

纤维小体在燃料乙醇中的应用

黄俊^{1,2} 陈东^{1,2} 黄日波^{1,2}

(1 广西大学生命科学与技术学院 南宁 530004)

(2 广西科学院生物质能源酶解技术国家重点实验室 国家非粮生物质能源工程技术研究中心 南宁 530004)

摘要 纤维小体在木质纤维素的降解中起着重要作用。它不仅含有降解纤维素所需的各种纤维素酶系,而且组装成具有高效催化活性的多酶复合体形式。介绍了纤维小体基本结构与功能,重点概述了其在生物燃料乙醇中的应用并对纤维小体的研究提出了展望。

关键词 纤维小体 生物质 应用

中图分类号 Q539+.3

纤维素资源是地球上最丰富的可再生资源,而自然界中的纤维素只有一小部分得到了充分利用,绝大多数纤维素以焚烧的形式被处理掉,不仅造成资源的浪费还对环境产生极大的污染。利用微生物产生的纤维素酶将其转化为人类急需的能源、化工原料,对人类社会解决环境污染和能源危机具有重大的实际意义。

纤维素生产乙醇及其他化工产品的关键是把纤维素水解成葡萄糖,即纤维素的糖化过程。目前,对纤维素的糖化过程研究较多的是酸水解法、酶水解法。酸水解法中,稀酸水解研究较为成熟,但得糖率低难于实现产业化。高浓度强酸虽可以有效水解纤维素,但其腐蚀性高且所需工艺条件苛刻,目前只有少数实验室能够进行相关研究。而用纤维素酶来水解纤维素,可在常温、常压条件下进行,酶解率高,最符合产业化要求。因此,用纤维素酶降解纤维素是最经济的途径。

纤维素酶是一组酶系的总称,它主要由三类不同催化功能的酶组成。根据其催化功能的不同可分为:①内切葡聚糖酶或称 Cx 酶、CMC 酶(endo-1,4- β -D-glucanase,来自真菌的简称 EG,来自细菌的简称 Len),该类酶能随机地在纤维素分子内切断1,4- β 糖苷键,产生非还原性末端;②外切葡聚糖酶或称 C1 酶(exo-1,4- β -D-glucanase,来自真菌的简称 CBH,来自细菌的简称 Cex),它从纤维素分子的非还原端切割糖苷键,生成纤维二糖;③纤维二糖酶或称 β -葡萄糖苷酶(β -1,4-glucosidase,简称 BG),它把纤维二糖水解开成单个的葡

萄糖分子。只有在这三类酶的协同作用下,才能把纤维素分子降解成葡萄糖。按最适 pH 可以将纤维素酶分为酸性纤维素酶,最适 pH 在 3~5;中性纤维素酶,最适 pH 在 6~7;碱性纤维素酶,最适 pH 在 8~10。

纤维素酶广泛存在于自然界的生物体中,细菌、真菌、动物体内都能产生纤维素酶。一般用于生产的纤维素酶主要由真菌产生,如木霉(*Trichoderma* sp.)、青霉(*Penicillium* sp.)、曲霉(*Aspergillus* sp.)以及腐质霉(*Humicola* sp.)等。其中里氏木霉(*T. reesei*)产生的纤维素酶具有酶谱全、活力高的特点,是产酸性纤维素酶的主要菌种。腐质霉则是中性纤维素酶的重要生产菌种。细菌和放线菌等也产生纤维素酶,它们产生的纤维素酶往往具有耐碱耐热的特点,如洗涤剂工业用的碱性纤维素酶就是由嗜碱芽胞杆菌产生。细菌纤维素酶则是以形成纤维小体(cellulosome)的形式起作用。纤维小体是一种多酶复合体,能高效降解纤维素而引起广泛关注。

Lamed 等^[1]首先在热纤梭菌(*C. thermocellum*)发现了纤维小体,分子大小是 $2 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ Da,直径大约为 18nm,由大小从 37~210kDa 不等的 14~50 个亚基组成。纤维小体具有类似核糖体的大分子结构,能协调、有序、高效地降解纤维素。纤维小体普遍存在于厌氧菌中,其原因可能在于依靠高效的多酶复合体精确调节代谢活动,抵消厌氧发酵产能的不足^[2]。研究发现,在其他类型细菌中也有纤维小体的存在。例如,Li 等^[3]就在厌氧真菌 *Orpinomyces* 中发现纤维小体的存在。但至今还未在好氧菌中发现有纤维小体的存在。

