



读书报告

汇报人：赵卓丽

日期：2017-8-19



IF=5.651

Bioresource Technology 227 (2017) 247–255



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech



Design and composition of synthetic fungal-bacterial microbial consortia that improve lignocellulolytic enzyme activity



Jiajun Hu^a, Yiyun Xue^a, Hongcheng Guo^a, Min-tian Gao^{a,*}, Jixiang Li^b, Shiping Zhang^b, Yiu Fai Tsang^c

^a Shanghai Key Laboratory of Bio-Energy Crops, School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China

^b Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 20110, China

^c Department of Science and Environmental Studies, The Education University of Hong Kong, Hong Kong, China

真菌-细菌联合培养的设计和组成提高了木质纤维素分解酶活性



Contents

01 Abstract

02 Introduction

03 Materials and methods

04 Results and discussion

05 Conclusions





01 Abstract





微生物相互作用—代谢（改善或降低）



微生物共同培养—改善木质纤维素分解酶活性

设计一系列增加多样性和复杂性的协同微生物联合体

Abstract

Trichoderma reesei

里氏木霉



Penicillium decumbens

斜卧青霉



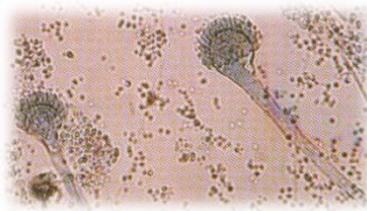
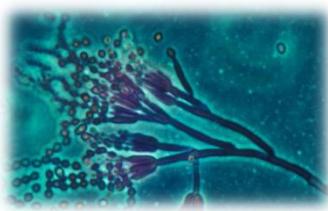
Aspergillus tubingensis

塔宾曲霉



Aspergillus niger

黑曲霉



Abstract |



微生物群落结构的分析表明，联合体中对于木质纤维素分解酶活性的贡献：细菌 > 真菌。

联合体中的1个真菌和16个细菌属可能与里氏木霉相互作用，并且是设计的协同微生物联合体的潜在成员。

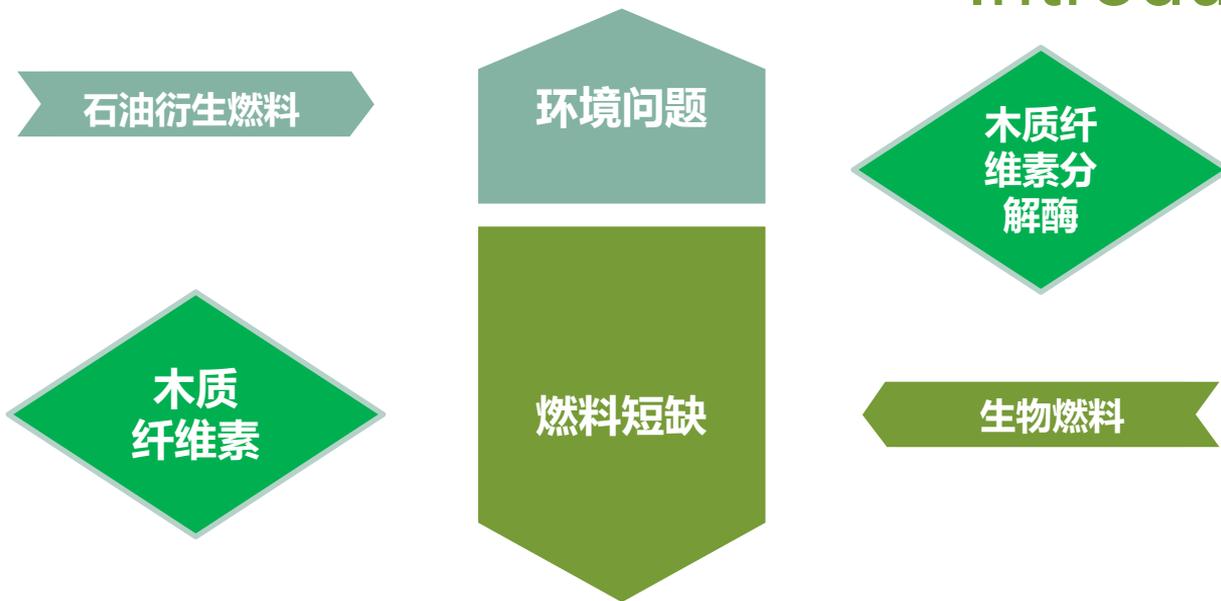
这种设计的微生物菌群对有效和经济地降解木质纤维素有潜在应用价值。



02 Introduction



Introduction |



地球上最丰富的可再生碳源；潜在的生物燃料原料。

Introduction |



真菌：商用纤维素酶



高产纤维素酶



限制因素：低 β -葡糖苷酶活性

Introduction



β-葡萄糖苷酶

外源添加

由其他菌株产生的葡萄糖苷酶的外部添加。

遗传转化

具有同源和异源β-葡萄糖苷酶基因的里氏木霉的遗传转化。

共同培养

高β-葡萄糖苷酶活性菌株与*T.reesei*共同培养。

Introduction

将筛选的非光合微生物群落与多个菌株相结合形成具有CO₂固定能力的合成微生物菌群。合成的自养异养联合体的CO₂固定效率高于其微生物成员理论CO₂固定效率的总和 (Hu *et al.*, 2016)。

通过测定木质纤维素分解酶活性来鉴定筛选的微生物群落内的一个或多个分离的菌株引起的定向微生物相互作用。基于高通量测序技术鉴定来筛选在微生物相互作用中起关键作用的菌株。

与 *T. reesei* 单一培养相比，与 *Aspergillus saccharolyticus* 的共培养物增加了 30% 微晶纤维素酶活性 (Kolasa *et al.*, 2014)。

