

基于一体化生物加工过程的木质纤维素合成生物丁醇的研究进展

吕阳¹, 蒋羽佳¹, 陆家声¹, 章文明^{1,2}, 周杰^{1,2}, 董维亮^{1,2}, 信丰学^{1,2}, 姜岷^{1,2}

1 南京工业大学 生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 211816

2 南京工业大学 江苏先进生物与化学制造协同创新中心 (SICAM), 江苏 南京 211816

吕阳, 蒋羽佳, 陆家声, 等. 基于一体化生物加工过程的木质纤维素合成生物丁醇的研究进展. 生物工程学报, 2020, 36(12): 2755-2766.

Lü Y, Jiang YJ, Lu JS, et al. Advances in the synthesis of biobutanol by consolidated bioprocessing from lignocellulose. Chin J Biotech, 2020, 36(12): 2755-2766.

摘要: 一体化生物加工过程 (Consolidated bioprocessing, CBP) 是在一个生物反应器中完成水解酶生产、酶解、微生物发酵等多步生物过程的工艺。因其过程步骤简单、成本低, 被认为是生产二代生物燃料最具发展前景的工艺。然而, 由于木质纤维素降解与丁醇合成路径的复杂性, 鲜有天然微生物可以直接利用木质纤维素合成丁醇。随着合成生物学技术的发展, 在纤维素降解梭菌中引入丁醇合成途径, 可以使单菌利用木质纤维素直接合成丁醇。但是该策略存在菌株代谢负荷重、丁醇产量低等问题。而混菌策略可以通过不同菌株的劳动分工, 使单菌代谢负担得到缓解, 因此进一步提高了丁醇合成效率。文中从单菌策略和混菌策略分析了近年来一体化生物加工过程利用木质纤维素合成丁醇的相关研究进展, 为生物丁醇以及其他生物燃料的一体化生物加工过程研究提供借鉴。

关键词: 一体化生物加工过程, 生物丁醇, 木质纤维素, 单菌策略, 混菌策略

Received: April 11, 2020; **Accepted:** May 20, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (Nos. 2018YFA0902200, 2019YFA09005600), National Natural Science Foundation of China (Nos. 31961133017, 21978130, 21978129).

Corresponding authors: Fengxue Xin. Tel/Fax: +86-25-58139927; E-mail: xinfengxue@njtech.edu.cn

Min Jiang. Tel/Fax: +86-25-58139927; E-mail: bioengine@njtech.edu.cn

国家重点研发计划 (Nos. 2018YFA0902200, 2019YFA09005600), 国家自然科学基金 (Nos. 31961133017, 21978130, 21978129) 资助。

网络出版时间: 2020-05-29

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200528.2025.002.html>

Advances in the synthesis of biobutanol by consolidated bioprocessing from lignocellulose

Yang Lü¹, Yujia Jiang¹, Jiasheng Lu¹, Wenming Zhang^{1,2}, Jie Zhou^{1,2}, Weiliang Dong^{1,2}, Fengxue Xin^{1,2}, and Min Jiang^{1,2}

1 State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

2 Jiangsu National Synergetic Innovation Center for Advanced Materials (SICAM), Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, China

Abstract: Consolidated bioprocessing (CBP) is a multi-step process in a bioreactor, which completes hydrolase production, enzymatic hydrolysis, and microbial fermentation. It is considered to be the most promising process for the production of second-generation biofuels because of its simple steps and low cost. Due to the complexity of lignocellulose degradation and the butanol synthesis pathway, few wild microorganisms can directly utilize lignocellulose to synthesize butanol. With the development of synthetic biology, single-bacterium directly synthesizes butanol using lignocellulose by introducing a butanol synthesis pathway in the cellulolytic *Clostridium*. However, there are still some problems such as heavy metabolic load of single bacterium and low butanol yield. Co-culture can relieve the metabolic burden of single bacterium through the division of labor in different strains and can further improve the efficiency of butanol synthesis. This review analyzes the recent research progress in the synthesis of biobutanol using lignocellulose by consolidated bioprocessing from both the single-bacterium strategy and co-culture strategy, to provide a reference for the research of butanol and other biofuels.

Keywords: consolidated bioprocessing, biobutanol, lignocellulose, single bacterium strategy, co-culture strategy

丁醇 (*n*-butanol) 是一种有 4 个碳原子的短链醇。因其较高的能量含量、较低的挥发性、吸水性和腐蚀性而被认为是优于生物乙醇的生物燃料。此外,它还是多种化学和纺织工程的重要溶剂和化学中间体^[1-4]。丁醇传统上是由产溶剂的梭状芽孢杆菌 (*Clostridium* species) 通过丙酮-丁醇-乙醇 (Acetone-butanol-ethanol, ABE) 发酵生产的。ABE 发酵曾是全球规模最大的工业发酵之一,然而由于其合成一般以粮食或其他淀粉质农副产品为原料,成本高,阻碍了生物丁醇的工业化进程。

木质纤维素是世界上储量最丰富的可再生资源,通过生物加工过程将其转化为高能量的生物燃料,可大大节约发酵成本^[5-8]。但由于木质纤维素复杂的结构,产溶剂梭菌一般不能利用木质纤维素直接合成丁醇^[9-13]。目前,已经设计了各种策略来实现该过程,包括分步水解发酵 (Separate hydrolysis and fermentation, SHF)、同步糖化发酵 (Simultaneous saccharification and fermentation,

SSF) 和一体化生物加工过程 (Consolidated bioprocessing, CBP)^[14-16]。其中,SHF 和 SSF 均需要额外添加昂贵的水解酶且发酵工艺复杂,大大增加了生产成本。而 CBP 不需要单独的水解酶生产和纤维素糖化等步骤,即在一个生物反应器中完成水解酶生产、酶解、微生物发酵等多步生物过程^[17-18]。目前通过 CBP 利用木质纤维素合成生物丁醇主要有两种策略。一种是单菌策略,包括在纤维素降解菌中引入丁醇合成途径或在产溶剂梭菌中引入纤维素水解酶体系。但是由于纤维素降解的复杂机理,鲜有通过将纤维素降解基因引入产溶剂梭状芽孢杆菌生产丁醇的成功案例;而将丁醇合成途径引入纤维素降解菌中,尽管可以实现木质纤维素到丁醇的生物转化,但是由于丁醇合成途径的复杂性,单菌代谢负荷重,仍存在丁醇产量低等问题。另一种是混菌策略,将纤维素降解菌株和产溶剂菌株共培养,通过劳动分工缓解单菌代谢负担,提高丁醇合成效率^[19]。本文综述了将丁醇代