收稿日期:2010-08-06 修回日期:2010-10-11

**通讯作者,电子信箱:rbhuang@gxas.cn

随着对纤维小体的进一步认识,现在又提出一个新概念:Cellulosomics^[4]。

1 纤维小体结构

纤维小体骨架是由在 Ca^{2+} 和亲和力共同作用下紧密连接的黏附蛋白 (cohesin) 和锚定蛋白 (dokerin) 组成的脚手架蛋白 (scaffoldin) 构成。酶同锚定蛋白结合后被定位于骨架特定位置,而该位置则是由黏附蛋白决定。骨架还包括一个将酶复合体结合到纤维素的碳水复合物结合模块 CBM (cellulose-binding module) 以及 S-层同源结构域 (SLH, S-layerhomology), SLH 可以把整个酶复合体固定在可水解纤维素细胞的膜上。

脚手架蛋白一般由两类黏附-锚定蛋白组成。I 型黏附-锚定蛋白特异性同酶结合并同 CBM 整合成最初脚手架蛋白 (primary scaffoldin), II 型黏附-锚定蛋白负责将最初脚手架蛋白整体结合到 SLH, II 型黏附-锚定蛋白同 SLH 组成锚定脚手架蛋白 (anchoring scaffoldin)。酶和锚定蛋白的特异性结合是纤维小体的一大特点,酶的多样性必然要求黏附-锚定蛋白也存在着多样性。这就形成了自然界中存在着的各种各样的纤维小体。有学者^[5]在 *R. flavefaciens* 发现最复杂的脚手架蛋白由 4 种黏附-锚定蛋白构成。而 *R. flavefaciens* 中一组 ScaA 和 ScaB 已经被划分为第三类黏附-锚定蛋白^[6]。纤维小体体外组装的机理仍不太清楚。目前所知的也只是 Ca^{2+} 离子对纤维小体有重要作用。它对黏附蛋白和锚定蛋白的折叠和稳定起着至关重要的作用,同时酶也离不开 Ca^{2+} 。因此一旦有螯合剂如 EDTA 的存在,纤维小体的酶活将受到抑制,同时纤维小体还会有崩溃瓦解的可能。

CBM 是普遍存在于纤维小体和非纤维小体的纤维素酶,它能够将催化域黏结到底物上从而大大提高酶的催化活性。按其功能可分为 3 类:类型 A,能牢固的结合到非溶性多糖表面;类型 B,同可溶性多糖链结合;类型 C,结合 small saccharides 小糖分子^[7]。其按氨基酸序列的同源性可分为 39 个家族。到目前为止,所有脚手架蛋白所带有的 CBM 都属于家族 3,这一类型的 CBM 能稳定的结合到纤维素表面^[8]。

纤维小体包含了许多种酶:其中主要有①内切葡聚糖酶,可以随机切断无定形态的纤维素如 CMC 和 TNP-CMC;②外切葡聚糖酶;③纤维 2 糖磷酸化酶,将纤维 2 糖磷酸化生成葡萄糖和 1-磷酸葡萄糖;④纤维

糊精磷酸化酶以及 2 个 β -葡萄糖苷酶;⑤半纤维素酶如木聚糖酶和甘露聚糖酶;⑥几丁质酶,几丁质酶的存在表明纤维小体不但可以利用木质纤维素还可以利用几丁质作为碳氮源^[9]。

