

木质纤维素生物转化的技术研究和应用前景

潘润泽¹, 牟璐¹, 邱敏¹, 姜万奎¹, 章文明^{1,2},

蒋羽佳^{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)

摘要:随着工业化进程的发展,不可再生能源的消耗以及环境的污染问题是面临的严峻挑战。因此,可再生生物质资源的开发得到了广泛关注。木质纤维素是一种丰富的可再生生物质资源,可用于生物化学品和生物燃料的生产。然而,其复杂的结构阻碍了木质纤维素生物转化的最终效率。有效的预处理技术以及合适的转化宿主为木质纤维素的生物转化提供了帮助。此外,选择合适的木质纤维素转化工艺更有利于目标产物的合成,其中包括单独水解和发酵、同步糖化和发酵以及统合生物加工过程。在这些工艺中,通过统合生物加工过程构建的微生物共培养系统被认为是高效生产生物化学品和生物燃料的潜在策略。进一步,将共培养体系与合成生物学和代谢工程相结合,为未来构建高效稳定的木质纤维素生物转化体系提供了理论指导。

关键词:木质纤维素;生物转化;糖化;发酵;统合生物加工过程

中图分类号:X51

文献标识码:A

Technical research and application prospects of lignocellulose biotransformation

PAN Runze¹, MOU Lu¹, QIU Min¹, JIANG Wankui¹, ZHANG Wenming^{1,2},

JIANG Yujia^{1,2,*}, XIN Fengxue^{1,2,*}, JIANG Min^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 2. Jiangsu National Synergetic Innovation Center for Advanced Materials (SICAM), Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

Abstract: With the progress of industrialization, the consumption of non-renewable energy and the issue of environmental pollution have intensified. Consequently, the development of renewable biomass resources has gained significant attention. Lignocellulose, as an abundant renewable biomass resource, holds immense potential for the production of biofuels and biochemicals. However, its complex structure presents challenges to achieving optimal efficiency in lignocellulose biotransformation. Effective pre-treatment techniques and suitable transformation hosts contribute to facilitating the biotransformation of lignocellulose. Furthermore, the selection of appropriate lignocellulose conversion processes enhances the synthesis of desired products, including separate hydrolysis and fermentation, simultaneous saccharification and fermentation, as well as consolidated bioprocessing. Among these approaches, the utilization of a microbe co-culture system, established through consolidated bioprocessing, is considered to be a promising strategy for efficiently producing biofuels and biochemicals. Additionally, the integra-

收稿日期:2023-11-27

DOI:10.20078/j.eep.20231203

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(22178169);江苏省杰出青年基金资助项目(BK20220052);山东省泰山产业领军人才工程资助项目(202306155)

作者简介:潘润泽(1997—),男,山东日照人,硕士研究生,主要研究方向为木质纤维素的高值化生物转化。E-mail: prunze@163.com

通讯作者:蒋羽佳(1991—),女,江苏高邮人,副教授,主要研究方向为设计和构建木质纤维素生物炼制可持续平台。

E-mail: jiangyujia@njtech.edu.cn

信丰学(1982—),男,山东济南人,教授,主要研究方向为低劣生物质的生物降解与有用化学品合成,以及人工多细胞体系的设计、构建与功能调控。E-mail: xinfengxue@njtech.edu.cn

tion of the co-culture system with synthetic biology and metabolic engineering offers theoretical guidance for constructing efficient and stable lignocellulose biotransformation systems in the future.

Keywords: Lignocellulose; Biotransformation; Saccharification; Fermentation; Consolidated bioprocessing

0 引言

化石资源的开发促进了工业和经济社会的发展;然而,化石资源的使用导致了价格波动、环境污染以及能源危机等问题^[1]。木质纤维素等可再生生物质资源具有替代传统煤炭、石油等化石能源的潜质,大多数生物化学品和生物燃料可以从可再生的生物质资源中生产出来^[2]。糖基农业资源通常作为第一代生物转化中生物燃料生产的原料,包括淀粉、甘蔗或油菜籽等,它们可以通过压榨、提取、添加淀粉酶等方法轻松提取。尽管生物转化技术在生物柴油和生物乙醇生产中取得了显著发展,但仍然存在“与人争粮,与粮争地”的问题。因此,开发非食用农业废弃物作为生物转化的原料已经引起了越来越多的关注^[3]。

木质纤维素资源丰富、可再生且不与人类需求存在竞争关系,是一种很有前途的可再生生物质资源(图1)。木质纤维素的年产量可达1700亿吨,然而,只有3%的木质纤维素能够在循环生物经济中得到有效利用^[4]。因此,如何合理高效利用木质纤维素一直是研究热点。目前,来源于农业和林业的废弃物或残留物的木质纤维素主要由纤维素(35%~50%)、半纤维素(23%~32%)和木质素(15%~30%)组成^[5]。纤维素由通过 β -1,4键结合的D-葡萄糖组成,多个线性纤维素分子通过分子间氢键和范德华键紧密结合形成高度结晶的微纤维结构^[6-7]。半纤维素是一种杂聚物,由通过(1,4)-糖苷键连接的几种不同类型的单糖组成,如木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖^[8]。木质素是位于植物细胞壁中的刚性芳香族多相聚合物,主要由酚类单体组成。它主要提供结构支持,并形成天然的一个不可渗透的屏障,以抵抗微生物的攻击和植物的氧化应激^[9]。此外,木质素通过氢键和共价键与纤维素和半纤维素连接,形成坚韧紧密的生物聚合物^[10]。

尽管木质纤维素资源被认为是生物化学品和生物燃料生产的潜在资源,但其复杂的结构限制了木质纤维素生物转化的发展,并大大降低了高附加值化学品和生物燃料生产的最终效率^[11]。

通常,木质纤维素材料应首先进行预处理,以破坏其刚性结构并提高微生物和酶催化效率。然而,预处理过程只是打破了木质纤维素的刚性结构,木质纤维素的进一步生物转化仍然依赖于水解酶和微生物。因此,本文对降解木质纤维素的水解酶和微生物进行了综述。此外,还介绍了利用生物技术实现木质纤维素降解和转化的现状、瓶颈和未来发展前景,包括单独水解和发酵、同步糖化和发酵以及统合生物加工过程,有助于木质纤维素生物转化的进一步发展。

