

综述

微生物菌群发酵生产化学品的研究进展

姜莉莉, 周瑾洁, 王旭东, 孙亚琴, 修志龙

大连理工大学 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116024

姜莉莉, 周瑾洁, 王旭东, 等. 微生物菌群发酵生产化学品的研究进展. 生物工程学报, 2016, 32(11): 1496-1506.

Jiang LL, Zhou JJ, Wang XD, et al. Progress in chemicals production by microbial consortia. Chin J Biotech, 2016, 32(11): 1496-1506.

摘要: 廉价生物质资源的利用是工业生物技术领域研究的热点, 复杂的成分和较多的杂质使传统的单菌发酵方式难以应对, 成为产业化的关键问题。文中从微生物菌群的工业应用、微生物菌群发酵与纯种发酵的比较、微生物细胞间的相互作用等方面综述了微生物菌群发酵技术的最新研究进展, 并对微生物菌群的设计和应用进行了展望。微生物菌群发酵可以充分利用廉价生物质基质、生产多个产品或减少副产物的生成, 在生物基化学品和燃料的生产中将是一种有前景的发酵技术。

关键词: 工业微生物组学, 微生物菌群, 发酵, 生物质, 生物炼制, 生物基化学品, 生物燃料

Progress in chemicals production by microbial consortia

Lili Jiang, Jinjie Zhou, Xudong Wang, Yaqin Sun, and Zhilong Xiu

School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

Abstract: Using cheap biomass resources is a hotspot of research on industrial biotechnology. It is difficult for traditional fermentations with single strain to treat so complex components and more impurities, which becomes the key problem in industrialization. In this review, some existing industrial bioprocesses involving microbial consortia were described. Comparison of 1,3-propanediol production by microbial consortia and pure cultures were then introduced and the relationship between cells in microbial consortia were summarized. Finally, the perspective was also addressed to design and apply microbial consortia in the future.

Keywords: industrial microbiome, microbial consortia, fermentation, biomass, biorefinery, bio-based chemicals, biofuels

Received: February 16, 2016; **Accepted:** May 6, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21476042), National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. SQ2011AAZY2805-2).

Corresponding author: Zhilong Xiu. Tel: +86-158-41165970; Fax: +86-411-84706369; E-mail: zhixiu@dlut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21476042), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. SQ2011AAZY2805-2) 资助。

网络出版时间: 2016-08-01

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160801.0951.001.html>

人类一直与微生物群落一起生活,人体肠道微生物细胞的数量甚至超过了其他细胞总量,但我们对自身和环境微生物群落的组成和功能知之甚少,至今未培养的微生物仍占自然界中微生物的90%以上。为此美国48位科学家联合在《科学》周刊上提出开展“联合微生物组计划(Unified Microbiome Initiative,简称UMI)”的建议,开展对人体、植物、动物、土壤和海洋等几乎所有微生物组的研究,并希望美国能将其与“精准医疗”和“脑科学”两大科学计划予以同样的重视^[1]。与此同时来自德国、美国和中国的3位科学家在《自然》周刊上呼吁,在UMI基础上启动“国际微生物组计划(IMI)”,建议所有相关学科的专家一起合作,使不同国家和研究领域能够共享标准,从而实现资源的整合^[2]。微生物组学(Microbiome)是研究土壤、湖泊、肠道等生态环境下微生物菌落与陆生、水生动植物的生长以及人类疾病和健康之间关系的新兴学科,研究主旨是揭示微生物多样性与人和生态稳定性之间的关系。微生物组学可以应用于工业、农业、水产和医药等领域,工业微生物组学研究的对象是在食品、轻工、环境、能源、化工等工业领域得到应用的微生物菌群。

人类对微生物资源的利用经历过天然混菌发酵和纯种发酵两个阶段,已有几千年历史的传统食品,如奶酪、酸菜、酿酒、大酱等的发酵生产是多种微生物(如细菌和真菌)共同作用的结果;为了避免发酵过程中染菌以及产物中带有病原微生物,混菌发酵逐渐被纯种发酵所替代。微生物纯培养技术使研究者摆脱了多种微生物共存的复杂局面,能够不受干扰地对单一菌株进行研究,从而使人们对微生物的形

态结构、生理生化和遗传特性有了更为深入的认识,是微生物学发展的一个巨大进步,也是生物化学工程和现代生物技术的里程碑。目前多数生物技术产品,如氨基酸、有机酸、抗生素和酶等都是利用纯培养的微生物细胞生产的^[3],但是自然环境中90%以上的微生物不能用现有的生物技术来培养,而且利用纯种培养技术生产生物基能源和化学品存在着基质成本高、产物分离困难^[4]、有机酸或醇类等副产物对细胞的生长有毒害作用^[5]等难题。

