

产纤维素体菌厌氧降解纤维素制乙醇的研究进展

闻志强 姜薇 林东强 林建平* 岑沛霖

(浙江大学化学工程与生物工程学系 生物工程研究所 浙江 杭州 310027)

摘要: 纤维素(植物细胞壁的主要成分)是自然界最丰富的一种可再生资源,但是极难降解利用。纤维素体是一种多酶复合体,能够高效降解纤维素,降解产物能够被某些厌氧微生物利用发酵产乙醇。综述了近年来产纤维素体菌厌氧降解纤维素制乙醇的研究进展,报道了纤维素体结构和功能、重组设计型纤维素体、代谢工程、混菌培养等研究方向的最新成果和思路,并对其前景作了展望。可以预期,随着研究的深入,生物质制乙醇必将日益显示出其强大的市场竞争力。

关键词: 纤维素, 生物乙醇, 纤维素体, 代谢工程, 混菌培养

Research Progress in Anaerobic Degradation of Cellulose and the Subsequent Ethanol Production by Cellulosome-producing Bacteria

WEN Zhi-Qiang JIANG Wei LIN Dong-Qiang LIN Jian-Ping* CEN Pei-Lin

(Institute of Biological Engineering, Department of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China)

Abstract: Cellulose, the main structural component of plant cell walls, is the most abundant renewable resource in nature, but it is extremely difficult to be degraded. Cellulosome is a multi-enzyme complex that can efficiently degrade cellulose and the degradation products can be used by some anaerobic microorganisms to produce ethanol. Recent research status in anaerobic degradation of cellulose for ethanol production by cellulosome-producing bacteria was reviewed in this paper. The latest achievements and research development in cellulosomes' structure and function, designer cellulosomes, metabolic engineering and co-culture of cellulosome producing microorganisms were also summarized. It is expected that the development of new cellulose degrading microorganisms and relative technology will further cut the cost of cellulosic ethanol in the near future and make it more competitive with gasoline.

Keywords: Cellulose, Bioethanol, Cellulosomes, Metabolic engineering, Mixed-culture

当前,世界各国对石油的需求不断增加,而石油作为一种不可再生资源,其供应日趋紧张,这使

得开发可持续利用替代性能源迫在眉睫。生物质制燃料乙醇是目前最易工业化、最易普及的替代燃料

(尤其是车用燃料)之一, 已经日益引起人们的广泛关注。利用纤维素发酵产乙醇是当前各国研究的热点。相比有氧发酵, 厌氧发酵可以免去供氧的需要; 厌氧微生物通常有比较低的细胞生长率, 由此消耗的糖比较少, 从而有更多的糖可以转化为酒精, 因而厌氧发酵的前景更好。本文简要综述了利用纤维素厌氧发酵产乙醇的研究进展, 并对其前景做了展望。

1 利用纤维素生产乙醇的现状和困境

纤维素资源是地球上数量最大的一种可再生资源, 但只有少量纤维素被有效利用, 绝大部分被作为废物弃置在自然界中, 反而造成了一定的环境污染问题, 如城市垃圾。目前, 用粮食(小麦、玉米等)和糖类物质(甜菜、甘蔗汁等)等传统原料生产乙醇的技术已经比较成熟, 在巴西、美国、加拿大等国也达到了相当大的规模。但利用纤维素发酵生产乙醇有明显优势, 其原材料来源广泛、供应充足、价格低廉, 还可以减少环境污染, 提高资源利用率, 保证国家能源和粮食安全等。目前纤维素发酵生产燃料乙醇的技术尚不成熟, 成本较高, 不足与化石燃料竞争, 主要原因在于:

(1) 纤维素结构稳定, 难以降解。纤维素由糖分子的极性基团通过氢键相连成长链, 在木质素的包裹下形成坚固而稳定的晶体结构, 发酵前需经过预处理。

(2) 原料预处理成本较高。预处理过程能耗大, 成本较高, 糖的回收率低, 而且对后续发酵不利, 发酵前需先除去对微生物生长有害的物质。

(3) 纤维素转化利用率低。纤维素水解产物包括己糖、戊糖, 但大部分微生物只能利用己糖发酵, 不能利用戊糖。

(4) 用于纤维素降解的成品纤维素酶价格高昂, 活性低, 用量大, 降解速率有待提高。

(5) 代谢速率慢, 乙醇产量低, 菌种的乙醇和恶劣环境耐受性差。

因此, 找到一条预处理简单易行(或者干脆不必预处理)、纤维素降解迅速、纤维素高效利用、乙醇产量高、经济、稳定的乙醇生产工艺路线是十分重要的。历史上, 先后有学者提出过 SHF (Separate hydrolysis and fermentation, 分步水解和发酵)、SSF