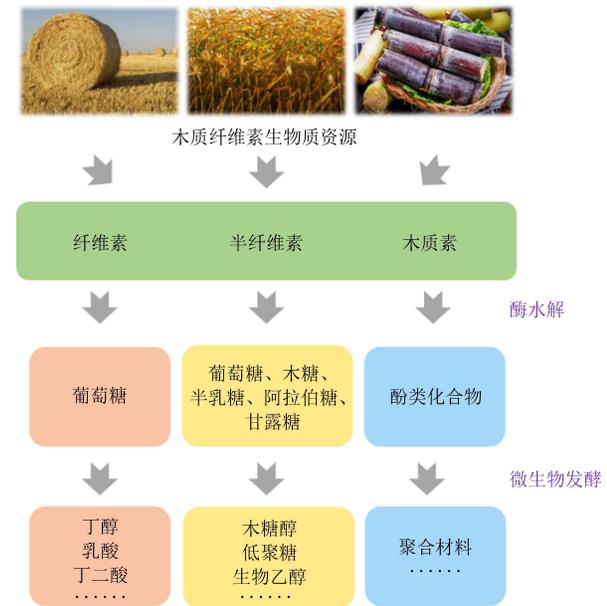


图1 木质纤维素的组分及可转化的高附加值产品
Fig. 1 Components of lignocellulose and convertible high value-added products

1 木质纤维素的预处理技术及降解

1.1 木质纤维素的预处理技术

木质纤维素具有复杂的结构,微生物很难能够直接利用其作为底物^[12]。通常,需要将木质纤维素等生物质进行预处理,打破紧密度木质素-半纤维素-纤维素结构,进而去除木质素,获得更利于降解的半纤维素和纤维素^[13]。常见的木质纤维素预处理技术有物理法、化学法和生物法。其中,物理法主要通过粉碎、水热和爆破等方法降低木质纤维素的结晶度来提高半纤维素和纤维素的

利用率;化学法主要通过酸处理、碱处理等添加化学试剂的方法破坏木质纤维素的化学结构,从而

提高降解效率^[14-15]。表1列举了常用木质纤维素预处理技术的作用机理及优缺点。

表1 木质纤维素的预处理技术^[16-17]

Table 1 Lignocellulose pretreatment technology^[16-17]

预处理技术	作用机理	优点	缺点
机械粉碎	破坏木质纤维素内部结构,降低纤维素结晶度	降低结晶度,增大比表面积	能耗大、成本高
水热法	去除木质素,溶出半纤维素	方法绿色,操作简单,无需外源添加化学试剂	水解产物复杂,还原糖得率不高
蒸汽爆破	破坏纤维素结构,增大空隙	处理时间短,无污染,效率高	容易产生抑制物,还原糖收率较低
酸处理	破坏木质纤维素中的糖苷键,溶出半纤维素和木质素	提高半纤维素的水解糖得率	成本高,对设备腐蚀严重,还原糖回收困难
碱处理	去除部分木质素,增大木质纤维素空隙	提高半纤维素和纤维素水解效率	脱碱液较困难,还原糖回收率低
生物法	增大内部孔隙结构,增加纤维素、半纤维素的接触面积	反应温和、设备简单、能耗较小和环境友好	处理时间长、效率低,难以实现工业化

物理法通过机械粉碎、水热和蒸汽爆破等方式可以有效破坏木质纤维素的结构,同时降低纤维素的结晶度,可降解为还原糖的部分损失较少。化学法中酸和碱的处理虽然可以提高木质纤维素的水解效率,但是存在污染严重和成本较高的缺点。生物法相较于物理法和化学法具有反应温和的特点,而且具有能耗低、无污染的优点。然而,生物法存在预处理时间长、效率低的缺陷,因此,难以实现大规模工业化生产^[18]。木质纤维素预处理技术作为高价值产品转化的上游,在考虑高效率和高产量的同时,也需要考虑设备和生产成本的问题^[19]。因此,寻找高效经济的预处理技术对木质纤维素高价值转化的发展具有重要意义。

1.2 木质纤维素的酶降解

由于水解酶具有环保和高效的特性,它们已被广泛应用于木质纤维素的降解。而水解酶的酶解效率是木质纤维素转化为可发酵糖的限速步骤^[20]。迄今为止,对降解机理的分析为进一步提高木质纤维素的降解效率提供了基础。

纤维素酶已广泛应用于许多工业领域,如食品加工、医用材料和洗涤剂加工等^[21]。通常,内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶是纤维素降解的主要水解酶^[22]。内切葡聚糖酶作用于纤维素分子的无定形区域打断 β -1,4糖苷键,然后将其水解成低聚糖。外切葡聚糖酶随机切割纤维素大分子末端的 β -1,4糖苷键,释放出纤维寡糖,包括纤维二糖、纤维三糖、纤维四糖等。 β -葡萄糖苷酶进而将这些纤维寡糖水解成葡萄糖,这通常被认为是整个纤维素降解过程中的限速

步骤^[23]。

与纤维素不同,半纤维素拥有更复杂的结构。以木聚糖为例,它不仅含有木糖,其侧链还含有不同种类的多糖^[24]。因此,半纤维素酶的种类比较复杂,主要由糖苷酶水解酶(木聚糖酶、木糖苷酶、阿拉伯糖苷酶、半乳糖苷酶)和糖类酯酶(乙酰木聚糖酯酶、阿魏酸酯酶等)组成。在这些酶中, β -木聚糖酶和 β -甘露聚糖酶可以随机切割半纤维素主链结构的内部并产生寡糖。其它糖苷酶和水解酶作用于侧链,协助半纤维素的水解并产生单糖或二糖^[25]。例如, α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶和 α -L-阿拉伯糖酶将阿拉伯聚糖侧链水解成阿拉伯糖。在半纤维素酯酶中,乙酰木聚糖酯酶作用于木糖残基的乙酰基,以消除乙酰基对内切木聚糖酶的阻碍^[26]。阿魏酸酯酶可以水解多糖和低聚糖中的酯键,促进细胞壁的降解^[27]。

木质素的降解是木质纤维素全组分利用的难题。虽然一些化学预处理方法可以有效地去除木质素,但增加的成本和产生的抑制剂仍然影响其进一步的应用^[28]。具有木质素降解能力的微生物有望实现木质纤维素全组分的利用。木质素酶主要由木质素过氧化物酶、锰依赖性过氧化物酶和漆酶组成^[29]。这些酶首先会溶解植物表面的蜡,然后微生物会使其菌丝体进入植物体内并且分泌各种酶,进而引发一系列有分子氧参与的自由基链式反应,使木质素发生自由基氧化^[30]。这些酶可以破坏木质素结构,降低纤维素的结晶度^[31]。然而,较低的酶催化反应速率仍然限制了木质纤维素的全面有效利用,因此,木质素降解的

机理有待进一步研究。

糖化效率受到酶负载、pH、温度、碳源浓度等条件的影响^[32]。对水解酶降解机制的深入了解将指导水解酶降解条件的优化,从而提高木质纤维素的糖化效率。通常,协调酶负载和降解效率是提高经济效益的有效途径。XU 等^[33]采用补料分批策略来提高酶水解效率,在底物含量为 22% (w/V)、纤维素酶用量仅为 4 FPU/g 干物质的条件下,葡萄糖产量和收率分别达到 122 g/L 和 80%。类似地,GAO 等^[34]通过优化不同比例水解酶的添加量,获得了较高的葡萄糖(80%)和木糖(70%)的收率。