面对微生物纯种培养技术的缺陷,人们对微生物发酵方式进行了重新思考。近年来,在纯种培养技术基础上发展起来的共培养(Co-culture)或混合培养生物技术(Mixed culture biotechnology, MCB),是将两种或以上的微生物(绝大多数是两种微生物)在无菌条件下进行混合培养,利用特定的不同微生物的生长和代谢特点进行发酵的生物技术。共培养发酵的典型应用是生产维生素C前体2-酮基-L-古龙酸(2-keto-L-gulonic acid, 2-KLG),这种混合菌系最为常用的是普通生酮基古龙酸菌(俗称小菌)和巨大芽孢杆菌(俗称大菌),其中小菌胞内分泌的L-山梨糖脱氢酶和L-山梨酮脱氢酶经过两步反应可以将L-山梨糖转化成2-KLG,大菌可以作为小菌的伴生菌,缩短小菌生长的延迟期,促进小菌的生长和产酸^[6]。为了进一步克服单菌的局限性,并能够适应复杂的基质和粗放的环境,利用微生物菌群(Microbial consortium)进行发酵生产日益成为新的研究热点。该技术是天然混菌发酵的工业应用,是基于生态选择的原则将能够利用复杂基质、产物范围特殊的菌群保留在反应器或发酵罐中持续使用,因此有助于降低基质成本和产物分离的

成本, 并且培养过程通常无需灭菌操作。微生物菌群中通常含有一些未知的或未培养的微生物, 其作用尚不清楚。微生物菌群在环境修复、能源生产中表现出极强的优越性, 如活性污泥处理废水、生产沼气等。

生物炼制 (Biorefinery) 是利用可再生的生物质资源为原料, 经过物理、化学、生物及其集成方法加工成化学品的过程, 所涉及的技术也称为工业生物技术。我国新近公布的《中国制造 2025》规划中明确提出, 构建“高效、清洁、低碳、循环”的绿色制造体系^[7]。生物炼制的宗旨是将廉价原料“吃干榨净”, 将发酵产物充分利用。廉价原料的多样性, 如木质纤维素、粗甘油、糖蜜、农产品加工废弃物等, 以及组成的复杂性, 如玉米秸秆等木质纤维素水解液中含有五碳糖、六碳糖、酸、醛、酚、盐等十几种组分, 这些原料用于发酵生产使传统的单菌单底物发酵模式难以应对, 出现原料利用不充分(多数菌偏爱六碳糖)、原料中的酸、醛、酚、盐抑制细胞生长、产物难以分离等难题^[8]。农产品生产或加工过程的废弃物或低值原料的高效利用是生物炼制的重要任务, 发酵过程中产生的副产物的分离提取或生物转化是生物炼制亟待解决的另一个问题。为了解决廉价原料难以利用、底物转化率低、副产物多、发酵和分离成本高等产业化难题, 微生物菌群发酵技术有望胜任廉价原料的工业化生产, 受到人们越来越多的关注。

1 微生物菌群在工业生产中的应用

微生物菌群在传统食品, 如奶酪、酸菜、酿酒、大酱等发酵生产中的应用已有上千年的历史了, 在生物能源(如生物气或沼气、生物氢

气、燃料乙醇等)、生物基化学品(如 1,3-丙二醇)、生物材料(如聚羟基脂肪酸酯)等工业生物技术产品生产中也有应用或研发。

1.1 生物气

生物气(沼气)是在厌氧微生物菌群的作用下将有机废弃物转化成甲烷、 H_2 、 CO_2 等气体的混合物, 菌群中有一些菌需要特殊的生长条件, 如一定的氢分压, 所以它们很难通过传统的纯培养技术进行培养。Nishio 和 Nakashimada^[9]利用两步法来处理富含糖的废水和面包垃圾。在这个过程中面包垃圾先在 $55\text{ }^\circ\text{C}$ 下经嗜热厌氧污泥发酵转化成氢气和挥发性脂肪酸(主要是乙酸和丁酸), 然后在第二阶段中产生甲烷气体。与此类似, 另一个日本研究团队建立了中试规模的利用有机垃圾生产氢气和甲烷的两阶段发酵过程^[10]。一个嗜热微生物菌群在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下以垃圾和废纸为基质发酵产生氢气和甲烷。尽管整个过程在不灭菌的条件下进行, 但嗜热过程有效地降低了染菌的机率。

1.2 生物氢气

近年来, 利用混菌厌氧发酵有机废物来生产氢气受到了显著重视。氢气在化学工业中应用广泛, 如合成胺类、醇类、醛类等, 同时氢气也是一种理想的燃料, 其燃烧后只产生水。因此许多能源学家认为氢气将成为代替石化燃料的下一代能源^[11]。目前, 制约微生物厌氧发酵制氢的主要因素是氢气的产量较低。由于生物化学和热力学的限制, 氢气的最大理论摩尔数是 4 mol/mol 葡萄糖, 但实际混菌发酵过程中由于存在消耗氢的微生物如产甲烷菌、同型产乙酸菌等, 使得氢气的产率通常不超过 2 mol/mol 葡萄糖^[12]。现在已有研究通过碱、酸、热等前处理方法来使上述消耗氢的微生物失

