

特约评述

DOI: 10.12211/2096-8280.2023-046

热纤梭菌在生物质能源开发中的合成生物学研究进展

肖艳^{1, 2, 3, 4}, 刘亚君^{1, 2, 3, 4}, 冯银刚^{1, 2, 3, 4}, 崔球^{1, 2, 3, 4}

(¹ 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 中国科学院生物燃料重点实验室, 山东省合成生物学重点实验室, 山东 青岛 266101; ² 山东省能源研究院, 山东 青岛 266101; ³ 青岛新能源山东省实验室, 山东 青岛 266101; ⁴ 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 农林废弃物、能源植物、微藻等生物质是唯一同时具备“能源”和“物质”双重属性的可再生资源, 在替代不可再生的化石能源方面具有巨大的潜力。木质纤维素生物转化的核心之一在于高效生物催化剂的构建。热纤梭菌是高效降解木质纤维素的嗜热厌氧菌, 是多种木质纤维素生物转化策略的理想底盘菌株, 在生物质能源开发中具有重要价值。经过近二十年的研究和开发, 针对热纤梭菌已经建立了多种遗传改造技术, 并构建了可以生产多种能源分子及化学品的热纤梭菌细胞工厂。本文首先介绍了热纤梭菌及其纤维素降解与利用特性, 简述了热纤梭菌的系统生物学研究和遗传改造工具开发的现状, 随后重点回顾和总结了热纤梭菌在生产乙醇、丁醇、异丁醇、氢气、乳酸、中/短链脂肪酸酯和可发酵糖等生物能源开发中的合成生物学研究进展。最后对热纤梭菌的合成生物学发展方向进行了展望, 并强调了合成生物学技术在未来生物质能源开发中的重要作用。

关键词: 生物能源; 热纤梭菌; 纤维素; 生物燃料; 纤维小体

中图分类号: Q812 文献标志码: A

Progress in synthetic biology research of *Clostridium thermocellum* for biomass energy applications

XIAO Yan^{1, 2, 3, 4}, LIU Yajun^{1, 2, 3, 4}, FENG Yin'gang^{1, 2, 3, 4}, CUI Qiu^{1, 2, 3, 4}

(¹Shandong Provincial Key Laboratory of Synthetic Biology, CAS Key Laboratory of Biofuels, Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, Shandong, China; ²Shandong Energy Institute, Qingdao 266101, Shandong, China; ³Qingdao New Energy Shandong Laboratory, Qingdao 266101, Shandong, China; ⁴University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Biomass, including agricultural and forestry waste, energy plants, and microalgae, possesses both “energy” and “substance” properties, making it a promising renewable resource that can potentially replace fossil fuels. The efficient lignocellulose bioconversion relies on the development of effective biocatalysts. *Clostridium thermocellum* (also known as *Ruminiclostridium thermocellum*, *Hungateiclostridium thermocellum*, and *Acetivibrio thermocellus*) is a thermophilic anaerobic bacterium that can efficiently degrade lignocellulosic biomass. Over the past two decades,

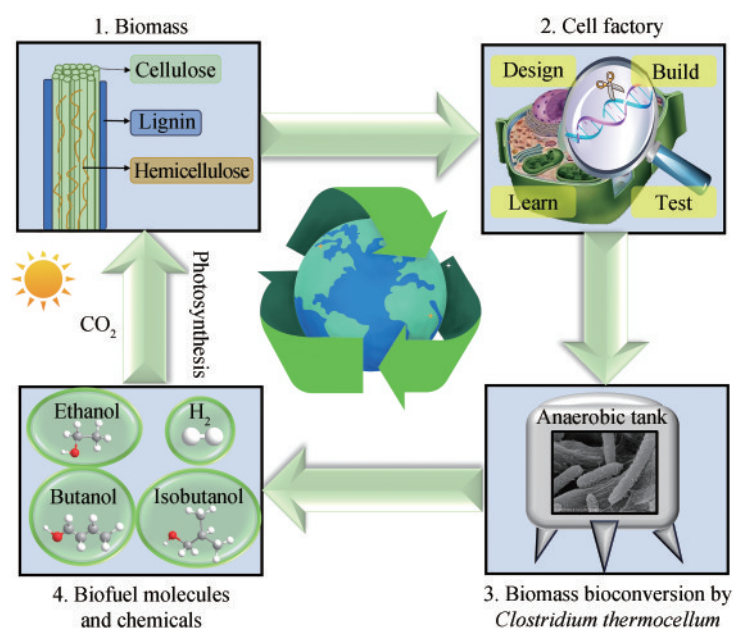
收稿日期: 2023-07-02 修回日期: 2023-09-22

基金项目: 国家自然科学基金 (32070125, 32170051); 山东能源研究院 (SEI I202106, SEI S202106); 山东省自然科学基金 (ZR2022MC128)

引用本文: 肖艳, 刘亚君, 冯银刚, 崔球. 热纤梭菌在生物质能源开发中的合成生物学研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(6): 1055-1081

Citation: XIAO Yan, LIU Yajun, FENG Yin'gang, CUI Qiu. Progress in synthetic biology research of *Clostridium thermocellum* for biomass energy applications [J]. Synthetic Biology Journal, 2023, 4(6): 1055-1081

extensive research and development have led to the potential of using *C. thermocellum* as a cell factory to produce various energy and chemicals from lignocellulose. *C. thermocellum* has been used to produce ethanol, butanol, isobutanol, hydrogen, lactic acid, medium/short-chain fatty acid esters, and fermentable sugars from lignocellulosic biomass. The degradation and utilization process of lignocellulosic biomass by *C. thermocellum* mainly involves substrate recognition and hydrolysis through the cellulosome, hydrolysate uptake through ABC transporters, and intracellular metabolism *via* atypical glycolytic pathways. *C. thermocellum* possesses dynamic regulation of cellulosome production adapting extracellular substrates, which enables the high capability of degrading various lignocellulosic substrates. The cellulosome consists of non-catalytic scaffoldins and multiple enzymatic subunits with distinct catalytic activities and has broad applications in synthetic biology as well as lignocellulose degradation. In addition to lignocellulose refinery, the thermophilic *C. thermocellum* also has great potential in synthetic biology research under high-temperature conditions. Several genetic manipulation tools have been developed for *C. thermocellum*, although greater challenges have been encountered compared to model organisms such as *Escherichia coli*. The genetic tools include homologous recombination technology, Thermotargetron technology, and CRISPR/Cas systems, which enable gene knockout, insertion, replacement, mutation, and expression regulation of target genes in the strain. *C. thermocellum* has been used as the whole-cell biocatalyst for lignocellulose bioconversion through consolidated bioprocessing (CBP) and consolidated bio-saccharification (CBS). CBS follows the concept of sugar platform construction and shows great potential in real-world applications. The synthetic biology research targeting the CBS strategy still requires future development. For example, we need to explore new genetic tools and thermophilic functional elements for *C. thermocellum* and improve the efficiency of gene editing. We need to strengthen research on the genetic, physiological, and metabolic aspects of *C. thermocellum*, and the molecular mechanisms underlying lignocellulose degradation. It is noteworthy that, as a strict anaerobe, *C. thermocellum* cannot be used as the chassis for catalyzing oxygen-involved reactions. Selecting suitable metabolic pathways and target products will be the focus in future developments of synthetic biology based on *C. thermocellum*. Therefore, we need to investigate additional target pathways and products for synthetic biology development. In recent years, automation methods and artificial intelligence (AI) technologies are being developed rapidly and have been applied in various synthetic biology research fields. Such technologies may also be employed to promote research on thermophilic and anaerobic microorganisms.



Keywords: bioenergy; *Clostridium thermocellum*; cellulose; biofuels; cellulosome

农林废弃生物质作为全球公认的零碳可再生能源,在我国能源转型和双碳战略中具有举足轻重的作用。我国农林废弃生物质的产量巨大,目前,通过化学转化、生物化学转化、电化学转化 and 光化学转化等多种技术可以将生物质转化为电、热、气、液体燃料、固体燃料等生物质能,但目前生物质能源与化石能源相比仍很难具有经济竞争力^[1-2]。其中,生物化学转化技术具有条件温和、能量需求小、排污少等优点,但是也存在转化效率不高、周期较长、生物催化剂稳定性不足等问题^[2-4]。

木质纤维素是农林废弃生物质中的主要成分,结构致密复杂,导致其难以被生物降解和转化。因此,木质纤维素生物转化的核心之一在于高效生物催化剂的创建。木质纤维素生物转化主要包括原料预处理、纤维素酶生产、纤维素酶解糖化和糖化液发酵等技术环节^[5]。基于对这些过程的不同程度的整合,研究者提出了不同的转化策略:分步糖化发酵(SHF)、同步糖化发酵(SSF)、整合生物加工(CBP)和整合生物糖化(CBS)^[6]。CBP策略由美国达特茅斯学院Lee R. Lynd教授提出,将纤维素酶的生产、纤维素酶解及可溶性糖发酵等反应整合在一个反应器中进行,通过过程的整合降低过程成本和污染的风险,得到了广泛的关注^[7-10]。自然界中的天然菌株中尚未发现能够直接完成CBP策略所有步骤的菌株,而木质纤维素的降解又是整个生物转化过程中最困难的一步,所以Lynd认为热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)等自然界中的高效降解木质纤维素的微生物是极具潜力的CBP候选菌株,通过改造它们有望实现CBP策略^[4, 11-12]。热纤梭菌是目前已知的自然界中最高效的纤维素降解厌氧细菌之一^[13],它通过分泌一种被称为纤维小体(cellulosome)的复杂多酶复合体来降解木质纤维素中的多糖组分,降解效率高于真菌分泌的游离纤维素酶系统^[14-15]。同时,热纤梭菌具有将糖代谢生成乙醇、氢气、有机酸等能源化合物的代谢途径,但产量和产率较低,因而Lynd研究组及其合作者对热纤梭菌进行了大量的改造,期望将其构建成为CBP工程菌株^[16-18]。但另一方面,由于在一个微生物中同时整合产酶、糖化和发酵的能力,存在微生物改造程度大、不

同步步骤最佳条件不兼容等问题,CBP工程菌株往往只能在牺牲部分性能的条件下进行生产,同时经过复杂的改造获得的一种菌株也只能生产特定的产品,缺乏灵活性。为解决这些问题,本文作者提出了CBS策略,将发酵步骤从CBP中剥离出来,通过高效降解木质纤维素的细菌将纤维素和半纤维素降解为可发酵糖,然后以可发酵糖作为平台化合物与其他发酵技术对接。由于糖化和下游产品发酵由不同的菌株完成,两类菌株可以分别在其最优条件下进行工作,可生产的产品种类也不再受到单一菌株的限制,因而将能生产多种多样能源产品和化学品,具有更为灵活的应用前景^[4]。在CBS策略中,需要生产较高浓度的可发酵糖,而通常情况下纤维素降解菌的降解能力受到产物糖的反馈抑制,因此需要对纤维素降解菌进行改造,降低产物糖分子对其酶系统的反馈抑制。热纤梭菌作为高效降解木质纤维素的菌株,也是CBS策略中极具潜力的底盘菌株。本文作者通过对热纤梭菌的迭代改造,成功构建了具有良好糖化性能的CBS工程菌株,并实现了与下游多种菌株的发酵偶联^[19-21]。

近年来,合成生物学技术发展迅速,为提升生物催化剂性能、构建细胞工厂进行生物能源炼制提供了新的思路、方法和工具,已经成为生物质能开发领域的研究热点^[22]。热纤梭菌作为最有潜力的CBP和CBS技术的底盘初始菌株,也存在许多天然的不足之处,包括生物量低、无法有效利用戊糖、纤维素降解产物对纤维小体存在反馈抑制、终产物乙醇和有机酸对细胞有很大的毒性、自身合成能源分子的产量较低等问题^[18, 23-25]。因此,要利用热纤梭菌实现生物质能源的高效生产,需要应用合成生物学技术对其进行系统的改造,构建以量产能源分子或可发酵糖为目标的高温生物质炼制细胞工厂。热纤梭菌作为一种嗜热厌氧的非模式微生物,其遗传操作相对困难。幸运的是,经过数十年的研究,目前研究者已经针对热纤梭菌建立了稳定的遗传转化技术和基因编辑技术^[4, 11-12],也已开展了热纤梭菌生理特性、代谢途径优化、底物谱拓展、能源产品衍生等领域的研究,为热纤梭菌的合成生物学开发提供了基础,但与成熟的工业模式微生物相比,热纤梭菌的合

成生物学研究还在初始发展阶段,未来还有巨大的发展潜力^[18]。本文总结了热纤梭菌这一高温厌氧菌在木质纤维素生物质降解中的独特生理特性,及其纤维素底物识别、转运及利用的过程,简述了热纤梭菌系统生物学研究和遗传操作技术的开发,重点讨论了热纤梭菌在乙醇、丁醇、异丁醇、氢气、乳酸、中/短链脂肪酸酯合成和糖平台中的合成生物学应用,最后对热纤梭菌的合成生物学开发进行了展望。

1 热纤梭菌简介

热纤梭菌是一种嗜热、严格厌氧的革兰氏阳性细菌,在45~65℃之间可以生长,最适生长温度为55~60℃,是目前最高效的纤维素降解细菌之一,其降解效率比嗜中温的解纤维梭菌和极端嗜热的热解纤维素菌高10倍以上^[26-27],比产纤维素酶的真菌高2~4倍^[14]。热纤梭菌最初分类为梭菌属,但后续的研究发现其属于梭菌纲中不同于梭菌属的一个分支,其拉丁名共经历了3次更名,从*Clostridium thermocellum*依次被更改为*Ruminiclostridium thermocellum*(热纤瘤胃梭菌)、*Hungateiclostridium thermocellum*(热纤亨氏梭菌)和*Acetivibrio thermocellus*(热纤醋弧菌)^[28]。由于*Clostridium thermocellum*的名称已被使用多年,目前大多数文献仍然采用这一名称,因此本文也仍然采用“热纤梭菌”这一中文译名。目前已有十余株不同的热纤梭菌菌株基因组得到测序^[29],其中DSM 1313和ATCC 27405是研究最多的热纤梭菌菌株。DSM 1313菌株具有完整的基因组信息^[30]和高效可靠的遗传操作方法^[31-32],而ATCC 27405的遗传转化更加困难^[33],目前在代谢工程方面的进展主要是以热纤梭菌DSM 1313菌株为主。热纤梭菌可以利用 β -1,4和 β -1,3葡聚糖快速生长,但是在以葡萄糖、果糖和山梨醇为底物时适应期较长^[29]。热纤梭菌的一个最大的特色是降解纤维素的机制与真菌不同,真菌来源的纤维素酶以游离形式独立起作用,热纤梭菌的纤维素酶则通过形成超分子复合体即纤维小体来高效协同降解纤维素,降解产物主要是可溶性的纤维寡糖,同时有少量的葡萄糖。

2 热纤梭菌的纤维素降解与利用

热纤梭菌的木质纤维素降解与利用过程主要包括三个步骤(图1):底物识别与降解,降解产物的摄取,以及胞内代谢。首先,利用纤维小体将纤维素底物降解为不同聚合度的可溶性纤维寡糖;其次,通过ABC转运蛋白将其转运到胞内;最后,通过非典型的糖酵解途径进行胞内糖代谢。

2.1 热纤梭菌的木质纤维素降解

热纤梭菌通过具有复杂组装的纤维小体降解木质纤维素。纤维小体是由无催化活性的脚架蛋白亚基(scaffoldin)和具有不同催化活性的多种酶亚基通过自组装形成的复合体(图2)^[34]。一级脚架蛋白亚基通常包含多个串联的I型粘连模块(cohesin),可以和酶亚基上带有的I型对接模块(dockerin)形成非常强的非共价相互作用,从而将多个酶串联组装在一起形成大复合体。不仅如此,热纤梭菌中还含有二级脚架蛋白,上面包含有串联的II型粘连模块,而一级脚架蛋白上带有的II型对接模块可以结合于二级脚架蛋白,从而使多个纤维小体串联起来形成整体分子量超大的多纤维小体复合体。除此之外,部分脚架蛋白和酶亚基上还带有纤维素结合模块(cellulose-binding module),可以增加纤维小体与底物的亲和力从而促进纤维小体的活力^[34]。部分脚架蛋白上还带有一个细胞壁结合模块,可以将纤维小体挂在细胞表面,这样纤维小体降解产生的寡糖可以立即被细胞所吸收,减少产物反馈抑制和扩散损失。纤维小体的这种组装架构,产生了酶-酶、酶-底物和酶-细胞三个层面的协同作用,这些协同作用是纤维小体高效降解纤维素的关键因素之一^[35]。纤维小体具有的这种模块化和自组装的特性,使其除了用于木质纤维素降解转化之外,各类组装模块在合成生物学中还具有广泛的应用^[36]。