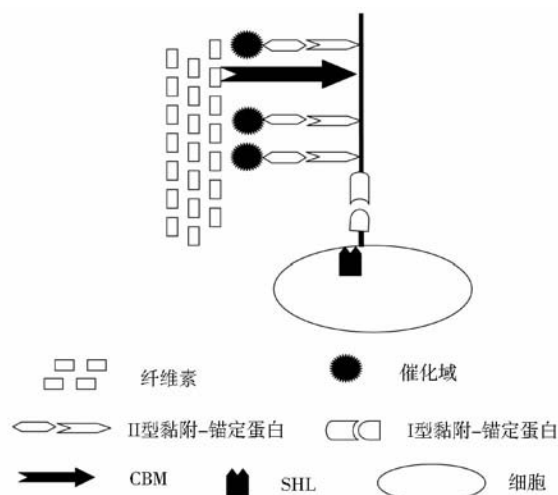


图 1 纤维小体结构示意图

Fig. 1 The structure of cellulosome

2 纤维小体在燃料乙醇中的应用

高能耗的前处理过程和纤维素酶本身高昂的价格极大的制约了纤维素酶在生物质能源中的利用。为了降低生产成本,可以将纤维素糖化和发酵等几步反应过程合并在一部反应里完成,即联合生物加工 (consolidated bioprocessing, CBP)。CBP 要求某种“超级”微生物具有既能水解纤维素又能利用水解纤维素产生的糖类发酵产酒精,可自然界中没有哪个微生物能满足 CBP 这样的要求。改造现有微生物也就成为唯一的选择。第一,将具有水解纤维素能力的微生物改造成能利用水解纤维素产生的糖类发酵生产酒精;第二,将能产酒精的微生物改造成能以纤维素为唯一碳源发酵生产酒精。对于第一点,厌氧微生物是最热门的研究对象,如热纤梭菌、食纤维梭菌 (*C. cellulovorans*)、解纤维梭菌 (*C. cellulolyticum*)。目前取得最成功的要属解糖热厌氧杆菌 (*T. saccharolyticum*)。解糖热厌氧杆菌本身可以发酵木聚糖生产酒精和乳酸等产物。Shaw 等^[10]通过改变代谢途径的办法,把发酵副产物代谢途径的基因敲除掉,使该基因重组菌株的发酵产物只有酒精。改造后的 *T. saccharolyticum* 产酒率可以达到 37g/L,是已有报道里的最高值。但厌氧微生物普遍存在产酒精率低、酒精耐受力低、副产物多等

缺点,只有解决了这些难题才能实现产业化。

对于第二点,则是设法将内切酶和外切酶导入产酒精微生物表达,使其能在以纤维素为唯一碳源的条件下利用水解纤维素产生的糖类发酵生产酒精。和运动发酵单胞菌(*Z. mobilis*)和产酸克雷伯菌(*K. oxytoca*)这些寄主微生物相比,酿酒酵母无疑是首选寄主微生物。Cho等^[11]就将来自*Bacillus* sp. DO4的内切和外切葡聚糖酶以及来自*B. circulans*的 β -葡糖苷酶这3个酶组分整合到酿酒酵母DNA上。虽然最终能检测到有酶活并在一定程度上促进酿酒酵母利用纤维低聚糖,但酶的表达水平仍不能满足生长和发酵的需要。目前制约基因水平上改造酵母等微生物的难点主要有:①多异源基因共表达的不良反应,纤维素、半纤维素的降解都涉及大量的基因,同时将如此大量的异源基因导入一个酵母细胞,可能会造成基因的不稳定或产出预想不到的产物;②异源基因的转录表达,即协调性,酶的分泌表达需要有合适的启动子和转录调节因子来控制基因;③酶的正确折叠,蛋白质只有正确折叠才能有功能,然而同时对如此大量的外源酶进行折叠对酵母而言是个巨大的挑战。

根据细胞表面展示技术把纤维小体展示在产酒精微生物表面可以避开上述3大难点。细胞表面展示技术类似于纤维小体结构,也是由一个起固定作用的锚定蛋白和起催化作用的表达蛋白所组成。依托成熟的细胞表面展示技术,设法将纤维小体转到合适的寄主微生物上,将整个复杂的纤维小体同时转到寄主微生物是不切实际的。Designer cellulosome随之诞生,即根据需要构建含有特定酶的迷你纤维小体(minicellulosome)^[12]。通过Designer cellulosome,一方面可以研究黏附蛋白和锚定蛋白的功能,研究酶体内各种酶的协同表达等降解机制,更为重要的是为开发纤维素资源开辟出新路。

2.1 纤维小体在大肠杆菌中的应用

Fierobe等^[13]以大肠杆菌为载体构建了一个含双酶的迷你纤维小体。他们从*C. thermocellum*和*C. cellulolyticum*各提取一套黏附-锚定蛋白,酶则是来自*C. cellulolyticum*的内切葡聚糖酶(Cel9G)和endoprocessive cellulase(Cel48F)。利用黏附-锚定蛋白的结合特异性,可以将已经固定在锚定蛋白的酶准确结合到脚手架蛋白上,从而构建出预期设计的纤维小体。结果表明人工合成的纤维小体有活性,而且比游离酶更具协调性。随后他们又构建出了3个酶组分的