有效共培养的前提是发现成员之间具有正相互作用的微生物组合，需要大量实验来检验各种组合。这限制了共培养菌株的数量。



03 Materials and methods



Materials and methods



真菌菌株和纤维素分解微生物群落



纤维素酶生产



酶活性测定



DNA提取

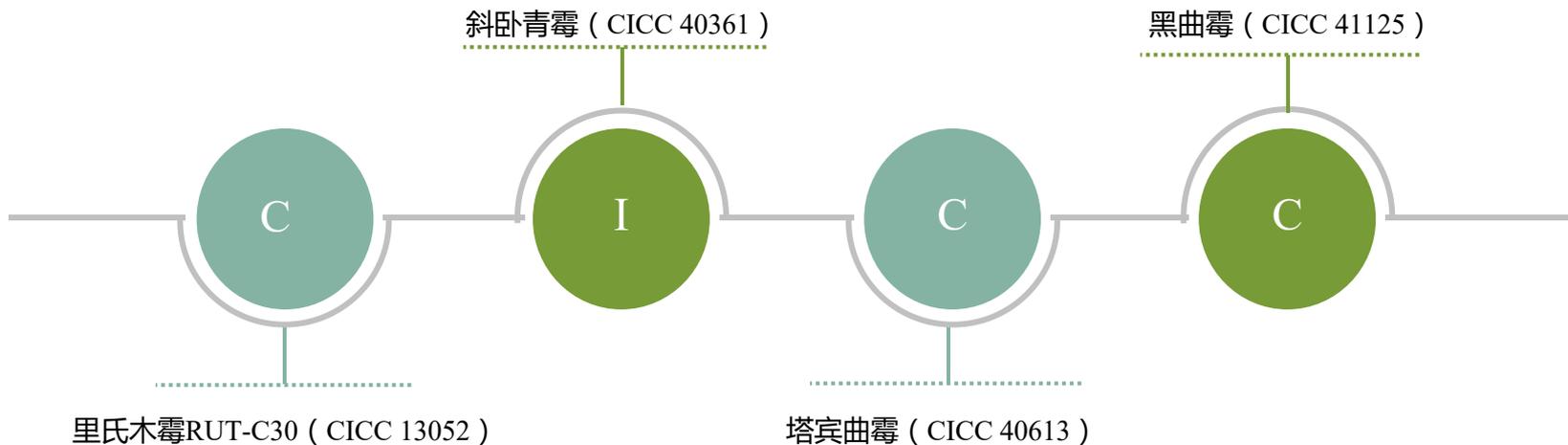
16S和18S rRNA基因PCR扩增
测序



生物信息学和统计学分析

真菌菌株

Materials and methods



中国工业微生物菌种保藏管理中心
CICC: China Center of Industrial Culture Collection

细菌菌株

Materials and methods

菌株分离

分解纤维素的
微生物群落

中国河南驻马店
采集农业土壤样品

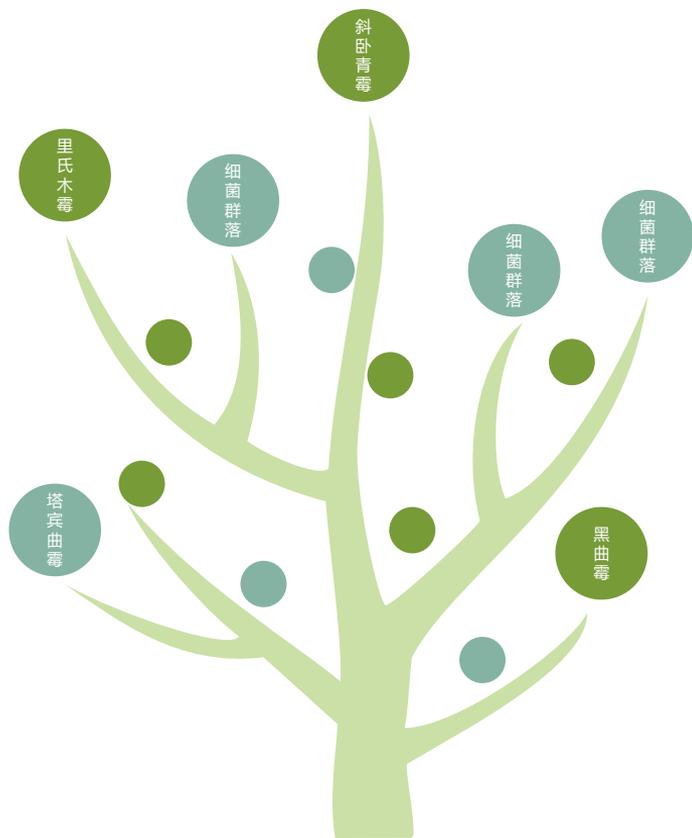
01
粉碎后的150g土壤和15g
稻草样品（从中国上海市
崇明市收集）在
500mL样品瓶中混合，
密封，然后转移到2L样
品瓶中并密封。

02
将样品瓶置于30°C的培
养箱中4周。2L样品瓶每
周打开一次，以转换一些
空气。

03
培养后收集来自2L样品
瓶的5g样品，并置于带
有50mL无菌水和玻璃珠
的250mL摇瓶中，
160rpm振荡1h。

04
收集液体样品并用无菌
水稀释至 10^{-3} ， 10^{-4} 和 10^{-5}
。将上述稀释剂等分试
样（1mL）接种到含有
50mL培养基I的250mL摇
瓶中，30°C，200rpm振
荡2周。