1.3 木质纤维素的生物降解

近年来,从农业废弃物、反刍动物胃肠道和一些昆虫中发现了近 200 种具有降解木质纤维素能力的微生物。它们通常以微生物群落的形式存在,通过协同作用降解木质纤维素来获取营养、抵御外界不良环境。例如,瘤胃微生物群落由细菌、原生动、真菌、古细菌和小部分噬菌体组成,它们形成一个复杂的共生系统参与木质纤维素的降解^[35]。这些瘤胃微生物能够厌氧消化稻草,纤维素和半纤维素的降解效率分别达到 46.2% 和 60.4%^[36]。另一个典型的例子是白蚁内脏,它含有丰富的纤维素酶来降解木质纤维素^[37]。然而,核心降解酶和菌株之间复杂的木质纤维素转化协同机制尚未阐明,这限制了木质纤维素降解的稳定性和效率。

与微生物群落相比,用于木质纤维素生物转化的单个微生物由于其相对清晰的代谢途径和作用机制而得到更广泛的研究^[38]。细菌具有生长快、代谢路径清楚等优势,在木质纤维素降解中具有非常大的潜力^[39]。大部分木质纤维素降解细

菌属于厌氧菌,如梭菌属、瘤胃球菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属、变形杆菌属和沙雷氏菌属^[40-41]。它们通常具有降解木质纤维素的酶系统,包括纤维素酶、木聚糖酶和纤维二糖酶等。在细菌中,纤维素降解酶是由多种酶组成的纤维素体,可将植物细胞壁降解为可溶性多糖。它们还分泌一种结合纤维素的支架蛋白,与底物紧密接触促进了木质纤维素的降解^[42]。例如,热纤梭菌具有丰富的降解酶系统,被广泛应用于木质纤维素的转化。此外,在高温(50~60 °C)下它的木质纤维素降解效率更高^[43]。

与细菌相比,丝状真菌可以分泌更多种类的水解酶,并且具有更高的酶活性。事实上,真菌是工业纤维素酶的主要生产者,例如木霉属和曲霉属。在这些真菌中,里氏木霉由于其优异的纤维素降解能力已经成为用于纤维素酶商业生产的首选^[44]。然而, β -葡萄糖苷酶分泌能力的缺乏导致纤维二糖过量积累,这将造成纤维素降解过程中的底物抑制^[45]。受天然微生物菌群的启发,另外结合里氏木霉和其它具有良好 β -葡萄糖苷酶分泌能力的真菌构建了多种互补共培养体系。例如,里氏木霉可与海枣曲霉在多物种生物膜反应器中共培养,以增强 β -葡萄糖苷酶的活性。与里氏木霉单一培养相比,微生物共培养使 β -葡萄糖苷酶产量增加了 2.5 倍^[46]。

2 传统的木质纤维素生物转化

各种酶和微生物可以将木质纤维素降解为单糖,而将木质纤维素有效转化为所需的高价值产品仍是最终目标(表 2)。迄今为止,木质纤维素

表 2 木质纤维素生物转化的化学品和燃料

Table 2 Chemicals and fuels from lignocellulosic bioconversion

底物	技术	宿主	产物	产量/收率	参考文献
预处理银胶菊	单独水解和发酵	酿酒酵母	乙醇	0.27 g/g	[47]
小麦秸秆	单独水解和发酵	丙酮丁醇梭菌	丁醇	7.05 g/L	[50]
	同步糖化和发酵			5.05 g/L	
小麦秸秆水解液	同步糖化和发酵	酿酒酵母	乙醇	40.00 g/L	[55]
预处理玉米芯	同步糖化和发酵	枯草芽孢杆菌	3-羟基丁酮	12.55 g/L	[59]
微晶纤维素	同步糖化和发酵	里氏木霉、酿酒酵母	葡萄糖二酸	0.54 g/L	[60]
蒸汽爆破玉米秸秆				0.45 g/L	
碱处理玉米芯	统合生物加工	纤维素梭菌	正丁醇	4.96 g/L	[64]
预处理玉米秸秆	统合生物加工	酿酒酵母	乙醇	1.61 g/L	[67]
木聚糖	统合生物加工	热解糖高温厌氧杆菌、产琥珀酸放线杆菌	琥珀酸	32.50 g/L	[76]
玉米芯				12.50 g/L	
碱处理脱壳玉米芯	统合生物加工	里氏木霉、玉米黑粉菌	衣康酸	33.80 g/L	[78]

生物转化的传统方法包括单独水解和发酵以及同步糖化和发酵(图2)。

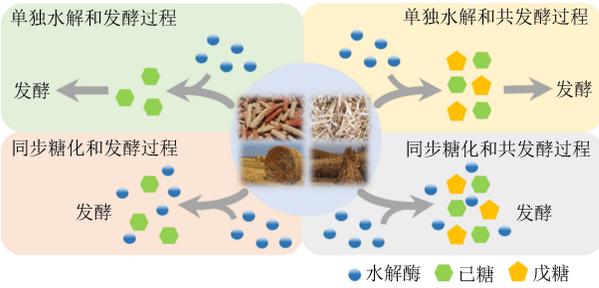


图2 单独水解和发酵过程以及同步糖化和发酵过程

Fig. 2 Separated hydrolysis and fermentation process and simultaneous saccharification and fermentation process

2.1 单独水解和发酵

单独水解和发酵可分为两个步骤,即制备可发酵糖和将这些糖转化为生物化学品和生物燃料。首先要在底物中加入各种水解酶以获取可发酵糖;然后,糖液被分离并转移到发酵体系最终获得高价值的目标产物^[47]。例如,阿本戈生物能源公司是世界上最大的商业化纤维素生物炼油厂,每年可以生产高达2 500万加仑的乙醇。它使用酸催化蒸汽爆炸法来破坏木质纤维素的结构。然后,纤维素和半纤维素被降解成己糖和戊糖,并进一步发酵成乙醇。此外,残余的木质素成分可以为工厂提供动力,使其成为一个能够自给自足的可再生能源工厂^[48]。此外,科莱恩公司每年可从小麦和玉米秸秆等残渣中生产1 000吨乙醇,实现了秸秆纤维素糖化和发酵^[49]。总之,由于木质纤维素降解和生物转化的分离,使得单独水解和发酵的每个步骤都可以在最佳条件下进行,从而获得高水解率和高产量。每千克木质纤维素的纤维素酶降解成本在0.31美元以上,与化石燃料转化相比不具备竞争力,这意味着水解酶的成本仍然限制了木质纤维素生物转化的商业应用。为了降低酶的成本,WANG等^[50]培养绿色木霉并利用分泌的粗纤维素酶来降解纤维素。粗纤维素酶发酵糖的最终产量达到17.32 g/L,糖化效率达到商业纤维素酶的82.2%。丙酮丁醇梭菌利用粗纤维素酶和商品纤维素酶的丁醇产量分别为5.05 g/L和5.56 g/L。与外加商业纤维素酶相比,粗酶无需分离纯化,可大大降低生产成本。

