

丝状真菌形态控制及其在发酵过程优化中的应用

熊强, 徐晴, 顾帅, 李霜

南京工业大学生物与制药工程学院, 江苏 南京 210009

熊强, 徐晴, 顾帅, 等. 丝状真菌形态控制及其在发酵过程优化中的应用. 生物工程学报, 2012, 28(2): 178-190.

Xiong Q, Xu Q, Gu S, et al. Controlling the morphology of filamentous fungi for optimization of fermentation process. Chin J Biotech, 2012, 28(2): 178-190.

摘要: 丝状真菌广泛用于发酵产业, 在液体深层发酵过程中, 其生长形态与产物种类及产量间存在重要关联, 成为发酵过程调控的热点。采用数学模型解释丝状真菌的形态发育与调控机制, 是近年来工程学界颇为关注的研究手段。本文结合自己的工作着重解释丝状真菌各种生长形态的生长机理及形态发育的数学描述方式, 以及如何采用数学模型描述丝状真菌发酵过程中产物、形态及环境的关联, 最终实现形态的控制, 完成生物发酵过程优化。具体包括: 1) 丝状真菌的生长机制; 2) 形态发育数学模型在发酵过程优化中的应用; 3) 控制丝状真菌形态的策略。

关键词: 丝状真菌, 形态生理学, 形态工程学, 数学模型, 发酵过程优化

Controlling the morphology of filamentous fungi for optimization of fermentation process

Qiang Xiong, Qing Xu, Shuai Gu, and Shuang Li

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, Jiangsu, China

Abstract: Filamentous fungi have been extensively used in industrial fermentation processes. One of the most interesting topics of filamentous fungi is their bothersome morphology, which closely correlates with the productivity and broth rheology. Aiming at the optimization of the microbial process, works mainly focused on the relationships between morphology, productivity and environment in the last decades. Based on those works, we tried to interpret the mechanism of filamentous fungi growth from physiological aspects, and reviewed the mathematical models describing the hyphal growth, differentiation during the formation

Received: September 5, 2011; **Accepted:** November 30, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21076104), National High Technology Research Program of China (863 Program) (No. 2011AA02A206).

Corresponding author: Shuang Li. Tel: +86-25-83172094; E-mail: lishuang@njut.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21076104), 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2011AA02A206) 资助。

of target products. Above all, efficient and effective morphology controlling strategies were addressed from the engineering view.

Keywords: filamentous fungi, morphology physiology, morphology engineering, mathematical models, fermentation process optimization

丝状真菌^[1] (Filamentous fungi) 是一类重要的工业微生物, 产品涵盖了工业酶制剂 (如淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶、脂肪酶等)、有机酸、抗生素等, 生产应用极其广泛。

丝状真菌的生长形态对细胞代谢途径、产物积累及分离提取均有显著影响, 因此如何控制丝状真菌的生长形态, 最大化提高目标产物产量成为研究的热点。然而, 生长形态发育作为丝状真菌生命体的一种本能表现形式, 受到影响因素多且过程复杂。如何理解并控制这种过程成为发酵调控的难点。

在现代生物学技术中, 以分子生物学为主要手段的生理学研究深入揭示了丝状真菌的遗传代谢机理和生长行为, 数学模型的引入可以准确预测分析和诊断生物发酵过程, 而工程学在生物发酵过程上的运用则大大提高了目标产物的产量、产率、以及生产强度^[2]。2010年, 国外学者 Wucherpennig、Krull 等分别对丝状真菌形态调控相关研究做了综述^[3-4], 主要集中于描述细胞形态与环境以及目标产物三者之间的相互关系; Wucherpennig 与 Driouch 于 2010 年以及 2011 年提出形态工程学 (Morphology engineering) 的概念^[3,5-6], 使得应用工程学理念调控形态获得更有效的产物积累成为一种研究趋势。

本文尝试以丝状真菌的形态为阐述对象, 分别从生理学和工程学角度揭示丝状真菌形态生长控制的基本原理, 为发酵过程的优化提供

策略。

1 丝状真菌生长的生理机制

1.1 丝状真菌生长过程的生物学原理

丝状真菌的形态发育过程被认为是高度极化生长的过程, 主要表现在 2 个方面, 即菌丝体分支形成的多极性以及尖端延伸的不对称性^[7]。

丝状真菌在极性生长的过程中, 多种细胞骨架成分、蛋白质、脂类、细胞器、信号分子以及能量分子都会参与^[8]。通常认为, 丝状真菌的细胞骨架由微丝肌动蛋白 (Actin filaments) 和微管 (Microtubules) 构成, 运输蛋白以及合成细胞壁所需物质的分泌小泡沿着微管运输至顶体 (Spitzenkörper)。顶体是指菌丝体尖端具有丰富囊泡的细胞结构, 其内部含有各种囊泡、核糖体、不同的功能蛋白质等等^[9]。顶体在细胞的延伸与分支的形成过程中扮演着重要角色, 它决定了细胞生长的中心及方向, 同时也是组成微管和微丝肌动蛋白囊泡的转换站^[10]。研究发现, 只有在快速生长的菌丝体尖端才有顶体的存在。

