借鉴OsmY蛋白的辅助,结合合成生物学方法,在12个不同的木聚糖酶组合中快速筛选出活性最强且对菌株生长影响最小的一组,并进一步通过过表达周质空间蛋白伴侣,优化木聚糖酶的表达水平以及过表达支链半纤维素酶来提高了大肠杆菌对半纤维素的水解能力,最终实现了由桦木木聚糖向琥珀酸的有效转化,其琥珀酸产率达到了0.08 g/(h·L),尽管与以葡萄糖等单糖作为底物时还有较大的差距,但在目前的基于重组策略的CBP中处于最高水平。

枯草芽胞杆菌被广泛地用于酶的生产,它可以在寡糖包括纤维糊精上生长。尽管枯草芽胞杆菌可以编码葡聚糖内切酶BsCel5和葡萄糖苷酶,但它并不能在纤维素上生长。Zhang等<sup>[23]</sup>将BsCel5进行易错PCR突变后,筛选出比活力最强的突变酶,然后通过在大肠杆菌中单一的高水平过表达该基因(约占细胞总蛋白的5.9%),可以在144 h内将7 g/L的再生非晶纤维素RAC转化为4 g/L的乳酸。由于枯草芽胞杆菌的分泌能力较强,再加上其自身可以内源表达一部分水解酶,如Zhang等的工作所示,仅需过表达突变的BsCel5这一种酶即可以完成CBP系统的构建,因此在CBP菌株构建上日益受到重视。

Den Haan等<sup>[24]</sup>通过在酿酒酵母中过表达葡聚糖内切酶以及葡萄糖苷酶,使之可以在10 g/L的磷酸疏松纤维素PASC上生长,厌氧生长速率为

0.03 h<sup>-1</sup>,同时还可以同时产生1.0 g/L左右的乙醇。

除以上3种模式微生物外,在其他菌株中也有类似的基于游离酶系统的重组策略的实施,如Hu等<sup>[25]</sup>在牛胃微生物中获得木聚糖酶XynR8的编码基因,并将其转入短乳杆菌*Lactobacillus brevis*中表达,在以木聚糖为主要碳源时,可发酵得到1.7 g/L乳酸和0.44 g/L乙醇。

#### 4 模拟酶复合体系统的重组策略

尽管在模拟游离酶系统的重组策略上人们取得了许多成果,但是由于缺乏有效的协同机制,高水解效率往往需要以水解酶的高水平分泌作为保障,而重组策略的多种出发菌株与本地策略的大多数菌株相比,分泌能力上处于劣势。自然界中存在的另一种纤维素水解菌的水解酶系统是以热纤梭菌*Clostridium thermocellum*为代表的厌氧菌的水解酶复合体系统<sup>[26]</sup>。与*C. thermocellum*的纯纤维素酶制剂相比,酶复合体对于纤维素的比水解速率是前者的2.7~4.7倍<sup>[27]</sup>。通过锚定蛋白与粘合蛋白之间相互作用的组装,在纤维素水解时,纤维素酶复合体被固定在细胞表面,形成纤维素-酶-微生物的三维复合体,从而提高了酶活性及协同效果。因此在分泌水平不占优势的情况下,可以模拟酶复合体系统,通过多聚糖底物-酶-微生物的协同作用来提高水解效率。

Ryu等<sup>[28]</sup>通过细胞表面展示技术将来自于解纤维梭菌*Clostridium cellulolyticum*的3种纤维素酶,包括葡聚糖内切酶Cel5A、葡聚糖外切酶Cel9E以及葡萄糖苷酶与锚蛋白PgsA融合,从而固定在在大肠杆菌表面。该菌株可以实现以PASC为底物进行乙醇的生产,在10 g/L PASC底物浓度下可得到3.59 g/L的乙醇,约为理论得率的95.4%。受分泌策略选择的影响,该CBP体系并不能得到固定在外膜表面的水解酶复合体,但是依然为该目标