谢路径引入纤维素降解梭菌及构建共培养混菌体系实现木质纤维素合成丁醇的最新研究。

1 通过代谢途径改造实现单菌一体化生物加工过程利用木质纤维素合成丁醇

1.1 解纤维梭菌

解纤维梭菌 *Clostridium cellulolyticum* 是一种能够分泌纤维小体高效降解纤维素的中温纤维素降解菌。纤维小体是一种具有降解纤维素、半纤维素和胶质能力的胞外酶复合体。因此,解纤维梭菌具有较高的天然纤维素水解活性。通过引入

L-缬氨酸合成途径,可将 2-酮酸中间代谢产物转化为醇,实现直接利用木质纤维素合成异丁醇^[20-21](图 1)。改造后的解纤维梭菌可以利用 10 g/L 的结晶纤维素合成 0.66 g/L 的异丁醇,这是首次通过单菌发酵利用纤维素合成异丁醇的报道(表 1)。虽然远低于以葡萄糖基为底物的产量(15–20 g/L),但是 L-缬氨酸合成途径的成功构建也为利用木质纤维素合成异丁醇提供了更多选择^[21]。

此外,辅酶 A 依赖途径的引入可以实现利用纤维素一体化生物加工过程合成丁醇^[22-23](图 1)。利用巯基酶启动子 P_{thi} ,将丙酮丁醇梭菌 *Clostridium*

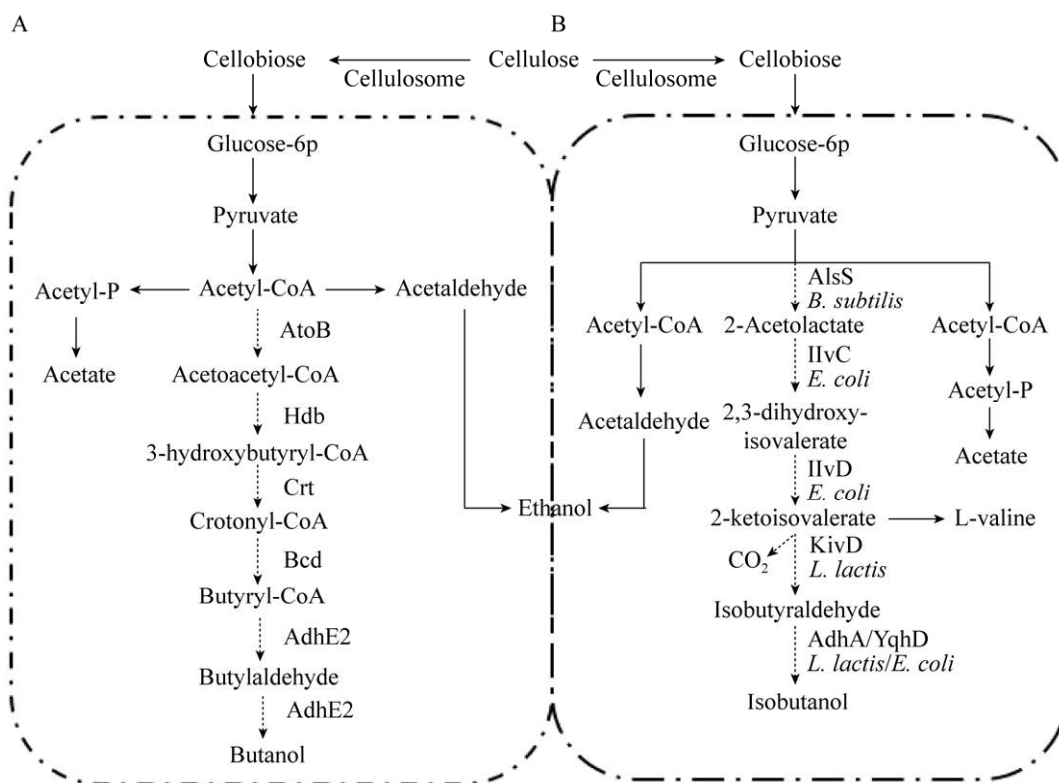


图 1 工程化解纤维梭菌的代谢途径,通过一体化生物加工过程(CBP)利用木质纤维素合成丁醇^[20,22]

Fig. 1 The metabolic pathway of engineered *C. cellulolyticum* to synthesize butanol from lignocellulose through bioprocessing process (CBP)^[20,22]. Introduction of butanol and isobutanol synthesis modules (shown in broken lines). (A) The butanol synthesis pathway in engineered *C. cellulolyticum*. The key enzymes in this pathway are thiolase (*atoB* from *Escherichia coli*), 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (*hbd*), crotonase (*crt*), butyryl-CoA dehydrogenase (*bcd*) and bifunctional butyraldehyde/butanol dehydrogenase (*adhE2*) (both from *C. acetobutylicum*). (B) Isobutanol synthesis pathway in engineered *C. cellulolyticum*. The key enzymes in this pathway are α -acetolactate synthase (*alsS* from *Bacillus subtilis*), acetohydroxy acid isomer reductase (*ilvC* from *E. coli*), dihydroxy acid dehydratase (*ilvD* from *E. coli*), keto acid decarboxylase (*kivD* from *Lactococcus lactis*) and alcohol dehydrogenases (*adh* from *E. coli* and *L. lactis*).