纤维小体除了具有高度复杂的自组装结构,还具有高度的异质性和动态性,这也是纤维小体高效降解纤维素的关键因素之一。热纤梭菌的纤维小体酶亚基达70多个,包括一系列的糖苷水解

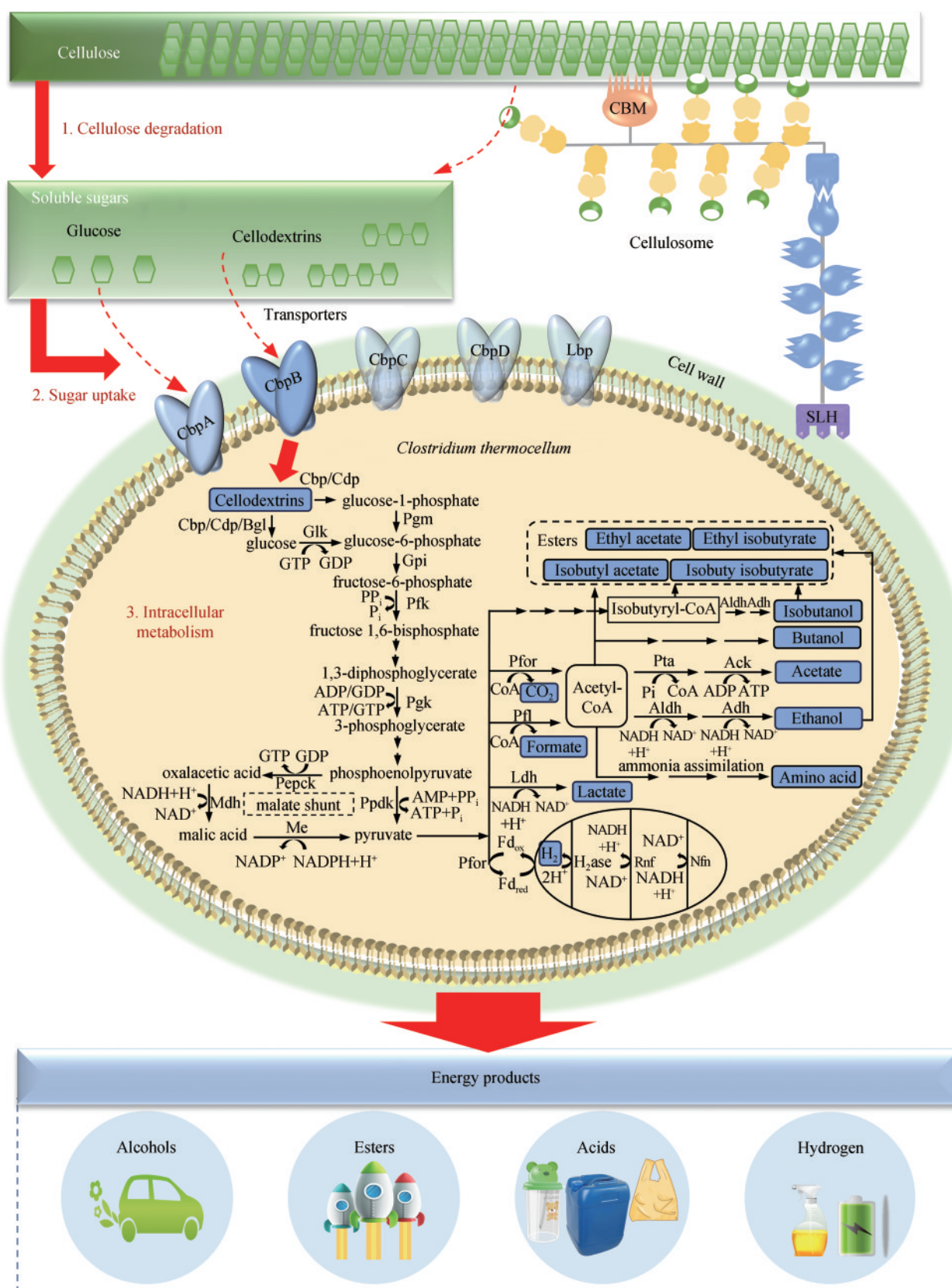


图1 热纤梭菌对纤维素底物降解、可溶性糖转运及胞内糖代谢的过程

Fig. 1 The whole process of substrate degradation, sugar uptake, and cellular metabolism by *C. thermocellum*

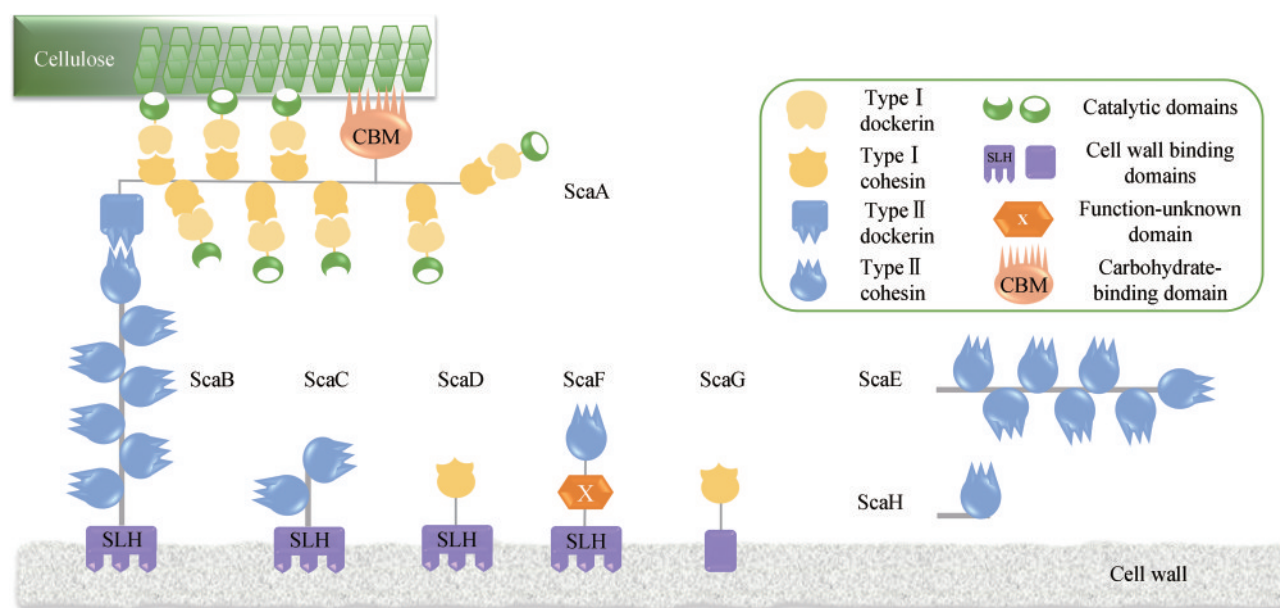


图2 热纤梭菌纤维小体组装模式示意图

Fig. 2 Schematic representation of the assembly of cellulosome in *C. thermocellum*

酶 (glycoside hydrolase, GH) 家族。根据催化底物的不同, 这些纤维小体酶可以分为纤维素酶、木聚糖酶、甘露糖酶、几丁质酶和地衣酶等, 其中纤维素酶主要来源于 GH5、GH9、GH48 家族, 木聚糖酶主要来源于 GH10、GH11 家族^[11]。目前, 热纤梭菌纤维小体中关键酶的生化功能都已得到解析^[37-41], 不仅如此, 这些关键酶的酶活性、结合特性、底物特异性和水解产物都得到了在相同条件下的系统比较^[42]。Yuan 等^[43]还对热纤梭菌中同时具有一个 β -1,4-内切葡聚糖酶和一个 β -1,4-木聚糖酶催化结构域的双功能酶 Cel5E 进行了生化功能与结构解析。以纤维素类的底物培养热纤梭菌时, 来源于 GH48 家族的 Cel48S 是纤维小体中含量最大的酶。Cel48S 是一种外切葡聚糖酶, 通过酶切纤维素链还原端产生纤维二糖, 对纤维素的降解起到了重要作用。该酶基因的缺失导致热纤梭菌对纤维素底物的降解速率降低 60%, 证明 Cel48S 在纤维小体中的重要性^[44]。作者所在课题组利用热纤梭菌无疤基因组编辑技术将表达的 Cel48S 蛋白的催化结构域从纤维小体上释放出来, 从而直接从热纤梭菌的发酵液中纯化获得了天然的可溶性 Cel48S 催化结构域蛋白, 并对其进行了系统的活性表征^[45]。结果表明 Cel48S 催化结构域蛋白对微晶纤维素具有较高的降解活性, 进一步

证明了 Cel48S 在纤维小体中的重要作用^[45]。

目前的研究认为热纤梭菌纤维小体酶亚基与脚架蛋白上不同的粘连模块的结合基本是随机的, 因而组装出的纤维小体所包含的酶组分及其位置可能是千变万化的^[35]。纤维小体亚基的各个模块之间通过具有柔性的区域连接, 因而组装后的纤维小体的各个模块之间仍可进行一定程度的相对运动, 这使纤维小体可以随着降解过程中固体底物的形貌变化而变化^[46-47]。热纤梭菌具有感知不可溶多糖底物类型, 并动态调控纤维小体酶组分的表达和分泌的自适应能力, 这种底物适应能力是热纤梭菌可以高效降解不同木质纤维素底物的关键原因之一^[48-51]。目前, 热纤梭菌的底物自适应机制研究已取得积极进展, 以色列的研究者发现了多对特殊的 σ /anti- σ 因子可感应胞外底物类型, 招募 RNA 聚合酶启动特定纤维小体组分的基因表达^[50, 52-53]。本文作者所在课题组也和以色列研究者合作对这些转录调控因子的机制进行了研究, 揭示了它们特殊的底物耦联调控机制^[48, 54-55]。

2.2 热纤梭菌的糖转运

2009 年以色列研究者 Nataf 等^[56]在热纤梭菌基因组中发现了 5 个转运蛋白基因簇, 推测它们可能负责纤维寡糖、葡萄糖和昆布二糖的转运, 但

缺乏明确的功能验证实验。本文作者所在课题组构建了5个可能的寡糖转运蛋白基因簇的敲除和回补突变株,通过生长表型实验表明转运蛋白B是唯一的纤维寡糖转运蛋白,而转运蛋白A是唯一的葡萄糖转运蛋白。此外,还鉴定到一个孤立的基因 *clo1313_2554* 是转运蛋白B基因簇中缺失的ATP酶亚基基因,补全了这个唯一的纤维寡糖转运蛋白的全部组分^[17, 56]。在该研究中本文作者还发现寡糖转运蛋白的敲除导致热纤梭菌纤维小体的表达失去了底物耦联特性,表明寡糖的转运或代谢也参与了纤维小体的底物耦联表达调控,但具体的机制还有待研究。

2.3 热纤梭菌的胞内碳源代谢

与典型的EMP途径相比,热纤梭菌的糖代谢具有独有的特征,这些特征决定了代谢过程的热力学驱动力^[12, 23, 57-58]: ①在6-磷酸果糖激酶(Pfk)催化6-磷酸果糖生成1,6-二磷酸果糖的反应中,使用焦磷酸(PPi)参与磷酸基团转移,而不是ATP; ②葡萄糖激酶(Glk)催化葡萄糖产生6-磷酸葡萄糖的反应使用GTP作为高能磷酸供体,而不是ATP; ③磷酸甘油酸激酶(Pgk)催化1,3-二磷酸甘油酸生成3-磷酸甘油酸,这是无氧糖酵解过程中第一次产生ATP的过程,这一过程也会产生GTP; ④丙酮酸磷酸二激酶(Ppdk)或“苹果酸分流器途径”催化磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)合成丙酮酸,而缺乏经典的丙酮酸激酶(Pyk)。由丙酮酸磷酸二激酶和AMP参与催化磷酸烯醇式丙酮酸生成丙酮酸的同时会产生ATP。苹果酸分流器的作用是产生丙酮酸和GTP和NADPH。苹果酸分流器途径生成的丙酮酸约占33%的代谢流^[12]。苹果酸分流器途径主要由3个催化反应串联构成,首先磷酸烯醇式丙酮酸经过磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(Pepck)催化生成草酰乙酸(OAA)和GTP,草酰乙酸由苹果酸脱氢酶(Mdh)催化进一步生成苹果酸(MA),苹果酸再经过苹果酸酶(Me)催化最终形成丙酮酸。丙酮酸是重要的前体化合物,通过以下3条代谢途径进一步合成能源分子和化学品,包括:通过乳酸脱氢酶(Ldh)催化生成乳酸,通过丙酮酸甲酸裂解酶(Pfl)催化生成甲酸

和乙酰辅酶A以及通过丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶(Pfor)催化生成二氧化碳和乙酰辅酶A。其中,生成的乙酰辅酶A作为重要的前体物质,可以通过磷酸转乙酰酶(Pta)和乙酸激酶(Ack)催化进一步生成乙酸和ATP,也可以通过乙醛脱氢酶(Aldh)和乙醇脱氢酶(Adh)催化进一步生成乙醇,还可以通过氨同化作用生成氨基酸。

除了胞内糖的利用,美国国家可再生能源实验室Katherine J. Chou教授课题组Xiong等^[59]发现碳酸氢盐也可促进热纤梭菌的生长。他们利用¹³C同位素示踪、质谱和核磁共振方法详细研究了热纤梭菌利用二氧化碳的途径,发现添加碳酸氢钠的细胞生物量比不添加时提高了40% (42.9 mmol/L vs. 63.8 mmol/L),且碳回收率也相应提高(75.5% > 65.7%),研究还发现合成的甲酸是从碳酸氢钠而来。热纤梭菌没有甲酸脱氢酶(FDH),但存在丙酮酸甲酸裂解酶基因(*pfl*),*pfl*敲除菌株失去了利用二氧化碳合成甲酸的能力,所以PFL可催化丙酮酸生成甲酸,而丙酮酸是由丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(PFOR)催化完成的,而不是丙酮酸代谢相关酶(如磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、核酮糖二磷酸羧化酶/加氧酶等)的作用。Xiong等^[59]将5个PFOR编码基因单独敲除并检测丙酮酸的合成,最后确定了2个主要的PFOR编码基因,最终证实热纤梭菌利用PFOR和PFL,PFOR催化二氧化碳得到丙酮酸,PFL进一步催化丙酮酸生成甲酸。这一研究说明热纤梭菌可以利用二氧化碳为碳源,热纤梭菌在固碳中的潜在价值值得后续进一步挖掘。

3 热纤梭菌的系统生物学研究

组学数据是合成生物学开发的重要基础,丰富的组学数据既为合成生物学开发提供了各种功能元件,也为合成生物学改造提供靶点和策略。热纤梭菌的基因组最早于2007年完成测序(菌株ATCC 27405),在之后的十多年里,文献中报道了大量从系统生物学角度进行的关于热纤梭菌的转录组、蛋白质组、代谢组以及多组学结合和代谢模型研究,部分代表性的重要研究见表1。