(Simultaneous saccharification and fermentation, 同步糖化和发酵)、SSCF (Simultaneous saccharification and co-fermentation, 同步糖化共发酵)等工艺方案, 有效改进了水解过程和己糖、戊糖发酵同步进行过程, 提高了纤维素的糖化效率和转化率。其中由美国国家可再生能源实验室(NREL)提出的 SSCF 法已经相对比较成熟, 但是纤维素酶生产仍是独立的。在此基础上, Lynd 等^[1-2]提出了 CBP (Consolidated bioprocessing, 联合生物加工工艺)方案, 并论证了其可行性。该方案将产酶过程与糖化、发酵集合在一个反应器内同步进行, 大大降低了来自酶的成本。更有学者设想将预处理这一能耗大、成本高的过程也由微生物来完成, 以期更大幅度地降低生产成本。

CBP 方案几乎是生物质转化技术进化中的逻辑终点, 对微生物的要求极高。参与该生产过程的微生物, 要能够高产一种或多种纤维素降解酶, 这些纤维素降解酶能够单酶作用或者多酶协同作用高效降解纤维素, 水解后的糖类(己糖、戊糖)能被一种或若干种微生物同步发酵高产乙醇。孤立的看, 上述各种条件都能在现有的微生物中找到, 但是到目前为止还没有一个天然的微生物或者微生物系统能够同时满足以上所有条件。

2 纤维素厌氧降解产乙醇的研究进展

2.1 纤维素体的结构和功能

纤维素体(Cellulosome)是一种能高效降解结晶纤维素、非结晶纤维素和木质素的多酶复合体。1983年, Bayer 和 Lamed 等^[3]首次从热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)中发现纤维素体, 其成分和组装方式比较有代表性, 研究的也比较透彻, 下面对其做简单介绍。纤维素体结构如图 1 所示。

由图 1 中可以看出, 在热纤梭菌中, 纤维素体的主体结构是支架蛋白(Scaffoldin)和各种酶。支架蛋白通常含有 1 个或多个纤维素连接域(Cellulose-binding module, CBM)、粘附域(Cohesin domain), 而酶分子的催化亚基能够通过 I 型锚定域(Dockerin domain)与 I 型粘附域结合, 装配形成纤维素体。纤维素体与细胞的结合是通过支架蛋白 CipA 上的 II 型锚定域与外膜蛋白上 II 型粘附域之间的相互作用来实现的, 而外膜蛋白是通过 S 层同源结构域

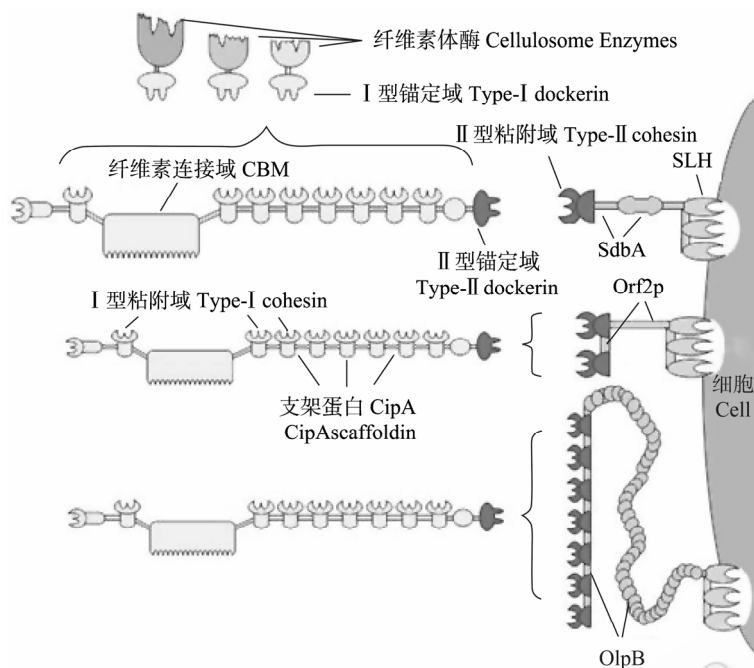


图 1 热纤梭菌纤维素体超分子结构示意图^[4]