活, 其中热处理的效果最好, 但是对同型产乙酸菌不是很有效^[12-13]。由于菌群复杂性, 生成 H₂ 所经历的胞内代谢途径也较复杂。Lee 等^[14]学者通过电子流和还原力 NADH₂ 平衡成功预测了生产 H₂ 的混合菌群结构模型, 并与基于基因文库的实验数据基本匹配。该研究成功地将实验数据与理论研究结合, 预测出在 pH 3.5 条件下混合菌群生产 H₂ 历经的基本代谢途径: 丙酮酸脱羧-铁氧还原蛋白氢化酶途径, 为后续研究提供了坚实的理论支持。除了葡萄糖, Mangayil 等^[15]利用粗甘油为底物, 利用活性污泥中筛选的混菌生产 H₂ 也取得良好效果, H₂ 摩尔转化率可达到 1.1 mol H₂/mol 甘油。马茜岚等^[16]采用硫酸纤维钠/聚二甲基二烯丙基氯化铵微胶囊体系固定混合产氢菌群, 构建成一个能高效产氢的虚拟“细胞工厂”。该方法有效地增加了菌群对温度的适应能力, 提高了底物浓度, 氢气产率保持在 1.73–1.81 mol H₂/mol 葡萄糖, 平均产氢速率提高了 198.6%。

1.3 燃料乙醇

乙醇被视为替代和节约汽油的最佳燃料, 具有廉价、清洁、环保、安全和可再生等优点^[17]。目前, 研究的热点是利用非粮食原料, 如农业秸秆等生产乙醇。木质纤维素水解产物主要是由葡萄糖、甘露糖、半乳糖等六碳糖和木糖、阿拉伯糖等五碳糖组成, 水解液中还含有多种有毒性副产物, 如酚、酸、醛等^[8], 传统的酿酒酵母纯培养技术无法对其高效利用转化。Du 等^[18]从 16 个不同的天然微生物菌群中筛选出了一组可以相对高效地生产乙醇 (7 g/L 的纤维素可以产生 2.06 g/L 的乙醇, 55 °C, 6 d) 的天然菌群, 并对 16 个微生物菌群的结构组成进行了分析, 发现微生物菌群的组成影响纤维素生产乙醇的

性能。杜然等^[19]通过限制性培养条件和连续继代培养, 筛选获得了一组具有高效稳定降解纤维素能力的复合菌群 H。当 pH 6–9 时, 3 d 可以完全降解置于 100 mL PCS 缓冲液培养基中的滤纸, 并产生 1.54 g/L 乙醇。自然界中的微生物菌群能够产生多种纤维素酶, 可以适应不同木质纤维素的降解要求, 例如有研究人员对不同食草哺乳动物的粪便样本进行微生物组学分析, 从中分离出 3 种新的肠道微生物: 厌氧鞭菌属 *Anaeromyces robustus*、新美鞭菌属 *Neocallimastix californiae* 和梨囊鞭菌属 *Piromyces finnis*^[20]。这些微生物细胞分泌的酶具有很强的分解木质纤维素的能力, 尤其是 *P. finnis* 分泌的酶分解植物细胞壁的能力比市售酶高出 3 倍。因此利用微生物菌群生产纤维素乙醇是一种非常有前景的方法。

1.4 1,3-丙二醇

1,3-丙二醇 (1,3-PD) 作为聚对苯二甲酸丙二酯 (PTT) 和聚呋喃二甲酸丙二酯 (PTF) 的单体, 市场需求量逐年增多。传统微生物发酵法是利用纯培养法生产 1,3-PD, 如利用天然菌株以甘油为底物或者利用基因工程大肠杆菌以葡萄糖为底物来发酵生产 1,3-PD^[21-24]。随着生物柴油副产物——粗甘油产量的日益增加, 使得转化粗甘油生产 1,3-PD 越来越受到人们的重视。粗甘油通常含有醇类、盐类、酯或脂类、色素等杂质, 一般需要纯化后才能用于纯培养过程, 无疑增加了生产成本^[25]。近年来人们开始关注利用混菌发酵粗甘油生产 1,3-PD, 一些研究小组已证明该方法是可行的^[12,26-32]。Dietz 等^[27]从污水处理厂的活性污泥中筛选出能够发酵甘油生产 1,3-PD 的混合菌群。1,3-PD 的转化率可达到 0.56–0.76 mol/mol 甘油, 在批次流加

实验中 1,3-PD 的浓度高达 70 g/L, 生产强度达到 2.6 g/(L·h)。研究结果表明在不灭菌条件下与无菌条件下具有相同水平的 1,3-PD 的产量、转化率和生产强度。Daria 等^[32]学者通过利用丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* DSP1 在 1,3-PD 纯培养过程中加入另一株具有代谢副产物有机酸功能的粪产碱杆菌 *Alcaligenes faecalis* JP1 构成共培养体系, 1,3-PD 的质量转化率达到 0.53 g/g, 同时大部分副产物有机酸降解, 显著降低后期分离成本。这种新型混菌培养方式为生物基化学品生产过程中目标产物的分离纯化提供了新的解决思路。