的最终实现迈出了重要一步。

You 等<sup>[29]</sup>通过在枯草芽胞杆菌细胞表面展示了一个微支架,将 3 个带有锚定结构域的纤维素酶组分组装成一个纤维素酶复合体。与未结合在细胞表面的纤维素酶复合体相比,结合在细胞表面的纤维素酶复合体对微晶纤维素 Avicel 和 RAC 的水解能力比未结合的分别高 4.5 倍和 2.3 倍,说明酶复合体与微生物之间的协同作用不仅仅在于水解产物被游离细胞所利用,更可能是由于水解的长链产物被定位在其边界层的邻近细胞所吸收。

酿酒酵母的自身蛋白分泌能力较强,因此已有多项研究在酿酒酵母中进行表面展示或水解酶复合体的构建,并验证有水解酶的活性<sup>[30]</sup>。Jeon 等<sup>[31]</sup>将葡聚糖内切酶 EngD 以及葡萄糖苷酶 BglII 的编码基因与酿酒酵母的  $\alpha$ -配对因子的分泌信号区域融合后,在酿酒酵母中过表达。该菌株可在 50 h 内以 20 g/L 葡聚糖为底物时生成 9.15 g/L 乙醇,是理论得率的 80.3%。Wen 等<sup>[32]</sup>在酿酒酵母细胞表面展示了一系列包括单功能,双功能以及三功能的纤维素酶复合体,这些复合体包含一个包含纤维素结合域的微支架,3 个粘合蛋白结合模块,通过酵母的  $\alpha$ -凝集亲和受体连接在酵母细胞表面,以及 3 种带有 C 端锚标的纤维素酶(葡聚糖内切酶、纤维二糖水解酶以及葡萄糖苷酶)。与单功能和双功能的纤维素酶复合体相比,三功能的复合体的酶之间协同及邻近作用更强,在以 PASC 为底物时,可得到 1.8 g/L 的乙醇。Hyeon 等<sup>[33]</sup>将来自于 *C. thermocellum* 的葡聚糖内切酶 E 与来自于食纤维梭菌 *Clostridium cellulovorans* 的葡聚糖内切酶 B 的锚定域融合,然后与酿酒酵母表面的来自于 *C. cellulovorans* 的重组支架蛋白进行组装,得到微纤维素酶复合体,同时该菌还可表达分泌来自于扣囊复膜酵母 *Saccharomycopsis fibuligera* 的  $\beta$ -葡萄糖苷酶。该菌可以以羧甲基纤

维素 CMC 为底物进行发酵产生乙醇,16 h 在 10 g/L CMC 底物浓度下可得到 3.45 g/L 的乙醇,乙醇得率为 0.34 g/g。同样,Hyeon 等<sup>[34]</sup>将此纤维素酶复合体系统移植到谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* 中,该菌株可以有效地降解纤维素。与同样组分的游离酶系统相比,纤维素酶复合体对于 CMC 的活性提高了 2.8 倍。Fan 等<sup>[35]</sup>将利用两个独立的微支架,同时过表达来源于 *C. cellulolyticum* 的葡聚糖内切酶、纤维二糖酶以及葡萄糖苷酶,从而在酿酒酵母细胞表面构建出一个纤维素酶复合体。在锚定微支架的长度优化后,酿酒酵母可以在以微晶纤维素为底物时得到 1.412 g/L 的乙醇。Goyal 等<sup>[36]</sup>则是通过多菌株共培养的方式构建了纤维素酶复合体,其中 3 株酿酒酵母分别表达分泌葡聚糖内切酶,葡聚糖外切酶以及葡萄糖苷酶,另一株酿酒酵母则是通过 Ag  $\alpha$  1 锚标系统将 Scaf-ctf (包括 3 个不同的粘合蛋白以及一个纤维素结合域) 表面展示在细胞表面,最终在这 4 个菌株的共同作用下,构建成了纤维素酶复合体。

乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 也是一种被广泛研究的模式微生物,被用于生产多种大宗化学品,包括乳酸和生物活性物质,此外还可以有效分泌不同大小的重组蛋白和酶。Wieczorek 等<sup>[37]</sup>利用支架蛋白 CipA 展示在细胞表面,该支架包含一个纤维素结合域,并通过另外一个锚标与纤维素酶结合,一个细胞表面可展示大约 10 000 个复合体。

## 5 合成生物学对于一体化生物加工过程的贡献

合成生物学是指将工程学原理应用到生物学上的一门多学科交插的方法,研究人员通过设计或合成基因改造过的微生物来获得目的产品<sup>[38]</sup>。随着这个学科的迅猛发展,合生生物学的许多思

想被应用于 CBP 菌株的构建改造上, 并取得了许多相应成果<sup>[7,20,22]</sup>。

DNA 合成技术已经成为现代分子生物学的基石, 并在合生生物学领域起着关键的作用, 全基因合成、全途径合成乃至全基因组合成已不再是梦想<sup>[39-40]</sup>。随着技术的发展及竞争的激烈, DNA 合成价格逐年下降, 2008 年初进行全基因合成的每对碱基价格平均约为 1 美元<sup>[41]</sup>, 而 4 年后这个价格已经降到不足 30 美分。基因合成不仅为 CBP 菌株构建提供了各种高质量的水解酶基因材料, 也使得符合工程设计原理的标准化基因格式得以实现, 即所谓的“生物砖” (Biobrick), 使得木质纤维素水解途径的构建变得越来越容易。

合成生物学的中心思想是工程化和模块化, 模块化是生物元件标准化原则的天然延伸。DNA 合成价格的下降意味着整个木质纤维素水解途径模块可以 *de novo* 合成, 并用于随后的生物学测试与分析<sup>[42]</sup>。运用模块代谢工程可以将水解途径重新定义为一组不同模块的集合, 来重新评估并消除代谢及调控途径中的瓶颈<sup>[42-43]</sup>, 从而筛选出最优的水解酶组合<sup>[22]</sup>。

## 6 结论与展望

在过去的 5 年中, CBP 菌株开发方面已经取得了许多关键的进步, 人们开始重视起在工业条件下实现高性能的 CBP 过程。对于基于重组策略的 CBP 而言, 纤维素酶系统的高效分泌依然是其中最具挑战性的任务。蛋白质分泌机制的高度复杂性和多样性还没有得到充分了解。虽然目前诸多基于重组策略的 CBP 研究表明, 原则上可以通过重组酶系统对木质纤维素材料进行水解, 但大都采用的是模式底物, 如 CMC、PASC, 而非结晶纤维素。而未来在工业生产中所使用的底物不可能是无定形的或者像那些模式底物一样易于

水解。以模式底物作为底物进行的 CBP 菌株开发, 会在一定程度上掩饰了对水解木质纤维素材料所面临的困难与挑战。纤维素酶系统对于结晶纤维性的水解机制依然还存在许多不确定之处<sup>[44]</sup>。纤维素结合域和纤维素酶的催化结构域之间的协同作用在木质纤维素材料水解中起到关键作用, 但其详尽的分子机制依然并不清晰<sup>[45]</sup>。而这个信息对于生物技术领域中水解酶及酶复合体的设计是至关重要的, 尤其是对于基于重组策略的 CBP 菌株的构建。

在过去的 20 年里, 代谢工程通过对代谢及其他途径的系统分析与分子生物学技术相结合, 加以理性设计并实施基因操作, 从而改善了细胞性状, 为工业微生物菌株的选育做出了重要贡献<sup>[46-47]</sup>。而随着合成生物学的发展, 其与代谢工程的密切联系, 使得这两个学科领域在 CBP 菌株构建方面所发挥的作用越来越大。在未来的 CBP 菌株构建方面, 合成生物学与代谢工程将在以下领域对 CBP 策略的发展继续发挥着影响: 1) 低成本的 DNA 合成技术及高质量的水解酶途径基因材料的提供; 2) *de novo* 水解途径及生物化学品转化途径的构建; 3) 最优水解酶的筛选及途径的协调表达; 4) 微生物的代谢网络分析及目标靶点的选择; 5) 新型遗传工具及基因改造方法的发展等。相信随着人们对于木质纤维素材料水解机理的理解, 以及合成生物学及代谢工程技术的不断发展, 人们必将在可预见的未来攻克 CBP 领域所存在的种种壁垒, 最终实现对于木质纤维素材料的完美利用, 使人类度过石油资源匮乏所带来的这一次能源危机。