表 1 工程化纤维素降解梭菌通过 CBP 利用木质纤维素合成丁醇/异丁醇

Table 1 Engineered cellulolytic *Clostridium* species synthesize butanol/isobutanol from lignocellulose through CBP

Strains	Metabolic construction	Solvent produced	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	References
<i>C. cellulolyticum</i>	Introduction of the keto acid pathway	Isobutanol	0.66	0.07	0.003 10	[20]
<i>C. cellulolyticum</i>	Introduction of the CoA-dependent pathway	Butanol	0.12	0.01	0.000 25	[22]
<i>C. cellulovorans</i>	Overexpression of <i>adhE</i> from <i>C. acetobutylicum</i>	Butanol	1.42	0.39	0.005 60	[33]
<i>C. cellulovorans</i>	Overexpression of <i>adhE</i> , <i>ctfA</i> , <i>ctfB</i> , <i>adc</i> from <i>C. acetobutylicum</i>	Butanol	3.47	0.08	0.041 30	[29]
<i>C. thermocellum</i>	Introduction of the keto acid pathway	Isobutanol	5.40	0.07	0.072 00	[39]

acetobutylicum 中的巯基酶基因 (*atoB*)、3-羟基丁基辅酶 A 脱氢酶基因 (*hbd*)、巴豆酸酶基因 (*crt*)、丁酰辅酶 A 脱氢酶基因 (*bcd*) 和丁醛/丁醇脱氢酶基因 (*adhE2*) 导入解纤维梭菌合成了 0.12 g/L 的丁醇 (表 1)。与异丁醇合成途径相比, 该策略下丁醇的合成不受 2-酮异戊酸转移产生二氧化碳造成的碳损失影响, 理论上丁醇的产率应该更高。然而, 以结晶纤维素为底物得到的丁醇浓度仍然比淀粉基底物低得多。通过功能酶的表达和代谢中间产物解析的联合方法, 去除副产物乙酸和乳酸, 可以进一步提高丁醇的效价。但是由于多酶转换系统的复杂性 (异丁醇需要 5 个步骤, 正丁醇需要 6 个步骤), 所以通过在解纤维梭菌中引入丁醇合成途径合成高浓度丁醇仍然面临重大挑战^[21]。

1.2 嗜纤维梭菌

嗜纤维梭菌 *Clostridium cellulovorans* 可以分泌多种纤维素酶, 能降解有效降解植物细胞壁的纤维素、木聚糖等。而且嗜纤维梭菌还具有广泛的碳谱, 包括多糖 (纤维素、木聚糖、果胶)、双糖 (纤维二糖、蔗糖、麦芽糖) 和单糖 (葡萄糖、半乳糖、果糖)。更重要的是, 相比于需要引入多个相关基因才能实现丁醇合成的解纤维梭菌, 嗜纤维梭菌可通过 *adhE* 一步转化, 实现其主要代谢产物丁酸到丁醇的转化 (图 2), 所以在嗜纤维梭菌中构建丁醇合成途径更容易 (图 2)。因此, 嗜纤维梭菌是一体化生物加工过程利用木质纤维素合成丁醇较好的宿主。

通过在嗜纤维梭菌中引入丙酮丁醇梭菌的 *adhE2*, 合成 1.42 g/L 的丁醇, 同时丁酸的产率降

低了 80% (表 1)。但该过程中的丁醇产量依然较低, 且存在较高的乙酸积累 (1.60 g/L)。为了进一步提高丁醇产量, 实现酸到醇的回补, 在引入 *adhE* 的基础上, 过量表达 *ctfA-ctfB* 编码的辅酶 A 转移酶以及其临近编码乙酰乙酸脱羧酶的 *adc* 最终可以合成 2.27 g/L 丁醇^[24-26]。此外, 丁醇毒性 (即高浓度丁醇抑制微生物生长和导致细胞死亡) 是梭菌生产高滴度溶剂的主要障碍。因此, 增强菌株的丁醇耐受性也是一种提高丁醇滴度的有效方法。目前已被验证的有效方法是微生物适应性进化^[27-28]。*C. cellulovorans* DSM743B ($\Delta spo0A$) 在额外添加了正丁醇 (从 3 g/L 到 12 g/L) 的培养基中进化。经过了 83 d 的 4 轮进化, 在初始浓度为 12 g/L 丁醇的培养基中培养 48 h, 菌株的生物量可以达到空白培养基的 45.2%。进化后的菌株利用巯基酶启动子 P_{thi} 再进行上述工程化改造, 丁醇产量可提高至 3.47 g/L^[29] (表 1)。

与解纤维梭菌相比, 嗜纤维梭菌的代谢工程改造更简单 (嗜纤维梭菌为一步, 而解纤维梭菌为 6 步), 为实现 CBP 提供了更好的基础。通过去除副产物, 包括酸和乙醇, 可以进一步提高丁醇的效价。例如, 敲除丁酸形成途径中的丁酸激酶基因 (*buk*), 以及在乙酸形成途径中的乙酸激酶基因 (*ack*) 或磷酸转乙酰酶基因 (*pta*), 都可以增加丁醇的产量^[30]。同时, 过量表达丁醇同化基因, 如丁醇脱氢酶基因 (*bdh*) 将进一步消除乙醇的形成并增加丁醇的滴度和收率^[31]。此外, 也可以尝试通过敲除产 H_2 相关的氢化酶基因进一步增加丁醇的产量^[32]。

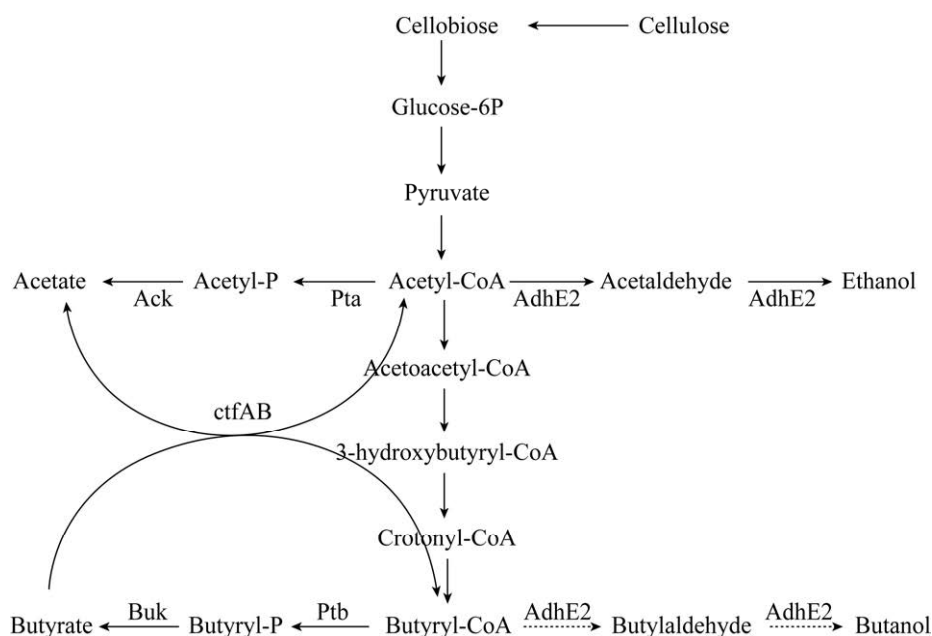


图 2 工程化嗜纤维梭菌的代谢途径，通过一体化生物加工过程 (CBP) 利用木质纤维素合成丁醇^[33]