迷你纤维小体^[14]。在前面2个纤维素酶的基础上多增加了木聚糖酶,这个迷你纤维小体和游离酶相比,酶活提高了7倍。可惜作者没有报道这些大肠杆菌利用纤维素产酒精方面的表现,不过Fierobe的成功为体外构建迷你纤维小体打下了坚实的基础。

2.2 纤维小体在酵母中的应用

Kondo^[15]研究小组首先尝试构建带有纤维小体的酵母细胞去降解大麦 β -葡聚糖。他们选取的纤维素酶是来自棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)的 β -葡糖苷酶(BGL1)和里氏木霉(*T. reesei*)的内切葡聚糖酶II(EG II)。大麦 β -葡聚糖是可溶的多糖复合物,其大致由占70%的 β -1,4葡苷链和占30%的 β -1,3葡苷链相连的1200个葡萄糖组成。该酵母能在以 β -葡聚糖为唯一碳源的培养基上生长并能直接将 β -葡聚糖发酵生产酒精,在50h内45g/L的 β -葡聚糖可产生16.5g/L的酒精。这也意味着每克碳水化合物可产0.48g酒精,达到了理论值的93.3%。其后,该小组^[16]还把来自里氏木霉的纤维二糖水解酶II(CBH II)增加到纤维小体中,从而使酵母细胞真正具有水解无定形纤维素能力。在以葡萄糖为碳源的培养基里,虽然在40h内所有无定形纤维素不能被完全利用,但其发酵能力也达到10g/L纤维素可产生3g/L的酒精。即每克碳水化合物可产0.45g酒精,是理论值的88.5%。可他们并没有报道在纤维素为唯一碳源条件下该酵母的发酵能力。

Tsai^[17]研究小组将选取来自厌氧菌的纤维素酶组成的迷你纤维小体重组到酵母细胞上。他们首先选择热纤梭菌的内切葡聚糖酶和解纤维梭菌的内切葡聚糖酶和外切葡聚糖酶组成迷你纤维小体,这个纤维小体仍有水解纤维素的协调能力。而一旦将解纤维梭菌的内切葡聚糖酶换成 β -葡糖苷酶,就可使新的纤维小体具有了纤维素酶的三大酶组分,其水解纤维素能力不但得到提高而且还能发酵产酒精。在以无定形纤维素(phosphoric acid swollen cellulose, PASC)为唯一碳源的培养基里,该重组酵母发酵能力为每10g/L PASC可产生3.5g/L的酒精。即每克碳水化合物可产0.49g酒精,是理论值的95%。而同样是以PASC为唯一碳源,Den Haan^[18]研究小组因没有采用纤维小体形式改造酵母,其效果大打折扣。Den Haan研究小组尝试将来自里氏木霉的内切葡聚糖酶I(EG I)和扣囊复膜袍酵母(*Saccharomycopsis flbuligera*)的 β -葡糖苷酶(BGL1)整合到酿酒酵母中表达。虽然都检测到有酶活并能利用PASC发酵生产酒精,但其发酵酒精的浓度只为1g/

L。从这两个小组的实验结果可以明显看出纤维小体的优势。

半纤维素是木质纤维素的主要成分之一,木聚糖是半纤维素的主要成分。Katahira 等^[19]则尝试利用纤维小体水解半纤维素来发酵产酒精。他们把来自里氏木霉的木聚糖酶 II (xylanase II) 和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 的 β -D-木聚糖苷酶 (β -D-xylosidase) 以纤维小体形式整合到酵母表面,结果表明这两个酶缺一不可,只有在两个酶都同时存在的情况下才能将木聚糖转化为木糖。因为酵母不能直接利用木糖生产酒精,所以要向酵母导入来自毕赤酵母的木糖还原酶和木糖醇脱氢酶以及酵母本身的木酮糖激酶,它们共同作用再将木糖转化成木酮糖-5 磷酸,从而把酵母改造成能利用的木糖。该重组酵母经 62h 发酵后可产生酒精浓度为 7.1g/L,表明每克碳水化合物可产 0.30g 酒精,是理论值的 58%。虽然该重组酵母产酒精能力明显不足,但该实验为今后开发利用半纤维素指出了一条出路。