## REFERENCES

- [1] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002, 66(3): 506-577.
- [2] Demain AL. Biosolutions to the energy problem. *J*

- Ind Microbiol Biot, 2009, 36(3): 319–332.
- [3] FitzPatrick M, Champagne P, Cunningham MF, et al. A bio-refinery processing perspective: treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technol*, 2010, 101(23): 8915–8922.
- [4] Olson DG, McBride JE, Joe Shaw A, et al. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(3): 396–405.
- [5] Lynd LR, van Zyl WH, McBride JE, et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(5): 577–583.
- [6] Shaw AJ, Podkaminer KK, Desai SG, et al. Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(37): 13769–13774.
- [7] Higashide W, Li Y, Yang Y, et al. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(8): 2727–2733.
- [8] Jin M, Gunawan C, Balan V, et al. Consolidated bioprocessing (CBP) of AFEX-pretreated corn stover for ethanol production using *Clostridium phytofermentans* at a high solids loading. *Biotechnol Bioeng*, 2012, 109(8): 1929–1936.
- [9] Jin M, Balan V, Gunawan C, et al. Consolidated bioprocessing (CBP) performance of *Clostridium phytofermentans* on AFEX-treated corn stover for ethanol production. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(6): 1290–1297.
- [10] Li Y, Tschaplinski TJ, Engle NL, et al. Combined inactivation of the *Clostridium cellulolyticum* lactate and malate dehydrogenase genes substantially increases ethanol yield from cellulose and switchgrass fermentations. *Biotechnol Biofuels*, 2012, 5: 2
- [11] Argyros DA, Tripathi SA, Barrett TF, et al. High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(23): 8288–8294.
- [12] Cripps RE, Eley K, Leak DJ, et al. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metab Eng*, 2009, 11(6): 398–408.
- [13] Tripathi SA, Olson DG, Argyros DA, et al. Development of pyrF-based genetic system for targeted gene deletion in *Clostridium thermocellum* and creation of a *pta* mutant. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(19): 6591–6599.
- [14] Kuck U, Hoff B. New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(1): 51–62.
- [15] la Grange DC, den Haan R, van Zyl WH. Engineering cellulolytic ability into bioprocessing organisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(4): 1195–1208.
- [16] Maki M, Leung KT, Qin WS. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(5): 500–516.
- [17] Elkins JG, Raman B, Keller M. Engineered microbial systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass. *Curr Opin Biotechnol*, 2010, 21(5): 657–662.
- [18] Dashtban M, Schraft H, Qin WS. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(6): 578–595.
- [19] Shin HD, McClendon S, Vo T, et al. *Escherichia coli* binary culture engineered for direct fermentation of hemicellulose to a biofuel. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(24): 8150–8159.
- [20] Steen EJ, Kang Y, Bokinsky G, et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass. *Nature*, 2010, 463(7280): 559–562.
- [21] Bokinsky G, Peralta-Yahya PP, George A, et al. Synthesis of three advanced biofuels from ionic liquid-pretreated switchgrass using engineered *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(50): 19949–19954.
- [22] Zheng Z, Chen T, Zhao M, et al. Engineering *Escherichia coli* for succinate production from hemicellulose via consolidated bioprocessing. *Microb Cell Fact*, 2012, 11(1): 37.
- [23] Zhang XZ, Sathitsuksanoh N, Zhu Z, et al. One-step production of lactate from cellulose as the sole carbon source without any other organic nutrient by recombinant cellulolytic *Bacillus subtilis*. *Metab Eng*, 2011, 13(4): 364–372.
- [24] Den Haan R, Rose SH, Lynd LR, et al. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2007, 9(1): 87–94.
- [25] Hu CY, Chi D J, Chen SS, et al. The direct