Fig. 2 The metabolic pathway of engineered *C. cellulovorans* to synthesize butanol from lignocellulose through bioprocessing process (CBP). Introduction of butanol synthesis modules (shown in broken lines)^[33].

1.3 热纤维梭菌

嗜热菌株在高温条件下 (例如 50–60 °C) 生长, 与中温相比, 高温不仅可以促进纤维素降解, 还可以降低污染风险^[34]。热纤维梭菌 *Clostridium thermocellum* 是很有潜力的嗜热型 CBP 宿主, 目前已被广泛用于生产生物乙醇^[35-38]。消除副产物代谢途径后, 利用 60 g/L 的结晶纤维素可以合成 22.4 g/L (0.39 g/g) 的乙醇, 达到理论产量的 75%^[37]。

热纤维梭菌是一种天然的乙醇生产宿主, 因此利用其合成丁醇首先要构建丁醇或异丁醇的合成途径。由于热纤维梭菌与解纤维梭菌有相似的代谢产物谱, 因此尝试将解纤维梭菌异丁醇合成途径的构建方法应用于热纤维梭菌 (图 1B)。然而在实际构建过程中某些启动子并不能完全匹配。例如, 利用乳酸乳球菌 *kivd* 或枯草芽孢杆菌 *alsS* 驱动的含有 *gapdh* 的质粒转化到热纤维梭菌均未取得成功。替换为热纤维梭菌的启动子后该问题得到解决。其利用纤维素可生产 5.4 g/L 的异丁醇, 相当于理论收

率的 41%, 是通过单一菌株利用纤维素直接生产异丁醇的最高水平^[39]。由于嗜热梭菌比嗜温梭菌水解效率更高, 所以异丁醇生产率也更高, 最高可达到 0.072 g/(L·h) (表 1)。因此, 嗜热梭菌比嗜温梭菌在纤维素降解速率、效率以及丁醇滴度方面都有很大的优势, 是极具潜力的单菌 CBP 产丁醇宿主。

然而, 关于热纤维梭菌生产丁醇的报道很少。因为热纤维梭菌和解纤维梭菌相似, 均不具有丁酸合成途径, 所以需要从乙酰辅酶 A 重新构建丁醇合成途径。因此, 其他具有丁酸合成能力的嗜热纤维素降解菌株, 例如热厌氧热解糖梭菌 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, 可能是利用纤维素合成丁醇的更好选择^[2,11]。此外, 这些嗜热纤维素降解菌株也是天然乙醇的生产宿主。在设计使用嗜热纤维素降解菌株的 CBP 丁醇生产宿主时, 也应考虑削弱其乙醇转化能力, 以促使其更多地还原成丁醇。

2 通过共培养实现利用木质纤维素混菌一体化生物加工过程合成丁醇

通过单菌 CBP 实现利用木质纤维素合成丁醇目前还存在诸多问题。首先,代谢工程改造相对困难,相比于大肠杆菌等模式微生物,梭菌的基因编辑工具还不够成熟。其次,通过单个菌株实现水解酶生产、纤维素糖化、微生物发酵这一复杂过程会造成单菌代谢负荷过重。因此,将合成路径分配到不同的宿主中,可通过分工合作的混菌系统完成单个菌株较难完成的任务^[40]。设计和建立人工混菌体系利用木质纤维素合成丁醇主要通过共培养纤维素降解菌和丁醇合成菌的混菌,包括细菌-细菌和真菌-细菌。目前混菌体系利用纤维素合成丁醇主要包括以下 3 种^[41]。

2.1 嗜热厌氧纤维素降解梭菌和产溶剂梭菌共利用纤维素合成丁醇

以结晶纤维素作为唯一的底物,通过顺序共培养(两菌一前一后顺序接入)解纤维梭菌和丙酮丁醇梭菌仅产生乙酸和丁酸,这表明发酵过程在丙酮丁醇梭菌的产酸阶段已经停止,没有继续向醇转化^[42]。因此猜测溶剂产量低主要是因为还原糖释

放速率缓慢,底物酶解速率受限。如前文所述,嗜热纤维素降解菌株纤维素水解效率更高,这表明该菌株将成为混菌体系利用木质纤维素合成丁醇的更优选择。

在热纤维梭菌和产溶剂梭菌组成的共培养体系中,热纤维梭菌主要负责产酶和纤维素糖化,产溶剂梭菌则负责丁醇的合成^[43]。而不同的产溶剂梭菌对混菌体系中丁醇的产量有较大影响^[44-45](表 2)。当共培养热纤维梭菌与丙酮丁醇梭菌或拜氏梭菌时,丁醇浓度只有 2.05 和 1.00 g/L(表 2)。而连续培养热纤维梭菌和糖丁基梭菌 N1-4,利用纤维素可以合成 7.90 g/L 的丁醇(表 2)。这是迄今为止从结晶纤维素中合成丁醇的最高记录^[44]。这说明不同种属的产溶剂梭菌对丁醇产量影响较大,猜测其原因可能是产溶剂梭菌中负责溶剂合成的基因在不同的菌群中被诱导表达的程度不同。因此,在未来的研究中,应该多集中于优化微生物菌群的培养条件(包括接种方法和混合比例),菌株之间的生态关系以及提高丁醇浓度和生产率的基因工程改造等问题。此外,增加丁醇合成途径中的还原力也有助于提高丁醇产量,因此设计低产氢的产丁醇菌株有望产生更高比例的丁醇^[46]。