2.3 纤维小体在丙酮丁醇梭菌的应用

丙酮丁醇梭菌因其可产生具有重要工业价值的丁醇而引起广泛关注。研究发现虽然其不能利用纤维素,可测序结果已经表明该菌基因组内含有纤维小体基因,因此依托其自身带有的纤维小体基因改造该菌,使其能利用纤维素生产丁醇也就成为一大亮点。Sabathe 等^[20]已经证实该菌的纤维小体主要由四部分组成:脚手架蛋白 cipA 和纤维二糖水解酶 Cel48A, Cel9X, Cel9C。该小组还首次以纤维小体的形式改造丙酮丁醇梭菌。他们^[21]首次克隆并异源表达了丙酮丁醇梭菌自身所带有的脚手架蛋白 cipA。研究发现完整的 CipA 由一个 N 末端的信号肽,一个属于家族 3a 的 CBD,5 个 I 型黏附蛋白和 6 个亲水域组成。随后将利用 PCR 克隆出来含有一个 CBD 和两个锚定蛋白的 cipA 基因转到表达质粒上,再转到丙酮丁醇梭菌体内表达,从而构建出一个迷你纤维小体。

Perret 等^[22]在丙酮丁醇梭菌体内构建出能带有 2 个纤维素酶的外源纤维小体。他们从解纤维梭菌 (*Clostridium cellulolyticum*) 提取一个带有 CBD 和 X2 结构域以及一个黏附蛋白的迷你脚手架蛋白 CipC1,再从热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*) 提取只含一个黏附蛋白的 Scaf3 组成一个迷你纤维小体基座在丙酮丁醇梭菌体内表达,然后再与带有酶的锚定蛋白结合从而组成完整的迷你纤维小体。与 Sabathe 相比,Perret 才构建出了真正意义上的纤维小体。可惜他们的工作受

制于找不到合适的纤维素酶结合到纤维小体上,而使纤维小体没有表现出该有的活性。来自同一研究小组的 Mingardon^[23]在 Perret 工作的基础上,选择来自解纤维梭菌的甘露聚糖酶来构建纤维小体。结果表明该纤维小体具有结合纤维素的能力,而且甘露聚糖酶保持有酶活。这些工作都说明能在丙酮丁醇梭菌体内合成出异源纤维小体。现在研究的难点还是找不到合适的纤维素酶来提高纤维小体的活性。

总体而言,异源表达纤维小体不外乎分为体外 (*in vitro*) 和体内 (*in vivo*) 两种方式。体外合成的优点在于可以明显提高水解能力,但纤维素酶分离纯化所需的高成本制约了其在工业大规模生产上的应用。而体内合成则没有这方面的困扰,因此体内合成更具应用前景。

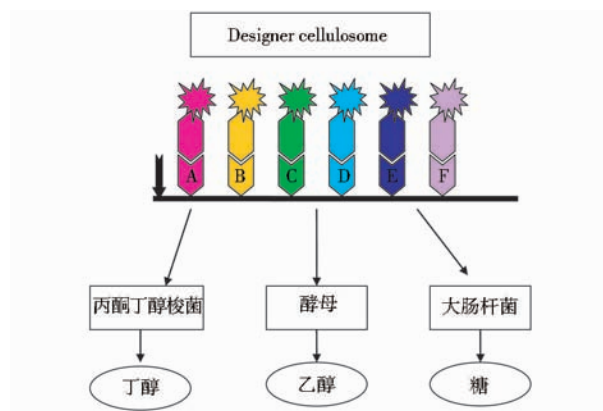


图 2 Designer cellulosome 应用示意图

Fig.2 The application of cellulosome

3 热纤梭菌的应用

热纤梭菌是革兰氏阳性、厌氧、嗜热、内生孢子的细菌,能利用纤维素或葡聚糖发酵产生酒精、乙酸、乳酸等。热纤梭菌一大特点是在木质纤维上生长速度比在葡萄糖上快 6 倍以上。在生物质开发上,利用热纤梭菌发酵产酒精有以下优点:①可以缩短冷却时间,在高温条件下更容易回收酒精;②高温下不易被污染;③在发酵过程中不需要加入氧气;④不消耗自身水解纤维素时产生的 5 碳糖,通过加入其它菌种共培养利用 5 碳糖发酵产酒精,从而保证了纤维素得到充分利用^[24]。