表1 热纤梭菌的系统生物学研究中的部分代表性工作

Table 1 Representative studies of systematic biology of *C. thermocellum*

热纤梭菌菌株	主要方法	研究内容、结果或结论	年份	文献
F7 (VKMB 2203)	蛋白质组	在热纤梭菌基因组草图中发现了超过 71 个编码纤维小体蛋白的基因;蛋白质组鉴定了纤维小体中含量较高的 13 个组分	2005	[37]
ATCC 27405	转录组	建立了有效的微阵列方法用于热纤梭菌的转录组研究	2007	[60]
ATCC 27405	蛋白质组	多通过蛋白质组分析了热纤梭菌纤维小体的组分以及在纤维素和二糖上生长时的变化	2007	[61]
ATCC 27405	构建代谢模型	构建了基因组尺度代谢模型 <i>iSR432</i> , 包含了 577 个反应	2010	[62]
DSM 1313	基因组	热纤梭菌 DSM1313 基因组测序结果	2011	[30]
ATCC 27405	转录组	对比纤维素和纤维二糖稳态培养的基因表达对比分析。3189 个基因中检测到 2846 个, 分析了底物依赖的基因表达变化	2011	[63]
ATCC 27405	转录组	在稀酸预处理的杨树和柳枝稷上生长的不同时间 (12 h 和 37 h) 的热纤梭菌的基因转录	2013	[64]
DSM 1313	代谢组	高纤维素载量 (50~100 g/L) 下的热纤梭菌胞外代谢产物分析	2014	[65]
ATCC 27405	通过机器学习预测转录单元	根据转录组数据, 使用机器学习方法预测了 2590 个转录单元, 44% 有多基因	2015	[66]
DSM 1313 突变株	转录组, 蛋白质组	在热纤梭菌中敲除不同脚架蛋白后, 检测热纤梭菌的各种基因表达变化, 揭示各种脚架蛋白的重要性以及与其他基因之间的耦联关系	2016	[67]
ATCC 27405	转录组, 代谢组, 蛋白质组	稀酸预处理的柳枝稷上生长的不同时间下三种组学的情况, 分析在降解过程中抑制物造成的代谢变化	2017	[68]
DSM 1313	构建代谢模型	建立基因组尺度代谢模型 <i>iCth446</i> , 并在此基础上构建了核心代谢动力学模型 <i>k-ctherm118</i>	2017	[69]
ATCC 27405	转录组, 蛋白质组	分析了纤维素附着细胞和游动细胞的基因表达和蛋白差异	2017	[70]
DSM1313 Δ hpt Δ hydG Δ ldh Δ pfl Δ pta-ack	转录组, 代谢组	分析了当时已知的产乙醇最高的菌株在不同 pH 稳态培养下的代谢物和基因表达变化	2018	[71]
KJ335(整合了木糖利用基因的工程菌株, 来自 DSM 1313)	转录组	分析了木糖利用工程菌株的在木糖和纤维二糖上的转录组差异, 揭示了木糖的转运与代谢相关基因以及热纤梭菌趋化与运动相关基因的表达变化	2020	[72]
DSM 1313	代谢流分析、构建动力学模型	基于代谢流分析建立核心代谢动力学模型 <i>k-ctherm138</i> , 鉴定了限制乙醇生产的 67 种底物水平抑制机制	2022	[73]
DSM 1313	构建代谢模型	构建基因组尺度代谢模型 <i>iCTH669</i> , 包含了 913 个代谢反应, 837 种代谢物, 669 个基因, 模型的可靠性得到巨大的提升	2023	[74]

3.1 基础组学研究

目前在 NCBI 的 Genome 数据库中已有 12 个菌株的基因组。除了菌株 ATCC27405, 另一个重要的能够有效进行遗传操作的菌株 DSM 1313 于 2011 年完成基因组测序^[30], 为后来的代谢工程和合成生物学研究奠定了基础。伴随着基因组测序的开展, 蛋白质组和转录组研究也几乎同时在不同的研究组开展。2005 年, 德国慕尼黑工业大学的 Zverlov 等^[37] 对菌株 ATCC27405 的基因组草图进行了分析, 发现热纤梭菌基因组中编码了至少 71 个纤维小体组分, 其中 47 个组分是之前的研究未曾鉴定的新组分, 他们对一株热纤梭菌的纤维小

体进行了蛋白质组鉴定, 确定了含量最高的 13 个组分, 包括 3 种之前未曾鉴定到过的组分。2007 年, 美国橡树岭国家实验室的 Brown 等^[60] 首次报道建立了有效的微阵列 (microarray) 方法用于热纤梭菌 ATCC27405 的转录组研究。2015 年美国佐治亚大学的 Chou 等^[66] 利用转录组数据通过机器学习方法对热纤梭菌的转录单元进行分析, 预测了 2590 个转录单元, 其中 44% 具有多个基因, 这一结果为热纤梭菌基因转录调控和转录后调控研究提供了基础。热纤梭菌的代谢组研究略微滞后, 2014 年美国达特茅斯学院的 Lynd 课题组^[65] 首次报道了热纤梭菌 DSM 1313 在高载量底物下的胞外代谢组分

析, 2020年美国橡树岭国家实验室的Jacobson等^[57]首次报道了热纤梭菌的代谢流研究。

3.2 野生菌株的比较组学研究

热纤梭菌纤维小体的表达与底物密切相关, 同时其底物降解性能以及发酵性能和底物或代谢产物的抑制相关, 因此通过比较分析不同条件下的组学数据, 可以深入理解热纤梭菌的底物降解机制与调控机制, 揭示可能导致性能下降的关键瓶颈因素, 为热纤梭菌的改造和应用工艺开发提供基础。2007年加拿大康考迪亚大学的Glod和Martin^[61]对热纤梭菌ATCC 27405在纤维二糖和纤维素上生长产生的纤维小体组分进行了定量蛋白质组分析, 共检测到了41个纤维小体蛋白, 并发现纤维素外切酶和GH9家族的内切酶在纤维素上的丰度显著增加, GH5家族的内切酶和半纤维素酶的丰度则显著降低。2011年, 美国威斯康星大学麦迪逊分校的Fox课题组^[63]研究了分别以纤维素和纤维二糖为底物稳态培养时热纤梭菌的转录组, 在3189个基因中检测到2846个, 分析了底物依赖的基因表达变化。2017年, 美国橡树岭国家实验室的Poudel等^[68]报道了热纤梭菌在稀酸预处理的柳枝稷上生长的不同时间下, 转录组、蛋白质组和代谢组三种组学的情况, 分析了在底物降解过程中抑制物造成的代谢变化。对热纤梭菌的比较组学研究最多的是不同底物条件下的研究^[61, 63, 68, 75-79], 其他还有不同生长阶段^[64, 80-81]、是否存在抑制物^[82-85]、不同细胞状态^[70, 86]下的各种比较组学研究。这些比较组学研究加深了对热纤梭菌的纤维小体表达和代谢调控的理解, 解决底物降解和产物生成过程中的关键瓶颈, 为热纤梭菌的改造和应用工艺开发提供了基础。

3.3 突变株或工程菌株的组学研究

除了野生型菌株的组学研究, 人们还通过定向进化筛选或遗传改造获得了许多具有不同性能的突变菌株, 对这些菌株的组学研究揭示了热纤梭菌突变株表型的分子机制。美国田纳西大学和橡树岭国家实验室的研究人员曾分离获得一株可以耐受杨树水解液的热纤梭菌突变菌株^[87], 他们

对该菌株和野生型菌株进行了转录组分析和比较, 发现耐受性的提升主要得益于非关键基因的下调和能量生产基因的上调, 而不是来源于针对特定水解物产生的耐受性^[88]。美国国家可再生能源实验室的研究人员构建了热纤梭菌的多种纤维小体脚架蛋白敲除突变株, 通过转录组和蛋白质组分析了纤维小体及其他基因表达的变化情况, 发现了许多与纤维小体不直接关联的基因表达的变化, 揭示了纤维小体与热纤梭菌生理代谢之间复杂的耦联调控关系^[67]。美国橡树岭国家实验室的研究人员对当时文献中报道的产乙醇最高的菌株LL 1210进行了转录组和代谢组研究, 分析了在不同pH稳态培养下的代谢物和基因表达变化, 为进一步菌株改良提供了新的靶点^[71]。美国国家可再生能源实验室的研究人员构建了一株可利用木糖的热纤梭菌工程菌株KJC 355^[23], 随后分析了该菌株在木糖和纤维二糖作为碳源时的转录组差异, 揭示了木糖的转运与代谢相关基因以及热纤梭菌趋化与运动相关基因的表达变化^[72]。这些基于突变株的比较组学研究, 揭示了热纤梭菌中复杂的基因调控网络, 也为进一步的菌株迭代开发提供了新的方向。

3.4 代谢模型研究

基于约束的基因组尺度代谢模型包含了一个生物体的所有代谢反应, 并具有物质和电荷的平衡。通过建立这一模型, 可以实现对生物体在特定条件下代谢行为的预测, 并通过一些分析方法揭示实现特定目标(如生物量)最大化的关键点。2010年, 美国弗吉尼亚联邦大学的Fong课题组^[62]就首次建立了热纤梭菌的基因组尺度代谢模型*iSR432*, 包含了577个代谢反应、525种胞内代谢物、432个基因, 并利用这一模型对基因组中的27个基因重新进行了注释, 鉴定了需要进一步研究的代谢反应, 预测了单个基因删除和条件变化导致的代谢表型和对乙醇生产的影响。之后, 随着对热纤梭菌生理代谢研究的逐渐深入以及各类组学数据的积累, 热纤梭菌的全基因组代谢模型被不断更新^[69, 89-91], 最近的一个是2023年5月发表的*iCTH669*, 包含了913个代谢反应、837种代谢

物、669个基因,模型的可靠性得到了巨大的提升^[74]。

上述的基因组尺度代谢模型为稳态模型,除此之外也有研究基于代谢流分析为热纤梭菌建立代谢的动力学模型。2017年宾夕法尼亚州立大学的研究者在建立基因组尺度代谢模型*iCth446*的基础上,构建了热纤梭菌中心代谢的核心代谢动力学模型*k-ctherm118*^[69],该模型包含了118个反应和93种代谢物。2022年研究者进一步利用代谢流分析数据和突变体代谢分析数据,构建了包含138个代谢反应的核心代谢动力学模型*k-ctherm138*,并利用这一模型鉴定了限制乙醇生产的67种底物水平抑制机制,为后续代谢工程改造提供了新的靶点和路线^[73]。

4 遗传工具开发

微生物的遗传改造技术是合成生物学开发的基础。热纤梭菌作为嗜热、严格厌氧的革兰氏阳性细菌,其遗传操作相对于大肠杆菌等模式生物来说更加困难。经过近二十年的发展,目前已报道的可用于热纤梭菌的遗传操作技术包括同源重组技术、Thermotargetron技术、基于CRISPR/Cas系统介导的基因编辑技术等,可以实现靶基因的敲除、插入、替换、突变、表达调控等各种分子操作^[31, 92-94]。

4.1 转化技术与筛选标记

外源遗传物质向细胞内的导入是实现遗传改造的前提,热纤梭菌的细胞壁较厚,常规的电转化难以获得成功。美国达特茅斯学院Lee R. Lynd教授课题组2004年首次报道了热纤梭菌的电转化技术,其核心之一是使用他们实验室自制的电转化仪,这导致在相当长时间里世界上仅有Lynd一个课题组能够实现热纤梭菌的遗传改造。为了克服这一技术垄断问题,本文研究组^[35]也自主研发了高效电转化仪,与传统电转仪相比具有可高度定制化的脉冲波形、能量、次数和间隔时间,可以针对微生物的细胞壁特征进行精确的脉冲设置与优化,并于2013年实现了热纤梭菌的遗传转化。

除了电转化设备,还有多种因素会影响转化效率。Guss等^[95]报道了质粒的Dam、Dcm甲基化修饰与转化效率有关,因而适当的甲基化修饰可以提升转化的成功率。有效的筛选标记是进行异源表达和基因组编辑的必要条件,目前已报道的可以在热纤梭菌中使用的筛选标记有甲砒霉素、尿嘧啶合成途径关键基因*pyrF*、反向筛选标记*hpt*和*tdk*^[31, 96-97]。

4.2 基于同源重组的基因组编辑技术

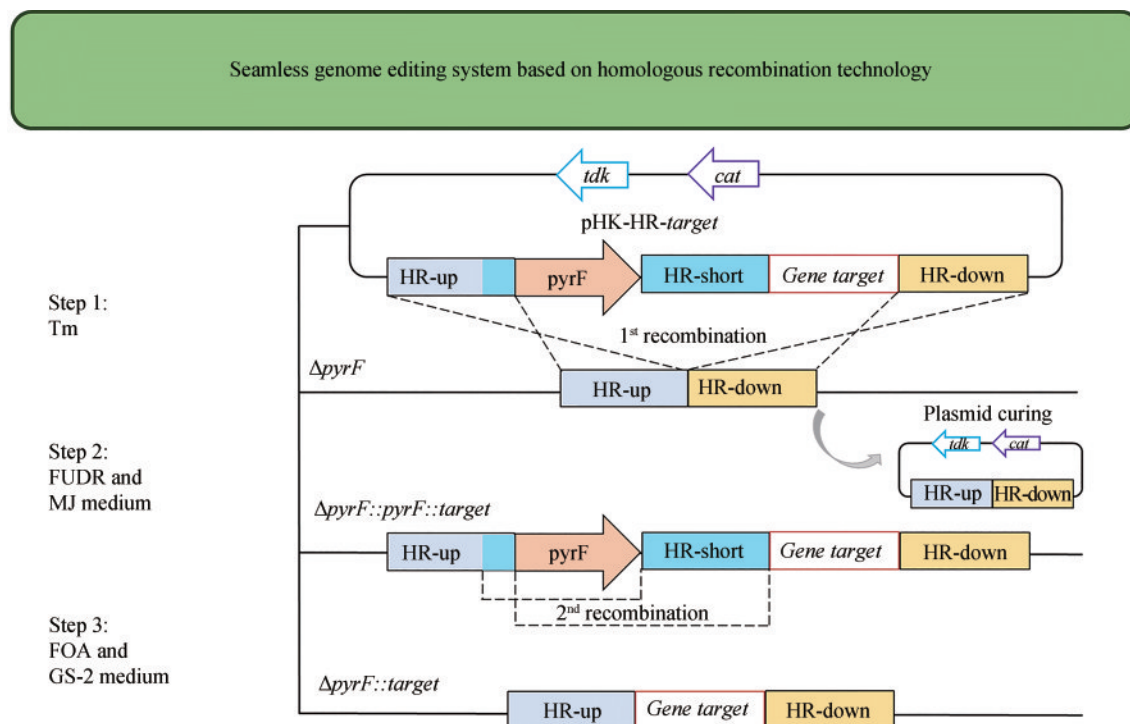
同源重组技术是一种经典的遗传操作技术,通过设计同源区域并与筛选标记联用,可以在基因组上对靶基因的无痕点突变、精准插入、删除等基因编辑操作(图3)。2010年,美国麦斯科玛公司Tripathi等^[31]首次报道了在热纤梭菌中基于尿嘧啶营养缺陷型(*ΔpyrF*)的同源重组基因敲除方法,成功敲除了热纤梭菌磷酸转乙酰基酶基因(phosphotransacetylase, *Pta*)。美国麦斯科玛公司Argyros等^[97]使用同源重组方法敲除了热纤梭菌磷酸转乙酰基酶基因(*Pta*)、乳酸脱氢酶基因(lactate dehydrogenase, *Ldh*)和*cel48S*基因。本课题组张杰等^[96]首先通过同源重组技术实现了热纤梭菌DSM1313菌株*pyrF*基因的敲除,获得了重要的营养缺陷性底盘细胞*ΔpyrF*突变株,在此基础上基于等位基因耦联交换(allele-coupled exchange, ACE)策略实现了基因组无痕编辑,成功使用该技术在基因组特定位点插入外源基因。这一无痕同源重组技术在本文课题组的后续研究中多次使用,证明该技术可以实现基因组的精准编辑^[17, 45],为热纤梭菌的分子机制研究与合成生物学开发奠定了基础。

4.3 Thermotargetron系统

Ⅱ型内含子是一类具有酶催化功能的内含子,当其转录成RNA后会通过自我剪接与内含子编码蛋白形成复合体,将内含子RNA插入到宿主染色体的特定位点,经过反转录,实现在目的基因内部插入一段DNA序列,使目的基因失活。Targetron系统正是基于Ⅱ型内含子的这种“归巢”原理实现的基因失活方法^[98-101]。Targetron系统具