表 2 混菌体系通过 CBP 利用木质纤维素合成丁醇

Table 2 Co-culture system synthesize butanol from lignocellulose through CBP

Microbial consortia	Culture strategy	Substrates	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	References
<i>C. cellulolyticum</i> and <i>C. acetobutylicum</i>	Mesophilic co-culture Dual pH adjustment	Cellulose	0.35	0.02	0.000 52	[48]
<i>C. celevecrescens</i> and <i>C. acetobutylicum</i>	Mesophilic co-culture	Filter paper	2.69	0.13	0.014 00	[49]
Microbial consortia N3 and <i>C. acetobutylicum</i>	Mesophilic co-culture	Filter paper	3.73	0.15	0.020 00	[49]
<i>C. cellulovorans</i> and <i>C. beijerinckii</i>	Mesophilic co-culture	Corn cobs (alkali-treated)	11.50	0.14	0.096 00	[53]
<i>C. thermocellum</i> and <i>C. acetobutylicum</i>	Sequential co-culture Temperature shift	Cellulose	—	—	—	[54]
<i>C. thermocellum</i> and <i>C. beijerinckii</i>	Sequential co-culture Temperature shift	Cellulose	2.05	0.05	0.009 50	[44]
<i>C. thermocellum</i> and <i>C. saccharoperbutylacetonicum</i>	Sequential co-culture Temperature shift	Cellulose	7.90	0.20	0.037 00	[44]

虽然通过将热纤维梭菌和产溶剂梭菌共培养实现了丁醇产量的突破,但是由于嗜热厌氧菌株和产溶剂梭菌温度条件不相同,需要进行双阶段发酵。第一阶段先在 60 °C 条件下热纤维梭菌糖化纤维素,第二阶段在 30 °C 由产溶剂梭菌利用还原糖发酵合成丁醇。菌株不匹配的生长温度要求纤维素水解和丁醇发酵步骤需要一个额外的冷却系统,这将大大影响丁醇的生产效率^[47]。同时由于两种菌株需要顺序共培养,该混菌体系还存在发酵时间延长等问题。因此,如果实现两个步骤在同一温度, CBP 的混菌体系则更经济可行。

2.2 中温梭菌利用纤维素合成丁醇

中温混菌体系,即共培养的菌株均在中温条件下生长。该体系中的菌株分为两部分,一部分负责纤维素的降解糖化,另一部分负责丁醇的合成。解纤维素梭菌和丙酮丁醇梭菌的混菌体系可在同一温度下合成 0.35 g/L 丁醇,但是需要采用双 pH 培养系统^[48](表 2)。在 pH 7.0 的条件下培养解纤维素梭菌,然后在接种丙酮丁醇梭菌后将 pH 值保持在 6.0。接入丙酮丁醇梭菌后,解纤维梭菌的纤维素降解活性明显提高。这说明解纤维梭菌可以在 pH 较低的共培养条件下继续生存和分泌纤维素酶,且丙酮丁醇梭菌通过中间代谢产物的移除可以提高解纤维梭菌的酶活。

但是单一纤维素降解菌株的纤维素降解能力较弱导致丁醇产量低。因此,通过高效降解纤维素的菌群与产溶剂梭菌共培养是一种有前景的策略。中温微生物菌群 N3 是从牛粪中分离得到的一种高效的天然纤维素降解菌群。N3 的主要组成部分包括多枝梭菌、速生梭菌、乙酰基嗜蛋白菌、非洲脱硫弧菌等。中温微生物菌群 N3 和速生梭菌 N3-2 均能利用纤维素中产生高浓度的还原糖(约 4.50 g/L)^[49]。微生物菌群 N3 和丙酮丁醇梭菌的混菌体系利用纤维素合成 3.73 g/L 丁醇,而速生梭菌 N3-2 和丙酮丁醇梭菌共培养仅合成 2.69 g/L 丁醇(表 2)。这说明和单独的速生梭菌相比,天然

纤维素降解菌群在纤维素降解过程中存在协同作用。此外,菌群 N3 或单独的速生梭菌 N3-2 在混菌体系中不仅仅为丙酮丁醇梭菌提供还原糖,其累积的脂肪酸(乙酸和丁酸)也作为中间产物对共培养体系中丁醇的生成有刺激作用^[41,50]。

相比于天然微生物菌群,人工微生物菌群没有经历长期的共同进化,很难达到天然微生物菌群的协同作用。因此,在设计人工微生物菌群可以利用多元模块化代谢工程(Multivariate modular metabolic engineering, MMME)。其工程思路是将整个代谢通路分成由不同菌株所负责的不同模块,再利用代谢工程技术与合成生物学调控元件对各个模块的强度进行调节以及协调不同模块的表达,最终达到对整个代谢通路的优化。MMME 是优化代谢途径和菌株相互作用的一个通用工具^[51-52]。例如, Wen 等设计了一个嗜纤维梭菌和拜氏梭菌的双梭菌体系合成丁醇^[53]。优化前,该混菌体系在 80 h 内降解了 68.6 g/L 碱处理玉米棒芯(Alkali extracted corn cobs, AECC),生成了 11.8 g/L 溶剂,其中包括 8.30 g/L 丁醇。依据 MMME 优化策略,敲除嗜纤维梭菌中的副产物形成基因,过量表达丁醇合成相关的主要基因——丁酸激酶,从而使碳流偏向合成丁醇。同时,为了提高木糖利用率和溶剂产量,对拜氏梭菌有机酸再利用和戊糖利用相关基因进行了改造。双梭状芽孢杆菌混菌体系最终降解了 83.2 g/L 的 AECC,产生 22.1 g/L 溶剂,其中包括 11.5 g/L 丁醇,丁醇产量提高了 38.55%(表 2)。此次以木质纤维素为底物的 ABE 的效价与以淀粉为底物的 ABE 的效价相当。虽然中温微生物混菌体系在恒温培养方面具有明显的优势,但是在纤维素降解能力上和嗜热菌株还存在一定差距,未来仍需要进一步提高其纤维素降解能力,使其更加经济可行。