在进行物质合成时, 微丝肌动蛋白会固定在顶体的中央, 然后将合成组织的囊泡运输至细胞质膜表面, 在细胞质膜表面进行物质的合成。附着于顶体上的由多种蛋白组成的极性体 (Polarisome) 在细胞核的分裂中起关键作用并控

制着菌丝体的最大极性生长速率^[11]。

顶体是一个富含囊泡组织的结构,其囊泡包括几丁体、富含钙的小泡以及其他不明成分的小泡。一种机理认为,菌丝体分支的产生是由于大量的囊泡在菌丝体的尖端或者其他部位非正常聚集,超过了其生长部位的容纳能力,为了容纳这些小泡,尖端一分为二,分支形成^[12]。

分子生物学的发展使得对丝状真菌形态的认识逐步深入到分子层面。以曲霉属 *Aspergillus* 为例,与曲霉属形态控制相关的基因及其功能如表 1 所示。可以发现,细胞的极化生长受多个基因控制。在基因的表达过程中,受到 Ca^{2+} 离子浓度、氧分压、胞内能量水平等因素的控制^[7]。尽管通过改变形态控制基因或调节形态基因的表达仍然难以获得理想的丝状真菌形态;但是,对于我们从分子生理层面认识和理解丝状真菌的

形态发育机制却意义重大。

1.2 丝状真菌的形态学描述

丝状真菌的生长形态描述没有既定的规则,一般可分为宏观形态^[14] (Macro-morphology) 与微观形态^[15] (Micro-morphology)。

1.2.1 丝状真菌的宏观形态

以米根霉 *Rhizopus oryzae* 生长形态为例,宏观形态中所描述的分散菌丝体 (Dispersed mycelium)、球状菌丝体 (Pellet)、还有团簇状菌丝体 (Clump or flock) 电镜图片如图 1 所示。

分散菌丝体表现为单个生长的菌丝体;菌球是圆形的、稳定的、规则的菌丝体聚集体,在不同菌球的表面有不同特征,表现为光滑或者毛糙;团簇状菌丝体也是菌丝体的一种聚集体形式,但是聚集的机制和类型表现为非规则性和随机性。

表 1 曲霉属形态控制基因列表^[13]

Table 1 Genes involved in morphological development of *Aspergillus*^[13]

Gene	Protein function	Morphology obtained on gene inactivity
<i>hyA/podA</i>	Maintain hyphal polarity Activation of growth arrest in subapical cells	Wide hyphae with thick lateral cell wall Frequency of dichotomous apical branching
<i>hypC</i>	Cell size control Spacing of septa	Short subapical cells. High branching frequency
<i>podB</i>	Cytoskeletal organization in tip cells Maintain hyphal polarity	Swollen hyphae
<i>sepA</i>	Formin. Control and organization of actin filaments at sites of localized cell wall deposition	A septated wide hyphae High frequency of dichotomous apical branching
<i>swaA</i>	Maintenance of hyphal polarity	Swollen hyphae
<i>swaF</i>	Establishment and maintenance of hyphal polarity	Swollen hyphae

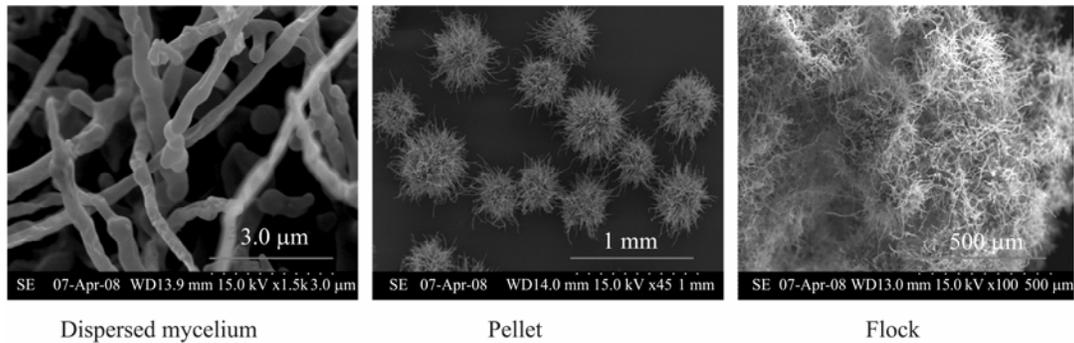


图1 米根霉 *Rhizopus oryzae* 的宏观形态
Fig. 1 Macro-morphology of *Rhizopus oryzae*.