然而把热纤梭菌应用在 CBP 上的也存在一些不足,首先是纤维二糖的累积会抑制纤维素酶的产生^[25]。为避免酶受到抑制可通过加入外源葡聚糖酶来提高纤维小体酶活,例如,加入来自黑曲霉的葡聚糖酶后纤维

小体的酶活提高了10倍^[26],这为我们提供一个减少纤维素酶受到抑制的可行性方案。

其次,热纤梭菌很难在分子水平上进行基因工程的改造。这是因为其自身带有Dam⁺型限制性内切核酸酶系统保护DNA,外源导入的DNA只有经过Dam⁺甲基化后才不会被该限制性内切核酸酶降解^[27]。现在这一瓶颈有望得到突破。Tyurin等^[28]通过电转化将外源DNA成功导入热纤梭菌。同时以PIMK1为代表的质粒也已经应用在热纤梭菌的改造上^[29]。

再次,热纤梭菌的生长代谢受有毒副产物抑制,如在发酵产酒精时会受到副产物乙酸和乳酸的抑制作用。敲除产乙酸和乳酸相关基因可以解决这个问题,但由于同样受制于Dam⁺型限制性内切核酸酶的保护,敲除基因变得极其困难。现在一种新技术能够有效敲除梭菌基因:ClosTron^[30]。ClosTron技术是基于来自*Lactococcus lactis*的*lirB*基因内的Ⅱ组内含子整合到梭菌里(to function in clostridial hosts)。这类内含子重组是双交换重组,和质粒单交换重组相比更加稳定。重组菌可根据红霉素抗性来筛选,培养时间缩短在10~14天。在*C. acetobutylicum*中成功筛选出了6个重组菌,*C. difficile*则获得5个重组菌。同类菌里,这个数目已经远远超过已有的报道。并首次在*C. botulinum*和*C. sporogenes*中实现基因失活,证明此方法能应用在梭菌属范围内,也为改造热纤梭菌提供了一种新手段。

4 展 望

目前,世界各国已经意识到不能盲目的以大量消耗粮食为代价去解决部分能源问题,由此可能导致更严重的社会问题——粮食短缺。因此,发展非粮生物质能源才是一条可持续发展的道路。而纤维素资源以其丰富,廉价等优点成为生产燃料乙醇的首选原料。在传统工艺上,纤维素必须经过预处理及酶解糖化才能产生乙醇,而这两步反应成本都很高,这就极大地制约了纤维素资源的利用。现在,通过构建含有纤维小体的工程菌,可以有望通过一步法达到生产酒精的目的,从而大大降低生产成本,推动纤维素资源的利用。

致谢 感谢曾丽娟同学对本文参考文献的查阅所做的贡献。

参考文献

[1] Lamed R, Setter E, Bayer E A. Characterization of a cellulose-

binding, cellulase-containing complex in *Clostridium thermocellum*. J Bacteriol, 1983,156:828-836.

[2] Miranda M, Leung K T, Qin W S. The prospects of cellulose producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. Int J Biol Sci, 2009,5:500-516.

[3] Li X L, Chen H, Ljungdahl L G. Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulose-hemicellulase complex. Appl Environ Microbiol, 1997,63:4721-4728.

[4] Bayer E A, Lamed R, White B A, et al. From cellulosomes to cellulosomes. Chem Rec, 2008,8:364-377.

[5] Alber O, Noach I, Lamed R, et al. Preliminary X-ray characterization of a novel type of anchoring cohesion from the cellulosome of *Ruminococcus flavefaciens*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2008,64:77-80.

[6] Ding S Y, Rincon M T, Lamed R, et al. Cellulosomal scaffoldin-like proteins from *Ruminococcus flavefaciens*. J Bacteriol, 2001,183:1945-1953.

[7] Boraston A B, McLean B W, Kormos J M, et al. Carbohydrate-binding modules: diversity of structure and function. In: Gilbert H J, Davies G J, Henrissat B, et al. Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. 202-211.

[8] Lehtio J, Sugiyama J, Gustavsson M, et al. The binding specificity and affinity determinants of family1 and family3 cellulose binding modules. Proc Natl Acad Sci USA, 2003,100:484-489.