2.3 纤维素降解霉菌和产溶剂工程化大肠杆菌利用纤维素合成丁醇

目前,最高效的纤维素降解系统仍来自需氧丝

状真菌里氏木霉 RUT C30, 它是具有较高纤维素酶活性的宿主, 是降解纤维素的最佳选择^[54-58]。但是, 由于里氏木霉 (好氧) 和产溶剂菌株 (严格厌氧) 的拮抗培养条件, 很少有研究报道使用霉菌-细菌混菌体系生产丁醇。2013年, Minty 等成功设计了里氏木霉-大肠杆菌的真菌-细菌混菌体系。该体系分泌游离的纤维素酶将木质纤维素水解为还原糖, 同时工程化大肠杆菌 NV3 pSA55/69 将可溶性还原糖同化为丁醇^[59] (图 3)。里氏木霉和大肠杆菌 NV3 pSA55/69 在培养条件和培养基组成方面具有相容性, 均可在有氧条件下良好生存并分泌纤维素酶合成丁醇。最终该混菌体系可利用 20 g/L 的微晶纤维素合成 1.88 g/L 的异丁醇, 达到理论最大值的 62%。此外, 因为大肠杆菌可以通过代谢工程改造在有氧条件下合成丁醇, 所以该过程全程可在有氧条件下进行, 节约了厌氧处理的成本^[59]; 且这一过程不需要外源添加其他昂贵的营养物。因此, 该真菌-细菌混菌体系不仅具有较高相容性可以合成丁醇, 而且代表了一个通用的 CBP 平台, 也可以尝试应用于其他微生物的纤维素分解和发酵过程中。该体系也实现了真菌细菌的协同作用,

证明了混菌体系的强大潜力, 为未来更多样化的混菌研究 (包括通过双菌、三菌或者多菌的共培养完成更多复杂的任务) 提供了理论支持。

3 结论

生物丁醇的研究已有百余年, 传统淀粉材料成本高的问题仍阻碍其大规模生产。其中有效降低成本的方法是以廉价的木质纤维素为底物。由于纤维素降解系统的复杂性, 目前在产溶剂梭菌中表达纤维素酶的研究尚未取得较大进展。然而, 随着改造工具的发展和成熟, 通过在各种纤维素降解菌中引入丁醇合成模块, 可以实现木质纤维素到丁醇的生物转化。在单菌 CBP 中, 嗜热菌株比嗜温菌株纤维素水解效率高, 是一种优选的单菌 CBP 平台。但是, 与淀粉基材料相比, 利用纤维素合成的丁醇产量仍然处于较低水平, 阻碍了工业应用。而这些问题通过混菌 CBP 得到进一步解决。基于混菌共培养系统, 将复杂的产酶、水解、代谢等过程分配给不同的微生物, 通过不同微生物之间的协同合作实现纤维素的有效利用和丁醇的高效生产。

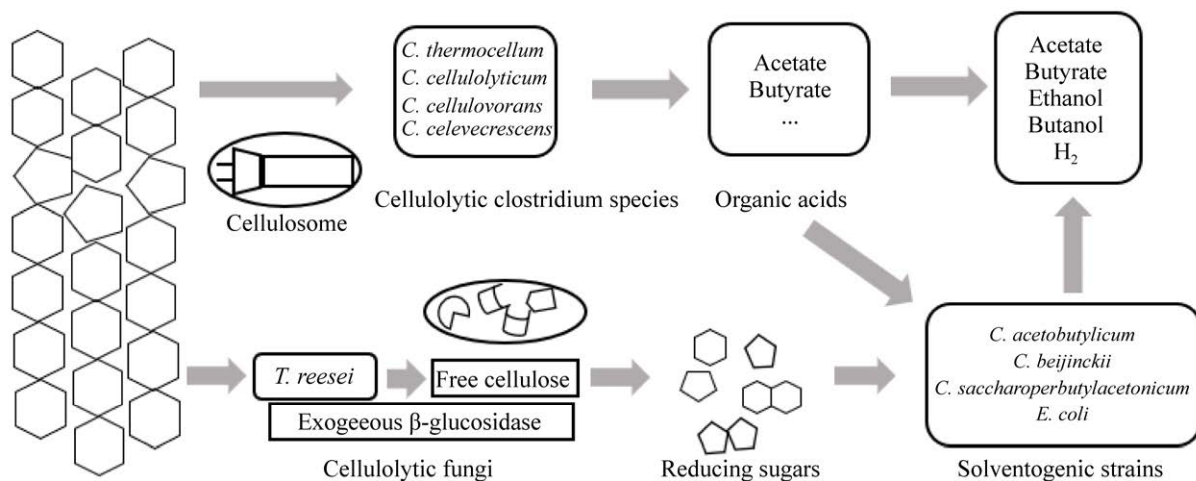


图 3 通过一体化生物加工过程 (CBP) 利用木质纤维素生产丁醇的菌株共培养的示意图^[60]

Fig. 3 Schematic diagram of co-culture for butanol production from lignocellulose through the bioprocessing process (CBP)^[60]. Cellulolytic *Clostridium* species adheres to cellulose through cellulosome, while *Trichoderma reesei* can secrete free cellulase and hydrolyze cellulose into cellobiose and glucose by supplementing with β -glucosidase. These reducing sugars can be metabolized by *Clostridium* species or *E. coli*.

4 展望

传统利用木质纤维素合成丁醇的工艺原料要经过酸/碱高温水解和酶解的方法处理,该处理过程大大增加了生产成本。一体化生物加工过程(CBP)不需要独立的水解酶生产和纯化步骤,即在一个生物反应器中完成水解酶的生产、木质纤维素的水解、水解多糖的发酵等多步生物过程,因此是一种更简单、高效、低成本的生物加工方法。在单菌 CBP 中,由于纤维素中还原糖的释放速率仍然是主要限速步骤,因此通过对纤维素降解酶系的进一步研究,实现在产丁醇宿主中表达纤维素降解酶系,可能会提供另一种有潜力的丁醇合成策略。另一方面,虽然混菌 CBP 展现出了强大优势,但是距离工业化应用还存在较大距离,例如不同菌株生长条件差别大、菌株之间存在竞争关系、协作机制不明晰等。因此,为了寻求更稳定高效的混菌体系提高丁醇产量,未来的研究应重点集中在以下几方面。首先,可以开发由生长条件相近菌株构成的人工混菌体系,例如嗜纤维梭菌和产溶剂梭菌。其次,在处理复杂的生物合成过程时可以借助 MMME 优化代谢途径和菌株相互作用。最后,还可以利用合成生物技术从最基本的元件一步步合成相应功能的细胞工厂和分子机器。总之,一体化生物加工过程利用木质纤维素合成丁醇需要对单菌的调控以及菌株之间的协作机制有更多的深入研究,通过大量的协调优化从而获得高产量的生物丁醇。