Fig. 1 Supermolecular structure of *Clostridium thermocellum* cellulosome^[4]

(S-layer homology module, SLH)连接到细胞表面上的^[5]。热纤梭菌有 3 种外膜蛋白: SdbA、Orf2p、OlpB, 分别有 1、2、7 个 II 型粘附域与之相连, 而单个 CipA 支架蛋白上就有 9 个粘附域, 因此单个纤维素体最多可能就有 63 个组分^[6]。热纤梭菌的纤维素体随着细菌生长其部分组分也会发生变化^[7](如 Cel48A), 在细菌生长后期纤维素体部分脱离细胞并被释放到培养基中与底物结合。

产纤维素体微生物降解纤维素时, 首先细胞多层黏附在纤维素表面, 细胞表面的纤维素体(簇)通过纤维连接域与纤维素紧密结合, 不同种类的酶排列在支架蛋白上, 确保了局域的高浓度, 而且相互之间的合适的组合和配比能够起到协同降解的作用, 这就使得纤维素体的酶分子能够比一般的游离酶更高效地降解纤维素。在黏附过程中细胞一直在生长, 在细胞生长后期, 细胞和纤维素分离, 而从细胞表面脱落的纤维素体(簇)仍停留在纤维素表面, 继续降解。

关于各种菌种纤维素体结构和功能的研究报道较多, 这里不再赘述。

2.2 设计型纤维素体

在纤维素体中, 参与降解的各种酶如能恰当排列组合, 且浓度比例合适, 将大大增加其降解效果。

据此, 有学者提出了“设计型纤维素体(Designer cellulosomes)”的概念^[8-9], 即重组或者构建出一种嵌合型的支架蛋白, 支架蛋白上有多个粘附域, 携带纤维素酶的锚定域高度专一地与各粘附域结合, 组装成设计型纤维素体。有了设计型纤维素体, 就可以设计、优化纤维素体酶的空间排列和组合, 并控制各种酶的浓度比例, 使之能够高效协同降解纤维素。

2.2.1 体外构建设计型纤维素体: 用 DNA 体外重组的方法分别构建和表达嵌合型支架蛋白(包括粘附域和纤维连接域)、携带纤维素酶的锚定域, 各自分离纯化后再利用锚定域与粘附域高度专一性结合的性质装配形成设计型纤维素体。

Fierobe 等^[10]在体外成功构建了 75 种双酶组合(双功能)的嵌合型纤维素体, 每个设计型纤维素体包含: (1) 一个嵌合型支架蛋白, 支架蛋白有一个纤维素连接域, 两个粘附域(专一性不同); (2) 两种纤维素酶及能与粘附域特异性结合的锚定域。在此基础上, 该研究小组又成功接入一种粘附域, 也即构建了三酶组合的设计型纤维素体。实验发现, 热纤梭菌的木聚糖酶 Xyn10Z 成功插入带有解纤维梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)纤维素酶 Cel9G 和 Cel48F 的纤维素体后, 相对于双功能的纤维素体,

三功能的纤维素体酶的比活力提高了 6 倍^[11]。Cha 等^[12]比较了嗜纤维梭菌(*Clostridium cellulovorans*)纤维素体支架蛋白上有 4、2、1 个粘附域时的纤维素体酶的活力,发现粘附域数目越多其比活力越大,依次为游离酶比活力的 1.8、1.3 和 1.2 倍。

也有学者从设计型纤维素体的理念出发,以一种类纤维素体的结构——来自白杨树上的一种同源低聚物自组装的 SP1 蛋白(环状结构,外径 12 nm,内径 3 nm)为支架蛋白,将 12 个特异性粘附域整合到环周,构建了一种全新的(类)纤维素体结构。纤维素体装配完成后,来自嗜热放线菌褐色喜热裂孢菌(*Thermobifida fusca*)的纤维素酶能够表现出活力且比活力是游离酶的 2 倍^[13]。

