

# 微生物混合培养及其应用\*

冯 树 周樱桥 张忠泽

(中国科学院沈阳应用生态研究所 沈阳 110015)

**摘要:** 简述了混合培养微生物资源及其应用的研究进展。在长期的实验和生产实践中,人们发现很多生物过程是微生物纯培养不能完成或只能微弱进行的,必须依靠两种或两种以上的微生物共同培养完成。对于很多工业污染物、生物农药、纤维素、几丁质的生物降解,微生物混合培养是必要的;微生物混合培养可用于维生素 C、维生素 B<sub>12</sub>、组氨酸、缬氨酸、L-苹果酸等发酵生产,还可用于药物的甾体转化、沼气发酵、湿法冶金等。混合培养的微生物资源应受到人们更多的重视。

**关键词:** 微生物, 混合培养

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0092-04

微生物是一类现实和潜在用途都很大的生物资源,广泛应用于农业、工业、医药、食品及环保等各个领域。人类对微生物的利用经历过天然混合培养到纯种培养两个阶段,纯培养技术使得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目的菌株进行研究,从而丰富了对微生物形态结构,生理和遗传特性的认识。但是,在长期的实验和生产实践中,人们不断地发现很多重要生化过程是单株微生物不能完成或只能微弱地进行的,必须依靠两种或多种微生物共同培养完成。微生物混

\* 中国科学院“百人计划”项目

收稿日期: 2000-01-13, 修回日期: 2000-04-15

合培养 (Mixed culture) 或混合发酵 (Mixed fermentation) 已越来越被人们所重视。科学家们对混合培养微生物资源进行了多方面的研究, 不仅具有深远的理论意义, 更具有重大的应用价值。

## 1 微生物混合培养生产代谢产物

微生物混合培养在有益代谢产物发酵生产的研究和应用中已取得了很大成绩。维生素 C 二步发酵是一典型实例。该法是由中国科学院微生物研究所和北京制药厂合作, 于七十年代初发明的。其第二步发酵由氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacterium oxydans*, 俗称小菌) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*, 俗称大菌) 等伴生菌混合发酵完成, 其中小菌为合成维生素 C 前体 2-酮基-L-古龙酸 (2KGA) 的菌株, 但很难单独培养, 且单独培养产酸能力很低; 大菌单独培养容易, 但不产生 2KGA, 与小菌混合培养时不仅可促进小菌生长, 而且能大大增强小菌的产酸能力<sup>[1]</sup>。能与小菌混合培养合成 2KGA 的伴生大菌有很多, 除巨大芽孢杆菌外, 还有蜡样芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌地衣芽孢杆菌, 苏云金芽孢杆菌等, 某些酵母亦有该作用。有关研究表明, 大菌为小菌提供某种生长因子促进其生长, 并且提供某些生物活性物质协助小菌合成 2KGA, 二菌混合培养呈互生关系<sup>[2]</sup>。通过调节二菌比例、pH、温度及溶氧量等因素, 可使混合菌达较适的生态状态, 发挥较高的生产效能。二者间的关系和作用机制正在进一步深入研究中。

还有多种维生素、氨基酸、有机酸等可利用混合菌培养生产。维生素 B<sub>12</sub> 可利用谢氏丙酸杆菌 (*Propionibacterium shermanii*) 和马铃薯芽孢杆菌 (*Bacillus mesentericus*) 或大肠杆菌 (*E. coli*) 的混合培养生成; 缬氨酸可利用粘质沙雷氏杆菌 (*Serratia marcescens*) 和 *E. coli* 的混合培养生成; 组氨酸可利用谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 和 *E. coli* 混合培养生成; L-苹果酸可利用少根根霉 NRRL1526 和拟青霉 AHU9417 混合培养产生。

乳酸菌素 (Nisin) 是一种由乳酸菌属菌株产生的抗生素类, 可抑制多种革蓝氏阳性菌的生长, 已被 50 余个国家用作食品保鲜剂<sup>[3]</sup>。1999 年 Shimizu 等<sup>[4]</sup>报道, 以 *Lactococcus lactis* 和 *Kluyveromyces marxianus* 混合培养可有效地生成乳酸菌素, 这主要是由于 *Kluyveromyces marxianus* 可通过消耗前者产生的乳酸控制发酵体系 pH, 从而使乳酸菌素的产率维持高水平。