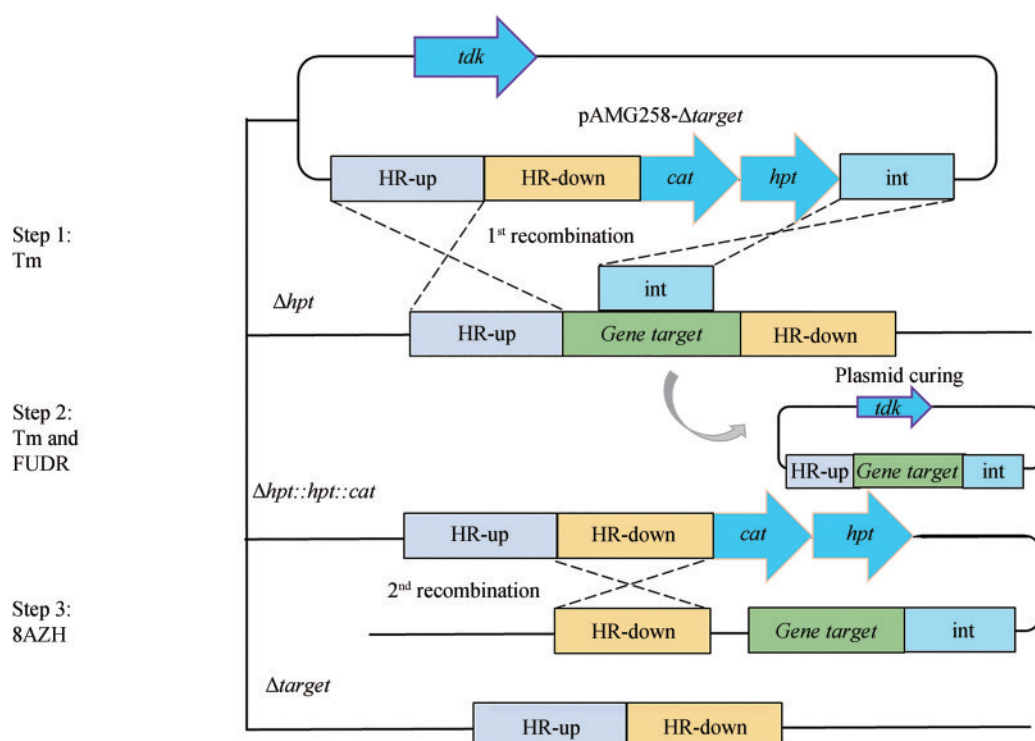
有操作简单、效率高等优点，已应用于基础研究和工程菌株的改造^[102]，然而，目前的Targetron系

统都是利用嗜中温（37~42 °C）微生物来源的Ⅱ型内含子元件构建的，不能在嗜热微生物中应用。



(a) 我们实验室开发的基于同源重组的无疤基因编辑技术

(a) Seamless genome editing system based on homologous recombination technology from our lab



(b) Lynd实验室开发的基于同源重组的无疤基因失活技术

(b) Markerless gene deletion based on homologous recombination technology from Lynd's lab

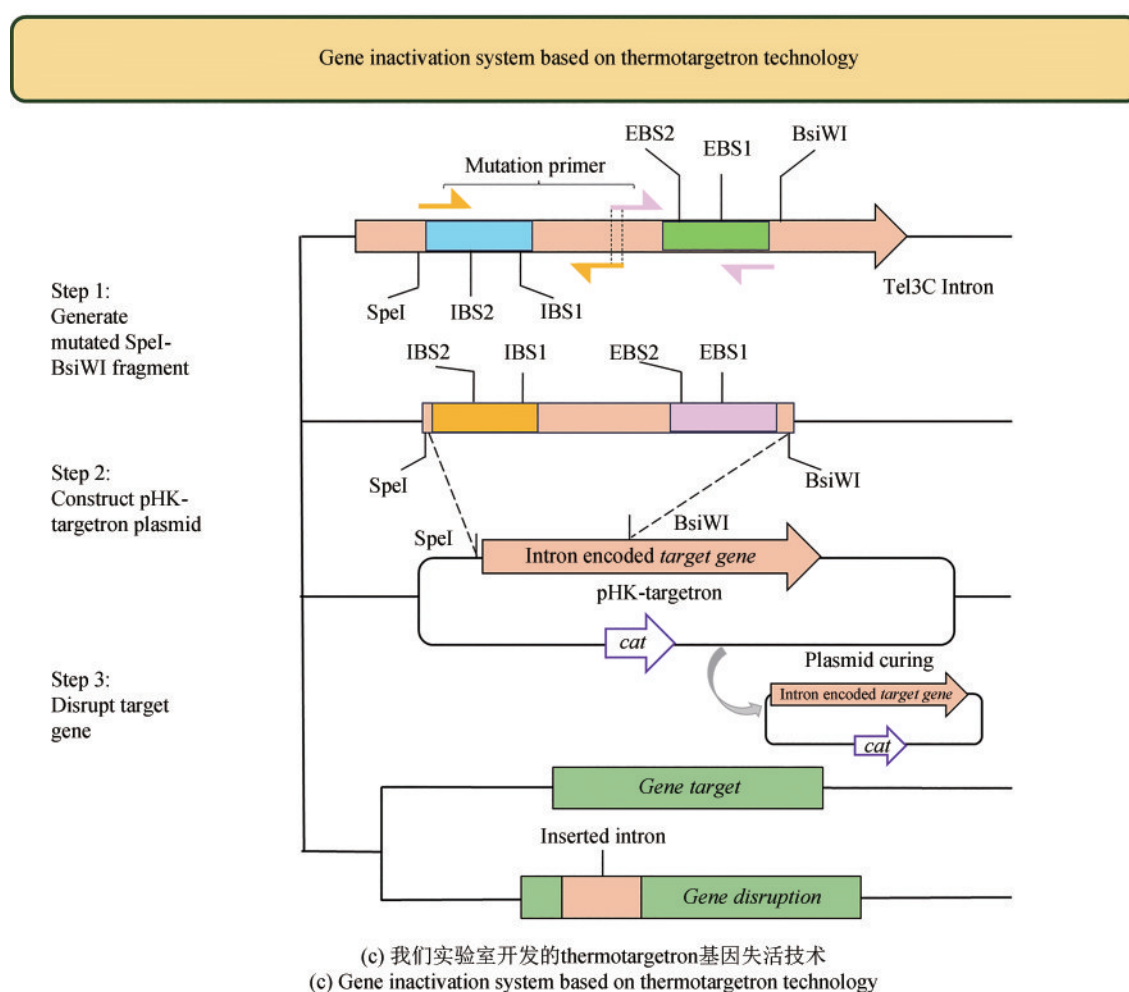


图3 热纤梭菌遗传改造技术

(EBS1, EBS12, IBS1和IBS2为DNA识别序列; SpeI, BsiWI为酶切位点; *cat*为氯霉素乙酰转移酶基因, 是氯霉素和甲砒霉素的抗性基因; *tdk*是用于FUDR反向筛选选择的标记; *hpt*是用于8AZH反向筛选的标记; HR-up是目的基因上游序列; HR-down是目的基因下游序列; HR-short是目的基因上游或下游序列; int是部分目的基因)

Fig.3 Genetic modification technology of *C. thermocellum*

(EBS1, EBS12, IBS1and IBS2 are DNA recognition sequences; SpeI, BsiWI are restriction cleavage sites; *cat* is the resistance gene to chloramphenicol and thiamphenicol; *tdk* is the marker used for counterselection with FUDR; *hpt* is the marker used for counterselection with 8AZH; HR-up is the upstream sequence of target gene; HR-down is the downstream sequence of target gene; HR-short is the upstream or downstream sequence of target gene; *int* is partial sequence of target gene.)

本文课题组通过与美国得克萨斯大学奥斯汀分校 Alan M. Lambowitz 院士课题组合作, 利用嗜热蓝细菌 (*Thermosynechococcus elongatus* BP-1) 来源的 II 型内含子, 成功构建了嗜热 Targetron 靶向基因失活系统 (称为 Thermotargetron) (图3), 基因打靶效率达到 67%~100%^[92]。Thermotargetron 可以同时失活一个多顺反子上的多个基因, 且具有实现无痕基因敲除的潜力^[35, 103]。Thermotargetron 技术也存在一定的不足, 如小于 400 bp 的基因序列在设计时可能难以找到合适的插入位点, 且内

含子可能会插入宿主基因组的非靶标基因, 需要通过 Southern blot 方法筛选出单插入菌株^[35]。

4.4 CRISPR/Cas 基因组编辑系统

CRISPR/Cas 系统是原核生物抵抗外源遗传物质入侵的一种免疫系统。CRISPR/Cas 系统中的 Cas 蛋白可以精准定位在靶标序列进行 DNA 剪切, 而宿主则启动 DNA 修复系统促进同源重组, 因此利用这一机制可以提高同源重组筛选阳性重组菌

株的效率, 进而提高基因组编辑效率^[104]。

热纤梭菌中存在已知6类CRISPR/Cas系统中的I-B型系统^[105-108], 其PAM序列已经解析^[107], 而且热纤梭菌的I-B型复合物已经完成了体外重构和表征^[109]。在此基础上, 科罗拉多大学Carrie A. Eckert教授课题组的Walker等建立了内源I-B型和外源II型CRISPR/Cas基因组编辑系统, 但是这两种系统都受限于同源重组效率。为了突破热纤梭菌同源重组效率低这一瓶颈, Walker等^[93]从喜温嗜酸硫杆菌(*Acidithiobacillus caldus*)筛选到耐热重组酶exo/beta同系物Red α 和Red β , 并在热纤梭菌中进行表达, 发现内源I-B型CRISPR/Cas系统的基因编辑效率从40%提高到70%, 外源II型GeoCas9系统的基因编辑效率从12.5%提高到94%, 然而该技术所需周期仍较长, 不具有明显优势。荷兰瓦赫宁根大学Ganguly等^[94]进一步开发了可用于热纤梭菌基因表达调控的CRISPRi系统, 实现了乳酸脱氢酶(Ldh)和磷酸转乙酰酶(Pta)的表达下调, 降低了乳酸和乙酸的产量。然而, CRISPRi系统的稳定性是一个亟待解决的问题^[110-111]。

5 基于热纤梭菌的生物能源炼制细胞工厂构建

5.1 纤维素乙醇

生物燃料乙醇具有绿色清洁和可再生的特性, 可作为石化能源替代品和燃油增氧剂, 具有减少对环境的污染和碳排放优势, 已经成为我国大力发展的战略性新兴产业之一。第一代生物燃料乙醇以粮食来源的淀粉糖为原料生产, 存在“与人争粮”的问题。第二代生物燃料乙醇以木质纤维素农林废弃物为原料, 因此, 发展纤维素乙醇是解决粮食安全问题、能源安全问题的重要途径。通过生命周期分析可知, 纤维素乙醇替代汽油可以使全生命周期温室气体减排最高达到115%, 远高于粮食乙醇(19%~48%减排量)^[112], 从长远发展来看, 发展二代生物燃料乙醇更加符合我国“双碳”战略需求^[113]。

热纤梭菌不仅能够高效降解纤维素, 还具有产乙醇的能力^[114]。然而, 野生型热纤梭菌的乙醇

滴度低于15 g/L, 产率只有理论最大值(1 mol己糖产生2 mol乙醇)的30%, 在10 g/L乙醇存在下, 热纤梭菌的生长受到抑制, 20 g/L的乙醇存在时, 热纤梭菌不能生长^[25]。乙醇生产需要达到至少40 g/L滴度和90%的理论最大值才有工业应用的可能^[115]。热纤梭菌代谢的天然产物除了乙醇还包括乙酸、乳酸、甲酸、氢气、氨基酸(主要是缬氨酸和丙氨酸)和其他产物(包括丙酮酸、苹果酸盐、富马酸盐和异丁醇), 这些副产物的产生会对乙醇产量和产率造成影响。

为了解决以上问题, 科研人员开展了大量代谢工程和合成生物学研究, 提升热纤梭菌的乙醇产量和产率, 包括: 去除副产物竞争途径、调节还原力供给、增加异源途径、提升菌株耐受性。例如, 美国麦斯科玛公司Tripathi等^[31]通过敲除磷酸转乙酰酶基因(*pta*)减少乙酸合成, 美国麦斯科玛公司Argyros等^[97]通过敲除乳酸脱氢酶基因(*ldh*)去除乳酸合成, 美国橡树岭国家实验室Rydzak等^[116]通过敲除丙酮酸甲酸裂解酶基因(*pfl*)消除甲酸, 这些工作都是通过减少热纤梭菌副产物的产生, 提高乙醇的合成能力。美国达特茅斯学院Deng等^[58]通过引入外源丙酮酸激酶, 强化了丙酮酸合成途径, 美国橡树岭国家实验室Rydzak等^[117]通过敲除谷氨酰胺合成酶基因(*glnA*), 减轻了氨基酸外泌, 这些研究都不同程度提高了乙醇的产量。还原力供给是乙醇合成的重要因素, 通过敲除氢化酶基因(*hydG*)、高浓度氢气抑制氢化酶活性或过表达铁氧还蛋白: NAD⁺氧化还原酶基因(*Rnf*)以提高热纤梭菌中的还原力供给^[118-120], 可以提高乙醇的产量。另外, 通过引入外源乙醇脱氢酶或者通过突变改变热纤梭菌乙醇脱氢酶的辅因子, 也能有效提高乙醇的合成能力^[118, 121]。

不仅如此, 实验室适应性进化也被证明是提高菌株的耐受性和乙醇产量的有效手段^[97, 122-123]。在高固体底物含量时, 乙醇产率往往降低, 可能是热纤梭菌对产物或者其他抑制物的耐受程度较低造成的。目前热纤梭菌的一些突变株在40 g/L的乙醇中稳定生长^[25, 124], 甚至可在高达80 g/L的乙醇中存活^[124]。然而, 高耐受乙醇的菌株乙醇产量通常很低。可见, 乙醇耐受性成为利用热纤梭菌

为生物催化剂生产CBP乙醇的重要生物学壁垒。除了乙醇,预处理衍生物以及菌株代谢产物也可能产生抑制作用。美国佐治亚大学Janet Westpheling教授课题组Kim等^[125]发现外源添加亚精胺可以增强热纤梭菌DSM 1313对呋喃和醋酸的耐受性,过表达内源性亚精胺合成酶可以在不添加亚精胺的情况下增加菌株对呋喃和醋酸的耐受性,乙醇产量提高1.2倍。

热纤梭菌虽然可以降解生物质中的半纤维素(占生物质含量的30%左右),但不能利用木糖为碳源生长,导致生物质的糖利用率不高。通过引入外源基因增加热纤梭菌对半纤维素中戊糖的利用从而提高乙醇产量的研究也取得了一些研究进展。美国国家可再生能源实验室Xiong等^[23]将来自嗜热厌氧乙醇杆菌(*Thermoanaerobacter ethanolicus*)的木糖异构酶基因(*xylA*)和木酮糖激酶基因(*xylB*)导入热纤梭菌DSM1313,实现了该热纤梭菌对木糖和聚合度为2~7的低聚木糖的同步利用。研究发现该菌株具有同步利用木糖、葡萄糖、纤维二糖和纤维素碳源的能力,而且没有出现碳代谢阻遏现象,该菌同时利用木糖和纤维素时, H_2 和乙醇的产量是单独利用纤维素时的2倍。除了引入戊糖代谢途径之外,另一种增强对半纤维素降解产物戊糖利用的方法是与其它能利用戊糖的厌氧高温菌共培养,进而提高乙醇产量。嗜热厌氧杆菌可发酵半纤维素和木聚糖,还能发酵纤维二糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖等,可以产生70 g/L的乙醇^[126]。因此,如何利用嗜热厌氧杆菌的优势进一步增强热纤梭菌的乙醇产量和突破耐受极限,是非常值得研究的方向。美国麦斯科玛公司的Argyros等^[97]率先将嗜热厌氧杆菌与热纤梭菌共培养,通过同时阻断热纤梭菌和热厌氧杆菌的乳酸和乙酸合成途径,并进行了2000 h的菌株实验室适应性进化,使用进化后的热纤梭菌和热厌氧杆菌共培养发酵92 g/L的纤维素,在146 h内产生了38 g/L的乙醇,达到理论最大值的80%,而且超越了热纤梭菌耐受乙醇的极限。这些研究表明,热纤梭菌与半纤维素发酵菌株共培养可以提高底物利用率、增加乙醇产量,这种分工合作的共培养模式为提高生物质炼制效率提供了新的研究方向^[127]。