1.5 聚羟基脂肪酸酯

聚羟基脂肪酸酯 (Polyhydroxyalkanoates, PHA) 是微生物合成的一种细胞内聚酯, 是一种天然的高分子生物材料。因 PHA 同时具有良好的生物相容性、生物可降解性和塑料的热加工性, 可以作为生物医用材料和生物可降解包装材料, 已成为近年来生物材料领域最为活跃的研究热点。纯培养生产 PHA 的缺点包括: 利用纯底物和细菌的无菌预培养成本高; 生产过程中需要进行无菌操作。而混菌发酵没有灭菌要求, 可以显著地降低成本。Moita 等^[33]利用混菌发酵粗甘油来生产 PHA。研究表明筛选的混合菌群可以直接利用粗甘油, 而不用对其进行预处理, 降低了生产成本, 增加了经济上的竞争力。

2 微生物菌群发酵与纯种发酵的比较

与传统纯种发酵相比, 微生物菌群发酵的优点主要体现在: 1) 原料的多样性: 更为廉价、复杂的基质, 如木质纤维素、乳清、糖蜜、粗甘油、马铃薯加工废水、玉米浸泡液等, 都可

以成为发酵原料用于生产化学品; 2) 产物的多样化或单一化: 通过协调菌群组成既可以利用不同微生物的代谢途径获得多个目标产物, 又可以使产物范围变窄, 利于下游物质分离纯化, 降低成本; 3) 操作的简易性和安全性: 微生物菌群具有很高的生物多样性, 可以在不灭菌的条件下操作, 抗噬菌体感染能力和生产操作上的安全性得以提升。

以 1,3-丙二醇 (1,3-PD) 的生物法生产为例对微生物菌群发酵和纯种发酵进行比较, 见表 1。目前, 微生物发酵法生产 1,3-PD 的研究还主要集中在菌株的筛选^[34-36]、工程菌的构建^[24]以及发酵条件的优化^[37-38]等方面, 这些都是以微生物纯培养技术为基础。微生物纯种发酵过程需要进行严格的无菌操作, 使用的原料具有一定的纯度, 这都增加了生物法生产 1,3-PD 的成本。此外, 在利用微生物纯种发酵生产 1,3-PD 的过程中, 由于需要平衡反应过程中的还原力, 常伴随乙酸、乳酸、琥珀酸等有机酸和其他副产物的产生。有机酸的积累常常抑制细胞生长, 并且降低基质 (甘油) 转化为 1,3-PD 的收率, 副产物的存在也为下游产品的分离纯化带来了困难。为了克服纯种发酵的缺点, 进一步降低生物法生产 1,3-PD 的成本, 微生物菌群发酵近年来受到了越来越多的关注。

在微生物菌群发酵过程中, 发酵甘油产生的有机酸可以被同一个反应器或后续阶段中的产甲烷菌转化为甲烷排放出去^[43]。Temudo 等^[28]从酒厂废水和土豆淀粉加工厂的污泥中筛选出了可以利用甘油生产 1,3-PD 的混合菌群。该菌群的甘油利用浓度为 4-25 g/L, 主产物为乙醇, 1,3-PD 的转化率仅为 0.16 mol/mol。虽然该研究

的产业化价值不大,但是为工业生产 1,3-PD 提供了一种新的思路,也是对纯种发酵生产 1,3-PD 的一种新的突破和挑战。

近年来,我们课题组从大连海岸海泥中筛选出了一组兼性微生物菌群 (GenBank Accession No. SRP066989)。该菌群可以将甘油转化为 1,3-PD,并且具有良好的底物耐受性,间歇发酵甘油的初始浓度可达 200 g/L,1,3-PD 产量达到 81.40 g/L,摩尔转化率为 0.63 mol/mol;且发酵产物中副产物较少,尤其是不含 2,3-丁二醇,有利于主产物 1,3-PD 的分离^[42]。我们课题组还从厌氧活性污泥中筛选出一组天然微生物菌群 C2-2M,可以高效转化粗甘油为 1,3-PD。经 16S rRNA 基因检测,C2-2M 以丁酸梭菌为绝对优势菌 (97.34%),还含双酶梭菌 (0.81%)、谷糠乳杆菌 (0.01%) 及未鉴定梭菌属

(1.82%)。批式流加发酵结果表明,连续补料能生成 85.21 g/L 1,3-PD,摩尔转化率达到 0.73 mol/mol,生产强度为 1.73 g/(L·h),副产物为 8.52 g/L 乙酸及 16.11 g/L 丁酸。微生物菌群发酵克服了单一菌株底物耐受性差、副产物多的缺点,提高了生产效率,为微生物发酵法生产 1,3-丙二醇的工业化提供了简单经济的发酵工艺。