产纤维素酶



Materials and methods

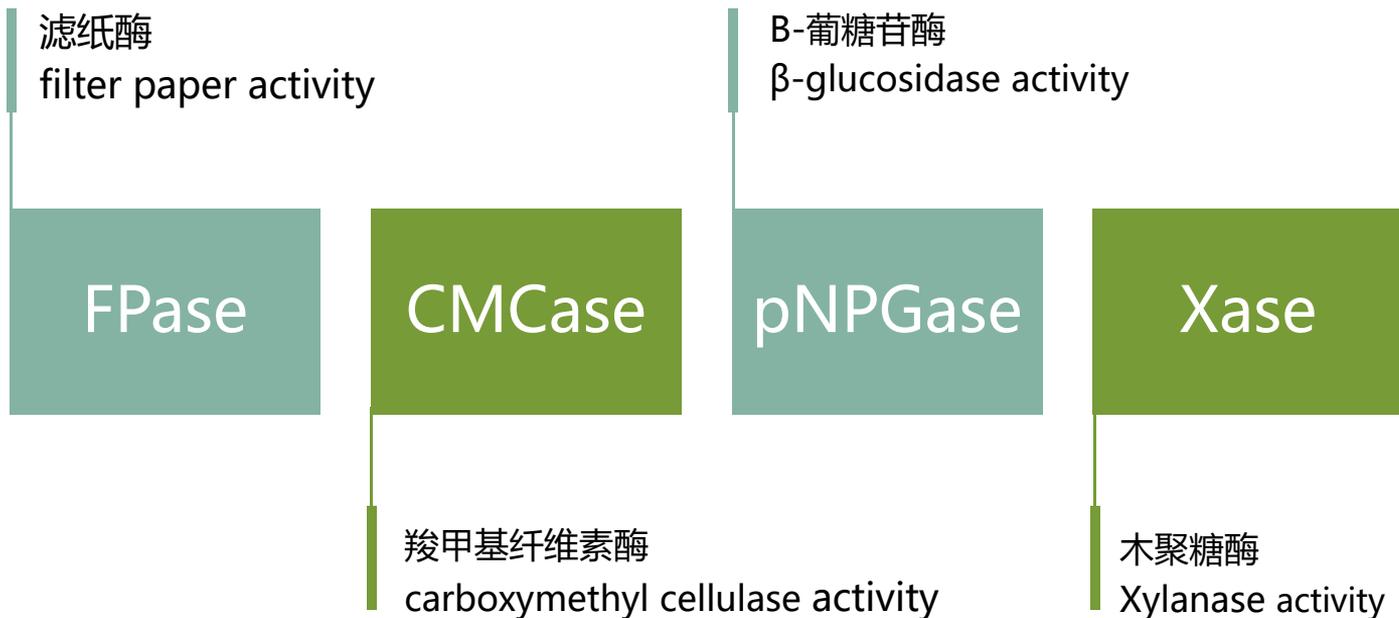
采用由四种真菌和纤维素分解微生物群落组成的微生物菌群来生产纤维素酶。

根据不同的特性，对每个菌株使用不同的种子培养和接种方法，以保证发酵实验中初始微生物状态和浓度的一致性。

酶活性测定

Materials and methods

纤维素酶活性通过三种主要成分的协同作用发生：外切葡聚糖酶（EC 3.2.1.91），内切葡聚糖酶（EC3.2.1.4）和葡糖苷酶（EC 3.2.1.21）。



Materials and methods



DNA提取

PowerSoil DNA Isolation Kit

(MO BIO Laboratories , Inc. , Carlsbad , CA , USA)



16S,18S rRNA PCR扩增

扩增细菌16S和真菌18S rRNA基因的V4区

引物对520F / 802R (Claesson *et al.*, 2009)

TAReuk454FWD1 / TAReuk-REV3 (Stoeck *et al.*, 2010)



测序

Illumina MiSeq 平台



04 Results and discussion



Results and discussion

木质纤维素分解酶活性

所有时间节点、四种酶：
R、D活性>N、T活性

N、T的Fpase、CMCase、
pNPGase活性相似，低水平；
R、D的pNPGase活性相似

R的Xylanase活性在2d时达到
高水平；

所有时间节点：

Xylanase活性：R>D

pNPGase：D>R；6d:283%

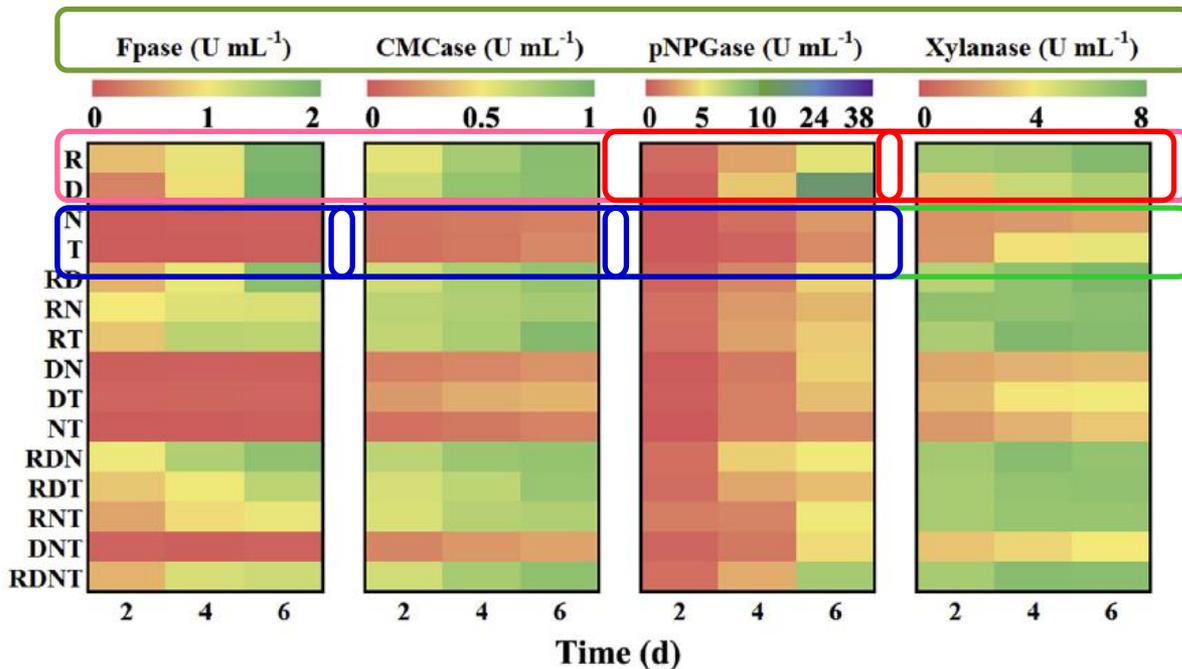


Fig. 1. Heatmap of lignocellulolytic enzyme activities of the fungal consortia composed of the four fungi. R, D, N, and T, which are *T. reesei*, *P. decumbens*, *A. niger*, and *A. tubingensis*, respectively.