实验室适应性进化研究发现,尽管可以获得高乙醇耐受的热纤梭菌菌株,但其在乙醇产率上并没有优势,这说明热纤梭菌乙醇滴度的提高存在其他的代谢瓶颈。具有高度正向驱动糖酵解途径的细菌,如大肠杆菌、热厌氧杆菌、运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)和酿酒酵母,具有较高的乙醇滴度(分别为40 g/L、70 g/L、86 g/L和94.8 g/L)^[126, 128-130]。美国威斯康星大学麦迪逊分校Daniel Amador-Noguez教授课题组与合作者的研究发现,热纤梭菌糖酵解的热力学驱动力极小,通过简单的酶过表达来增加糖酵解通量和乙醇产量的代谢干预是无效的,因此纤维素降解菌中有限的糖酵解驱动力可能是其乙醇合成能力低的主要原因^[57, 131]。美国宾夕法尼亚州立大学帕克分校Costas D. Maranas教授课题组Foster等^[73]分析了热纤梭菌以纤维二糖为底物的细胞内代谢通量,并构建了核心代谢的动力学模型,评估了酶的调控对乙醇产量的影响,研究发现了代谢网络中存在的67种可能限制乙醇生产的底物水平抑制机制。

综上所述,采用CBP策略以热纤梭菌作为底盘细胞直接降解纤维素制备乙醇的研究已经有近20年的历史,虽然经过了大量的代谢工程改造,但是离可以实际生产和应用仍有相当远的距离。其中的一个原因是CBP策略只使用一种菌株,而在产酶、糖化和乙醇发酵这一全链条过程中的每个步骤对菌株的生理代谢要求可能存在一定的矛盾,这是CBP策略的固有缺陷。针对CBP策略的这种内在缺陷,本文作者实验室提出了CBS策略,从理论上解除乙醇发酵对产酶与糖化的限制,因而可能具有更接近实际应用的潜力,初步试验表明,CBS技术获得的可发酵糖可以用于酿酒酵母的乙醇发酵,因而有望突破热纤梭菌通过CBP策略所能达到的最高乙醇滴度,从而推动纤维素乙醇的工业化实现。

5.2 生物丁醇、异丁醇

丁醇是四碳醇,具有高燃烧性能、低挥发性和低腐蚀性,而且无需改性或者与汽油混合便可以直接用作燃料。到目前为止,关于高温菌产丁醇的报道较少,可用于构建热纤梭菌产丁醇的工

程菌的酶基因有限^[132-133]。美国达特茅斯学院 Lee R. Lynd 教授课题组的 Tian 等^[134]通过在热纤梭菌中引入其他细菌丁醇合成途径的酶,使得改造后的热纤梭菌可以产生 88 mg/L 的丁醇,之后将关键途径酶进行蛋白质工程优化,丁醇滴度提高了 2.2 倍,最后通过添加适量乙醇到培养基中,最终获得了 357 mg/L 的丁醇。热纤梭菌野生菌可以耐受 5 g/L 的丁醇,经过耐受适应后,可以耐受 15 g/L 丁醇^[135]。然而,改造后热纤梭菌的丁醇滴度很低,推测改造后热纤梭菌丁醇滴度低的原因可能是乙酰辅酶 A 到乙酰乙酰辅酶 A 的这一限速步骤,另一个原因可能是乙醇的产生对还原力 NADPH 的竞争性消耗^[134]。

除了基于 CBP 策略对热纤梭菌进行复杂的代谢工程改造,利用热纤梭菌与产丁醇菌的两段式发酵也是一种方便可行的方法,可以用于生物质生产丁醇^[6, 136]。东京农工大学 Shunichi Nakayama 课题组 Kiyoshi 等^[137]将热纤梭菌 NBRC 103400 和产丁醇梭菌 (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4, 30 °C 培养) 进行两段式发酵,降解 40 g/L 碱预处理后的稻秆,获得 5.5 g/L 的丁醇,额外添加 100 U/g 生物质的纤维素酶,可将丁醇滴度提高到 6.9 g/L。浙江大学闻志强等^[138]将热纤梭菌 ATCC 27405 (60 °C 培养) 与拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052, 37 °C 培养) 进行两段式发酵,先接种热纤梭菌降解 90 g/L 碱预处理的玉米芯,发酵 1~5 d 产糖后,降温到 37 °C 再接入拜氏梭菌进行产物发酵,这种两段式发酵获得了总量为 19.9 g/L 的丙酮、乙醇和丁醇,其中丁醇滴度为 10.9 g/L,乙醇滴度为 5 g/L,丙酮滴度为 4 g/L。这些两段式发酵研究在思路类似于我们提出的 CBS 策略,但由于使用的热纤梭菌菌株未经过改造,其积累糖的能力不足,因此影响了第二阶段发酵所能产生的最大丁醇滴度。除了两段式发酵方法, Begum 与 Dahman^[139]探索了原生质体融合的方法,将热纤梭菌和丙酮丁醇梭菌 (37 °C 培养)、热纤梭菌和拜氏梭菌 (37 °C 培养) 分别进行原生质体融合,获得的融合菌株 *CaCt* 和 *CbCt* 在 45 °C 降解预处理后的麦秆,分别获得 12.92 g/L 和 14.13 g/L 丁醇,丙酮的滴度是丁醇的 50% 左右。

异丁醇是丁醇的同分异构体,可以作为高能

燃料和生产多种化学品的骨架,其生物合成受到了非常多的关注^[140]。天然的热纤梭菌具有产异丁醇的途径,可以产 1.6 g/L 的异丁醇^[65]。热纤梭菌中的丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶基因 (*pfor4*) 参与了异丁醇的生物合成,敲除该基因后,异丁醇产量降低^[141]。热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 (*Geobacillus thermoglucosidasius*) 的异丁醇合成途径已有报道^[142],美国加州大学洛杉矶分校 James C. Liao 教授课题组 Lin 等^[8]对热纤梭菌 DSM 1313 进行代谢工程改造,通过引入热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌的异丁醇代谢途径,证实热纤梭菌自身的酮异戊酸氧化还原酶和异源表达的酮异戊酸脱羧酶的表达负责产异丁醇,改造后的菌株 CT 24 可以降解 80 g/L 纤维素,并产生 5.4 g/L 的异丁醇 (50 °C, 72 h),达到 41% 的理论最大值。野生型热纤梭菌耐受的异丁醇小于 10 g/L,删除 *adhE* 基因可以进一步提高菌株对异丁醇的耐受^[135],菌株 CT 24 的异丁醇产量已接近野生型热纤梭菌对异丁醇的耐受极限。Lee R. Lynd 教授课题组 Holwerda 等^[123]通过删除乙酸和乳酸合成途径以及突变 *AdhE*^{D4949G},获得了突变株 LL 1043,经过进化后,该菌株最终获得 5.1 g/L 的异丁醇滴度。

目前已报道的通过热纤梭菌进行丁醇和异丁醇的生产,离可以产业化应用所需的滴度还有相当大的距离。然而,文献中已报道的产丁醇和异丁醇的菌株可以获得更高的滴度。例如,改造后的大肠杆菌等可以产生 20 g/L 以上的丁醇^[143-144],改造后的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 可以产生 10.80 g/L 异丁醇^[145],改造后的大肠杆菌 (*Escherichia coli* JCL 260) 甚至可以产生高达 50 g/L 的异丁醇^[146]。是否可以对热纤梭菌通过 CBP 策略来改造,或者是否可以通过 CBS 策略与这些菌株联用获得这种丁醇和异丁醇滴度,仍需要后续进一步的研究。

5.3 生物制氢

氢具有燃烧时零碳排放、高能产率、可循环利用等优点,被认为是最佳的清洁替代能源之一,与传统化学制氢方法相比,利用木质纤维素进行生物制氢具有可再生、环境友好和易于操作的优

势,但是,目前生物制氢的产量低、生产率低^[147-148]。热纤梭菌是一种具有完整氢气合成途径的高温生物催化剂,但是氢气产量并不高^[23, 149-150]。在发酵过程中,来自产物二氧化碳和氢气的气压具有影响整体反应动力学的作用^[151]。美国劳伦斯伯克利国家实验室Eric Sundstrom课题组的Kim等^[152]通过调节通氮速率(通N₂移除H₂)和CO₂分压之间的平衡,在45 g/L纤维素条件下,将H₂滴度提高到181.3 mmol/L,同时不影响其中心代谢,证明H₂移除和CO₂供给存在耦合作用。产氢是热纤梭菌的“电子池”,用于平衡细胞氧化还原状态的代谢^[153],通过N₂喷射从溶液中去除H₂,可以有效地降低溶解氢的浓度,改变热力学动态平衡,有利于提高H₂产量^[152]。热纤梭菌与非纤维素产H₂菌共培养制H₂是另一种生物制氢策略。中国科学院过程工程研究所Li等^[154]将热纤梭菌与热解糖梭菌(*Clostridium thermosaccharolyticum*)共培养,降解玉米秸秆制备H₂的得率为74.9 mL/g玉米秸秆。华南理工大学An等^[155]将热纤梭菌与嗜热解糖厌氧杆菌(*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* MJ1)共培养,降解过氧化氢-乙酸预处理的甘蔗渣获得H₂的得率为226 mL/g底物。基于现有的生物制氢技术,制备H₂的成本和产量还无法和传统的煤、天然气来源的H₂竞争,生物制氢技术还有很长的路要走。

5.4 发酵产乳酸

乳酸(LA)是应用广泛的化学品,用作食品防腐剂、风味增强剂、乳化剂、药物前体、可生物降解的溶剂以及合成可降解塑料的聚合物[如聚乳酸(PLA)]等^[156]。LA可由化学合成或微生物发酵,微生物发酵生产的LA与化学合成相比具有更低的能耗和更高的纯度^[156]。高产LA的菌株通常来源于芽孢杆菌属和根霉属,不能直接发酵木质纤维素^[157]。热纤梭菌可以直接发酵纤维素,但是其主要分解产物是乙醇和乙酸,LA产率很低(0.01 mol/mol己糖当量)^[158]。美国达特茅斯学院Lee R. Lynd教授课题组Mazzoli等^[159]通过删除热纤梭菌的双功能醇/醛脱氢酶基因(*adhE*)和表达突变乳酸脱氢酶基因(*ldh*^{S161R})获得了菌株LL 1111

(DSM 1313 $\Delta hpt\Delta adhE\ ldh^{S161R}$)。菌株LL 1111几乎不产乙醇,碳通量流向了LA的生产,产生9.9 g/L的LA,达到理论最大值的40%^[159]。LL 1111的*ldh*基因发生了突变,导致*ldh*的活性不依赖于果糖1,6-二磷酸的变构激活(F1, 6BP)^[158]。然而,在工业发酵中,菌株满足100 g/L的乳酸滴度才具有实用性^[160]。已有研究指出有多种途径可以提高热纤梭菌中乳酸产量,比如热纤梭菌通过产H₂、乳酸或乙醇将NADH氧化为NAD⁺,当氢化酶被抑制时,乳酸的产量增加,底物过多会导致1,6-二磷酸果糖增加,从而触发热纤梭菌中乳酸的产生^[119]。热纤梭菌的生长受到pH的抑制^[71],乳酸产量过多会抑制菌株生长,通过实验室进化、代谢工程等方法增加菌株耐酸性有望提高乳酸产量^[71, 161-162]。然而,通过CBP策略对热纤梭菌遗传改造实现100 g/L乳酸的目标仍有很多问题需要解决,如细胞对高浓度乳酸的耐受性、碳源到乳酸的引流程度等等。

5.5 中链脂肪酸酯、短链脂肪酸酯

中链脂肪酸酯(C₆~C₁₀)可用于食品添加剂、香料、溶剂和生物燃料,具有广泛工业用途^[163-164]。美国田纳西大学Cong T. Trinh教授课题组Seo等^[165]通过在热纤梭菌中表达热稳定性的氯霉素乙酰转移酶(CAT),实现了中链脂肪酸酯的直接生物合成。乙酸异丁酯是一种可生物降解的溶剂,在许多配方中可替代甲基异丁基酮和甲苯,热纤梭菌具有多种碳水化合物酯酶(CEs),Seo等^[166]证实*clo1313_0613*和*clo1313_0693*是热纤梭菌负责乙酸异丁酯降解的关键基因,敲除后减缓了乙酸异丁酯的降解,但是不影响生长性能。天然的热纤梭菌不具有产生短链脂肪酸酯的能力,但是可以合成短链脂肪酸酯的前体代谢物乙酰辅酶A、异丁酰辅酶A、乙醇和异丁醇,通过删除热纤梭菌内源的酯降解酶基因-碳水化合物酯酶基因(CEs)和引入外源性的耐热醇酰基转移酶基因(AAT),利用乙酰辅酶A和乙醇合成乙酸乙酯,利用乙酰辅酶A和异丁醇合成乙酸异丁酯,利用异丁酰辅酶A和乙醇合成异丁酸乙酯,利用异丁酰辅酶A和异丁醇合成异丁酸异丁酯,搭建多种短链脂肪酸

酯生产途径^[166-167]。美国田纳西大学 Cong T. Trinh 教授课题组 Seo 等^[168]通过敲除碳水化合物酯酶和过表达耐热醇酰基转移酶基因 *CATec3 Y20F* 构建的突变株 HSCT2108 产生 4 种脂肪酸酯的总滴度约为 200 mg/L, 占比为: 乙酸异丁酯>异丁酸异丁酯>乙酸乙酯≈异丁酸乙酯。研究还发现删除乳酸生物合成途径后, 利用不同预处理方式的杨树为底物可以进一步提高短链脂肪酸酯产量。目前, 使用热纤梭菌为底盘细胞生产脂肪酸酯的产量仍然很低, 还需要更精细的途径设计和更加复杂的改造。

5.6 糖平台

本文课题组提出的 CBS 技术采用热纤梭菌为全菌催化剂实现木质纤维素到可发酵糖的高效转化, 然而, 由于热纤梭菌纤维小体降解纤维素的主要产物是纤维二糖, 而纤维二糖对纤维小体活性存在显著的反馈抑制, 必须通过菌株改造解除这种反馈抑制才有可能积累较高浓度的可发酵糖。通过 β -葡萄糖苷酶将纤维二糖进一步降解为葡萄糖, 是解除纤维小体反馈抑制的有效手段。为此, 本文课题组首先通过筛选得到来源于热解纤维素菌 (*Caldicellulosiruptor* sp. F32) 耐热高效 β -葡萄糖苷酶 (*CaBglA*), 并将该酶插入到热纤梭菌纤维小体外切酶 Cel48S 的催化模块和对接模块之间, 获得了将 Cel48S 和 *CaBglA* 融合表达的第一代全菌催化剂, 其产糖能力比对照菌株提高了 2.2 倍^[96]。然而, Cel48S 和 *CaBglA* 的融合表达导致 Cel48S 的表达量显著下降, 影响了纤维小体的整体性能。为保证 Cel48S 这一关键酶的表达量, 本课题组又将 *CaBglA* 与热纤梭菌中的一个外切酶 Cel9K 融合表达, 构建了第二代全菌催化剂^[169]。第二代全菌催化剂 100 g/L 微晶纤维素存在条件下, 经过 18 d 降解, 产生 72.5 g/L 还原糖, 糖化率为 65.9%, 显著高于底盘菌株以及第一代全菌催化剂^[169]。本课题组进一步成功获得基于质粒的 *CaBglA* 高表达和外泌的第三代全菌催化剂, 糖化率超过 90%, 糖化时间也显著缩短^[170]。这三代热纤梭菌全菌催化剂的构建验证了 CBS 策略进行糖化的可行性, 为 CBS 策略的进一步开发和实现奠定了基础。