1.2.2 丝状真菌的微观形态

微观形态特指宏观形态的微观组成以及微观结构,包括菌丝体的直径、分支频率、尖端分支情况,以及生理学上的结构分布情况等^[15]。

菌丝体的微观形态与其生长以及产物的代谢分泌具有紧密关联;因此,可用相应的数学模型来描述其生长动力学。微观形态的动力学描述一般牵涉菌丝体的总长度 (Total hyphal length) L , 菌丝体尖端数量 (Amount of tips) n , 主菌丝体长度 (Main length) L_m , 等等。与微观形态相对应的结构如图2所示。

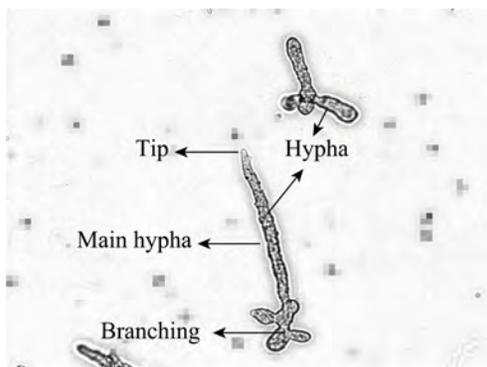


图2 米根霉 *Rhizopus oryzae* 微观形态及形态结构
Fig. 2 Micro-morphology of a growing mycelium of *Rhizopus oryzae*.

早期的经典模型认为^[16],细胞壁的合成推动菌丝体的延伸和生长,而细胞壁的合成依赖于细胞中囊泡 (Vesicle) 的合成速率及其运输至尖端的速率。菌丝体的延伸与分支形成存在关联,定义单位尖端数量的菌丝体长度为 HGU (Hyphal growth unit), 有:

$$HGU = \frac{L}{n} \quad (1)$$

在菌丝体的初期生长阶段,细胞壁的合成是限速步骤,随着菌丝体长度的增长,囊泡运输需要的时间增长,此时囊泡的运输限制了菌丝体的延长。假设囊泡以恒速运输,因此,菌丝体将以线性增长的方式延伸,当囊泡运输速率超过菌丝体增长速率,囊泡在菌丝体的尖端聚集,达到一定的零界点,便会产生新的分支。分支发生的过程是与菌丝体的总长度相偶联的,用 K_{bran} (菌丝体分支生长常数 $\mu\text{m/h}$) 来表征这种偶联关系:

$$\frac{dn}{dt} = k_{bran} \cdot L \quad (2)$$

菌丝体的极化生长也取决于尖端的生长与分支的形成。尖端生长以 q_{tip} (菌丝体尖端生长常数 $\mu\text{m/h}$) 的速率恒定进行:

$$\frac{dL}{dt} = q_{tip}n \quad (3)$$

在对数生长期, 此时 HGU 为稳态, 菌丝体的延伸以恒定的生长速度 μ (菌丝体生长速率 h^{-1}) 进行。即有:

$$\frac{dL}{dt} = \mu L \quad (4)$$

解方程 (1)、(2)、(3)、(4), 便可得到:

$$\mu = \sqrt{q_{tip} \cdot k_{bran}} \quad (5)$$

求解所得的式 (5) 也印证了机理的假设, 因此在该模型中, 用数学的方法将菌丝分支等生理现象与生长的关系进行了完美的阐释, 其应用非常广泛。但是, 该模型也存在一定的缺陷, 如囊泡在胞内的扩散运输并没有得到有力证据, 基于囊泡恒速运输的假设也是值得商榷的。所以, Nielsen 等在菌丝体微观形态的描述中引入了一套新的体系。他认为菌丝体的尖端延伸是一个高度极化的过程, 而且菌丝体分支的产生是不相关的随机事件^[17]。定义 2 个分支产生事件间的时间差为 τ , 确定模拟时间的步长为 $\Delta\tau$, 如果随机数在区间 $[0; 1 - \exp(-q_{bran} \Delta\tau)]$ 内小于 $\Delta\tau$, 则新的分支产生, 选择该时间, 否则舍去。

$$F(\tau) = Pr\{T \leq \tau\} = 1 - \exp(-\int_0^\tau q_{bran} d\tau) \quad (6)$$