Results and discussion

无里氏木霉 (*T.reesei*) 的真菌联合体的四种酶活：DN、DT、NT、DNT活性较低，与N、T相似

有里氏木霉 (*T.reesei*) 的真菌联合体的四种酶活：RD、RN、RT、RDN、RDT、RNT、RDNT活性较高

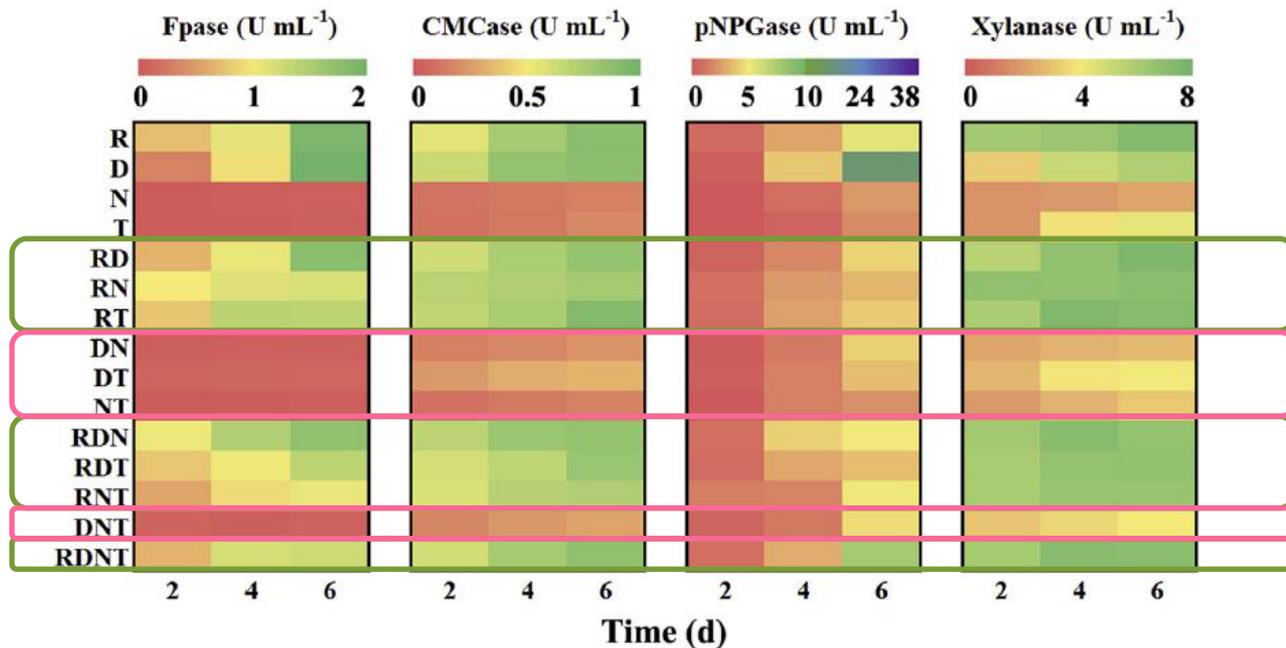


Fig. 1. Heatmap of lignocellulolytic enzyme activities of the fungal consortia composed of the four fungi. R, D, N, and T, which are *T. reesei*, *P. decumbens*, *A. niger*, and *A. tubingensis*, respectively.

Results and discussion

R、D的Fpase、CMCase、Xylanase的最大活性基本一致；pNPGase:D>R

四种酶活性：含有R的真菌联合体>含有D的真菌联合体

可能：D与其他真菌之间存在强烈的负面相互作用

里氏木霉与其他真菌联合后酶活性可达到高水平

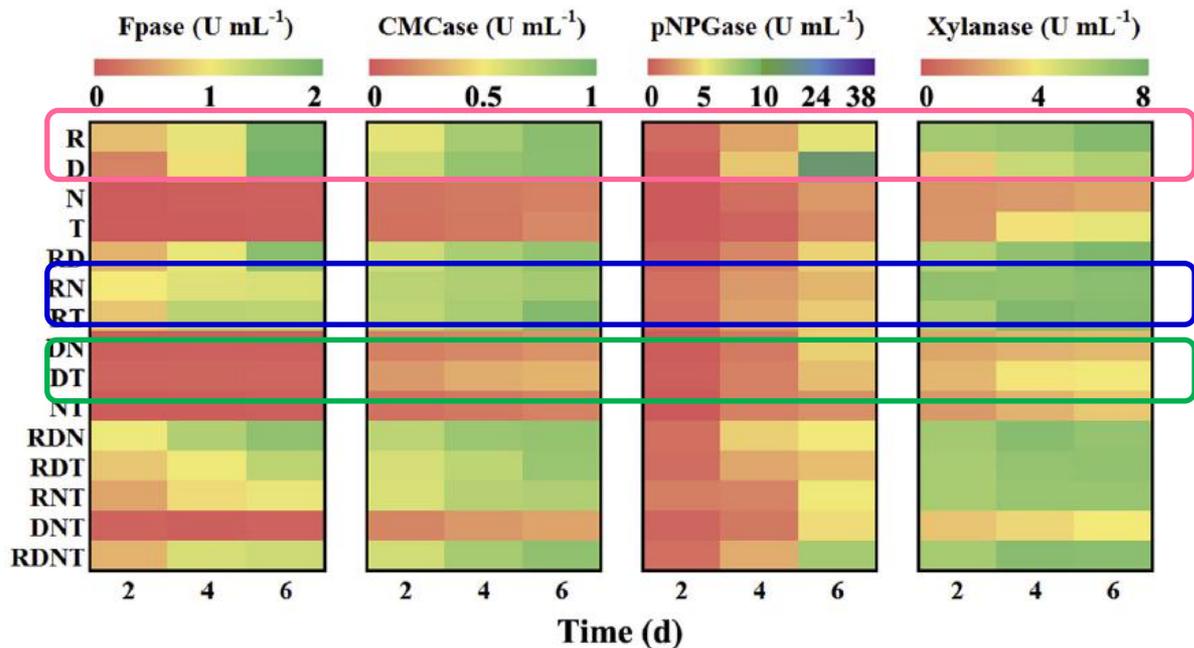


Fig. 1. Heatmap of lignocellulolytic enzyme activities of the fungal consortia composed of the four fungi. R, D, N, and T, which are *T. reesei*, *P. decumbens*, *A. niger*, and *A. tubingensis*, respectively.