多种甾体类药物的转化也是利用混合菌培养实现的。诺卡氏菌 (*Nocardia* sp.) 和节杆菌 (*Arthrobacter simplex*) 混合培养用于 5 $\alpha$ - $\Delta^9$ <sup>[11]</sup>-16 $\beta$  甲基-3 $\beta$ , 17 $\alpha$ , 21-羟基-孕甾烯-3 $\beta$ , 21-双醋酸酯-20 酮和 5 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -甲基-17 $\beta$  羟基-雄甾-3 酮的 1, 4 位上的脱氢转化<sup>[5]</sup>。简单节杆菌 (*Arthrobacter*) 和玫瑰产色杆菌 (*Streptomyces roseochromogene*) 的混合培养也可用于甾体转化。

## 2 微生物混合培养进行生物降解

### 2.1 工业污染物的降解

工业污水中的有害物质, 利用微生物混合培养法降解取得了显著的效果。

聚乙烯醇 (PVA) 的生降解需要混合菌完成, 一般是 *Pseudomonas* sp. 和 *Aleali-genes* sp. 或两株不同的 *Pseudomonas* sp., 它们之间靠一种共生关系来完成 PVA 的降

解<sup>[6]</sup>。Chapalamadugu 等<sup>[7]</sup>从自然界中分离得到两株假单胞菌 *Pseudomonas* spp. 50552 和 *Pseudomonas* spp. 50581, 其中 50581 可将一种 N-甲基氨基甲酸酯类杀虫剂 Carboryl 降解成  $\alpha$ -萘酚, 50552 菌株可将  $\alpha$ -萘酚转化为  $\text{CO}_2$ , 二菌株混合培养协同作用可彻底降解该污染物。Beaubien 等<sup>[8]</sup>报道 *Xanthomonas* sp. 和 *Plesiomonas* sp. 混合培养可大大提高对直链烷基苯磺酸钠的降解效率。

**2.2 纤维素降解** Glancer<sup>[9]</sup>报道, 选用 *P. stipitis* 和 *T. penicillatum* 混合培养可将玉米秸秆的稀酸水解物转化成菌体蛋白、降解木素并降低 COD。选用 *T. fermentaus* 和 *P. tannophilus* 混合培养亦可产生类似效应。在这两个混合菌发酵体系中, *P. stipitis* 和 *P. tannophilus* 分别将木糖发酵成乙醇, *T. penicillatum* 和 *T. fermentaus* 以乙醇为生长碳源, 混合菌中二菌间建立了互生关系。陈庆森等<sup>[10]</sup>最近报道选用高纤维素酶产生菌 *Trichoderma ressi* TB9701 与饲料酵母混合培养, 可有效地利用秸秆类纤维素转化单细胞蛋白。

混合菌降解纤维素除各菌间互生作用外, 还有的存在共生关系。Murray<sup>[11]</sup>对 *Bacteroides cellulosolvens* 和 *Clostridium saccharolyticum* 混合培养分解纤维素进行研究发现, 前者分解纤维素进行研究发现, 前者分解纤维素为后者提供生长所需碳源, 后者又可利用前者产生的有毒中间产物, 消除对前者分解纤维素的反馈抑制。Mori 认为, *Clostridium Thermohydrosulfurium* YM3 和 *C. thermocellum* YM4 混合培养降解纤维素效果明显高于单菌培养, 主要原因是两菌互相提供了对方所需的生长因子<sup>[12]</sup>。

**2.3 氨基多糖生物降解** 氨基多糖主要以几丁质和脱乙酰几丁质的形式存在于节肢动物外骨骼和真菌细胞壁中, 在自然界中的含量仅次于纤维素。利用微生物对氨基多糖进行降解和转化, 有可能生成具有生物功能的活性糖蛋白。王士奎<sup>[13]</sup>以 *Beauveria Bassiana* LB<sub>30</sub> 为氨基多糖降解菌, 以 *Candida* sp. LB<sub>50</sub> 作为氨基糖转化菌, 建立了氨基多糖混合菌生物降解和转化模型。与纯培养比较, 粘度下降比率提高 23.0%, 可溶性糖含量增加 167.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 两菌呈互生关系。