粗酶的回收和再利用是木质纤维素生物转化的瓶颈,最终造成发酵时间延长和酶资源的浪费。为了克服这一难题,已经开发了一种磁性纳米颗粒^[51]。氧化铁磁性纳米颗粒的表面被二氧化硅

和胺基双官能化,可以将纤维素酶、木聚糖酶和 β -1,3-葡聚糖酶固定在氧化铁磁性纳米颗粒上,实现酶的循环利用。与游离酶相比,氧化铁磁性纳米颗粒在6批次利用后仍能保持较高活性。酶固定化方法可以显著降低生产成本,但颗粒聚集降低了底物水解速率。除了水解酶的固定化之外,细胞的固定化也得到了广泛的研究。例如,郑等^[52]将酪丁酸梭菌固定在大孔海藻酸钙-木质素珠中,以从预处理的玉米芯中生产丁酸。重复10批发酵后丁酸产量基本保持不变,同时显著降低了发酵的成本和时间。此外,与游离培养相比,固定化细胞可以呈现更高的应激因子抗性,例如对pH和毒性副产物的抗性,并且增加了细胞的生长速率。

尽管酶和细胞的固定化可以显著降低生产成本并提高高浓度底物下的耐受性,但在许多研究中仍然很少涉及与回收技术和操作相关的成本^[53]。一方面,相关参数会随着生物转化规模的扩大而变化,如有毒副产物对微生物和酶活性的影响;另一方面,固定化酶的成本和效率需要作进一步的经济评估^[54]。

2.2 同步糖化和发酵

虽然单独水解和发酵是一种相对成熟的工艺,并已用于许多化学品和生物燃料的生产,但木质纤维素水解和发酵步骤的分离增加了设备成本,延长了发酵时间并且增加了对底物的抑制效果。因此,为了进一步优化这项技术,KIM等^[55]提出将水解和发酵步骤合并在一个反应器中,称为同步糖化和发酵。该工艺可缓解酶水解产物的抑制,进而提高水解效率。许多研究通过增加底物浓度来提高单独水解和发酵的生产效率,然而,高浓度的底物会使发酵液的传质效率降低,酶活性和微生物发酵也将受到高浓度底物的影响^[56]。通过添加表面活性剂或可溶性多糖可以增加细胞的通透性,提高微生物在高浓度底物环境中的耐受性。例如,XIAO等^[57]在发酵体系中加入聚氧乙烯(80)山梨醇酐单油酸酯可加快细胞生长速度,提高糖化效率;与对照组相比,可发酵糖产量增加了13.5%。

大多数生产化学品和燃料的微生物是嗜温的,而木质纤维素水解的适宜温度在50℃以上,更适合嗜热微生物发酵^[58]。例如,枯草芽孢杆菌是一种耐热菌株,能同时利用葡萄糖和木糖生产3-羟基丁酮,最高产量达到12.55 g/L,比单独水

解和发酵高 15.27%^[59]。然而,同步糖化和发酵过程中嗜温微生物的产量远低于单独水解和发酵。LI 等^[60]利用酿酒酵母从木质纤维素中生产葡萄糖二酸,而在酿酒酵母最适生长温度(30 ℃)下限制了水解酶的降解效率;相较于单独水解和发酵,同步糖化和发酵过程的葡萄糖二酸产量较低。解决水解和发酵温度不适配问题的关键是通过基因工程和诱变技术获得耐高温的菌株。最近,WU 等^[61]通过过量表达编码葡萄糖特异性磷酸转移酶系统的 *glcG* 开发了一种工程丙酮丁醇梭菌菌株。*glcG* 的过量表达不仅促进了葡萄糖的高效摄取,而且对 ATP/NADH 的可用性和抗逆性产生了显著的级联效应。在 42 ℃ 下,工程菌株从 48 g/L 玉米秸秆中得到 10.8 g/L 丁醇,与原始菌株相比产量增加了 40%。

3 统合生物加工过程

单独水解和发酵以及同步糖化和发酵都需要额外添加水解酶,这将限制其工业应用。统合生物加工过程将水解酶生产、酶水解和微生物发酵整合到一个生物反应器中,该方法可以消除外源酶的添加,同时降低木质纤维素生物转化的复杂性和生产成本^[62]。由于木质纤维素水解酶系统和产物代谢途径都很复杂,在单一菌株中同时进行这两个过程将增加代谢负荷,从而显著降低产物合成的最终效率。因此,除了单一细菌发酵外,通过统合生物加工过程的共培养策略受到越来越多的关注。

3.1 单一微生物策略

在单一微生物中直接完成木质纤维素水解和转化的统合生物加工过程策略可分为两种,包括“本地策略”和“重组策略”(图 3(a)和(b))^[63]。前者是通过基因工程的手段在天然纤维素降解微生物中表达目标产物的代谢途径。本地策略的主要挑战是既需要保持较高的水解能力,又需要提高目标产品的合成能力。为了实现纤维素梭菌直接从纤维素中生产丁醇的目的,WEN 等^[64]开发了一种基于“推拉”策略的代谢工程方法。首先将反式烯酰辅酶 A 还原酶过量表达,使得碳流从乙酰辅酶 A 拉到丁酰辅酶 A。然后,引入与丙酮生产不耦合的酸再同化途径,以将碳流从丁酸盐和乙酸盐重新导向丁酰辅酶 A。通过该策略,丁醇的最终产量比野生型提高了 135 倍。此外,热纤梭菌是另一种没有丁醇生产能力的纤维素降解菌株,将与丁醇生产相关的外源关键基因引入热纤梭菌,工程菌株便能在 120 h 内从纤维素中生产 357 mg/L 的正丁醇^[65]。“重组策略”是将纤维素酶或/和半纤维素酶引入非纤维素分解菌株中,这可以赋予它们降解木质纤维素的能力^[66]。与“本地策略”相比,这些菌株具有更好的目标产物转化能力。然而,其主要的挑战是需要进一步提高木质纤维素的降解能力。例如,CHEN 等^[67]构建了用于纤维素乙醇转化的二倍体酿酒酵母,其可以异源表达纤维素酶和木聚糖酶。工程酿酒酵母在没有外源添加水解酶的情况下,从 20 g/L 经过蒸汽爆破的玉米秸秆中生产得到 1.61 g/L 乙醇。