REFERENCES

- [1] Dürre P. Butanol formation from gaseous substrates. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(6): fnw040.
- [2] Poehlein A, Solano JDM, Flitsch SK, et al. Microbial solvent formation revisited by comparative genome analysis. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10(1): 58.
- [3] Shanmugam S, Sun CR, Zeng XM, et al. High-efficient production of biobutanol by a novel *Clostridium* sp. strain WST with uncontrolled pH strategy. *Bioresour Technol*, 2018, 256: 543–547.
- [4] Xin FX, Dong WL, Jiang YJ, et al. Recent advances on conversion and co-production of acetone-butanol-ethanol into high value-added bioproducts. *Crit Rev Biotechnol*, 2018, 38(4): 529–540.
- [5] Sun CR, Zhang SF, Xin FX, et al. Genomic comparison of *Clostridium* species with the potential of utilizing red algal biomass for biobutanol production. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 42.
- [6] Zhou ZY, Li Z, Zhang QH, et al. Research progress in production of butanol from lignocellulose. *Microbiol China*, 2019, 46(12): 3461–3468 (in Chinese).
周智友,李志,张庆华,等.利用木质纤维素生产丁醇的研究进展. *微生物学通报*, 2019, 46(12): 3461–3468.
- [7] Jiang Y, Liu JL, Jiang WH, et al. Current status and prospects of industrial bio-production of n-butanol in China. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(7): 1493–1501.
- [8] Xiao M, Wu YD, Xue C. Biorefinery and research progress of butanol production. *Chin J Bioprocess Eng*, 2019, 17(1): 60–71 (in Chinese).
肖敏,吴又多,薛闯.丁醇的生物炼制及研究进展. *生物加工过程*, 2019, 17(1): 60–71.
- [9] Shukor H, Abdeshahian P, Al-Shorgani NKN, et al. Saccharification of polysaccharide content of palm kernel cake using enzymatic catalysis for production of biobutanol in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Bioresour Technol*, 2016, 202: 206–213.
- [10] Zhang J, Zong WM, Hong W, et al. Exploiting endogenous CRISPR-Cas system for multiplex genome editing in *Clostridium tyrobutyricum* and engineer the strain for high-level butanol production. *Metab Eng*, 2018, 47: 49–59.
- [11] Dürre P. Fermentative production of butanol — the academic perspective. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(3): 331–336.
- [12] Hijosa-Valsero M, Paniagua-García AI, Díez-Antolínez R. Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(21): 8041–8052.

- [13] Hou XR, From N, Angelidaki I, et al. Butanol fermentation of the brown seaweed *Laminaria digitata* by *Clostridium beijerinckii* DSM-6422. *Bioresour Technol*, 2017, 238: 16–21.
- [14] Xin FX, Wu YR, He JZ. Simultaneous fermentation of glucose and xylose to butanol by *Clostridium* sp. strain BOH3. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(15): 4771–4778.
- [15] Alcalde M. Engineering the ligninolytic enzyme consortium. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(3): 155–162.
- [16] Qin AD, Duns GJ, Pan T, et al. Consolidated processing of biobutanol production from food wastes by solventogenic *Clostridium* sp. strain HN₄. *Bioresour Technol*, 2018, 264: 148–153.
- [17] Xin FX, Chen TP, Jiang YJ, et al. Strategies for improved isopropanol-butanol production by a *Clostridium* strain from glucose and hemicellulose through consolidated bioprocessing. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10(1): 118.
- [18] Yamada R, Hasunuma T, Kondo A. Endowing non-cellulolytic microorganisms with cellulolytic activity aiming for consolidated bioprocessing. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(6): 754–763.
- [19] Wen ZQ. Mixed-culture and metabolic engineering of anaerobic clostridia for one-pot butanol production from Alkali extracted corn cobs[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014 (in Chinese). 闻志强. 以碱处理玉米棒芯为原料直接生产丁醇的厌氧梭菌混菌发酵过程及代谢工程研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [20] Higashide W, Li YC, Yang YF, et al. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for production of isobutanol from cellulose. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(8): 2727–2733.
- [21] Atsumi S, Hanai T, Liao JC. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature*, 2008, 451(7174): 86–89.
- [22] Gaida SM, Liedtke A, Jentges AHW, et al. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for the production of n-butanol from crystalline cellulose. *Microb Cell Fact*, 2016, 15(1): 6.
- [23] Tardif C, Maamar H, Balfin M, et al. Electrotransformation studies in *Clostridium cellulolyticum*. *J Indl Microbiol Biot*, 2001, 27(5): 271–274.
- [24] Jang YS, Im JA, Choi SY, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for butyric acid production with high butyric acid selectivity. *Metab Eng*, 2014, 23: 165–174.
- [25] Lehmann D, Radomski N, Lütke-Eversloh T. New insights into the butyric acid metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 96(5): 1325–1339.
- [26] Lee JY, Jang YS, Lee J, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* M5 for highly selective butanol production. *Biotechnol J*, 2009, 4(10): 1432–1440.
- [27] Peabody GL, Kao KC. Recent progress in biobutanol tolerance in microbial systems with an emphasis on *Clostridium*. *FEMS Microbiol Lett*, 2016, 363(5): fnw017.
- [28] Nicolaou SA, Gaida SM, Papoutsakis ET. A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metab Eng*, 2010, 12(4): 307–331.
- [29] Wen ZQ, Ledesma-Amaro R, Lin JP, et al. Improved n-butanol production from *Clostridium cellulovorans* by integrated metabolic and evolutionary engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(7): e02560–18.
- [30] Jang YS, Lee JY, Lee J, et al. Enhanced butanol production obtained by reinforcing the direct butanol-forming route in *Clostridium acetobutylicum*. *mBio*, 2012, 3(5): e00314–12.
- [31] Ji YR, Mao GN, Wang YY, et al. Crystallization and preliminary X-ray characterization of an NAD(P)-dependent butanol dehydrogenase A from *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2013, 69(2): 184–187.
- [32] Biswas R, Zheng TY, Olson DG, et al. Elimination of hydrogenase active site assembly blocks H₂ production and increases ethanol yield in *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8(1): 20.
- [33] Yang XR, Xu MM, Yang ST. Metabolic and process engineering of *Clostridium cellulovorans* for biofuel