3 微生物菌群中细胞间的相互作用

在同一生态环境中微生物之间不仅有营养上的协同与竞争,还有代谢产物之间的相互影响。在微生物菌群中,同种微生物细胞之间可以通过群体感应效应 (Quorum sensing, QS) 来进行信号传递,不同种微生物细胞间则可通过互利共生、协同作用、竞争作用等相互作用影响混菌体系中代谢物质的类型和目标产物的产量。

表 1 微生物菌群发酵与纯种发酵生产 1,3-丙二醇的比较

Table 1 Comparison of 1,3-propanediol production by microbial consortia and pure cultures

Inoculum	Fermentation type	1,3-PD (g/L)	Yield (mol/mol)	References
Pure culture				
<i>Klebsiella pneumonia</i> DSM 4799	Fed-batch	80.20	0.54	Jun et al. ^[39]
<i>Klebsiella oxytoca</i> M5al	Fed-batch	83.56	0.62	Yang et al. ^[40]
<i>Citrobacter freundii</i> FMCC-B 294	Fed-batch	68.10	0.48	Metsoviti et al. ^[22]
<i>Clostridium butyricum</i> AKR102a	Fed-batch	93.70	0.63	Wilkens et al. ^[41]
<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	Fed-batch	65.30	0.81	Jolly et al. ^[23]
Microbial consortia				
Organic soil	Batch	3.76	0.65	Liu et al. ^[26]
Wheat soil	Batch	1.71	0.69	Selembo et al. ^[12]
Sludge	Batch	15.21	0.51–0.76	Dietz and Zeng ^[27]
	Fed-batch	70.00	0.52–0.56	
Granular sludge	Continuous	10.74	0.52	Gallardo et al. ^[31]
Marine sludge	Batch	81.40	0.63	Xiu et al. ^[42]
	Fed-batch	72.15	0.70	
Activated sludge	Fed-batch	85.21	0.73	Our work

3.1 群体感应效应

群体感应效应是一种依赖细胞密度大小进行信息交流,调节微生物细胞间相互作用的基因调控机制。微生物细胞能够自发产生和释放一些特定的信号分子并感知其浓度变化,从而调节微生物的群体行为。将高密度细胞培养时收集的无菌上清液加入到低细胞密度的培养液中,会诱发效应基因的表达^[44]。革兰氏阴性菌普遍使用酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactones, AHLs)作为群感效应信号分子,而革兰氏阳性菌则使用短肽^[45]。在所有的群感效应系统中信号分子都是在细胞内产生,再转运到胞外环境中。小分子的高丝氨酸内酯会通过自由扩散的方式跨过细菌的细胞膜,而肽类和大分子量的高丝氨酸内酯则需要通过泵进行转运。随着细胞密度的增加,信号分子的浓度不断积累并对周围细胞产生影响。当信号分子的浓度达到一定阈值时,会产生两个结果:一是激活信号感应和效应调节子用于信号分子的传导,进而触发多个基因的表达;二是激活自动诱导正反馈来扩大信号分子的产生。张志伟和吴胜^[46]通过在大肠杆菌群落中建立信号分子高丝氨酸内酯(AHL)介导的细胞-细胞交流机制,在细胞生长过程中产生的AHL积累到一定浓度启动靶基因表达,通过在细胞生长的不同阶段启动AHL降解酶的表达,控制环境中信号分子AHL的浓度水平,从而控制靶基因的转录效率,最终实现对靶蛋白表达水平的精确控制。肽类和一些高丝氨酸内酯类信号分子通过膜受体引发磷酸化级联反应,从而控制靶基因的表达^[47]。简而言之,群体感应效应的作用就是保证了细胞在表达特定功能之前达到一定的密度。

3.2 互利共生和协同作用

互利共生是指两种微生物在一起,彼此有利,两者分开以后双方的生活都要受到很大影响,甚至死亡。在混菌发酵工艺中,有很多互利共生关系的例子。如厌氧发酵产甲烷过程中,细菌和古细菌就是互利共生的关系^[48]。在乳制品产业中,利用嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* 和德氏乳杆菌保加利亚亚种 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 来生产酸奶。与纯培养相比,两者的合作关系对产品的品质和稳定性具有重要的影响^[49]。

协同作用是微生物互利共生关系的一种表现形式,在利用微生物菌群进行有机物降解过程中尤为重要。Du等^[18]从自然界中筛选出可以降解纤维素生产乙醇的微生物菌群,通过对菌群结构的研究发现了一株假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas taiwanensis*。尽管该菌没有产生乙醇的能力,但是具有分泌葡萄糖苷酶的能力,其在纤维素利用上具有很重要的作用。该菌的存在有利于纤维素的降解及乙醇的产量提高,并对菌群的结构产生影响。Kato等^[50]从堆肥中富集了可以降解纤维素的微生物菌群并从中分离了两种菌株:一种是在厌氧条件下水解纤维素的梭状芽孢杆菌 *Clostridium straminisolvens* CSK1,另一种是不具有水解纤维素能力的好氧菌。在纤维素降解过程中由于好氧菌创造了厌氧环境并消耗代谢产物,因此好氧菌的存在对纤维素的降解起着至关重要的作用。