CBS 策略中, 使用热纤梭菌全菌催化剂将底物转化获得的非粮可发酵糖, 需要进一步对接下游各类发酵菌株, 实现不同种类的产品生产^[4]。事实上, 本文课题组已经成功实现 CBS 糖化液与普鲁兰多糖、乳酸、多元醇酯等高值产品的耦联^[19-21], 实验室的小规模试验也表明 CBS 糖化液对绝大多数的模式菌株和工业菌株的发酵没有抑制性, 因而适用于各类下游产品的发酵。例如, 研究表明, 通过 CBS 技术获得的糖化液, 无需中间灭菌、补充营养物或调节发酵条件, 直接接种与 CBS 条件匹配的高温乳酸生产细菌 *Geobacillus stearothermophilus* 2H-3 即可实现高光学纯度 (99.5%)、高产率 (51.36 g/L) 和高收率 (0.74 g/g 生物量) 的木质纤维素基乳酸的生产^[19]。我们使用 CBS 技术获得的糖化液直接与好氧的深海红酵母 *Rhodotorula paludigena* P4R5 (28 °C 培养) 对接, 可以生产高滴度 (41.1 g/L) 和生产率的脂肪酸多元醇酯 [8.22 g/(L·d)] 及细胞内单细胞油脂, 这与 P4R5 使用纯糖的发酵效果相当, CBS 技术获得的纤维素源糖化液可以替代纯糖, 实现了利用纤维素碳源来生产高值化学品的构想^[20]。我们使用 CBS 技术获得的糖化液无需补充营养物, 直接与海洋真菌产黑色素短梗霉菌 *Aureobasidium melanogenum* TN2-1-2 对接, 可以生产高滴度 (55.1 g/L) 和高产量 (0.5 g/g CBS 水解液) 的黑色素普鲁兰多糖, 开发了利用纤维素碳源制备普鲁兰多糖的可行路线^[21]。这些研究证明, CBS 技术可以与下游细菌和真菌发酵相结合, 生产不同种类的化学品, 这与 CBP 技术相比具有显著的优势 (图4)。

自 2020 年我们研究组提出 CBS 策略以来, 其思路也在逐渐被国际同行认可和接受^[171-174]。日本的小杉昭彦课题组^[175]也提出了使用热纤梭菌产糖, 并对接下游菌株的类似策略。Lynd 虽然是 CBP 概念的提出者, 但在近年的研究中也因为热纤梭菌乙醇耐受性限制以及热动力学平衡问题^[57, 176], 逐渐过渡到热纤梭菌与其他厌氧菌的共培养研究^[177-179], 乃至开始使用热纤梭菌进行木质纤维素糖化的思路上来^[180-181], 这和我们提出的 CBS 策略在思路上是完全一致的。这表明 CBS 策略的理念越来越多地被国际上的研究者所接受和

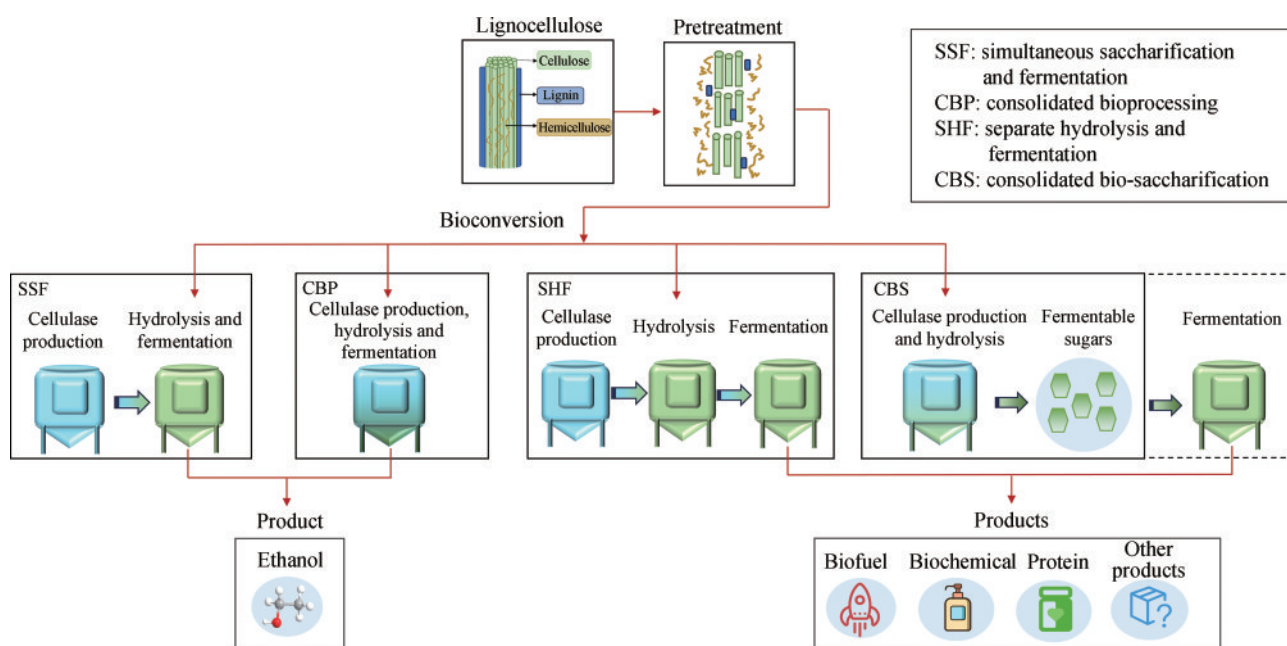


图4 木质纤维素生物转化策略的比较

Fig. 4 Comparison of lignocellulose bioconversion strategies

认可。另一方面,虽然我们已经对CBS策略的可行性以及具体路线进行了探索和验证,但在实际的工业化应用中仍然存在一些问题需要克服。例如,热纤梭菌纤维小体体系容易受到木质素的抑制,这对预处理过程提出了更高的要求,因此,仍需要开发低成本的适配于CBS全菌催化剂的底物预处理技术,或者改造热纤梭菌的纤维小体系统提升其对木质素的耐受性,以进一步降低整个过程成本。在对接下游发酵方面,通常高浓度糖液可以提高下游发酵的产率,从而降低下游发酵的成本,这也需要进一步提升CBS全菌催化剂在高固底物情况下的糖化性能。

6 总结和展望

热纤梭菌是自然界中高效利用生物物质的高温厌氧细菌,在生物能源领域具有极其重要的研究和应用价值。经过包括本文作者课题组在内的国内外多个研究组十余年的努力,热纤梭菌的遗传改造技术以及组学研究已有深厚的积累,这使得热纤梭菌成为潜在的生物能源分子生产底盘,也成为木质纤维素生物炼制合成生物学研究的热点。热纤梭菌作为严格的厌氧菌,在实验室研究时需

要配套厌氧手套箱进行操作,相比于好氧菌操作的难度稍有增加,但在工业应用上,发酵过程的厌氧环境比较容易实现,同时厌氧特性使得在通气和搅拌方面的需求大大降低,从而可以大大节约成本,这反而是热纤梭菌这类厌氧菌的工业应用的一个优势。目前以热纤梭菌为底盘细胞采取CBP策略可以生产的能源产品包括乙醇、丁醇、异丁醇、 H_2 、中/短链脂肪酸酯、乳酸等。其中,热纤梭菌制备乙醇的研究开展得最早也最多,目前能够达到的最高滴度为29.9 g/L,热纤梭菌和其他菌株共培养制备乙醇的最高滴度为38 g/L。这虽然接近于乙醇工业化需要达到的40 g/L的目标,然而由于这一结果是经过了非常系统复杂的改造获得的,进一步的改造和提升变得非常困难甚至是几乎不可能的。同时,热纤梭菌通过CBP策略获得的其他能源产品的产量都不高,难以在成本上和化石来源的产品竞争。因此,CBS策略通过糖平台来生产下游能源产品和化学品,可能是可以超越CBP策略的极限的有效新策略。目前由于CBS策略提出的时间不长,针对CBS策略所进行的合成生物学改造研究仍比较有限,后续还有较大的研究和发展空间。

热纤梭菌的合成生物学开发除了可以为生物燃料和化学品的生产提供嗜热底盘细胞,还可以

应用于木质纤维素降解以外的领域。笔者实验室通过将嗜热角质酶LCC在热纤梭菌中进行异源表达,成功构建具有PET塑料降解功能的嗜热全菌催化剂,实现了目前最高效的全菌PET塑料降解策略^[182]。热纤梭菌的纤维小体模块还可以为合成生物学技术提供丰富的元件^[36],进一步扩展了热纤梭菌在合成生物学中的应用潜力。但是,由于热纤梭菌是一种厌氧菌,对于合成路径中需要氧气参与的反应将无法实现,这限制了使用热纤梭菌作为合成生物学平台的开发潜力。如何选择合适的代谢通路获得新型目标分子,将是未来基于热纤梭菌合成生物学开发中首要解决的问题。

值得注意的是,虽然近年来对热纤梭菌的合成生物学研究取得了一定的进展,但热纤梭菌作为一种嗜热厌氧的非模式微生物,以热纤梭菌为底盘开展合成生物学理性改造、生产能源产品的研究中仍面临一些科学和技术瓶颈需要克服,包括:许多生理、生化与代谢的分子机制还不清楚,遗传操作技术的效率较低,不能有效利用半纤维素,生物量较低等。目前对热纤梭菌的大部分研究仍然只是处于简单的代谢工程的思路,系统的围绕DBTL开展的合成生物学研究和开发仍然较少。基于目前的研究和对热纤梭菌及其纤维小体体系的认识,我们认为未来基于热纤梭菌的合成生物学的研究和技术开发可以重点关注以下几个方面:

①热纤梭菌具有较为独特的生理、遗传和代谢机制,前期Lynd课题组的研究已表明热纤梭菌的胞内代谢具有许多独特之处,我们最近的研究也发现了热纤梭菌在寡糖摄取和代谢方面的一些新机制^[17, 183],同时热纤梭菌的许多代谢过程仍未清晰阐明。因此,需要加强热纤梭菌降解生物质和自身遗传、生理和代谢的分子机理研究,为合成生物学开发提供更多靶点。

②虽然目前已有多种可用于热纤梭菌的遗传操作工具,但总的来说效率仍然不高,遗传操作的周期较长,导致合成生物学开发的速度较为缓慢。因此仍然需要针对热纤梭菌挖掘新的遗传操作工具,提高热纤梭菌基因编辑的效率。

③目前热纤梭菌中可以使用的各类合成生物学功能元件数目仍相对较少,种类不够丰富。系

统挖掘和筛选嗜热功能元件,如启动子、外泌信号肽、终止子、诱导表达元件、各类多糖降解酶类、各类生长与抗逆相关的调控因子、嗜热报告基因等,可以大大加速热纤梭菌的合成生物学开发。

④随着热纤梭菌组学数据的不断丰富,未来的合成生物学开发需要整合各类组学数据,在全基因组代谢模型的基础上开展更为精准的针对目标产物的代谢工程。

⑤近年来自动化方法与人工智能技术迅速发展,但能够适用于嗜热微生物和厌氧微生物的技术相对较少。开发适用于嗜热厌氧菌的自动化工具,整合最新的人工智能方法,将会有效推动热纤梭菌合成生物学从制造进化到智造。

⑥在热纤梭菌的合成生物学开发策略方面,CBP策略经过二十余年的发展,目前已发现许多难以克服的瓶颈。因此在未来的合成生物学开发中,应当更加关注分段式的CBS策略或类似策略,从而减少或避免不同过程或阶段中相互矛盾的需求,实现整体效益的最大化。

生物质能作为唯一的可再生碳资源,在未来的能源结构中具有不可替代的作用。热纤梭菌在高效降解木质纤维素生物质中的优势,以及近十余年研究所积累的相对成熟的遗传操作工具和丰富的组学、生理生化与代谢机制数据,使其成为生物质能源的合成生物学开发的重要底盘细胞之一。基于热纤梭菌的合成生物学开发将为生物质能源的发展注入新的动力,为实现绿色、可持续的人类社会发展做出贡献。

参 考 文 献

- [1] LI F H, LI Y W, NOVOSELOV K S, et al. Bioresource upgrade for sustainable energy, environment, and biomedicine[J]. Nano-Micro Letters, 2023, 15(1): 35.
- [2] LYND L R, BECKHAM G T, GUSS A M, et al. Toward low-cost biological and hybrid biological/catalytic conversion of cellulosic biomass to fuels[J]. Energy & Environmental Science, 2022, 15(3): 938-990.
- [3] KEASLING J, GARCIA MARTIN H, LEE T S, et al. Microbial production of advanced biofuels[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(11): 701-715.
- [4] LIU Y J, LI B, FENG Y G, et al. Consolidated bio-

- saccharification: leading lignocellulose bioconversion into the real world[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107535.
- [5] ZHANG H Y, HAN L J, DONG H M. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: experimental and modeling studies[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 140: 110758.
 - [6] RE A, MAZZOLI R. Current progress on engineering microbial strains and consortia for production of cellulosic butanol through consolidated bioprocessing[J]. *Microbial Biotechnology*, 2023, 16(2): 238-261.
 - [7] 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.
 - [8] LIN P P, MI L, MORIOKA A H, et al. Consolidated bioprocessing of cellulose to isobutanol using *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 31: 44-52.
 - [9] KOTHARI N, BHAGIA S, PU Y Q, et al. The effect of switchgrass plant cell wall properties on its deconstruction by thermochemical pretreatments coupled with fungal enzymatic hydrolysis or *Clostridium thermocellum* consolidated bioprocessing[J]. *Green Chemistry*, 2020, 22(22): 7924-7945.
 - [10] PERIYASAMY S, BEULA ISABEL J, KAVITHA S, et al. Recent advances in consolidated bioprocessing for conversion of lignocellulosic biomass into bioethanol — a review[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 453: 139783.
 - [11] DEMAİN A L, NEWCOMB M, DAVID WU J H. Cellulase, *Clostridia*, and ethanol[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(1): 124-154.
 - [12] OLSON D G, HÖRL M, FUHRER T, et al. Glycolysis without pyruvate kinase in *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 169-180.
 - [13] LAMED R, BAYER E A. Cellulosomes from *Clostridium thermocellum*[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 160: 472-482.
 - [14] HOLWERDA E K, WORTHEN R S, KOTHARI N, et al. Multiple levers for overcoming the recalcitrance of lignocellulosic biomass[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 15.
 - [15] ARTZI L, BAYER E A, MORAİS S. Cellulosomes: bacterial nanomachines for dismantling plant polysaccharides[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(2): 83-95.
 - [16] ZHANG Y H P, LYND L R. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(20): 7321-7325.
 - [17] YAN F, DONG S, LIU Y J, et al. Deciphering cellodextrin and glucose uptake in *Clostridium thermocellum*[J]. *mBio*, 2022, 13(5): e01476-22.
 - [18] MAZZOLI R, OLSON D G. *Clostridium thermocellum*: a microbial platform for high-value chemical production from lignocellulose[M/OL]//*Advances in Applied Microbiology*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 111-161[2023-06-01]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065216420300423?via%3Dihub>.
 - [19] LIU Y J, ZHANG Y D, CHI F, et al. Integrated lactic acid production from lignocellulosic agricultural wastes under thermal conditions[J]. *Journal of Environmental Management*, 2023, 342: 118281.
 - [20] LIU G L, BU X Y, CHEN C Y, et al. Bioconversion of non-food corn biomass to polyol esters of fatty acid and single-cell oils[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16(1): 9.
 - [21] LIU G L, ZHAO X X, CHEN C, et al. Robust production of pigment-free pullulan from lignocellulosic hydrolysate by a new fungus co-utilizing glucose and xylose[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2020, 241: 116400.
 - [22] LÓPEZ-MONDEJAR R, ALGORA C, BALDRIAN P. Lignocellulolytic systems of soil bacteria: a vast and diverse toolbox for biotechnological conversion processes[J]. *Biotechnology Advances*, 2019, 37(6): 107374.
 - [23] XIONG W, REYES L H, MICHENER W E, et al. Engineering cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum* to co-ferment cellulose- and hemicellulose-derived sugars simultaneously[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(7): 1755-1763.
 - [24] JOHNSON E A, REESE E T, DEMAİN A. Inhibition of *Clostridium thermocellum* cellulase by end products of cellulolysis[J]. *Journal of Applied Biochemistry*, 1982, 4: 64-71.
 - [25] BROWN S D, GUSS A M, KARPINETS T V, et al. Mutant alcohol dehydrogenase leads to improved ethanol tolerance in *Clostridium thermocellum*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(33): 13752-13757.
 - [26] HAMILTON-BREHM S D, MOSHER J J, VISHNIVETSKAYA T, et al. *Caldicellulosiruptor obsidiansis* sp. nov., an anaerobic, extremely thermophilic, cellulolytic bacterium isolated from obsidian pool, Yellowstone National Park[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(4): 1014-1020.
 - [27] DESVAUX M, GUEDON E, PETITDEMANGE H. Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2461-2470.
 - [28] TINDALL B J. The names *Hungateiclostridium* Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium thermocellum* (Viljoen et al. 1926) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium cellulolyticum* (Patel et al. 1980) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium aldrichii* (Yang et al. 1990) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium*