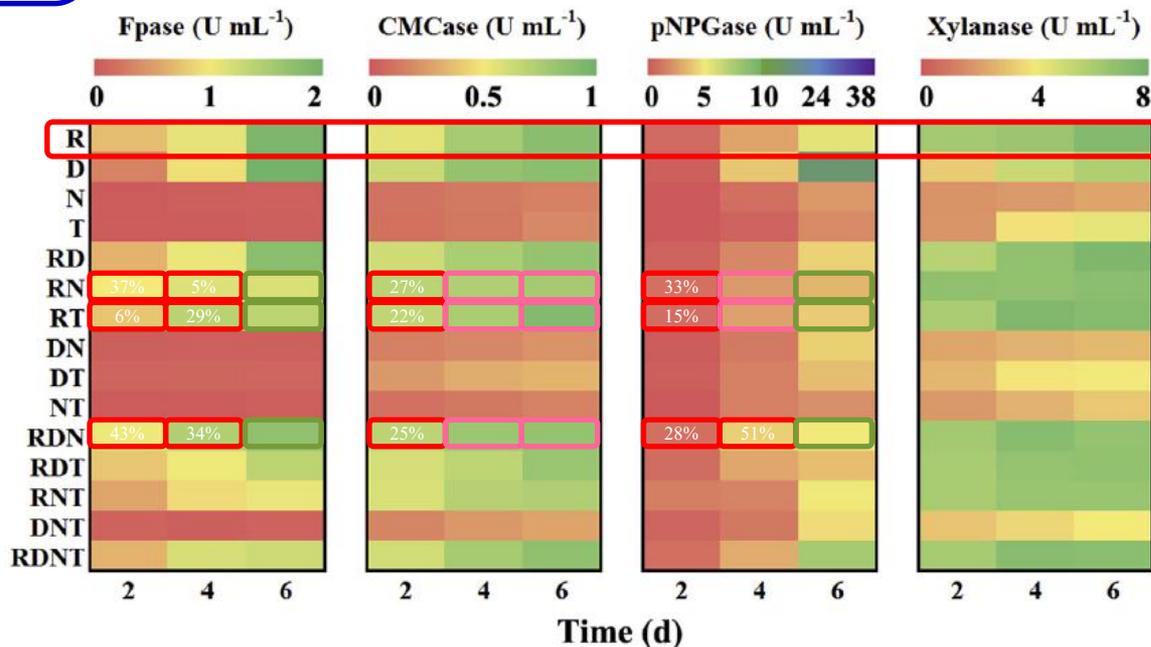
目的：联合体的酶活性高于单一真菌，甚至高于真菌组分的酶活性的理论总和。

Results and discussion

评估联合体酶活的基准

以R的酶活性为基准, RD、RT、RDN联合体四种酶活性的比较。

红框：高于R；
粉框：与R相似；
绿框：低于R



无统计学意义

Fig. 1. Heatmap of lignocellolytic enzyme activities of the fungal consortia composed of the four fungi. R, D, N, and T, which are *T. reesei*, *P. decumbens*, *A. niger*, and *A. tubingensis*, respectively.

Results and discussion |

Table 1

Correlations between the activities of different enzymes and the fungi.

		FPase	CMCase	pNPCase	Xylanase
<i>T. reesei</i>	S	0.754	0.704	0.307	0.859
	P	0.000	0.000	0.002	0.000
<i>P. decumbens</i>	S	0.192	0.207	0.147	0.021
	P	0.035	0.025	0.084	0.424
<i>A. niger</i>	S	-0.208	-0.248	0.005	-0.180
	P	0.024	0.009	0.481	0.045
<i>A. tubingensis</i>	S	-0.231	-0.208	-0.074	-0.051
	P	0.014	0.025	0.244	0.318

There were 90 sets of data from Fig. 1. S is the Spearman correlation coefficient. Four fungi were set as dummy variables with "not added" set at level 0 and "added" at level 1. Results of 0.000 mean <0.001.

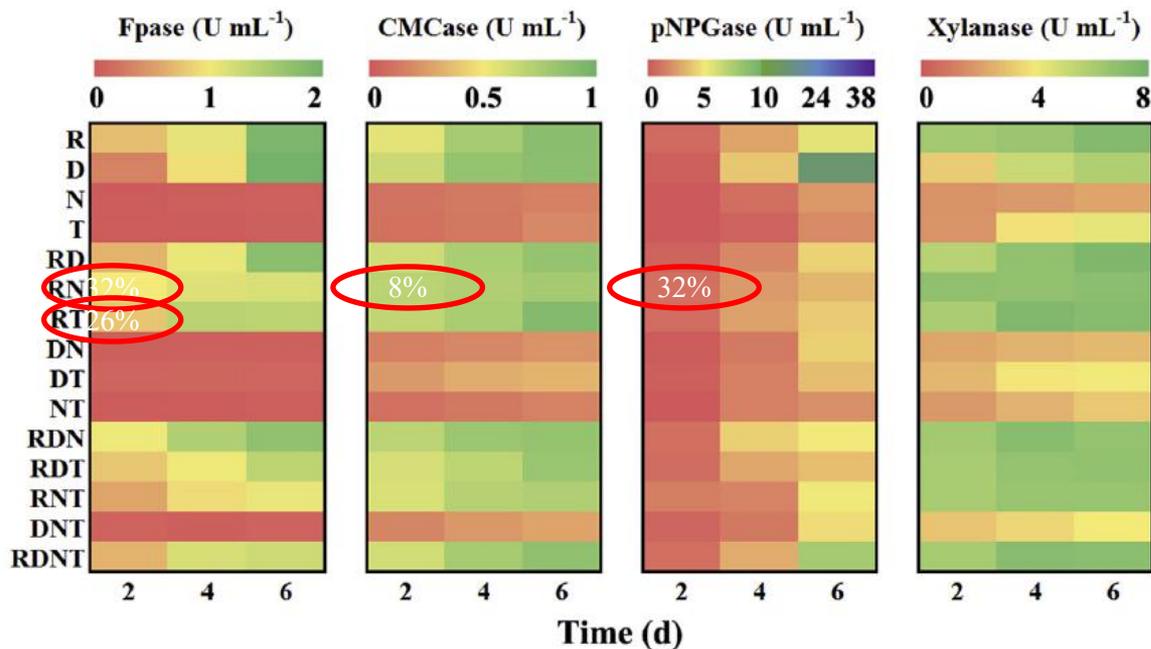
斯皮尔曼相关系数：估计两个变量X、Y之间的相关性。

里氏木霉影响影响联合体四种酶的活性高于斜卧青霉、塔宾曲霉和黑曲霉。斜卧青霉只能改善Fpase和CMCase的活性。塔宾曲霉和黑曲霉降低了联合体Fpase和CMCase的活性。

与理论酶活的总和相比

Results and discussion

T. reesei 与 *A. niger* ,
T. reesei 与 *A. tubingensis*
的相互作用显著提高了木质
纤维素分解酶的活性。



由表一可知 *A. niger* , *A. tubingensis* 减少联合体的酶活 , 因此 *T. reesei* 与 *A. niger* , *A. tubingensis* 的相互作用十分特殊。

Results and discussion

随时间线性增加

虽然RT和RN在6天的Fpase活性增加低于里氏木霉，但是在2天和4天的RN的Fpase活性比里氏木霉的Fpase活性高约30%-40%。如果在2d或4d停止培养，酶的产生将优于*T.reesei*。