3.3 竞争作用和拮抗作用

竞争作用是微生物在菌群中竞争有限的自然资源和空间,被认为是促进抗菌物质生物合成的选择性压力。在自然环境中,某种微生物通常利用产生抗菌物质来抑制不同竞争者的生

长来达到生存的目的。实际上,抗菌物质一直是个备受争议的话题,有些研究者认为这些物质的真正作用是作为一种中间信号分子^[51]。另有研究表明在混菌发酵生产乳制品中微生物的生长速率和菌群动力学主要是由氨基酸的利用能力决定的^[52]。

拮抗作用是指一种微生物对其他微生物产生有害影响,但对自身没有影响。这种情况常常发生在食品发酵过程中,微生物菌群会有效抑制病原微生物的生长^[53]。另外,产乳酸的细菌在食物发酵过程中会产生细菌素等抗菌物质,在混合菌群动力学中具有重要的作用。

关于协同和竞争关系在微生物菌群稳定性方面起何作用一直是个悬而未决的问题,最近有研究人员用数学模型证明不同种类细胞之间的协作关系会扰乱菌群生态系统的稳定,而益生菌间的竞争关系反而会通过负反馈抵消菌群多样性造成的不稳定,从而使肠道生态系统保持稳定^[54],这一论断与先前人们的推测或想象恰好相反,需要实验验证。

4 微生物菌群的设计与应用展望

整合生物工艺 (Consolidated bioprocessing, CBP) 在生物能源和化学品的研发中形成并不断完善,即在一步生物过程中整合所有的生物转化反应^[55]。传统的 CBP 策略是利用基因工程菌,将所需要的功能集中在一个菌体上。然而,许多实验证明在一个微生物中设计并优化多种功能挑战性很大。尽管经历了几十年的研究,真正应用于商业化的例子却很少。同样近几年新兴的合成生物学也面临着类似的巨大挑战。

与 CBP 利用基因工程菌的策略相比,在绝大多数的自然环境中微生物以菌群的形式存

在,每一种微生物都行使着特定的功能,相互合作、共同生活。自然界中的微生物菌群具有许多吸引人的特点,如菌群稳定性、功能鲁棒性、底物广谱性、可以进行复杂工作等。正是受到了自然菌群特点的启发,人们对微生物菌群的设计和应用产生了浓厚的兴趣,而设计微生物菌群也逐渐成为合成生物学的前沿问题。

Brenner 等^[56]对设计不同微生物间的交流方式来构建人工微生物菌群的相关研究进行了综述。这些人工微生物菌群可以用来研究在最小的菌群中种间的相互作用关系(如共生、竞争和寄生)或在特定条件下模拟微生物间的相互作用关系。另外,还可以通过数学模型来描述这些成分确定的人工菌群,并用于更为复杂系统模型的开发和验证。在工业生物技术的应用上,从自然界中筛选合适的微生物菌株并把它们组合在一起行使新的功能将更具吸引力、也更具潜力。

随着人们对微生态关系的积极探索和了解,微生物菌群的优势正逐渐被人们所重视,并在工业、农业、食品等诸多领域得到拓展和应用,但是仍然存在一些亟待解决的问题,如新的微生物菌群培养技术、菌种的定量和定性分析工具、菌种间相互作用的确定、细胞交流和信号分子的研究方法、数学模型的构建等。尤其是微生物菌群的功能基因组研究和系统生物学都处于刚刚起步的阶段,许多技术和概念上的问题需要解决。在此基础上,包含确定的或者几个菌种的小型微生物菌群具有很好的应用前景,它们可以作为方法和技术发展的模式系统,并有利于用合成生物学的方法设计微生物菌群。综上所述,对微生物菌群进行深入研究,不仅具有深远的理论意义,更具有广泛的应用价值,能更多地造福人类,极具发展潜力。