- alkalicellulosi* (Zhilina et al. 2006) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium clariflavum* (Shiratori et al. 2009) Zhang et al. 2018, *Hungateiclostridium straminisolvens* (Kato et al. 2004) Zhang et al. 2018 and *Hungateiclostridium saccincola* (Koeck et al. 2016) Zhang et al. 2018 contravene Rule 51b of the International Code of Nomenclature of Prokaryotes and require replacement names in the genus *Acetivibrio* Patel et al. 1980[J/OL]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(12): 3927-3932[2023-06-01]. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.003685>.
- [29] AKINOSHO H, YEE K, CLOSE D, et al. The emergence of *Clostridium thermocellum* as a high utility candidate for consolidated bioprocessing applications[J]. Frontiers in Chemistry, 2014, 2: 66.
- [30] FEINBERG L, FODEN J, BARRETT T, et al. Complete genome sequence of the cellulolytic thermophile *Clostridium thermocellum* DSM 1313[J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(11): 2906-2907.
- [31] TRIPATHI S A, OLSON D G, ARGYROS D A, et al. Development of *pyrF*-based genetic system for targeted gene deletion in *Clostridium thermocellum* and creation of a *pta* mutant[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(19): 6591-6599.
- [32] OLSON D G, LYND L R. Transformation of *Clostridium thermocellum* by electroporation[M/OL]. Methods in enzymology, 2012, 510: 317-330[2023-06-01]. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124159310000173?via%3Dihub>.
- [33] RILEY L A, JI L X, SCHMITZ R J, et al. Rational development of transformation in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 via complete methylome analysis and evasion of native restriction-modification systems[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2019, 46(9/10): 1435-1443.
- [34] BAYER E A, BELAICH J P, SHOHAM Y, et al. The cellulosomes: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58: 521-554.
- [35] HONG W, ZHANG J, FENG Y G, et al. The contribution of cellulosomal scaffoldins to cellulose hydrolysis by *Clostridium thermocellum* analyzed by using thermotargetrons[J]. Biotechnology for Biofuels, 2014, 7: 80.
- [36] 冯银刚, 刘亚君, 崔球. 纤维小体在合成生物学中的应用研究进展[J]. 合成生物学, 2022, 3(1): 138-154.
- FENG Y G, LIU Y J, CUI Q. Research progress in cellulosomes and their applications in synthetic biology[J]. Synthetic Biology Journal, 2022, 3(1): 138-154.
- [37] ZVERLOV V V, KELLERMANN J, SCHWARZ W H. Functional subgenomics of *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes: identification of the major catalytic components in the extracellular complex and detection of three new enzymes[J]. Proteomics, 2005, 5(14): 3646-3653.
- [38] KUROKAWA J, HEMJINDA E, ARAI T, et al. *Clostridium thermocellum* cellulase CelT, a family 9 endoglucanase without an Ig-like domain or family 3c carbohydrate-binding module[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002, 59(4): 455-461.
- [39] ZVERLOV V V, SCHANTZ N, SCHWARZ W H. A major new component in the cellulosome of *Clostridium thermocellum* is a processive endo- β -1, 4-glucanase producing cellotetraose[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249(2): 353-358.
- [40] YE X H, ZHU Z G, ZHANG C M, et al. Fusion of a family 9 cellulose-binding module improves catalytic potential of *Clostridium thermocellum* cellodextrin phosphorylase on insoluble cellulose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(3): 551-560.
- [41] ANBAR M, GUL O, LAMED R, et al. Improved thermostability of *Clostridium thermocellum* endoglucanase Cel8A by using consensus-guided mutagenesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(9): 3458-3464.
- [42] LEIS B, HELD C, BERGKEMPER F, et al. Comparative characterization of all cellulosomal cellulases from *Clostridium thermocellum* reveals high diversity in endoglucanase product formation essential for complex activity[J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 240.
- [43] YUAN S F, WU T H, LEE H L, et al. Biochemical characterization and structural analysis of a bifunctional cellulase/xylanase from *Clostridium thermocellum*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(9): 5739-5748.
- [44] OLSON D G, TRIPATHI S A, GIANNONE R J, et al. Deletion of the Cel48S cellulase from *Clostridium thermocellum*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(41): 17727-17732.
- [45] LIU Y J, LIU S Y, DONG S, et al. Determination of the native features of the exoglucanase Cel48S from *Clostridium thermocellum*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 6.
- [46] EIBINGER M, GANNER T, PLANK H, et al. A biological nanomachine at work: watching the cellulosome degrade crystalline cellulose[J]. ACS Central Science, 2020, 6(5): 739-746.
- [47] DING S Y, BAYER E A. Understanding cellulosome interaction with cellulose by high-resolution imaging[J]. ACS Central Science, 2020, 6(7): 1034-1036.
- [48] WEI Z, CHEN C, LIU Y J, et al. Alternative σ /anti- σ factors represent a unique form of bacterial σ /anti- σ complex[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(11): 5988-5997.
- [49] SMITH S P, BAYER E A. Insights into cellulosome assembly and dynamics: from dissection to reconstruction of the

- supramolecular enzyme complex[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2013, 23(5): 686-694.
- [50] NATAF Y, BAHARI L, KAHAL-RAIFER H, et al. *Clostridium thermocellum* cellulosomal genes are regulated by extracytoplasmic polysaccharides via alternative σ factors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(43): 18646-18651.
- [51] STEVENSON D M, WEIMER P J. Expression of 17 genes in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during fermentation of cellulose or cellobiose in continuous culture[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4672-4678.
- [52] KAHAL-RAIFER H, JINDOU S, BAHARI L, et al. The unique set of putative membrane-associated anti- σ factors in *Clostridium thermocellum* suggests a novel extracellular carbohydrate-sensing mechanism involved in gene regulation [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2010, 308(1): 84-93.
- [53] GRINBERG I R, YANIV O, DE ORA L O, et al. Distinctive ligand-binding specificities of tandem PA14 biomass-sensory elements from *Clostridium thermocellum* and *Clostridium clariflavum*[J]. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2019, 87(11): 917-930.
- [54] ORTIZ DE ORA L, LAMED R, LIU Y J, et al. Regulation of biomass degradation by alternative σ factors in cellulolytic clostridia[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 11036.
- [55] CHEN C, DONG S, YU Z L, et al. Essential autoproteolysis of bacterial anti- σ factor RsgI for transmembrane signal transduction[J]. *Science Advances*, 2023, 9(27): eadg4846.
- [56] NATAF Y, YARON S, STAHL F, et al. Cellodextrin and laminaribiose ABC transporters in *Clostridium thermocellum* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(1): 203-209.
- [57] JACOBSON T B, KOROSH T K, STEVENSON D M, et al. *In vivo* thermodynamic analysis of glycolysis in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* using ^{13}C and ^2H tracers[J]. *mSystems*, 2020, 5(2): e00736-e19.
- [58] DENG Y, OLSON D G, ZHOU J L, et al. Redirecting carbon flux through exogenous pyruvate kinase to achieve high ethanol yields in *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2013, 15: 151-158.
- [59] XIONG W, LIN P P, MAGNUSSON L, et al. CO_2 -fixing one-carbon metabolism in a cellulose-degrading bacterium *Clostridium thermocellum*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(46): 13180-13185.
- [60] BROWN S D, RAMAN B, MCKEOWN C K, et al. Construction and evaluation of a *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 whole-genome oligonucleotide microarray[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 137: 663-674.
- [61] GOLD N D, MARTIN V J J. Global view of the *Clostridium thermocellum* cellulosome revealed by quantitative proteomic analysis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(19): 6787-6795.
- [62] ROBERTS S B, GOWEN C M, BROOKS J P, et al. Genome-scale metabolic analysis of *Clostridium thermocellum* for bioethanol production[J]. *BMC Systems Biology*, 2010, 4: 31.
- [63] RIEDERER A, TAKASUKA T E, MAKINO S I, et al. Global gene expression patterns in *Clostridium thermocellum* as determined by microarray analysis of chemostat cultures on cellulose or cellobiose[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(4): 1243-1253.
- [64] WILSON C M, RODRIGUEZ M, JOHNSON C M, et al. Global transcriptome analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 during growth on dilute acid pretreated *Populus* and switchgrass[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 179.
- [65] HOLWERDA E K, THORNE P G, OLSON D G, et al. The exometabolome of *Clostridium thermocellum* reveals overflow metabolism at high cellulose loading[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 155.
- [66] CHOU W C, MA Q, YANG S H, et al. Analysis of strand-specific RNA-seq data using machine learning reveals the structures of transcription units in *Clostridium thermocellum* [J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(10): e67.
- [67] XU Q, RESCH M G, PODKAMINER K, et al. Dramatic performance of *Clostridium thermocellum* explained by its wide range of cellulase modalities[J]. *Science Advances*, 2016, 2(2): e1501254.
- [68] POUDEL S, GIANNONE R J, RODRIGUEZ M, et al. Integrated omics analyses reveal the details of metabolic adaptation of *Clostridium thermocellum* to lignocellulose-derived growth inhibitors released during the deconstruction of switchgrass[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 14.
- [69] DASH S, KHODAYARI A, ZHOU J L, et al. Development of a core *Clostridium thermocellum* kinetic metabolic model consistent with multiple genetic perturbations[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 108.
- [70] DUMITRACHE A, KLINGEMAN D M, NATZKE J, et al. Specialized activities and expression differences for *Clostridium thermocellum* biofilm and planktonic cells[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 43583.
- [71] WHITHAM J M, MOON J W, RODRIGUEZ M JR, et al. *Clostridium thermocellum* LL 1210 pH homeostasis mechanisms informed by transcriptomics and metabolomics[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2018, 11: 98.
- [72] TAFUR RANGEL A E, CROFT T, GONZÁLEZ BARRIOS A F, et al. Transcriptomic analysis of a *Clostridium thermocellum* strain engineered to utilize xylose: responses to xylose versus cellobiose feeding[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 14517.
- [73] FOSTER C, BOORLA V S, DASH S, et al. Assessing the impact of substrate-level enzyme regulations limiting ethanol titer in *Clostridium thermocellum* using a core kinetic model

- [J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 69: 286-301.
- [74] SCHROEDER W L, KUIL T, VAN MARIS A J A, et al. A detailed genome-scale metabolic model of *Clostridium thermocellum* investigates sources of pyrophosphate for driving glycolysis[J]. *Metabolic Engineering*, 2023, 77: 306-322.
- [75] RAMAN B, PAN C L, HURST G B, et al. Impact of pretreated switchgrass and biomass carbohydrates on *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulosome composition: a quantitative proteomic analysis[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5271.
- [76] BURTON E, MARTIN V J J. Proteomic analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 reveals the upregulation of an alternative transhydrogenase-malate pathway and nitrogen assimilation in cells grown on cellulose [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2012, 58(12): 1378-1388.
- [77] WEI H, FU Y, MAGNUSSON L, et al. Comparison of transcriptional profiles of *Clostridium thermocellum* grown on cellobiose and pretreated yellow poplar using RNA-Seq[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 142.
- [78] YOAV S, BARAK Y, SHAMSHOUM M, et al. How does cellulosome composition influence deconstruction of lignocellulosic substrates in *Clostridium (Ruminiclostridium) thermocellum* DSM 1313? [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 222.
- [79] DE CAMARGO B R, STEINDORFF A S, DA SILVA L A, et al. Expression profiling of *Clostridium thermocellum* B8 during the deconstruction of sugarcane bagasse and straw[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2023, 39 (4): 105.
- [80] RAMAN B, MCKEOWN C K, RODRIGUEZ M, et al. Transcriptomic analysis of *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 cellulose fermentation[J]. *BMC Microbiology*, 2011, 11: 134.
- [81] RYDZAK T, MCQUEEN P D, KROKHIN O V, et al. Proteomic analysis of *Clostridium thermocellum* core metabolism: relative protein expression profiles and growth phase-dependent changes in protein expression[J]. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 214.
- [82] YANG S H, GIANNONE R J, DICE L, et al. *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 transcriptomic, metabolomic and proteomic profiles after ethanol stress[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 336.
- [83] WILSON C M, YANG S H, RODRIGUEZ M, et al. *Clostridium thermocellum* transcriptomic profiles after exposure to furfural or heat stress[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 131.
- [84] SANDER K, WILSON C M, RODRIGUEZ M, et al. *Clostridium thermocellum* DSM 1313 transcriptional responses to redox perturbation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 211.
- [85] TIAN L, PEROT S J, STEVENSON D, et al. Metabolome analysis reveals a role for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in the inhibition of *C. thermocellum* by ethanol [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 276.
- [86] LI H Y, PAN Y L, CHANG S, et al. Transcriptomic analysis of *Clostridium thermocellum* in cellulolytic consortium after artificial reconstruction to enhance ethanol production[J]. *BioResources*, 2015, 10(4): 7105-7122.
- [87] LINVILLE J L, RODRIGUEZ M JR, LAND M, et al. Industrial robustness: understanding the mechanism of tolerance for the *Populus* hydrolysate-tolerant mutant strain of *Clostridium thermocellum*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e78829.
- [88] LINVILLE J L, RODRIGUEZ M, BROWN S D, et al. Transcriptomic analysis of *Clostridium thermocellum* *Populus* hydrolysate-tolerant mutant strain shows increased cellular efficiency in response to *Populus* hydrolysate compared to the wild type strain[J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 215.
- [89] THOMPSON R A, LAYTON D S, GUSS A M, et al. Elucidating central metabolic redox obstacles hindering ethanol production in *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 32: 207-219.
- [90] THOMPSON R A, DAHAL S, GARCIA S, et al. Exploring complex cellular phenotypes and model-guided strain design with a novel genome-scale metabolic model of *Clostridium thermocellum* DSM 1313 implementing an adjustable cellulosome[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9: 194.
- [91] GARCIA S, THOMPSON R A, GIANNONE R J, et al. Development of a genome-scale metabolic model of *Clostridium thermocellum* and its applications for integration of multi-omics datasets and computational strain design[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 772.
- [92] MOHR G, HONG W, ZHANG J E, et al. A targetron system for gene targeting in thermophiles and its application in *Clostridium thermocellum*[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69032.
- [93] WALKER J E, LANAHAAN A A, ZHENG T Y, et al. Development of both type I-B and type II CRISPR/Cas genome editing systems in the cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering Communications*, 2020, 10: e00116.
- [94] GANGULY J, MARTIN-PASCUAL M, VAN KRANENBURG R. CRISPR interference (CRISPRi) as transcriptional repression tool for *Hungateiclostridium thermocellum* DSM 1313[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(2): 339-349.
- [95] GUSS A M, OLSON D G, CAIAZZA N C, et al. Demethylation is detrimental to plasmid transformation in *Clostridium thermocellum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*,