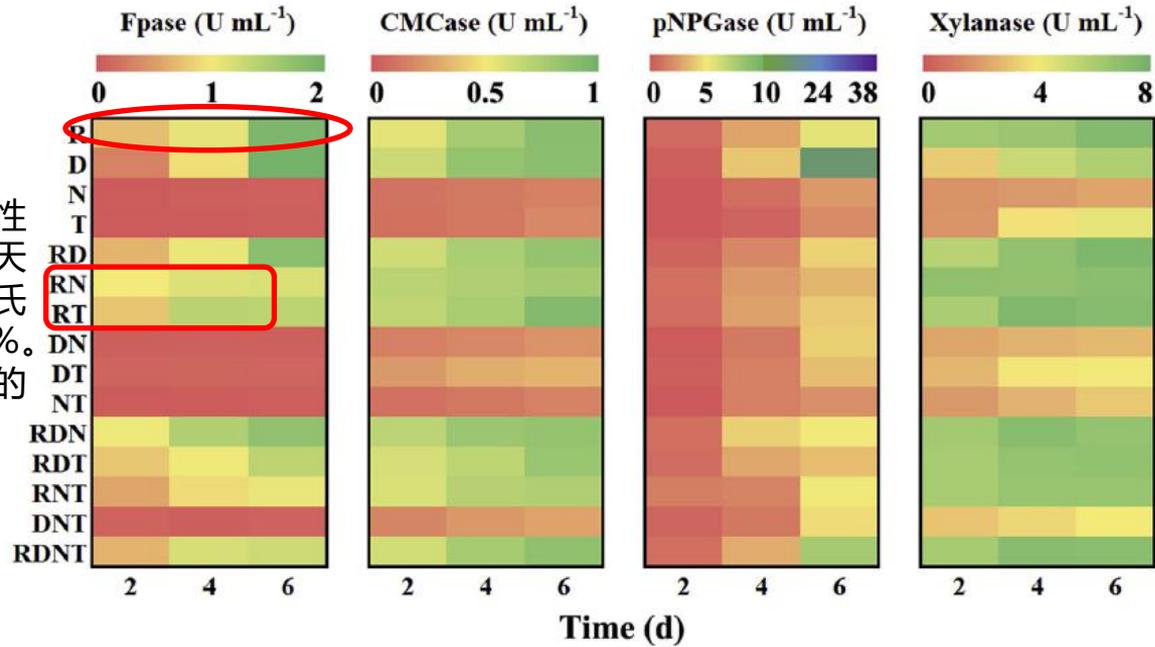


Fig. 1. Heatmap of lignocellulolytic enzyme activities of the fungal consortia composed of the four fungi. R, D, N, and T, which are *T. reesei*, *P. decumbens*, *A. niger*, and *A. tubingensis*, respectively.

Results and discussion

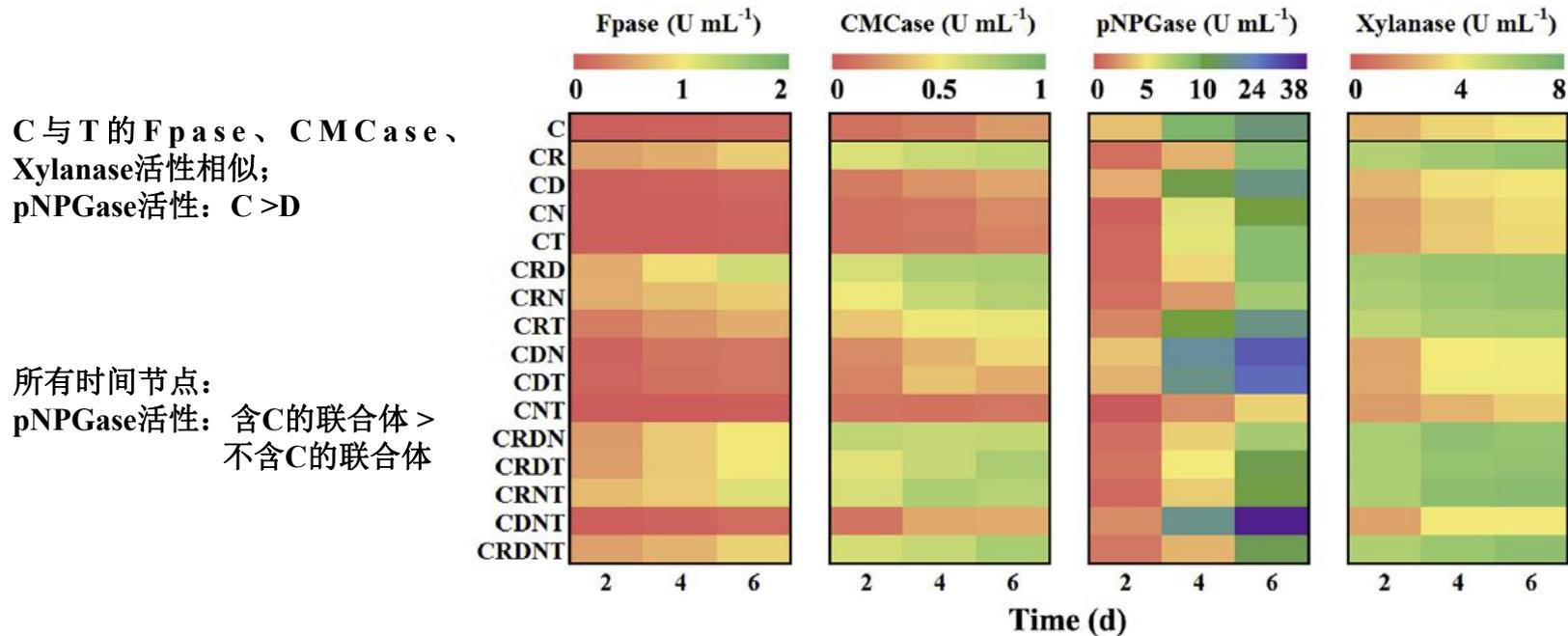


Fig. 2. Heatmap of lignocellulolytic enzyme activities of the microbial consortia composed of the four fungi and the cellulolytic microbial community. C, R, D, N, and T are the cellulolytic microbial community, *T. reesei*, *P. decumbens*, *A. niger*, and *A. tubingensis*, respectively.