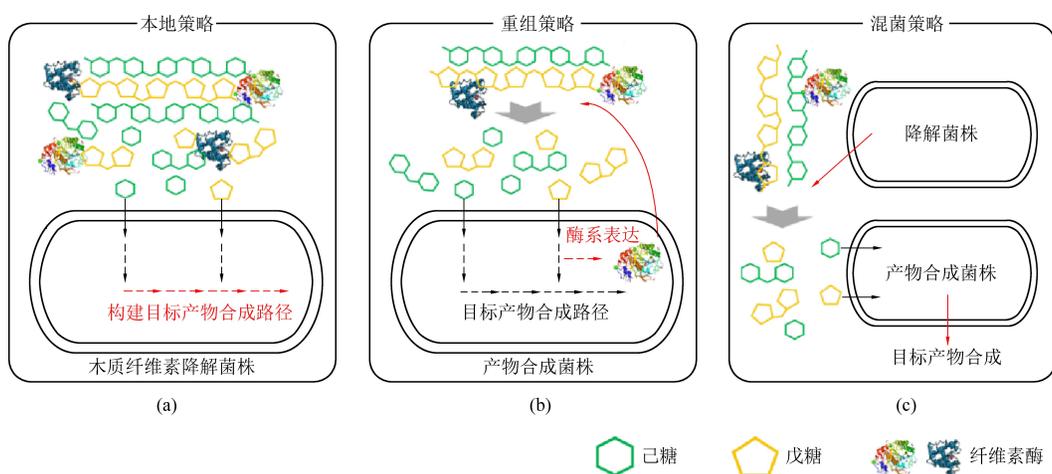


图 3 统合生物加工过程策略

Fig. 3 The strategy of consolidated bioprocessing

虽然“本地策略”和“重组策略”可以实现在单一菌株中利用木质纤维素进行生物转化的目

的,但是这两种策略的产量往往较低。其主要原因是在单一菌株中同时完成木质纤维素的降解和

转化会导致严重的代谢负担。例如,细胞的产物合成代谢途径需要消耗胞内的能量来产生辅酶因子,这将导致细胞生长所需的能量减少^[68]。通常,敲除不必要的基因和增强目标产物合成的代谢途径将提高目标产物的合成能力。例如,谷氨酸棒状杆菌是一种应用于琥珀酸生产的微生物,为了提高其生产琥珀酸的能力,将 *pntAB* 整合到谷氨酸棒状杆菌中以增加 NADH 分泌。此外,有研究表明,谷氨酸棒状杆菌中的 *pgi* 会使碳通量流入双磷酸己糖降解途径,导致副产物的增加。为了减少副产物的产生,删除 *pgi* 以将碳通量重新导向戊糖磷酸途径。然而,研究发现,在葡萄糖作为唯一底物的情况下,*pgi* 缺陷的谷氨酸棒状杆菌生长不良,这是由于负责葡萄糖分子转运的 *ptsG* 下调造成的。为了解决这个问题,将 *ptsG* 整合到 *pgi* 缺陷菌株中。最后,与以葡萄糖为底物获得 1.07 mol/mol 琥珀酸的对照菌株相比,工程菌株的琥珀酸收率达到 1.37 mol/mol^[69]。即便如此,工程菌株的提高也是有限的。许多微生物仍然缺乏完整的代谢机制和成熟的基因编辑工具,这限制了它们的工业应用^[70]。此外,水解酶系统和代谢途径的复杂性也将增加单一微生物的代谢负担,并且,即使通过基因编辑的工程菌株也仅仅获得了相对较低的产量和收率。

3.2 微生物共培养策略

在自然界中,微生物难以独自在错综复杂的环境中生存,它们通常以各种微生物团体的形式存在^[71]。基于此,木质纤维素的水解和转化工作也可以划分给不同的菌株,通过劳动分工可以有效减轻细胞代谢负担(图 3(c))^[72]。然而,建立劳动分工的微生物菌群通常只能产生 CH₄、H₂ 和少量有机酸等产物^[73]。因此,建立适用于工业生产的合成微生物群落是一个较有前景的研究方向。

在微生物群落中不合理的代谢分工会造成对营养物质的竞争,从而导致菌群比例的失衡^[74]。因此,共培养系统中菌株之间的特定劳动分工对于有效的木质纤维素降解和转化是必要的。对于木质纤维素生物转化而言,合理的劳动分工是:上游菌株降解木质纤维素,然后水解得到的可发酵糖被下游菌株转化成目标产物。最重要的是,可发酵糖的快速消耗可以解除底物抑制,增强上游菌株对木质纤维素的降解效率。例如,一个包含木质纤维素降解菌、热解糖高温厌氧杆菌 M5 和

丁醇生产菌丙酮丁醇梭菌 NJ4 的微生物共培养系统成功实现了从木聚糖和未经预处理的玉米芯中生产丁醇^[75]。菌株 M5 分泌的木聚糖酶和木糖苷酶将木聚糖降解为木糖,菌株 NJ4 对木糖的快速消耗解除了木糖对木聚糖酶的抑制。此外,菌株 M5 可以产生丁酸盐,丁酸盐可以被菌株 NJ4 进一步同化以产生丁醇。这两种菌株能产生良好的互补作用,使发酵过程更加高效,最终从未经处理的玉米芯中产生 7.61 g/L 丁醇。类似地,包含热解糖高温厌氧杆菌 M5 和产琥珀酸放线杆菌 130Z 的微生物共培养系统也实现了从木质纤维素生产琥珀酸的目的^[76]。通过单因素和响应面优化从 84 g/L 木聚糖和 80 g/L 玉米芯中获得的琥珀酸产量分别为 32.50 g/L 和 12.5 g/L。热纤梭菌是另一种具有纤维素降解能力的嗜热细菌。CHI 等^[77]构建了包含热纤梭菌 ATCC 27405 和热丁酸梭菌 ATCC 49875 的共培养系统来生产丁酸。代谢分析表明,热纤梭菌能降解木质纤维素释放的可发酵糖并迅速转化为丁酸,以稻草为底物时丁酸的产量达到 33.9 g/L。此外,热丁酸梭菌的次生代谢还能促进丁酸的生产,同时能够将副产物乙酸和乙醇再同化。

在微生物共培养系统中,相似的生长条件对于木质纤维素的有效转化是重要的。里氏木霉和玉米黑粉菌都可以在 30 °C 的有氧条件下生长,在这种共培养系统中,里氏木霉负责木质纤维素的降解,玉米黑粉菌负责衣康酸的产生。采用补料分批发酵的策略,衣康酸的产量达到 33.8 g/L^[78]。为了进一步提高共培养系统成员之间的适应性,采用了基因工程和适应性进化的策略。例如,WEN 等^[79]设计了一种共培养系统,通过纤维素梭菌和拜氏梭菌从木质纤维素中生产丁醇。拜氏梭菌在较低的 pH 下发酵生产丁醇,而纤维素梭菌在低于 6.4 的 pH 下不能良好的生长。因此,纤维素梭菌被工程化以增强对低 pH 的耐受性,这可以改善木质纤维素糖化和丁醇发酵。工程菌最终产生 3.94 g/L 丁醇,比对照菌株的产量高出 5 倍。