- conversion of xylan to lactic acid by *Lactobacillus brevis* transformed with a xylanase gene. *Green Chem*, 2011, 13(7): 1729–1734.
- [26] Doi RH. *Incredible Anaerobes: From Physiology to Genomics to Fuels*. MA: Wiley-Blackwell, 2009, 267–279.
- [27] Lu Y, Zhang YHP, Lynd LR. Enzyme-microbe synergy during cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(44): 16165–16169.
- [28] Ryu S, Karim MN. A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 91(3): 529–542.
- [29] You C, Zhang XZ, Sathitsuksanoh N, et al. Enhanced microbial utilization of recalcitrant cellulose by an *ex vivo* cellulosome-microbe complex. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(5): 1437–1444.
- [30] van Zyl WH, Lynd LR, den Haan R, et al. 2007. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2007, 108: 205–235.
- [31] Jeon E, Hyeon JE, Eun LS, et al. Cellulosic alcoholic fermentation using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of *Clostridium cellulovorans* endoglucanase and *Saccharomycopsis fibuligera* beta-glucosidase. *FEMS Microbiol Lett*, 2009, 301(1): 130–136.
- [32] Wen F, Sun J, Zhao H. Yeast surface display of trifunctional minicellulosomes for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(4): 1251–1260.
- [33] Hyeon JE, Yu KO, Suh DJ, et al. Production of minicellulosomes from *Clostridium cellulovorans* for the fermentation of cellulosic ethanol using engineered recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 310(1): 39–47.
- [34] Hyeon JE, Jeon WJ, Whang SY, et al. Production of minicellulosomes for the enhanced hydrolysis of cellulosic substrates by recombinant *Corynebacterium glutamicum*. *Enzyme Microb Tech*, 2011, 48(4-5): 371–377.
- [35] Fan LH, Zhang ZJ, Yu XY, et al. Self-surface assembly of cellulosomes with two miniscaffoldins on *Saccharomyces cerevisiae* for cellulosic ethanol production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(33): 13260–13265.
- [36] Goyal G, Tsai SL, Madan B, et al. Simultaneous cell growth and ethanol production from cellulose by an engineered yeast consortium displaying a functional minicellulosome. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 89.
- [37] Wieczorek AS, Martin VJ. Engineering the cell surface display of cohesins for assembly of cellulosome-inspired enzyme complexes on *Lactococcus lactis*. *Microb Cell Fact*, 2010, 9: 69.
- [38] Greenwood J. Focus on synthetic biology: what's in a name? *Nature Biotechnol*, 2009, 27(12): 1071–1073.
- [39] Gibson DG, Benders GA, Andrews-Pfannkoch C, et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*, 2008, 319(5867): 1215–1220.
- [40] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, et al. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 2010, 329(5987): 52–56.
- [41] Czar MJ, Anderson JC, Bader J S, et al. Gene synthesis demystified. *Trends Biotechnol*, 2009, 27(2): 63–72.
- [42] Yadav VG, De Mey M, Giaw Lim C, et al. The future of metabolic engineering and synthetic biology: towards a systematic practice. *Metab Eng*, 2012, 14(3): 233–241.
- [43] Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE J, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science*, 2010, 330(6000): 70–74.
- [44] Wilson DB. Cellulases and biofuels. *Curr Opin Biotechnol*, 2009, 20(3): 295–299.
- [45] Mazzoli R, Lamberti C, Pessione E. Engineering new metabolic capabilities in bacteria: lessons from recombinant cellulolytic strategies. *Trends Biotechnol*, 2012, 30(2): 111–119.
- [46] Koffas M, Roberge C, Lee K, et al. Metabolic engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 1999, 1: 535–557.
- [47] Tyo KE, Alper HS, Stephanopoulos GN. Expanding the metabolic engineering toolbox: more options to engineer cells. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(3): 132–137.

(本文责编 陈宏宇)