REFERENCES

- [1] Alivisatos AP, Blaser MJ, Brodie EL, et al. A unified initiative to harness Earth's microbiomes. *Science*, 2015, 350(6260): 507–508.
- [2] Dubilier N, McFall-Ngai M, Zhao LP. Microbiology: great a global microbiome effort. *Nature*, 2015, 526(7575): 631–634.
- [3] Sabra W, Dietz D, Tjahjajari D, et al. Biosystems analysis and engineering of microbial consortia for industrial biotechnology. *Eng Life Sci*, 2010, 10(5): 407–421.
- [4] Xiu ZL, Zeng AP. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 78(6): 917–926.
- [5] Zeng AP, Sabra W. Microbial production of diols as platform chemicals: recent progresses. *Curr Opin Biotechnol*, 2011, 22(6): 749–757.
- [6] Yang WC, Han LT, Wang ZY, et al. Two-helper-strain co-culture system: a novel method for enhancement of 2-keto-L-gulonic acid production. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(11): 1853–1857.
- [7] 国务院关于印发《中国制造 2025》的通知. 中华人民共和国国务院公报, 2015, (16): 10–26.
- [8] Eiteman MA, Lee SA, Altman E. A co-fermentation strategy to consume sugar mixtures effectively. *J Biol Eng*, 2008, 2(1): 3.
- [9] Nishio N, Nakashimada Y. Recent development of anaerobic digestion processes for energy recovery from wastes. *J Biosci Bioeng*, 2007, 103(2): 105–112.
- [10] Ueno Y, Fukui H, Goto M. Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(4): 1413–1419.
- [11] Li CL, Fang HHP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Environ Sci Technol*, 2007, 37(1): 1–39.
- [12] Selembo PA, Perez JM, Lloyd WA, et al. Enhanced hydrogen and 1,3-propanediol production from glycerol by fermentation using mixed cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(6): 1098–1106.
- [13] Oh SE, Van Ginkel S, Logan BE. The relative effectiveness of pH control and heat treatment for enhancing biohydrogen gas production. *Environ Sci Technol*, 2003, 37(22): 5186–5190.
- [14] Lee HS, Krajmalinik-Brown R, Zhang H, et al. An electron-flow model can predict complex redox reactions in mixed-culture fermentative bioH₂: microbial ecology evidence. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(4): 687–697.
- [15] Mangayil R, Karp M, Santala V. Bioconversion of crude glycerol from biodiesel production to hydrogen. *Int J Hydrogen Energy*, 2012, 37(17): 12198–12204.
- [16] Ma QL, Lin DQ, Yao SJ. Immobilization of mixed bacteria by microcapsulation for hydrogen production—a trial of pseudo “Cell Factory”. *Chin J Biotech*, 2010, 26(10): 1444–1450 (in Chinese). 马茜岚, 林东强, 姚善泾. 微胶囊固定化混合菌群发酵产氢——构建一种虚拟“细胞工厂”的尝试. *生物工程学报*, 2010, 26(10): 1444–1450.
- [17] Rossi DM, da Costa JB, de Souza EA, et al. Bioconversion of residual glycerol from biodiesel synthesis into 1,3-propanediol and ethanol by isolated bacteria from environmental consortia. *Renew Energy*, 2012, 39(1): 223–227.
- [18] Du R, Yan JB, Li SZ, et al. Cellulosic ethanol production by natural bacterial consortia is enhanced by *Pseudoxanthomonas taiwanensis*. *Biotechnol Biofuels*, 2015, 8(1): 10.
- [19] Du R, Li SZ, Zhang XQ, et al. Cellulose hydrolysis and ethanol production by a facultative anaerobe bacteria consortium H and its identification. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 960–965 (in Chinese). 杜然, 李十中, 章晓庆, 等. 兼性厌氧复合菌群 H 纤维素降解和产乙醇能力及生态组成初探. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 960–965.
- [20] Solomon KV, Haitjema CH, Henske JK, et al. Early-branching gut fungi possess a large, comprehensive array of biomass-degrading