体外构建的设计型纤维素体固然可以大幅度提高酶的活力,但是纯化重组蛋白,然后再装配形成设计型纤维素体这一过程势必带来高成本,这将限制其大规模工业化生产,而利用基因工程使参与生产过程的微生物能够在体内合成设计型纤维素体,直接降解纤维素是一种相对廉价的选择。

2.2.2 体内合成设计型纤维素体: 嵌合型支架蛋白和酶一次性构建和表达成功,省去纯化和装配过程,直接合成完整的设计型纤维素体。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)生长快,能分泌胞外蛋白,而且基因操作很方便,是很理想的设计型纤维素体异源表达的宿主。Murashima 等^[14-15]将来自嗜纤维梭菌的内切葡聚酶 EngB 和 mini-CbpA1 支架蛋白基因在枯草芽孢杆菌突变株 WB800 (该突变株缺少胞外蛋白酶)中成功地同时构建和表达,且可以检测到 EngB 酶活,第 1 次实现了设计型纤维素体在枯草芽孢杆菌中的体内合成。这说明未来在枯草芽孢杆菌中插入纤维素体基因使之能够生产有特殊用途的设计型纤维素体或者利用纤维素生产高价值产物是有可能的。

丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)作为一种高产溶剂菌,其染色质上有纤维素体基因簇,也能够表达纤维素体,但是它的纤维素体没有纤维素酶活,不能降解和利用结晶纤维素^[16-17]。Perret 等^[18]将来自解纤维梭菌的支架蛋白 miniCipC1 (携带有解纤维梭菌的粘附域)和 Scaf3 (携带 1 种热纤维梭菌粘附域的 miniCipC1)在丙酮丁醇梭菌中成功表达,并且在体外验证了粘附域、锚定域等单元的活性,

说明在丙酮丁醇梭菌中异源表达设计型纤维素体是可行的。该研究小组更进一步将甘露糖酶基因 *man5K* 和支架蛋白 CipC1 基因整合在同一质粒上,实现了共表达,且可以检测到 Man5K 酶活,完成了设计型纤维素体在丙酮丁醇梭菌体内合成。这也是产溶剂梭菌异源生产、装配和表达设计型纤维素体的首例报道,说明利用纤维素产溶剂是完全可能的^[19]。

2.3 代谢工程

在自然界原生态中,某些纤维素降解微生物的生存环境营养匮乏,长期进化只能适应低碳流代谢。纤维素体酶降解纤维素的产物如葡萄糖、纤维二糖等如果不能马上被微生物利用,就会对纤维素酶产生抑制作用,甚至还会抑制这些低碳流代谢微生物的生长。

解纤维梭菌能够产生纤维素体,能够利用纤维素生长,但是代谢路径及产物量随纤维素浓度变化。它自身只能适应低碳流代谢。在高碳流下,细菌进入稳定期后,细胞长期近似休眠,停止生长,而乳酸和丙酮酸等大量积累。Guedon 等^[20]在间歇发酵试验中,待细菌到稳定期(第 4 天)后重新接种(反复 4 次),大大提高了发酵液中菌体数量(干重增加了 2.75 倍),同时该菌对纤维素的消耗量、降解速率、乙醇产量等也分别提高了 110%、105%、73.8%。进一步,该研究小组采用代谢工程的方法^[21],将运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*) CP4 的丙酮酸脱羧酶(Pyruvate decarboxylase)和醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase)基因在解纤维梭菌中异源表达,添加了一条丙酮酸代谢途径,有效缓解了细胞受抑制程度,纤维素消耗量、降解速率和乙醇产量分别提高了 167%、175%和 53%。可见,对于解纤维梭菌,纤维素降解的限速步骤不是纤维素体酶降解纤维素,而是纤维素酶解后的糖酵解阶段。如果提高解纤维梭菌的代谢效率,细胞生长受抑制程度会有极大缓解,该菌纤维素体酶潜力也能更大程度地发挥。因此,对于产纤维素体菌,不仅要关注其纤维素体酶的活力,也要关注其代谢过程,切实分清哪个是物质转化的限速步骤。