- production from cellulose. *Metab Eng*, 2015, 32: 39–48.
- [34] Jiang YJ, Guo D, Lu JS, et al. Consolidated bioprocessing of butanol production from xylan by a thermophilic and butanogenic *Thermoanaerobacterium* sp. M5. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11(1): 89.
- [35] Biswas R, Prabhu S, Lynd LR, et al. Increase in ethanol yield via elimination of lactate production in an ethanol-tolerant mutant of *Clostridium thermocellum*. *PLoS ONE*, 2014, 9(2): e86389.
- [36] Papanek B, Biswas R, Rydzak T, et al. Elimination of metabolic pathways to all traditional fermentation products increases ethanol yields in *Clostridium thermocellum*. *Metab Eng*, 2015, 32: 49–54.
- [37] Tian L, Papanek B, Olson DG, et al. Simultaneous achievement of high ethanol yield and titer in *Clostridium thermocellum*. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9(1): 116.
- [38] Ellis LD, Holwerda EK, Hogsett D, et al. Closing the carbon balance for fermentation by *Clostridium thermocellum* (ATCC 27405). *Bioresour Technol*, 2012, 103(1): 293–299.
- [39] Lin PP, Mi L, Morioka AH, et al. Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*. *Metab Eng*, 2015, 31: 44–52.
- [40] Kylilis N, Tuza ZA, Stan GB, et al. Tools for engineering coordinated system behaviour in synthetic microbial consortia. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2677.
- [41] Xin FX, He JZ. Characterization of a thermostable xylanase from a newly isolated *Kluyvera* species and its application for biobutanol production. *Bioresour Technol*, 2013, 135: 309–315.
- [42] Yu EKC, Chan MKH, Saddler JN. Butanol production from cellulosic substrates by sequential co-culture of *Clostridium thermocellum* and *C. acetobutylicum*. *Biotechnol Lett*, 1985, 7(7): 509–514.
- [43] Zhao Q. Characterization and analysis of interaction and biohydrogen between *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* in a co-culture system for lignocelluloses degradation[D]. Ji'nan: Shandong University, 2017 (in Chinese).
- 赵奇. 在木质纤维素降解过程中热纤梭菌和热厌氧热解糖杆菌共生关系以及产氢机理的解析[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [44] Nakayama S, Kiyoshi K, Kadokura T, et al. Butanol production from crystalline cellulose by cocultured *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1–4. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(18): 6470–6475.
- [45] Lin YJ, Wen ZQ, Zhu L, et al. Butanol production from corncob in the sequential co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium beijerinckii*. *J Chem Eng Chin Univ*, 2013, 27(3): 444–449 (in Chinese).
- 林逸君, 闻志强, 朱力, 等. *Clostridium thermocellum* 与 *Clostridium beijerinckii* 偶联发酵玉米棒芯产丁醇. *高校化学工程学报*, 2013, 27(3): 444–449.
- [46] Nakayama S, Bando Y, Ohnishi A, et al. Decreased hydrogen production leads to selective butanol production in co-cultures of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1–4. *J Biosci Bioeng*, 2013, 115(2): 173–175.
- [47] Jiang YJ, Xin FX, Lu JS, et al. State of the art review of biofuels production from lignocellulose by thermophilic bacteria. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1498–1506.
- [48] Salimi F, Mahadevan R. Characterizing metabolic interactions in a clostridial co-culture for consolidated bioprocessing. *BMC Biotechnol*, 2013, 13(1): 95.
- [49] Wang ZY, Cao GL, Zheng J, et al. Developing a mesophilic co-culture for direct conversion of cellulose to butanol in consolidated bioprocess. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8(1): 84.
- [50] Fu DF. Isolation of butanol production strain and construction of co-culture system with cellulose[D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016 (in Chinese).
- 傅德丰. 丁醇生产菌的筛选及以纤维素为底物共培养体系的构建[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016.
- [51] Tseng HC, Prather KLJ. Controlled biosynthesis of odd-chain fuels and chemicals via engineered modular metabolic pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(44): 17925–17930.

- [52] Wu JJ, Du GC, Zhou JW, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for (2S)-pinocembrin production from glucose by a modular metabolic strategy. *Metab Eng*, 2013, 16: 48–55.
- [53] Wen ZQ, Minton NP, Zhang Y, et al. Enhanced solvent production by metabolic engineering of a twin-clostridial consortium. *Metab Eng*, 2017, 39: 38–48.
- [54] Cerisy T, Souterre T, Torres-Romero I, et al. Evolution of a biomass-fermenting bacterium to resist lignin phenolics. *Appl Environ Microbiol*, 2017, 83(11): e00289–17.
- [55] Gusakov AV. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends Biotechnol*, 2011, 29(9): 419–425.
- [56] Thompson RA, Trinh CT. Overflow metabolism and growth cessation in *Clostridium thermocellum* DSM1313 during high cellulose loading fermentations. *Biotechnol Bioeng*, 2017, 114(11): 2592–2604.
- [57] Qian YC, Zhong LX, Gao J, et al. Production of highly efficient cellulase mixtures by genetically exploiting the potentials of *Trichoderma reesei* endogenous cellulases for hydrolysis of corncob residues. *Microb Cell Fact*, 2017, 16(1): 207.
- [58] Derntl C, Guzmán-Chávez F, Mello-de-Sousa TM, et al. *In vivo* study of the sorbicillinoid gene cluster in *Trichoderma reesei*. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2037.
- [59] Minty JJ, Singer ME, Scholz SA, et al. Design and characterization of synthetic fungal-bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(36): 14592–14597.
- [60] Xin FX, Dong WL, Zhang WM, et al. Biobutanol production from crystalline cellulose through consolidated bioprocessing. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(2): 167–180.

(本文责编 陈宏宇)