纤维素分解微生物群落的最高pNPGase活性分别比里氏木霉和斜卧青霉高出约197%和5%。

Results and discussion

因此，将纤维素分解微生物群落的pNPGase活性用作评估微生物菌群的pNPGase活性的基线。

CD、CRT、CDN、CDT、CDNT的最大pNPGase活性分别比C高6%、9%、77%、64%、126%

CDNT的最大pNPGase活性：4d时比理论总和高25%，6d时高2%

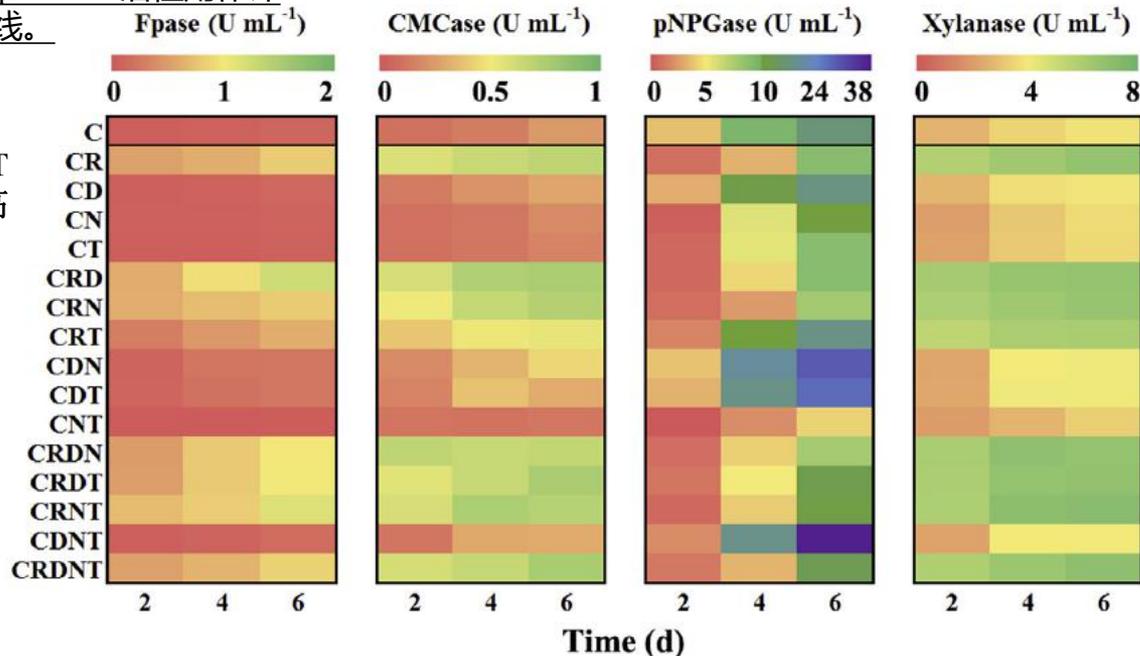
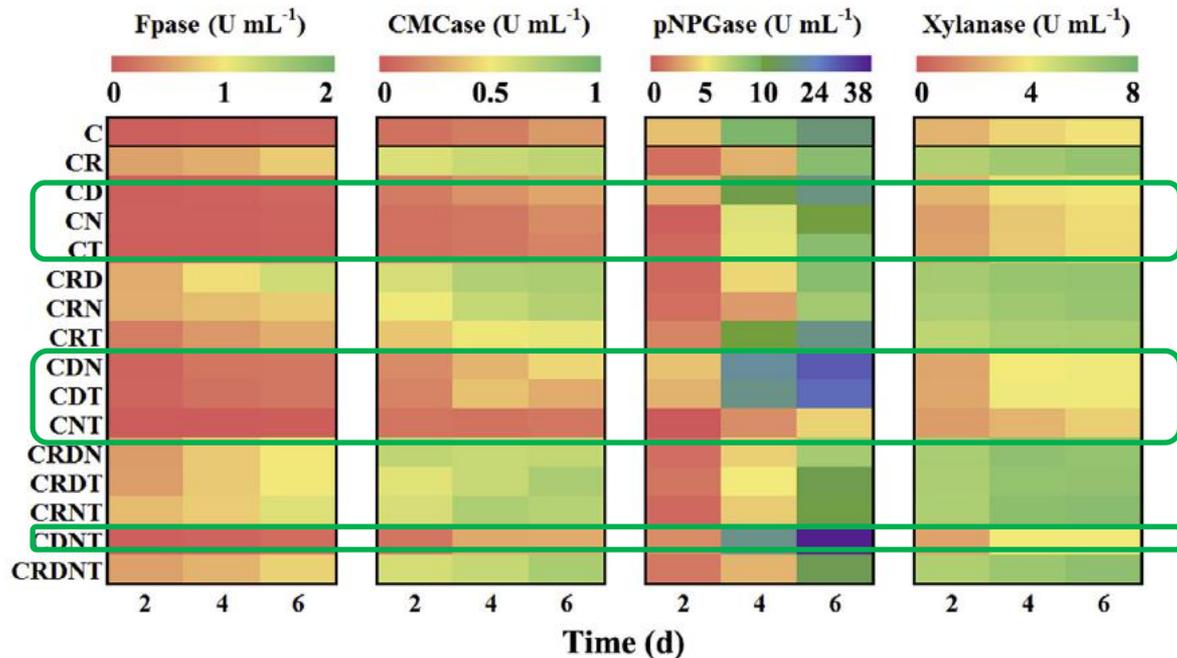


Fig. 2. Heatmap of lignocellulolytic enzyme activities of the microbial consortia composed of the four fungi and the cellulolytic microbial community. C, R, D, N, and T are the cellulolytic microbial community, *T. reesei*, *P. decumbens*, *A. niger*, and *A. tubingensis*, respectively.

Results and discussion



不含里氏木霉的联合体：CD、CN、CT、CDN、CDT、CNT、CDNT的Fpase、CMCase、Xylanase活性较低

用斯皮尔曼相关系数分析表明里氏木霉的添加改善了Fpase、Xylanase活性；斜卧青霉提高了Fpase活性；塔宾曲霉、黑曲霉对四种酶活性影响不大。

与其他三种真菌相比，里氏木霉可能是微生物群落中的良好成员，可促进四种酶活性达到较高水平。

Results and discussion

- ✓ 里氏木霉可用于构建具有高Fpase, CMCase、Xylanase活性的多种微生物菌群。纤维素分解微生物群落可用于改善pNPGase活性, 这补充了里氏木霉的缺陷。Community-reesei(CR)是与这两个组件最简单的组合。
- ✓ CRT的pNPGase活性高于纤维素分解微生物群落, Fpase活性高于微生物组分的理论Fpase活性的总和。因此, CRT也可能是一个很好的组合。
- ✓ 纤维素分解微生物群落的增加显著降低了1微生物菌群的Fpase活性。如果可以减少纤维素分解微生物群落与降低Fpase活性的真菌之间的负微生物相互作用, 则有助于进一步优化微生物联合体的所有酶的活性。

Results and discussion

确定具有高pNPGase活性的合成微生物菌群的关键菌株

香农指数分析:分别基于细菌16S rRNA基因和真菌18S rRNA基因进行分析。

CR:细菌 (4.28/4.78/4.65/4.72)
真菌 (0.24/0.38/0.48/0.39)

CRT:细菌 (4.28/4.35/4.73/5.01)
真菌 (0.24/0.79/0.96/0.15)