2.4 混菌培养

共生关系是自然生态系统中普遍存在的现象。混菌培养就是利用这一原理将有着互补优势特点的菌混合培养发酵,以期提高纤维素降解速率,提升产物产量和价值。

早在 20 世纪 70、80 年代,利用混菌培养发酵纤维素产乙醇的研究就已经出现,并陆续见诸报道。目前,混菌培养降解纤维素已经成为纤维素降解研究的另一热点。混菌的形式包括以下几种:已知属性细菌的混合^[22-23],原生态中分离出的未知高效降解菌群^[24-25],瘤胃微生物群^[26-27]等。已知属性细菌混合培养的主要思路有两个:混合培养纤维素降解糖化菌和发酵菌,直接利用纤维素发酵产乙醇;混合培养己糖发酵菌和戊糖发酵菌,实现己糖、戊糖同步发酵。

热纤梭菌是最有效的纤维素降解微生物之一,它能够直接利用纤维素产乙醇,而且产量也比较高(其种群之一 *C. thermocellum* I-1-B 在 60°C 下接种于 80 g/L 纤维素培养基中,发酵 156 h 甚至可以高产 23.6 g/L 乙醇^[28]),但是它只能利用己糖,所以一般和另一种可利用戊糖的厌氧嗜热菌混合培养。MIT 的学者^[23]研究了热纤梭菌 ATCC27405 和热解糖梭菌(*C. thermosaccharolyticum* HG-8)在摇瓶条件下的混合发酵。混合菌 90 h 内可以降解 38 g/L 纤维素,产 13.8 g/L 乙醇,远远高于热纤梭菌单独发酵时的产量(1.4 g/L)及纤维素利用水平(5 g/L)。

但是不是所有混合都能够达到预期效果,寻找合适的共生菌组合,分离出高效稳定的混合菌群,优化混菌培养条件,开发新型生化反应器等将是未来混菌培养发酵纤维素产乙醇的研究方向。另外,以混菌培养产乙醇为基础,对混菌培养产氢^[29]、产溶剂^[30]等做些延伸研究也是很有意义的。

3 总结及展望

针对利用纤维素发酵产乙醇成本过高的问题(目前约为 4.5 元/L),美国国家可再生能源实验室(NREL)学者通过技术经济分析指出,预处理、酶降解和发酵过程是改进工作的研究重点^[31],具体可大致分为以下几个方面:

- (1) 深入研究纤维素体的结构和功能,利用基因工程开发表达高效的设计型纤维素体。
- (2) 利用代谢工程打通代谢瓶颈,提高代谢效率,挖掘微生物降解纤维素的潜力。
- (3) 开发己糖、戊糖同步高效发酵产乙醇的工业微生物。
- (4) 混菌培养。

(5) 优化 CBP 工艺,降低预处理成本,重视废弃物的综合利用。

利用纤维素厌氧发酵产乙醇的关键有两个:(1) 高效的微生物或微生物系统,要能够高表达高活力纤维素酶,快速降解纤维素,同步利用己糖和戊糖发酵高产乙醇;(2) 合理的工艺路线,预处理能耗低,不影响后续发酵,系统高度集成,废弃物综合利用程度高。其中微生物方面可改进的空间仍然很大。可以预见,随着研究的深入进行,利用纤维素生产乙醇的成本将会大幅度下降,生物乙醇在高油价时代将越发显现其强劲的市场竞争力。

参考文献

- [1] Lynd LR. Overview and evaluation of fuel ethanol production from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. *Annu Rev Energy Environ*, 1996(21): 403-465.
- [2] Lynd LR, vanZyl WH, McBride JE, et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol*, 2005, 16(5): 577-583.
- [3] Lamed R, Setter E, Bayer EA. Characterization of a cellulose-binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. *J Bacteriol*, 1983, 156(2): 828-836.
- [4] Bayer EA, Lamed R, White BA, et al. From cellulosomes to cellosomics. *The Chemical Record*, 2008, 8(6): 364-377.
- [5] Jindou S, Kajino T, Inagaki M, et al. Interaction between a type-II dockerin domain and a type-II cohesin domain from *Clostridium thermocellum* cellulosomes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2004, 68(4): 924-926.
- [6] Leibovitz E, Beguin P. A new type of cohesin domain that specifically binds the dockerin domain of the *Clostridium thermocellum* cellulosome-integrating protein CipA. *J Bacteriol*, 1996, 178(11): 3077-3084.
- [7] Dror TW, Morag E, Rolider A, et al. Regulation of the cellulosomal celS (cel48A) gene of *Clostridium thermocellum* is growth rate dependent. *J Bacteriol*, 2003, 185(10): 3042-3048.
- [8] Bayer EA, Morag E, Lamed R. The cellulosome—a treasure trove for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 1994, 12(9): 379-386.
- [9] Ohmiya K, Sakka K, Kimura T, et al. Application of microbial genes to recalcitrant biomass utilization and environmental conservation. *J Biosci Bioeng*, 2003, 95(6): 549-561.
- [10] Fierobe HP, Bayer EA, Tardif C, et al. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. Substrate targeting versus proximity of enzyme components. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49621-49630.