底物降解速率仍然是统合生物加工过程中的关键限速步骤。因此,提高木质纤维素的降解速率和可发酵糖的释放速率是统合生物加工过程所必需的。通常,真菌比细菌具有更高的木质纤维素降解能力^[80]。然而,好氧菌和厌氧菌生长条件(包括温度和氧气需求)的矛盾也是木质纤维素生物转化的挑战。因此,开发了多物种生物膜反应

器,其可以同时创造有氧和厌氧环境。首先,丝状真菌由于其良好的成膜性,容易附着在材料表面。随着时间的推移,菌丝占据了材料的整个表面,形成了致密的生物膜。然后,生物膜上的细胞会消耗空气中的氧气,阻止氧气渗透到液相中。一个典型的例子是在生物膜反应器中构建跨种属共培养体系,其中包含好氧真菌里氏木霉和厌氧乳酸菌^[81]。里氏木霉在载体材料上形成生物膜消耗氧气,分泌的纤维素酶能高效降解纤维素。厌氧乳酸菌在获得的可发酵糖中生长并产生乳酸。以高温蒸汽预处理后的山毛榉木材为底物,最终乳酸的产量达到 19.8 g/L。此外,复杂、稳定且高效的产乳酸盐共培养系统可用作生产短链脂肪酸的平台。

4 结语和展望

当前,石油等不可再生资源仍是制备化学品和燃料的主要原料,但随着化石燃料的枯竭以及对环境的污染日益加剧,开发一种新的和可再生的生物质资源变得越来越重要。木质纤维素作为一种储量巨大的生物质资源,如果能将其有效开发,不仅可以缓解能源危机,而且可以减少对环境的污染,实现绿色、可持续的生产模式。

目前,木质纤维素的降解和生物转化策略已经取得了很大进展。然而,由于木质纤维素复杂的结构,使得其难以降解利用,因此,通过筛选性能更强的微生物和水解酶,并选择合适的生物转化策略有望实现更高的生产能力。单独水解和发酵可以使木质纤维素水解和发酵在最适的温度等条件下进行,有利于提高水解效率和发酵产量,但同时也会增加生产成本。同步糖化和发酵可以缓解酶水解产物对酶的抑制,进而提高水解效率,但酶水解和发酵的温度往往不匹配,因此会导致最终的生产效率较低。相较而言,统合生物加工过程实现了不需要外源添加水解酶即可从木质纤维素中获取产物,有效减少了生产成本。然而,统合生物加工过程中单一微生物策略需要对菌株进行基因工程改造,对于一些非模式微生物来说,由于基因编辑工具的缺乏,使得改造难度增大。因此,开发有效的基因编辑工具是未来研究的方向。为了减轻单一微生物需要同时完成水解和发酵的代谢负担,于是,构建了微生物共培养体系。这种微生物共培养策略可以实现上游木质纤维素降解菌株和下游产物合成菌株的合理代谢分工,提高了木质纤维素生物转化的效率。然而,共培养体系

中菌株间的不适配性仍然是制约其工业化应用的关键因素。未来,通过筛选相适配的菌株和基因工程改造提高菌株的耐受性,有望建立稳定、可调和高效的共培养体系,最终实现木质纤维素生物质资源的全组分利用以及节能减排和可持续发展的目标。

参考文献 (References):

- [1] BANU J R, PREETHI, KAVITHA S, et al. Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy [J]. *Fuel*, 2021, 302(1): 121086.
- [2] AREVALO GALLEGOS A, AHMAD Z, ASGHER M, et al. Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 99: 308–318.
- [3] MOKOMELE T, SOUSA L D, BALAN V, et al. Ethanol production potential from AFEXTM and steam-exploded sugarcane residues for sugarcane biorefineries [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11(1): 127.
- [4] SHEN Xiaojun, SUN Runcang. Recent advances in lignocellulose prior-fractionation for biomaterials, biochemicals, and bioenergy [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 261: 117884.
- [5] LI Pengfei, HE Chao, CHENG Chongbo, et al. Prediction of methane production from co-digestion of lignocellulosic biomass with sludge based on the major compositions of lignocellulosic biomass [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28 (20): 25808–25818.
- [6] CHANG Y H, LIN C L, HSU Y H, et al. Medium effect on acid degradation of cotton and wood celluloses [J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 167: 113540.
- [7] ROMASHKIN I, SHOROHVA E, KAPITSA E, et al. Substrate quality regulates density loss, cellulose degradation and nitrogen dynamics in downed woody debris in a boreal forest [J]. *Forest Ecology and Management*, 2021, 491: 119143.
- [8] SHALLOM D, SHOHAM Y. Microbial hemicellulases [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6 (3): 219–228.
- [9] CHEN W H, PEN B L, YU C T, et al. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (3): 2916–2924.
- [10] SINGH R, SINGH S, TRIMUKHE K D, et al. Lignin-carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification, and characterization [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2005, 62 (1): 57–66.
- [11] SARSAIYA S, JAIN A, AWASTHI S K, et al. Microbial dynamics for lignocellulosic waste bioconversion and its importance with modern circular economy, challenges and future perspectives [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 291: 121905.
- [12] 马泽林, 刘家亨, 黄序, 等. 微生物利用木质纤维素的研