### 3 混合菌在沼气发酵中的作用

沼气发酵是由多种产甲烷菌和非产甲烷菌混合共同发酵完成的。沼气发酵的第一阶段由厌氧和兼性厌氧的水解性细菌或发酵性细菌将纤维素、淀粉等水解成单糖, 并进一步形成丙酮; 将蛋白质水解成氨基酸, 并进一步形成有机酸的氨; 将脂类水解为甘油和脂肪酸, 进一步形成丙酸、乙酸、丁酸、乙醇等。第二阶段由产氢产乙酸细菌群利用第一阶段产生的有机酸, 氧化分解成乙酸和分子氢; 第三阶段由严格厌氧的产甲烷菌群 (*methangens*) 完成。在这个庞杂的混合发酵体系中, 非产甲烷菌为产甲烷菌提供生长和产甲烷所需的基质, 创造适宜的氧化还原条件, 并清除有毒物质; 产甲烷菌为非产甲烷菌的生化反应解除反馈抑制, 创造热力学上的有利条件; 并且两类菌共同维持环境中适宜的 pH 值。产甲烷菌和非产甲烷菌间通过互营联合实现甲烷的高效形成<sup>[14,15]</sup>。

微生物混合培养除以上几个方面的作用外, 在石油采收、湿法冶金、食品发酵和银耳栽培等领域同样显示其优势。混合培养微生物资源具有非常广阔的应用前景。

## 4 问题和展望

虽然微生物混合培养在很多领域中的作用已得到充分肯定,部分成果已成功应用于实践,但对大多混合菌体系中菌间相互关系和作用机制的研究尚不够深入。因此,目前对于具有协同作用关系的菌株筛选和组合还是一个随机过程的,缺乏有效的理论指导,而且对于已经应用的混合培养体系也不能有效地协调菌间的关系,使其达最佳生态水平,发挥最大效应。这严重地阻碍了混合菌培养的发展和运用。因此,如果从生理、代谢和遗传角度对混合菌间关系和协同作用机制进行深入研究,对混合菌培养的理论和应用都将有巨大的突破。

随着混合菌培养在各方面应用研究的深入,人们不再满足于传统的反应模式,已开始引入一些新兴的生物工程技术,使该领域的研究更具活力。采用固定化细胞技术固定混合菌可使反应系统多次使用,降低成本,增加效率,在实际应用中很有意义。利用细胞融合技术和基因工程技术由具有互生或共生关系的微生物构建工程菌,可使工程菌既具有混合培养的功能,又拥有纯培养菌株营养要求单一、生理代谢稳定、易于调控等优点,也是极有前景的研究方向。

## 参考文献

- [1] 林红雨, 陈策实, 尹光琳. 微生物学通报, 1999, 26 (1): 3~6.
- [2] 冯 树, 张 舟, 张成刚, 等. 应用生态学报, 2000, 11 (1): 119~122.
- [3] Taniguchi M, Hoshino K, Urasaki H, *et al.* J Ferment Bioeng, 1994, 77: 704~708.
- [4] Shimizu H, Mizuguchi T, Tanaka E, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (7): 3134~3141.
- [5] 张丽青, 张恩慈, 吴照华. 药学报, 1981, 16 (5): 356~360.
- [6] Shimao M, Saimoto H, Kato N, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1983, 46 (3): 605~610.
- [7] Chapalamadugu S. Appl Environ Microbiol, 1991, 57 (3): 744~750.
- [8] Beaubien A, Keita L, Jolicoeur C. Appl Microbiol, 1987, 53 (10): 2567~2578.
- [9] Glancer M. Process Biochemistry, 1989, 24 (3): 109~113.
- [10] 陈庆森, 刘剑虹, 潘建阳, 等. 生物技术, 1999, 9 (4): 15~20.
- [11] Murray W D. Appl Environ Microbiol. 1986, 51 (4): 710~714.
- [12] Mori Y. Appl Environ Microbiol. 1990, 56 (1): 37~42.
- [13] 王士奎. 微生物学通报. 1997, 24 (2): 88~1.
- [14] Stams A J M. Antonie van Leeuwenhoek, 1994, 66: 271~294.
- [15] Dong X, Stams A J M. Anaerobe, 1995, 1: 35~39.