- [11] Fierobe HP, Mingardon F, Mechaly A, *et al.* Action of designer cellulosomes on homogeneous versus complex substrates: controlled incorporation of three distinct enzymes into a defined trifunctional scaffoldin. *J Biol Chem*, 2005, **280**(16): 16325–16334.
- [12] Cha J, Matsuoka S, Chan H, *et al.* Effect of multiple copies of cohesins on cellulase and hemicellulase activities of *Clostridium cellulovorans* mini-cellulosomes. *J Microbiol Biotechnol*, 2007, **17**(11): 1782–1788.
- [13] Heyman A, Barak Y, Caspi J, *et al.* Multiple display of catalytic modules on a protein scaffold: nano-fabrication of enzyme particles. *J Biotechnol*, 2007, **131**(4): 433–439.
- [14] Murashima K, Chen CL, Kosugi A, *et al.* Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* *engB*, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *J Bacteriol*, 2002, **184**(1): 76–81.
- [15] Cho HY, Yukawa H, Inui M, *et al.* Production of minicellulosomes from *Clostridium cellulovorans* in *Bacillus subtilis* WB800. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(9): 5704–5707.
- [16] Nölling J, Breton G, Omelchenko MV, *et al.* Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 2001, **183**(16): 4823–4838.
- [17] Sabathe F, Belaich A, Soucaille P. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **217**(1): 15–22.
- [18] Perret S, Casalot L, Fierobe HP, *et al.* Production of heterologous and chimeric scaffoldins by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol*, 2004, **186**(1): 253–257.
- [19] Mingardon F, Perret S, Belaich A, *et al.* Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Biotechnol*, 2005, **71**(3): 1215–1222.
- [20] Desvaux M, Guedon E, Petitdemange H. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(6): 2461–2470.
- [21] Guedon E, Desvaux M, Petitdemange H. Improvement of cellulolytic properties of *Clostridium cellulolyticum* by metabolic engineering. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**(1): 53–58.
- [22] Saddler JN, Chan MKH, Louis-Seize G. A one step process for the conversion of cellulose to ethanol using anaerobic microorganisms in mono- and co-culture. *Biotechnology Letters*, 1982, **3**(6): 321–326.
- [23] Venkateswaren S, Demain AL. The *Clostridium thermocellum*-*Clostridium thermosaccharolyticum* ethanol production process: nutritional studies and scale-down. *Chem Eng Commun*, 1986, **45**(1/6): 53–60.
- [24] Haruta S, Cui Z, Huang Z, *et al.* Construction of a stable microbial community with high cellulose-degradation ability. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**(4/5): 529–534.
- [25] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, *et al.* Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **51**(1): 133–142.
- [26] Mourino F, Akkarawongsa R, Weimer PJ. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J Dairy Sci*, 2001, **84**(4): 848–859.
- [27] Hu ZH, Wang G, Yu HQ. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, **21**(1): 59–62.
- [28] Sato K, Tomita M, Yonemura S, *et al.* Characterization of and ethanol hyper-production by *Clostridium thermocellum* I-1-B. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, **57**(12): 2116–2121.
- [29] Liu Y, Yu P, Song X, *et al.* Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International journal of hydrogen energy*, 2008, **33**(12): 2927–2933.
- [30] Yu EKC, Chan MKH, Saddler JN. Butanol production from cellulosic substrates by sequential co-culture of *Clostridium thermocellum* and *C. acetobutylicum*. *Biotechnology Letters*, 1985, **7**(7): 509–514.
- [31] Aden A, Foust T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. *Cellulose*, 2009, **16**(4): 535–545.