引入的随机数 P , 便可计算分支经验饱和常数 K_S :

$$K_S = \exp(\beta p + \alpha) \quad (7)$$

菌丝体在生长的过程中, 分支的生长随着自身物质的合成、运输逐渐达到饱和, 便会停止延伸, 并产生新的尖端, 其生长过程满足饱和动力学方程。

$$\frac{dl_i}{dt} = k_{up} \frac{l_i}{l_i + K_S} \quad (8)$$

式 (8) 中, k_{tip} 为环境影响常数, 取决于发酵参数的变化。结果表明, 该模型能够很好地预测黑曲霉 *Aspergillus niger* 在不同葡萄糖浓度下菌丝体的总长度以及分支产生的情况。

1.2.3 丝状真菌宏观形态与微观形态之间的关联

丝状真菌微观形态的发展过程决定了菌丝体最终的宏观形态。液体深层发酵过程中, 根据丝状真菌孢子在萌发早期的聚集特性, 可以将其分为聚集型 (Coagulating type) 与非聚集型 (Non-coagulating type)。

聚集型的丝状真菌 (如曲霉属), 最终宏观形态倾向成为菌丝球。对孢子聚集现象的研究常常需要建立在种群数量平衡的基础之上, 而由此发展起来的模型也可称为种群数量平衡模型 (Population balanced model)。例如, 黑曲霉 *Aspergillus niger* 在接种后便开始出现孢子的聚集现象, 孢子的聚集与散开处于动态平衡, 孢子萌发产生的菌丝体对孢子产生二次吸附, 此时平衡被打破, 菌丝体最终形成菌球^[18]。也有研究表明, 孢子的聚集与否只影响菌球形成时间的早晚, 而不能决定宏观形态^[19]。

对于非聚集型的丝状真菌 (如米根霉), 菌丝体的宏观形态表现非常不稳定。描述这类真菌生长的模型多以微观形态的各项参数为统计量。Lejeune 的研究认为, 里氏木霉 *Trichoderma reesei* 尖端的延伸速率以及分支的频率都会影响到菌球的形成以及菌球的结构^[20]。而 Liao 等则用逻辑回归模型 (Multiple logistic regression model) 表述了环境因素的变化对米根霉菌球形态的综合作用^[21]。但是, 从本质上来讲, 上述研究都只是对形态发育过程的描述与预测, 尚未能深入解释非聚集类型丝状真菌的微观形态与宏观形态之

间关联的机理。

2 形态发育数学模型在发酵过程优化中的应用

2.1 描述菌丝体形态与产物的模型

丝状真菌的不同形态直接影响了氧气与基质的供应,进而影响基因的全面调节及代谢途径的迁移;例如,黑曲霉 *Aspergillus niger* 在呈球状的形态时,倾向于产有机酸,极少或者不产酶制剂;呈丝状时,却是酶制剂产品的高产形态^[22]。

形态与产量的关联还体现在不同部位的菌丝体的生长代谢存在差异。例如,蛋白质通常是在菌丝体尖端分泌的;次级代谢产物通常与菌丝体的非活性生长部位有关。大量文献报道了青霉菌 *Penicillium chrysogenum* 菌丝体中分隔形成及空泡程度与青霉素的产量存在关联性^[23]。

由于氧在发酵体系中的低溶解性,质量传递的限制步骤一般认为是氧传递限制。根据双膜理论,氧传递的限制步骤主要发生在氧分子从边界层扩散到液相主体的过程中;但是,在丝状真菌的液体深层发酵体系中,氧的传递还涉及到菌丝球内部的扩散过程。Cui 认为,氧气在菌球内部的传递过程为分子扩散,不受液相主体流型影响^[24]。Hille 等认为,受液相主体复杂流型的影响,单纯的分子扩散过程不足以描述菌球内部的传递,菌球内部的结构及质量分布对氧的传递具有重要影响^[25]。但是共同的观点都认为,当菌丝球过大,氧在内部的传递是受限的,所以存在一个理论最大直径,此时菌球中心的理论氧浓度为零,该直径即为菌球的临界直径。