- enzymes. *Science*, 2016, 351(6278): 1192–1195.
- [21] Chatzifragkou A, Aggelis G, Komaitis M, et al. Impact of anaerobiosis strategy and bioreactor geometry on the biochemical response of *Clostridium butyricum* VPI 1718 during 1,3-propanediol fermentation. *Bioresour Technol*, 2011, 102(22): 10625–10632.
- [22] Metsoviti M, Zeng AP, Koutinas AA, et al. Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. *J Biotechnol*, 2013, 163(4): 408–418.
- [23] Jolly J, Hitzmann B, Ramalingam S, et al. Biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol with *Lactobacillus reuteri*: effect of operating variables. *J Biosci Bioeng*, 2014, 118(2): 188–194.
- [24] Nakamura CE, Whited GM. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Curr Opin Biotechnol*, 2003, 14(5): 454–459.
- [25] Johnson DT, Taconi KA. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environ Prog*, 2007, 26(4): 338–348.
- [26] Liu BC, Christiansen K, Parnas R, et al. Optimizing the production of hydrogen and 1,3-propanediol in anaerobic fermentation of biodiesel glycerol. *Int J Hydrogen Energy*, 2013, 38(8): 3196–3205.
- [27] Dietz D, Zeng AP. Efficient production of 1,3-propanediol from fermentation of crude glycerol with mixed cultures in a simple medium. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2014, 37(2): 225–233.
- [28] Temudo MF, Poldermans R, Kleerebezem R, et al. Glycerol fermentation by (open) mixed cultures: a chemostat study. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(6): 1088–1098.
- [29] Kanjilal B, Noshadi I, Bautista EJ, et al. Batch, design optimization, and DNA sequencing study for continuous 1,3-propanediol production from waste glycerol by a soil-based inoculum. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(5): 2105–2117.
- [30] Temudo MF, Muyzer G, Kleerebezem R, et al. Diversity of microbial communities in open mixed culture fermentations: impact of the pH and carbon source. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 80(6): 1121–1130.
- [31] Gallardo R, Faria C, Rodrigues LR, et al. Anaerobic granular sludge as a biocatalyst for 1,3-propanediol production from glycerol in continuous bioreactors. *Bioresour Technol*, 2014, 155(4): 28–33.
- [32] Szymanowska-Powalowska D, Piatkowska J, Leja K. Microbial purification of postfermentation medium after 1,3-PD production from raw glycerol. *Biomed Res Int*, 2013, 2013(1): 949107.
- [33] Moita R, Freches A, Lemos PC. Crude glycerol as feedstock for polyhydroxyalkanoates production by mixed microbial cultures. *Water Res*, 2014, 58(3): 9–20.
- [34] Metsoviti M, Paramithiotis S, Drosinos EH, et al. Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Eng Life Sci*, 2012, 12(1): 57–68.
- [35] Metsoviti M, Paraskevaïdi K, Koutinas A, et al. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media. *Process Biochem*, 2012, 47(12): 1872–1882.
- [36] Raghunandan K, Mchunu S, Kumar A, et al. Biodegradation of glycerol using bacterial isolates from soil under aerobic conditions. *J Environ Sci Health*, 2014, 49(1): 85–92.
- [37] Sun LH, Song ZY, Sun YQ, et al. Dynamic behavior of glycerol–glucose co-fermentation for 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* DSM 2026 under micro-aerobic conditions. *World J Microbiol Biotechnol*, 2010, 26(8): 1401–1407.
- [38] Xiu ZL, Chen X, Sun YQ, et al. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol-glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Biochem Eng J*, 2007, 33(1): 42–52.
- [39] Jun SA, Moon C, Kang CH, et al. Microbial

- fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, 161(1–8): 491–501.
- [40] Yang G, Tian JS, Li JL. Fermentation of 1, 3-propanediol by a lactate deficient mutant of *Klebsiella oxytoca* under microaerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 73(5): 1017–1024.
- [41] Wilkens E, Ringel AK, Hortig D, et al. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93(3): 1057–1063.
- [42] Xiu ZL, Liu HF, Chen Y, et al. A method of fermentation of 1,3-propanediol from glycerol by mixed culture: CN, CN104774879A. 2015-07-15 (in Chinese).
修志龙, 刘会芳, 陈洋, 等. 一种混菌发酵甘油生产 1, 3-丙二醇的方法: 中国, CN104774879A. 2015-07-15.
- [43] Bizukojc M, Dietz D, Sun JB, et al. Metabolic modelling of syntrophic-like growth of a 1, 3-propanediol producer, *Clostridium butyricum*, and a methanogenic archaeon, *Methanosarcinamazei*, under anaerobic conditions. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2010, 33(4): 507–523.
- [44] Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. *Trends Microbiol*, 2009, 17(5): 189–195.
- [45] Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(16): 8789–8793.
- [46] Zhang ZW, Wu S. Construct a molecular switch based on bacterial quorum sensing. *Chin J Biotech*, 2013, 29(9): 1301–1312 (in Chinese).
张志伟, 吴胜. 基于细菌群感效应人工构建分子开关. *生物工程学报*, 2013, 29(9): 1301–1312.
- [47] Williams P. Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world. *Microbiology*, 2007, 153(12): 3923–3938.
- [48] Stolyar S, Van Dien S, Hillesland KL, et al. Metabolic modeling of a mutualistic microbial community. *Mol Syst Biol*, 2007, 3(1): 92.
- [49] Herve-Jimenez L, Guillouard I, Guedon E, et al. Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(7): 2062–2073.
- [50] Kato S, Haruta S, Cui ZJ, et al. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*, 2004, 51(1): 133–142.
- [51] Hibbing M, Fuqua C, Parsek MR, et al. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(1): 15–25.
- [52] Sieuwerts S, de Bok FAM, Hugenholtz J, et al. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(16): 4997–5007.
- [53] Teusink B, Wiersma A, Molenaar D, et al. Analysis of growth of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on a complex medium using a genome-scale metabolic model. *J Biol Chem*, 2006, 281(52): 40041–40048.
- [54] Coyte KZ, Schluter J, Foster KR. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability. *Science*, 2015, 350(6261): 663–666.
- [55] Olson DG, McBride JE, Shaw AJ, et al. Recent progress in consolidated bioprocessing. *Curr Opin Biotechnol*, 2012, 23(3): 396–405.
- [56] Brenner K, You LC, Arnold FH. Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends Biotechnol*, 2008, 26(9): 483–489.

(本文责编 陈宏宇)