- 究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(6): 124-133.
- MA Zelin, LIU Jiaheng, HUANG Xu, et al. Research progress on utilization of lignocellulosic biomass by microorganisms [J]. China Biotechnology, 2017, 37(6): 124-133.
- [13] 余强, 庄新妹, 袁振宏, 等. 木质纤维素类生物质制取燃料及化学品的研究进展 [J]. 化工进展, 2012, 31(4): 784-791.
- YU Qiang, ZHUANG Xinshu, YUAN Zhenhong, et al. Research progress on fuel and chemicals production from lignocellulose biomass [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2012, 31(4): 784-791.
- [14] DENG Weiping, FENG Yunchao, FU Jie, et al. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels [J]. Green Energy & Environment, 2023, 8(1): 10-114.
- [15] 丛高鹏, 施英乔, 房桂干. 利用木质纤维素原料生产高附加值产品的技术前景 [J]. 国际造纸, 2012, 31(1): 56-62.
- CONG Gaopeng, SHI Yingqiao, FANG Guigan. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products [J]. Paper and Biomaterials, 2012, 31(1): 56-62.
- [16] 曹运齐, 解先利, 郭振强, 等. 木质纤维素预处理技术研究进展 [J]. 化工进展, 2020, 39(2): 489-495.
- CAO Yunqi, XIE Xianli, GUO Zhenqiang, et al. Research progress on lignocellulose pretreatment technology [J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2020, 39(2): 489-495.
- [17] 曹玉连, 庄伟, 唐成伦, 等. 木质纤维素预处理实现组分综合利用 [J/OL]. 生物加工过程: 1-12 [2023-11-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1706.Q.20231023.1622.012.html>.
- CAO Yulian, ZHUANG Wei, TANG Chenglun, et al. Advances on comprehensive utilization of lignocellulose by pretreatment technology [J/OL]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering: 1-12 [2023-11-24]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/32.1706.Q.20231023.1622.012.html>.
- [18] WU Zengyou, PENG Kun, ZHANG Yin, et al. Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review [J]. Materials Today Bio, 2022, 16: 113540.
- [19] 朱晨杰, 张会岩, 肖睿, 等. 木质纤维素高值化利用的研究进展 [J]. 中国科学: 化学, 2015, 45(5): 454-478.
- ZHU Chenjie, ZHANG Huiyan, XIAO Rui, et al. Research progress in catalytic valorization of lignocellulose [J]. Scientia Sinica Chimica, 2015, 45(5): 454-478.
- [20] ZHU Ning, ZHU Yanyun, LI Bingqing, et al. Increased enzyme activities and fungal degraders by *Gloeophyllum trabeum* inoculation improve lignocellulose degradation efficiency during manure - straw composting [J]. Bioresource Technology, 2021, 337: 125427
- [21] HE Xiangxiang, LU Wei, SUN Cuixia, et al. Cellulose and cellulose derivatives: Different colloidal states and food-related applications [J]. Carbohydrate Polymers, 2020, 255(2): 117334.
- [22] DARANAGAMA N D, SHIOYA K, YUKI M, et al. Proteolytic analysis of *Trichoderma reesei* in cellulase-inducing condition reveals a role for trichodermapepsin (TrAsP) in cellulase production [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2019, 46(6): 831-842.
- [23] SHIDA Y, FURUKAWA T, OGASAWARA W. Deciphering the molecular mechanisms behind cellulase production in *Trichoderma reesei*, the hyper-cellulolytic filamentous fungus [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2016, 80(9): 1712-1729.
- [24] HUANG Yu, WANG Linshan, CHAO Yuesheng, et al. Relationships between hemicellulose composition and lignin structure in woods [J]. Journal of Wood Chemistry and Technology, 2015, 36(1): 9-15.
- [25] SINGH S, MADLALA A M, PRIOR B A. *Thermomyces lanuginosus*: Properties of strains and their hemicellulases [J]. Fems Microbiology Reviews, 2003, 27(1): 3-16.
- [26] CHUNDAWAT S P S, LIPTON M S, PURVINE S O, et al. Proteomics-based compositional analysis of complex cellulase-hemicellulase mixtures [J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10(10): 4365-4372.
- [27] WHEELER M M, TARVER M R, COY M R, et al. Characterization of four esterase genes and esterase activity from the gut of the termite *Reticulitermes flavipes* [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2010, 73(1): 30-48.
- [28] 秦影, 傅英娟, 秦梦华. 木质纤维素生物质精炼的研究进展 [J]. 大连工业大学学报, 2018, 37(3): 8.
- QIN Ying, FU Yingjuan, QIN Menghua. Advances in lignocellulosic biorefinery [J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2018, 37(3): 8.
- [29] YANG S, HAI F I, NGHIEM L D, et al. Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review [J]. Bioresource Technology, 2013, 141: 97-108.
- [30] ZHUO Rui, FAN Fangfang. A comprehensive insight into the application of white rot fungi and their lignocellulolytic enzymes in the removal of organic pollutants [J]. Science of the Total Environment, 2021, 778: 146132.
- [31] KAMIMURA N, SAKAMOTO S, MITSUDA N, et al. Advances in microbial lignin degradation and its applications [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 56: 179-186.
- [32] ZHANG Xu. Determination of optimal reaction conditions and influence of metal ions on cellulose degradation by cellulase in the dioctyl sulfosuccinate sodium salt (AOT)/n-hexanol/cyclohexane reversed micelle system [J]. Journal of Dispersion Science and Technology, 2014, 35(1): 14-21.
- [33] XU Chao, ZHANG Jun, ZHANG Yu, et al. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives [J]. Bioresource Technology, 2019, 292: 121993.
- [34] GAO Dahai, UPPUGUNDLA N, CHUNDAWAT S P S, et al.

- Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4(1): 5.
- [35] VAHIDI M F, GHARECHAHI J, BEHMANESH M, et al. Diversity of microbes colonizing forages of varying lignocellulose properties in the sheep rumen [J]. *Peerj*, 2021, 9: e10463.
- [36] LIANG Jinsong, ZHENG Wenge, ZHANG Haibo, et al. Transformation of bacterial community structure in rumen liquid anaerobic digestion of rice straw [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 269: 116130.
- [37] BRUNE A. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(3): 168–180.
- [38] PUENTES TÉLLEZ P E, SALLES J F. Construction of effective minimal active microbial consortia for lignocellulose degradation [J]. *Microbial Ecology*, 2018, 76(2): 419–429.
- [39] XIE Xiao, YANG Chunlei, GUAN Le L, et al. Persistence of cellulolytic bacteria fibrobacter and treponema after short-term corn stover-based dietary intervention reveals the potential to improve rumen fibrolytic function [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1363.
- [40] PATEL M, PATEL H M, VOHRA N, et al. Complete genome sequencing and comparative genome characterization of the lignocellulosic biomass degrading bacterium *Pseudomonas stutzeri* MP4687 from cattle rumen [J]. *Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)*, 2020, 28: e00530–e00530.
- [41] AN Xuejiao, CHEN Xi, WANG Yue, et al. Cellulolytic bacterium characterization and genome functional analysis: An attempt to lay the foundation for waste management [J]. *Biore-source technology*, 2021, 321: 124462.
- [42] DOI R H, TAMARU Y. The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: An enzyme complex with plant cell wall degrading activity [J]. *Chemical Record*, 2001, 1(1): 24–32.
- [43] OSIRO K O, DE CAMARGO B R, SATOMI R, et al. Characterization of *Clostridium thermocellum* (B8) secretome and purified cellulosomes for lignocellulosic biomass degradation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 97: 43–54.
- [44] BISCHOF R H, RAMONI J, SEIBOTH B. Cellulases and beyond: The first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei* [J]. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15(1): 106.
- [45] SPREY B, BOCHEM H P. Effect of endoglucanase and cellobiohydrolase from *trichoderma-reesei* on cellulose microfibril structure [J]. *Fems Microbiology Letters*, 1992, 97(1–2): 113–117.
- [46] XIROS C, STUDER M H. A multispecies fungal biofilm approach to enhance the cellulolytic efficiency of membrane reactors for consolidated bioprocessing of plant biomass [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1930.
- [47] TAVVA S, DESHPANDE A, DURBHA S R, et al. Bioethanol production through separate hydrolysis and fermentation of *Parthenium hysterophorus* biomass [J]. *Renewable Energy*, 2016, 86: 1317–1323.
- [48] DUWE A, TIPPKÖTTER N, ULBER R. Lignocellulose-bio-refinery: Ethanol-focused [J]. *Biorefineries*, 2019, 166: 177–215.
- [49] HORTSCH R, CORVO P. The biorefinery concept: Producing cellulosic ethanol from agricultural residues [J]. *Chemie Ingenieur Technik*, 2020, 92(11): 1803–1809.
- [50] WANG Zhenyu, CAO Guangli, JIANG Cheng, et al. Butanol production from wheat straw by combining crude enzymatic hydrolysis and anaerobic fermentation using *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 [J]. *Energy & Fuels*, 2013, 27(10): 5900–5906.
- [51] PERIYASAMY K. SANTHALEMBI L, MORTHA G, et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to fermentable sugars by immobilized magnetic cellulolytic enzyme cocktails [J]. *Langmuir*, 2018, 34(22): 6546–6555.
- [52] ZHENG Wenxiu, LIU Xujie, ZHU Liying, et al. Pretreatment with γ -Valerolactone/[Mmim]DMP and enzymatic hydrolysis on corncob and its application in immobilized butyric acid fermentation [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(44): 11709–11717.
- [53] INGLE A P, RATHOD J, PANDIT R, et al. Comparative evaluation of free and immobilized cellulase for enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass for sustainable bioethanol production [J]. *Cellulose*, 2017, 24(12): 5529–5540.
- [54] KARAGOZ P, BILL R M, OZKAN M. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations [J]. *Renewable Energy*, 2019, 143: 741–752.
- [55] OLOFSSON K, BERTILSSON M, LIDÉN G. A short review on SSF – An interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2008, 1(1): 1–14.
- [56] NOGUEIRA C D, PADILHA C E D, DOS SANTOS E S. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of green coconut fiber under high concentrations of ethylene oxide – based polymers [J]. *Renewable Energy*, 2021, 163: 1536–1547.
- [57] XIAO Wenjing, SONG Huiting, LI Huanan, et al. Effect of different biological surfactants on engineering *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and fermentation of corncob [J]. *Bioresources*, 2020, 15(2): 2512–2524.
- [58] 李江, 谢天文, 刘晓风. 木质纤维素生产燃料乙醇的糖化发酵工艺研究进展 [J]. *化工进展*, 2011, 30(2): 8. LI Jiang, XIE Tianwen, LIU Xiaofeng. Technologies of saccharification and fermentation for fuel ethanol from lignocellulosic materials [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2011, 30(2): 8.
- [59] JIA Xiaojing, PENG Xiaowei, LIU Ying, et al. Conversion of cellulose and hemicellulose of biomass simultaneously to acetoin by thermophilic simultaneous saccharification and fermentation [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 232.
- [60] LI Chaofeng, LIN Xiaofeng, LING Xing, et al. Consolidated bioprocessing of lignocellulose for production of glucaric acid

- by an artificial microbial consortium [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14 (1): 110.
- [61] WU Youduo, WANG Zhen Zhong, MA Xiao, et al. High temperature simultaneous saccharification and fermentation of corn stover for efficient butanol production by a thermotolerant *Clostridium acetobutylicum* [J]. *Process Biochemistry*, 2021, 100: 20–25.
- [62] LYND L R, VAN ZYL W H, MCBRIDE J E, et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16 (5): 577–583.
- [63] NAGARAJAN D, LEE D J, CHANG J S. Recent insights into consolidated bioprocessing for lignocellulosic biohydrogen production [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2019, 44 (28): 14362–14379.
- [64] WEN Zhiqiang, LEDESMA AMARO R, LU M R, et al. Metabolic engineering of *Clostridium cellulovorans* to improve butanol production by consolidated bioprocessing [J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9 (2): 304–315.
- [65] TIAN L, CONWAY P M, CERVENKA N D, et al. Metabolic engineering of *Clostridium thermocellum* for n-butanol production from cellulose [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 1–13.
- [66] DAVISON S A, DEN HAAN R, VAN ZYL W H. Exploiting strain diversity and rational engineering strategies to enhance recombinant cellulase secretion by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104 (12): 5163–5184.
- [67] CHEN Le, DU Jiliang, ZHAN Yongjia, et al. Consolidated bioprocessing for cellulosic ethanol conversion by cellulase-xyylanase cell-surfaced yeast consortium [J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 2018, 48 (7): 653–661.
- [68] MAKI M, LEUNG K T, QIN W S. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass [J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5 (5): 500–516.
- [69] WANG Chen, ZHOU Zhihui, CAI Heng, et al. Redirecting carbon flux through *pgi*-deficient and heterologous transhydrogenase toward efficient succinate production in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44 (7): 1115–1126.
- [70] YAN Qiang, FONG S S. Challenges and advances for genetic engineering of non-model bacteria and uses in consolidated bioprocessing [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2060.
- [71] SPERANDIO G B, FERREIRA E X. Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2019, 142: 109–123.
- [72] MINTY J J, SINGER M E, SCHOLZ S A, et al. Design and characterization of synthetic fungal – bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110 (36): 14592–14597.
- [73] TSOI R, WU F L, ZHANG C, et al. Metabolic division of labor in microbial systems [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115 (10): 2526–2531.
- [74] XIN Fengxue, DONG Weiliang, ZHANG Wenming, et al. Biobutanol production from crystalline cellulose through consolidated bioprocessing [J]. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37 (2): 167–180.
- [75] JIANG Yujia, LV Yang, WU Ruofan, et al. Consolidated bioprocessing performance of a two-species microbial consortium for butanol production from lignocellulosic biomass [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117 (10): 2985 – 2995.
- [76] LU Jiasheng, LV Yang, JIANG Yujiang, et al. Consolidated bioprocessing of hemicellulose-enriched lignocellulose to succinic acid through a microbial cocultivation system [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8 (24): 9035–9045.
- [77] CHI Xue, LI Jianzheng, WANG Xin, et al. Hyper-production of butyric acid from delignified rice straw by a novel consolidated bioprocess [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 254: 115–120.
- [78] SCHLEMBACH I, TEHRANI H H, BLANK L M, et al. Consolidated bioprocessing of cellulose to itaconic acid by a co-culture of *Trichoderma reesei* and *Ustilago maydis* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2020, 13 (1): 207.
- [79] WEN Zhiqiang, LEDESMA AMARO R, LU M R, et al. Combined evolutionary engineering and genetic manipulation improve low pH tolerance and butanol production in a synthetic microbial *Clostridium* community [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117 (7): 2008–2022.
- [80] ANDLAR M, REZIC T, MARDETKO N, et al. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2018, 18 (11): 768–778.
- [81] SHAHAB R L, LUTERBACHER J S, BRETHAUER S, et al. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass to lactic acid by a synthetic fungal–bacterial consortium [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115 (5): 1207–1215.