采用数学模型描述丝状真菌发酵过程中产

物、形态及环境的关联,极大地丰富和发展了丝状真菌形态学,同时也提高了发酵过程的预测控制水平。常见的模型为菌丝体个体模型 (Individual model or cell model),具体包括非结构化模型与结构化模型。

2.1.1 非结构化模型 (Unstructured model)

非结构化模型是基于微生物反应原理,包括底物的运输、细胞内生化反应以及产物的分泌过程,同时基于稳态假设,将单个菌丝体或者菌球类比成自固化酶,用一系列的控制方程来探究底物在研究对象内的消耗,以及产物生成过程的模型。

以菌球生长形式的发酵体系为例,质量在菌球内部的传递被认为是非稳态扩散过程^[25],根据费克第二定律 (Fick's second law)。在 r_p 处,组分 i 浓度 c_i 随时间的变化率等于该处的扩散通量随距离变化率的负值与质量的消耗速率 r_i 之和。

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_i \frac{1}{r_p^2} \frac{\partial (r_p^2 \partial c_i / \partial t)}{\partial r_p} + r_i \quad (9)$$

式 (9) 中 D_i 为 i 组分在发酵体系中的有效扩散系数。除了对发酵体系中组分变化的认识外,菌体的生物量 x_i 变化情况是非结构化模型关心的重点。生物量的通量 j_{x_i} 在径向方向的变化以及整个过称中生物量的合成速率决定了整个生物量的变化与分布。

$$\frac{\partial X_i}{\partial t} = -\frac{\partial j_{x_i}}{\partial r_p} + r_{x_i} \quad (10)$$

对非结构化的数学模型进行求解,可以预测发酵体系中各种物质的生成,菌体生物量的变化。例如,Rinas 等成功运用非结构化模型预测了黑曲霉产葡萄糖氧化酶 (GOD) 体系中葡萄

糖、氧气、中间代谢物以及产物的关联^[26]。非结构化模型针对的是菌丝体与环境、产物之间的生长代谢情况，该模型无法解析菌丝体在具体结构中的功能分区，以及形态的生长演化过程；因此，从非结构化模型向结构化模型发展已成为趋势。

2.1.2 结构化模型 (Structured model)

结构化模型是基于菌丝体在功能上的结构分区或者活性在结构上变化的生理学基础，建立的丝状真菌分化与关于产物生成的理论模型。结构化模型侧重于解释形态分化的内在机理以及形态分化在功能变化上的表现。

在细胞的一个生长周期中，涉及尖端的生长、细胞核的分化、分隔、及分支的形成^[27]。

Nielsen 认为，根据该周期的复制情况，菌丝体可以分为 3 个区域：顶端 (Apical)、次顶端 (Subapical) 以及菌丝体 (Hyphal)^[28]。而 Megee, Thomas 等则认为，结构分区应该与细胞的分化和产能相关联^[29-31]。以产黄青霉 *Penicillium chrysogenum* 为例，菌丝体的生长、功能分化以及青霉素产生是一个高度集成的过程；青霉素的产生与停止生长的菌丝体比例密切相关。在深层发酵中，可以将菌丝体的生长状态分为不同类型： A_0 ，活性生长区域； A_1 非活性生长区域 (停止生长区)； A_2 小空泡区； A_3 衰退区域 (空泡区) 与 A_4 自溶区。根据其功能的分区，可以得到如图 3 所示的结构化原理图。