[9] Zverlov V V, Fuchs K P, W. H. Schwarz. Chi18A, the endochitinase in the cellulosome of the thermophilic, cellulolytic bacterium *Clostridium thermocellum*. Appl Environ Microbiol, 2002,68:3176-3179.

[10] Shaw A J, Podkaminer K K, Desai S G, et al. Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. Proc Natl Acad Sci USA, 2008,105:13769-13774.

[11] Cho K M, Yoo Y J, Kang H S. δ -integration of endo/exoglucanase and β -glucosidase genes into the yeast chromosomes for direct conversion of cellulose to ethanol. Enzyme Microb Technol, 1999,25:23-30.

[12] Bayer E A, Morag E, Lamed R. The cellulosome—a treasure-trove for biotechnology. Trends Biotechnol. 1994,12:378-386.

[13] Fierobe H P, Mechaly A, Tardif C, et al. Design and production of active cellulosome chimeras. J Biol Chem, 2001,276:21257-21261.

[14] Fierobe H P, Bayer E A, Tardif C, et al. Degradation of cellulose substrates by cellulosome chimeras. J Biol Chem, 2002,277:49621-49630.

[15] Fujita Y, Takahashi S, Ueda M, et al. Direct and efficient

- production of ethanol from cellulosic material with a yeast strain displaying cellulolytic enzymes. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68:5136-5141.
- [16] Fujita Y, Ito J, Ueda M, et al. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl Environ Microb*, 2004, 70:1207-1212.
- [17] Tsai S L, Oh J, Singh S, et al. Functional assembly of minicellulosomes on the *saccharomyces cerevisiae* cell surface for cellulose hydrolysis and ethanol production. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75: 6087-6093.
- [18] Den Haan R, Rose S H, Lynd R, et al. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2007, 9:87-94.
- [19] Katahira S, Fujita Y, Mizuike A, et al. Construction of axylan-fermenting yeast strain through codisplay of xylanolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:5407-5414.
- [20] Sabathe F, Belaich A, Soucaille A. Characterization of the cellulolytic complex (cellulosome) of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 217:15-22.
- [21] Sabathe F, Soucaille P. Characterization of the CipA scaffolding protein and *in vivo* production of a minicellulosome in *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol*, 185:1092-1096.
- [22] Perret S, Casalot L, Fierobe H P, et al. Production of heterologous and chimeric scaffoldins by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *J Bacteriol*, 2004, 186:253-257.
- [23] Mingardon F, Perret S, Belaich A, et al. Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Appl Environ Microb*, 2005, 71:1215-1222.
- [24] Demain A L, Newcomb M, Wu J H. Cellulase, clostridia, and ethanol. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69:124-154.
- [25] Brener D, Johnson B F. Relationship between substrate concentration and fermentation product ratios in *Clostridium thermocellum* cultures. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47:1126-1129.
- [26] Lamed R, Kenig R, Morgenstern E, et al. Efficient cellulose solubilisation by a combined cellulosome- β -glucosidase system. *Appl Biochem Biotechnol*, 1990, 27:173-183.
- [27] Klapatch T R, Demain A L, Lynd L R. Restriction endonuclease activity in *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermosaccharolyticum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 45:127-131.
- [28] Tyurin M V, Desai S G, Lynd L R. Electrotransformation of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:883-90.
- [29] Mai V, Lorenz W W, Wiegel J. Transformation of *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL-YS485 with plasmid pIKM1 conferring kanamycin resistance. *FEMS Microbiol Lett*, 1997, 148:163-167.
- [30] Heap J T, Pennington O J, Cartman S T, et al. The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*. *J Microbiol Methods*, 2007, 70:452-464.

Research Progress in Cellulosome Application in Bio-ethanol

HUANG Jun^{1,2} CHEN Dong^{1,2} HUANG Ri-bo^{1,2}

(1 College of Life Science and Biotechnology, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(2 State Key Laboratory of Bioenergy Enzyme Technology, Guangxi Academy of Sciences,

National Engineering Research Center for Non food Biorefinery, Nanning 530007, China)

Abstract Cellulosome plays important roles in lignocellulose degradation. The cellulosome not only secreted enzymes degrade lignocellulose, but also can assemble multi-enzyme complexes which has an effective catalytic activity. The basic structure and function of cellulosome was described, summarizes the applications progresses in bioethanol, and analyzed the perspectives and challenges.

Key words Cellulosome Biofuel Application