以纤维素分解微生物群落为初始的微生物群落结构。

则：

培养后CR和CRT的真菌和细菌部分的生物多样性显著增加。

CR和CRT的细菌部分的生物多样性远远高于真菌部分的生物多样性。

这表明加入真菌菌株可刺激纤维素分解微生物群落中一些菌株的生长，受影响菌株的数量可能远远高于受影响的真菌菌株。

Results and discussion

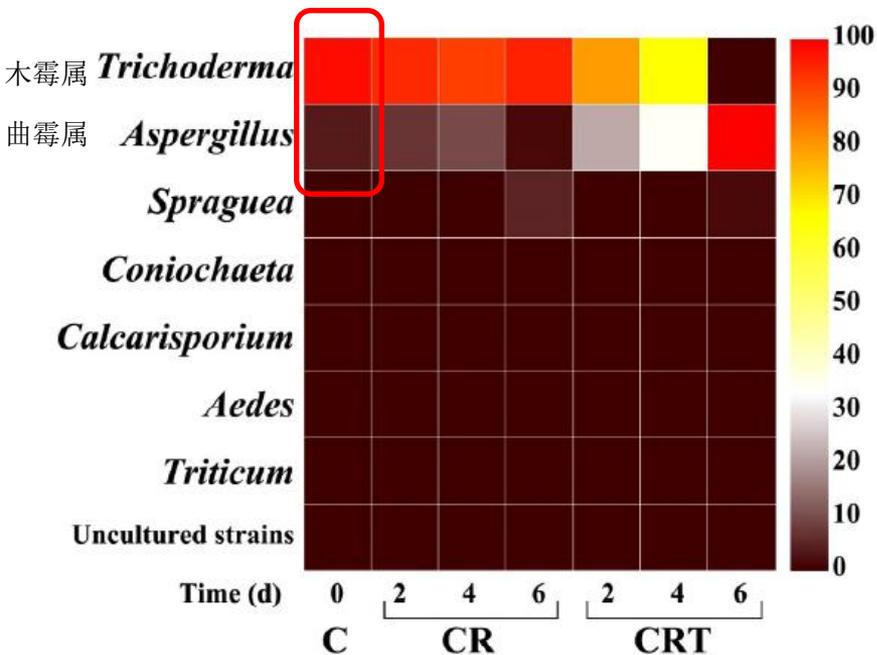
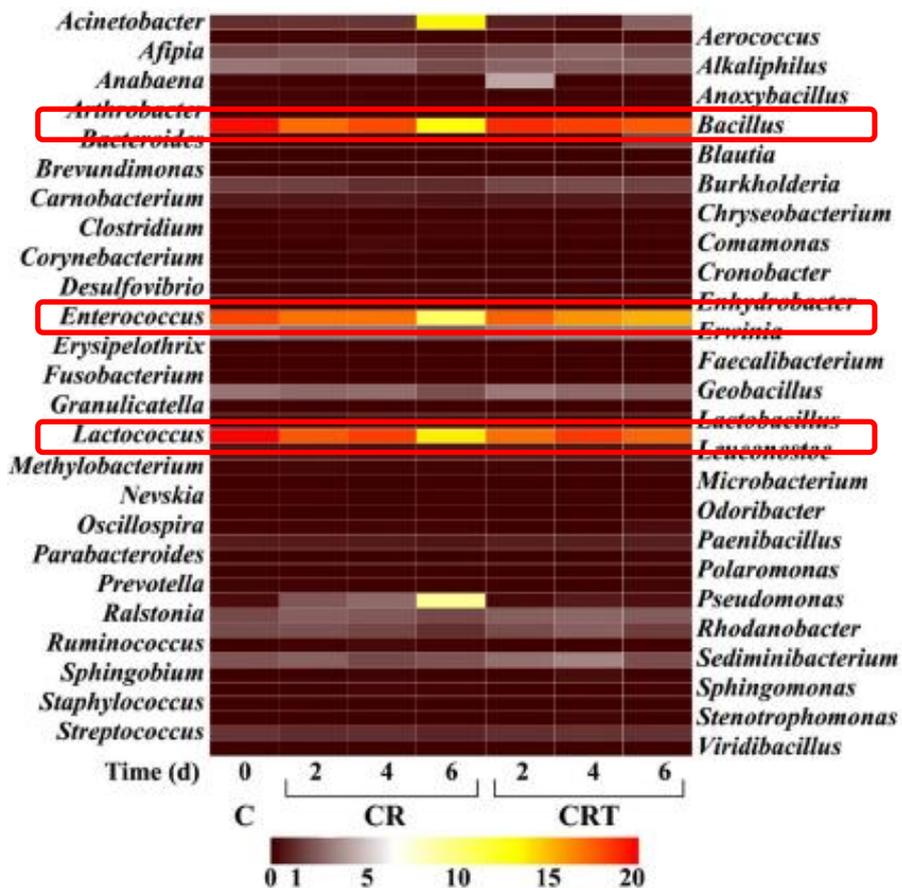


Fig. 3. Heatmap analysis based on the fungal genus distributions and abundances of the consortia.

联合体的**真菌部分**包括7个真菌属和一些未培养的菌株。最初的微生物群落结构由约96%的木霉属和4%的曲霉属组成，其他真菌属的比例在微量级（小于1%）。CR联合体中曲霉菌对*T. reesei*有积极作用，其比例在4天时增加到10%。这表明曲霉菌和木霉属之间可能存在正相互作用。

培养期间木霉的比例降低，曲霉菌的比例持续上升。如前所述，木霉属与联合体的F_{pase}酶活性呈正相关，因此木霉属比例降低可能导致F_{pase}酶活性增加的速率降低。

Results and discussion



初始微生物群落结构中芽孢杆菌，肠球菌和乳球菌的比例均高达约20%，其他菌株小于5%。虽然培养过程中CR和CRT中三者比例都有所改变，但仍保持在高水平（约10%-20%）。

CR和CRT中的1个真菌属和16个细菌属对添加木霉属或曲霉菌有积极反应，其中可能存在有利于木质纤维素分解酶生产的相互作用。这些菌株是设计的协同微生物联合体的潜在成员木霉和曲霉用于木质纤维素分解酶的生产。

Fig. 4. Heatmap analysis based on the bacterial genus distributions and abundances of the consortia. The 50 most prominent OTUs at the genus level are shown.

05 Conclusions



Conclusions

结果表明，**里氏木霉**是合成联合体的重要成员，因为它可以促进其酶活性达到高水平。加入含有许多菌株的分解纤维素的微生物群落刺激了合成联合体内的微生物相互作用。

B

C

来自纤维素分解微生物群落的菌株对于添加里氏木霉和斜卧青霉是积极响应的，这是设计出的协同微生物菌群生产木质纤维素分解酶的潜在成员。

A

由于阳性微生物相互作用，合成联合体在生产木质纤维素分解酶方面比单一菌株更有效。



敬请各位老师批评指正！