- 2012, 5(1): 30.
- [96] ZHANG J, LIU S Y, LI R M, et al. Efficient whole-cell-catalyzing cellulose saccharification using engineered *Clostridium thermocellum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 124.
- [97] ARGYROS D A, TRIPATHI S A, BARRETT T F, et al. High ethanol titers from cellulose by using metabolically engineered thermophilic, anaerobic microbes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(23): 8288-8294.
- [98] KWON S W, PAARI K A, MALAVIYA A, et al. Synthetic biology tools for genome and transcriptome engineering of solventogenic *Clostridium*[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, 8: 282.
- [99] KUEHNE S A, MINTON N P. ClosTron-mediated engineering of *Clostridium*[J]. *Bioengineered*, 2012, 3(4): 247-254.
- [100] HEAP J T, PENNINGTON O J, CARTMAN S T, et al. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(3): 452-464.
- [101] PARK S K, MOHR G, YAO J, et al. Group II intron-like reverse transcriptases function in double-strand break repair[J]. *Cell*, 2022, 185(20): 3671-3688.e23.
- [102] CUI G Z, HONG W, ZHANG J, et al. Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 89(3): 201-208.
- [103] ENYEART P J, CHIRIELEISON S M, DAO M N, et al. Generalized bacterial genome editing using mobile group II introns and Cre-lox[J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9: 685.
- [104] ADLI M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1911.
- [105] OLSON D G, MCBRIDE J E, JOE SHAW A, et al. Recent progress in consolidated bioprocessing[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2012, 23(3): 396-405.
- [106] MCALLISTER K N, SORG J A. CRISPR genome editing systems in the genus *Clostridium*: a timely advancement[J]. *Journal of Bacteriology*, 2019, 201(16): e00219.
- [107] PYNE M E, BRUDER M R, MOO-YOUNG M, et al. Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 25666.
- [108] RICHTER H, ZOEPHEL J, SCHERMULY J, et al. Characterization of CRISPR RNA processing in *Clostridium thermocellum* and *Methanococcus maripaludis*[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(19): 9887-9896.
- [109] RICHTER H, ROMPF J, WIEGEL J, et al. Fragmentation of the CRISPR-Cas Type I-B signature protein Cas8b[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2017, 1861(11): 2993-3000.
- [110] ZHAO H, SUN Y J, PETERS J M, et al. Depletion of undecaprenyl pyrophosphate phosphatases disrupts cell envelope biogenesis in *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198: 2925-2935.
- [111] LIU X, GALLAY C, KJOS M, et al. High-throughput CRISPRi phenotyping identifies new essential genes in *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Molecular Systems Biology*, 2017, 13(5): 931.
- [112] WANG M, HAN J, DUNN J B, et al. Well-to-wheels energy use and greenhouse gas emissions of ethanol from corn, sugarcane and cellulosic biomass for US use[J]. *Environmental Research Letters*, 2012, 7(4): 045905.
- [113] LI J J, ZHANG Y L, YANG Y L, et al. Life cycle assessment and techno-economic analysis of ethanol production via coal and its competitors: a comparative study[J]. *Applied Energy*, 2022, 312: 118791.
- [114] KANNUCHAMY S, MUKUND N, SALEENA L M. Genetic engineering of *Clostridium thermocellum* DSM 1313 for enhanced ethanol production[J]. *BMC Biotechnology*, 2016, 16 (Suppl 1): 34.
- [115] DIEN B S, COTTA M A, JEFFRIES T W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63(3): 258-266.
- [116] RYDZAK T, LYND L R, GUSS A M. Elimination of formate production in *Clostridium thermocellum*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(9): 1263-1272.
- [117] RYDZAK T, GARCIA D, STEVENSON D M, et al. Deletion of Type I glutamine synthetase deregulates nitrogen metabolism and increases ethanol production in *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 41: 182-191.
- [118] BISWAS R, ZHENG T Y, OLSON D G, et al. Elimination of hydrogenase active site assembly blocks H₂ production and increases ethanol yield in *Clostridium thermocellum*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2015, 8: 20.
- [119] LI H F, KNUTSON B L, NOKES S E, et al. Metabolic control of *Clostridium thermocellum* via inhibition of hydrogenase activity and the glucose transport rate[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(4): 1777-1784.
- [120] LO J, OLSON D G, MURPHY S J L, et al. Engineering electron metabolism to increase ethanol production in *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 39: 71-79.
- [121] ZHENG T Y, OLSON D G, TIAN L, et al. Cofactor specificity of the bifunctional alcohol and aldehyde dehydrogenase (AdhE) in wild-type and mutant *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(15): 2610-2619.

- [122] TIAN L, PAPANEK B, OLSON D G, et al. Simultaneous achievement of high ethanol yield and titer in *Clostridium thermocellum*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 116.
- [123] HOLWERDA E K, OLSON D G, RUPPERTSBERGER N M, et al. Metabolic and evolutionary responses of *Clostridium thermocellum* to genetic interventions aimed at improving ethanol production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 40.
- [124] WILLIAMS T I, COMBS J C, LYNN B C, et al. Proteomic profile changes in membranes of ethanol-tolerant *Clostridium thermocellum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(2): 422-432.
- [125] KIM S K, WESTPHELING J. Engineering a spermidine biosynthetic pathway in *Clostridium thermocellum* results in increased resistance to furans and increased ethanol production [J]. Metabolic Engineering, 2018, 49: 267-274.
- [126] HERRING C D, KENEALY W R, JOE SHAW A, et al. Strain and bioprocess improvement of a thermophilic anaerobe for the production of ethanol from wood[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 125.
- [127] BERI D, HERRING C D, BLAHOVA S, et al. Coculture with hemicellulose-fermenting microbes reverses inhibition of corn fiber solubilization by *Clostridium thermocellum* at elevated solids loadings[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 24.
- [128] CHEN S T, XU Z X, DING B N, et al. Big data mining, rational modification, and ancestral sequence reconstruction inferred multiple xylose isomerases for biorefinery[J]. Science Advances, 2023, 9(5): eadd8835.
- [129] CHEN X W, KUHN E, JENNINGS E W, et al. DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations (230 g·L⁻¹) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentrations (>10% v/v) during fermentation without hydrolysate purification or concentration[J]. Energy & Environmental Science, 2016, 9(4): 1237-1245.
- [130] GHOSH I N, LANDICK R. OptSSeq: high-throughput sequencing readout of growth enrichment defines optimal gene expression elements for homoethanogenesis[J]. ACS Synthetic Biology, 2016, 5(12): 1519-1534.
- [131] KHANA D B, CALLAGHAN M M, AMADOR-NOGUEZ D. Novel computational and experimental approaches for investigating the thermodynamics of metabolic networks[J]. Current Opinion in Microbiology, 2022, 66: 21-31.
- [132] BHANDIWAD A, SHAW A J, GUSS A, et al. Metabolic engineering of *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* for *n*-butanol production[J]. Metabolic Engineering, 2014, 21: 17-25.
- [133] KELLER M W, LIPSCOMB G L, LODER A J, et al. A hybrid synthetic pathway for butanol production by a hyperthermophilic microbe[J]. Metabolic Engineering, 2015, 27: 101-106.
- [134] 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: 186.
- [135] TIAN L, CERVENKA N D, LOW A M, et al. A mutation in the AdhE alcohol dehydrogenase of *Clostridium thermocellum* increases tolerance to several primary alcohols, including isobutanol, *n*-butanol and ethanol[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 1736.
- [136] PINTO T, FLORES-ALSINA X, GERNAEY K V, et al. Alone or together? A review on pure and mixed microbial cultures for butanol production[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2021, 147: 111244.
- [137] KIYOSHI K, FURUKAWA M, SEYAMA T, et al. Butanol production from alkali-pretreated rice straw by co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*[J]. Bioresource Technology, 2015, 186: 325-328.
- [138] WEN Z Q, WU M B, LIN Y J, et al. A novel strategy for sequential co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium beijerinckii* to produce solvents from alkali extracted corn cobs[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(11): 1941-1949.
- [139] BEGUM S, DAHMAN Y. Enhanced biobutanol production using novel clostridial fusants in simultaneous saccharification and fermentation of green renewable agriculture residues[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2015, 9(5): 529-544.
- [140] LAKSHMI N M, BINOD P, SINDHU R, et al. Microbial engineering for the production of isobutanol: current status and future directions[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 12308-12321.
- [141] HON S, HOLWERDA E K, WORTHEN R S, et al. Expressing the *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* *pforA* in engineered *Clostridium thermocellum* improves ethanol production[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 242.
- [142] LIN P P, RABE K S, TAKASUMI J L, et al. Isobutanol production at elevated temperatures in thermophilic *Geobacillus thermoglucosidasius*[J]. Metabolic Engineering, 2014, 24: 1-8.
- [143] DONG H J, ZHAO C H, ZHANG T R, et al. A systematically chromosomally engineered *Escherichia coli* efficiently produces butanol[J]. Metabolic Engineering, 2017, 44: 284-292.
- [144] ZHAO C H, SINUMVAYO J P, ZHANG Y P, et al. Design and development of a “Y-shaped” microbial consortium capable of simultaneously utilizing biomass sugars for efficient production of butanol[J]. Metabolic Engineering, 2019, 55: 111-119.
- [145] ZHAN Y Y, XU Y, LU X C, et al. Metabolic engineering of

- Bacillus licheniformis* for sustainable production of isobutanol[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2021, 9(51): 17254-17265.
- [146] BAEZ A, CHO K M, LIAO J C. High-flux isobutanol production using engineered *Escherichia coli*: a bioreactor study with *in situ* product removal[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(5): 1681-1690.
- [147] DODDS P E, STAFFELL I, HAWKES A D, et al. Hydrogen and fuel cell technologies for heating: a review[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2015, 40(5): 2065-2083.
- [148] OLADOKUN O, AHMAD A, ABDULLAH T A T, et al. Biohydrogen production from *Imperata cylindrica* bio-oil using non-stoichiometric and thermodynamic model[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2017, 42(14): 9011-9023.
- [149] LEVIN D B, ISLAM R, CICEK N, et al. Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2006, 31(11): 1496-1503.
- [150] TIAN Q Q, LIANG L, ZHU M J. Enhanced biohydrogen production from sugarcane bagasse by *Clostridium thermocellum* supplemented with CaCO_3 [J]. Bioresource Technology, 2015, 197: 422-428.
- [151] KIM D H, SHIN H S, KIM S H. Enhanced H_2 fermentation of organic waste by CO_2 sparging[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37(20): 15563-15568.
- [152] KIM C, WOLF I, DOU C, et al. Coupling gas purging with inorganic carbon supply to enhance biohydrogen production with *Clostridium thermocellum*[J]. Chemical Engineering Journal, 2023, 456: 141028.
- [153] LEE H S, VERMAAS W F J, RITTMANN B E. Biological hydrogen production: prospects and challenges[J]. Trends in Biotechnology, 2010, 28(5): 262-271.
- [154] LI Q, LIU C Z. Co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum* for enhancing hydrogen production via thermophilic fermentation of cornstalk waste[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2012, 37(14): 10648-10654.
- [155] AN Q, BU J, CHENG J R, et al. Biological saccharification by *Clostridium thermocellum* and two-stage hydrogen and methane production from hydrogen peroxide-acetic acid pretreated sugarcane bagasse[J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2020, 45(55): 30211-30221.
- [156] ALVES DE OLIVEIRA R, KOMESU A, VAZ ROSSELL C E, et al. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—from economic to production aspects[J]. Biochemical Engineering Journal, 2018, 133: 219-239.
- [157] TARRARAN L, MAZZOLI R. Alternative strategies for lignocellulose fermentation through lactic acid bacteria: the state of the art and perspectives[J]. FEMS Microbiology Letters, 2018, 365(15): fny126.
- [158] LO J, ZHENG T Y, HON S, et al. The bifunctional alcohol and aldehyde dehydrogenase gene, *adhE*, is necessary for ethanol production in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*[J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(8): 1386-1393.
- [159] MAZZOLI R, OLSON D G, LYND L R. Construction of lactic acid overproducing *Clostridium thermocellum* through enhancement of lactate dehydrogenase expression[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 141: 109645.
- [160] SUBRAMANIAN M R, TALLURI S, CHRISTOPHER L P. Production of lactic acid using a new homofermentative *Enterococcus faecalis* isolate[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(2): 221-229.
- [161] WEN Z Q, 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.
- [162] MAZZOLI R, OLSON D G, CONCU A M, et al. *In vivo* evolution of lactic acid hyper-tolerant *Clostridium thermocellum*[J]. New Biotechnology, 2022, 67: 12-22.
- [163] KRUIS A J, BOHNENKAMP A C, PATINIOS C, et al. Microbial production of short and medium chain esters: enzymes, pathways, and applications[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(7): 107407.
- [164] RODRIGUEZ G M, TASHIRO Y, ATSUMI S. Expanding ester biosynthesis in *Escherichia coli*[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10(4): 259-265.
- [165] SEO H, LEE J W, GARCIA S, et al. Single mutation at a highly conserved region of chloramphenicol acetyltransferase enables isobutyl acetate production directly from cellulose by *Clostridium thermocellum* at elevated temperatures[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12: 245.
- [166] SEO H, NICELY P N, TRINH C T. Endogenous carbohydrate esterases of *Clostridium thermocellum* are identified and disrupted for enhanced isobutyl acetate production from cellulose[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2020, 117(7): 2223-2236.
- [167] SEO H, LEE J W, GIANNONE R J, et al. Engineering promiscuity of chloramphenicol acetyltransferase for microbial designer ester biosynthesis[J]. Metabolic Engineering, 2021, 66: 179-190.
- [168] SEO H, SINGH P, WYMAN C E, et al. Rewiring metabolism of *Clostridium thermocellum* for consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass poplar to produce short-chain esters[J]. Bioresource Technology, 2023, 384: 129263.
- [169] LIU S Y, LIU Y J, FENG Y G, et al. Construction of

- consolidated bio-saccharification biocatalyst and process optimization for highly efficient lignocellulose solubilization [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 35.
- [170] QI K, CHEN C, YAN F, et al. Coordinated β -glucosidase activity with the cellulosome is effective for enhanced lignocellulose saccharification[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 337: 125441.
- [171] OLGUIN-MACIEL E, SINGH A, CHABLE-VILLACIS R, et al. Consolidated bioprocessing, an innovative strategy towards sustainability for biofuels production from crop residues: an overview[J]. *Agronomy*, 2020, 10(11): 1834.
- [172] PATEL A, SHAH A R. Integrated lignocellulosic biorefinery: gateway for production of second generation ethanol and value added products[J]. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2021, 6(2): 108-128.
- [173] ARORA R, SINGH P, SARANGI P K, et al. A critical assessment on scalable technologies using high solids loadings in lignocellulose biorefinery: challenges and solutions[J/OL]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2023[2023-06-01]. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07388551.2022.2151409>.
- [174] REIS C E R, LIBARDI N, BENTO H B S, et al. Process strategies to reduce cellulase enzyme loading for renewable sugar production in biorefineries[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2023, 451: 138690.
- [175] ICHIKAWA S, ICHIHARA M, ITO T, et al. Glucose production from cellulose through biological simultaneous enzyme production and saccharification using recombinant bacteria expressing the β -glucosidase gene[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 127(3): 340-344.
- [176] DASH S, OLSON D G, CHAN S H J, et al. Thermodynamic analysis of the pathway for ethanol production from cellobiose in *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 55: 161-169.
- [177] HON S, OLSON D G, HOLWERDA E K, et al. The ethanol pathway from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* improves ethanol production in *Clostridium thermocellum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2017, 42: 175-184.
- [178] SANDER K, ASANO K G, BHANDARI D, et al. Targeted redox and energy cofactor metabolomics in *Clostridium thermocellum* and *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 270.
- [179] CUI J X, OLSON D G, LYND L R. Characterization of the *Clostridium thermocellum* AdhE, NfnAB, ferredoxin and Pfor proteins for their ability to support high titer ethanol production in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*[J]. *Metabolic Engineering*, 2019, 51: 32-42.
- [180] CHIRANIA P, HOLWERDA E K, GIANNONE R J, et al. Metaproteomics reveals enzymatic strategies deployed by anaerobic microbiomes to maintain lignocellulose deconstruction at high solids[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3870.
- [181] BALCH M L, HOLWERDA E K, DAVIS M F, et al. Lignocellulose fermentation and residual solids characterization for senescent switchgrass fermentation by *Clostridium thermocellum* in the presence and absence of continuous *in situ* ball-milling[J]. *Energy & Environmental Science*, 2017, 10(5): 1252-1261.
- [182] YAN F, WEI R, CUI Q, et al. Thermophilic whole-cell degradation of polyethylene terephthalate using engineered *Clostridium thermocellum*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2021, 14(2): 374-385.
- [183] XIAO Y, DONG S, LIU Y J, et al. Key roles of β -glucosidase BglA for the catabolism of both laminaribiose and cellobiose in the lignocellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 250: 126226.



通讯作者：崔球(1975—)，男，博士，研究员，博士生导师。研究方向为基于代谢物组/代谢流组学的计算分析辅助能源微生物代谢工程设计、蛋白质结构功能研究。

E-mail: cuiqiu@qibebt.ac.cn



通讯作者：冯银刚(1977—)，男，博士，研究员，博士生导师。研究方向为能源微生物的分子生理机制与合成生物学应用、工业酶催化机制与酶工程等。

E-mail: fengyg@qibebt.ac.cn



第一作者：肖艳(1982—)，女，博士，副研究员，硕士生导师。研究方向为能源微生物代谢机理与改造。

E-mail: xiaoyan@qibebt.ac.cn