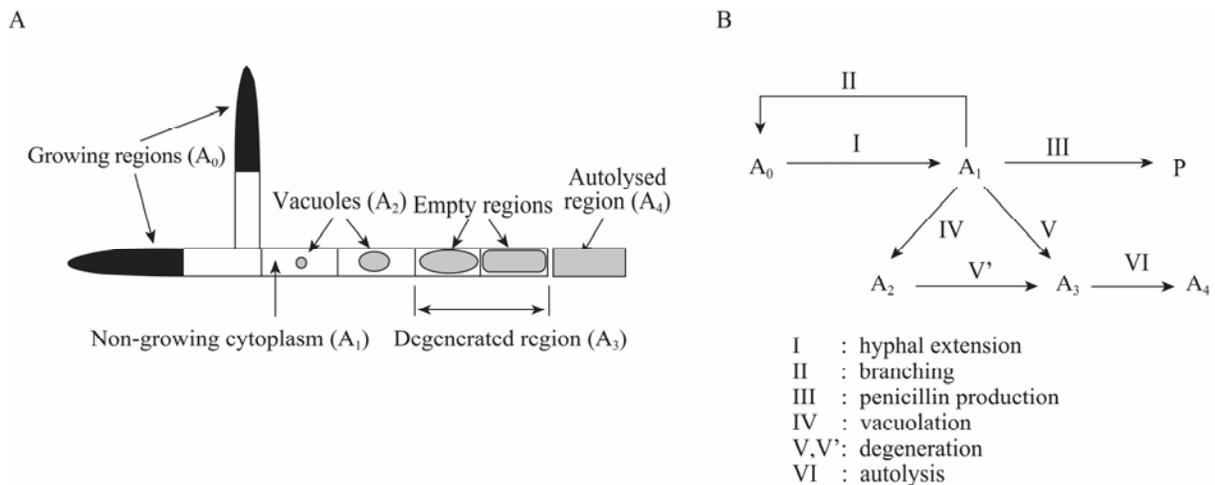


图 3 (A) 青霉菌 *Penicillium chrysogenum* 产青霉素结构分化原理图 (B) 结构分化以及青霉素生产原理图^[31]

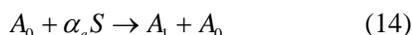
Fig. 3 (A) A schematic diagram for simple differentiation of *Penicillium chrysogenum*. (B) Mechanisms for extension, branching, vacuolation, degeneration, autolysis, and penicillin production^[31].

在结构化分区原理图的基础上，建立相应的动力学反应模型，便可获得整个过程控制的方程。结构化模型在建立方程的过程中，需要进行必要的简化处理或者假设。例如：在菌丝体活性生长区 (A_0) 延伸转化为非活性生长区 (A_1) 的

过程 (I) 以及非活性生长区分支产生活性生长区域 (A_0) 的过程 (II) 中，不同的研究者所采用的控制方程会有所区别。Birol 等认为^[32]，单纯的菌丝体延伸以及分支过程分别决定于所需底物的数量关系以及转化的速率。即：



但是, Paul 和 Thomas 则认为, 在 A_1 至 A_0 的过程 (分支形成) 中, 还涉及基质的消耗; 而菌丝体延伸的过程, 不但涉及基质的消耗, 而且分支形成后也伴随 A_0 的产生; 所建立的方程如下:



借鉴酶催化反应中底物与酶结合的中间过渡态, 在分化过程中, 假设了 A_0 至 A_1 的中间过渡态 A_0^* 。认为 A_0 至 A_0^* 以及 A_0^* 至 A_0 , 再从 A_0^* 至 A_1 的过程处于动态平衡之中。基于这种过渡态假设, 很好地解决了菌丝体分化过程中, 活性生长部位与非活性生长部位的区分问题, 模型体现了很好的适用性^[31]。

应当指出的是, 结构化模型是当前功能最为强大、高度发展且适用性很好的模型; 广泛应用于工程实践, 尤其是在次级代谢产物以及酶制剂的发酵控制中。

2.2 描述菌体形态与环境流变性变化的模型

丝状真菌在深层发酵中, 发酵过程还伴随着发酵液流体特征的改变, 在这个过程中质量传递、动量传递以及流变性均发生改变。

研究表明, 丝状真菌发酵形态会直接影响发酵液的流变性能, 特别是在高粘度发酵的时候^[33]。最开始的发酵液一般为牛顿流体, 随着菌丝体的增长, 菌丝体间发生相互缠绕与粘连, 菌丝体生物量的细微变化即可引起发酵液粘性的

迅速增加, 发酵液在后期表现为非牛顿流体^[34]。由于非牛顿流体的假塑性或者胀塑性特性, 其粘性不仅受体系中生物量变化的影响, 也与流体的流型 (雷诺数 Re) 以及质量传递系数 ($K_L a$) 密切相关^[35]。

研究发酵体的流变性是一个相当复杂的过程。在早期研究形态与流变性的模型中, 都表现为经验或者半经验的模型, 如宾汉模型以及谢赫尔-巴克利模型等等, 这些模型的特点是针对发酵液体系表观粘性的研究, 并没有真正体现菌体形态与粘性的关系, 其应用也存在很大的局限性。随着研究的深入, 人们发现相比生物量, 菌体形态 (特别是团簇状菌丝体) 对流变性具有同样重要的影响^[36]。Thomas 等定义了单位重量的生物干重对流变参数的数值为 X_{BDM} ; 研究认为, 菌体形态参数如粗糙度 (Roughness) R 与致密度 (Compactness) C 对菌体的流变性影响最为显著^[37], 得到菌体形态与流变性的关系模型:

$$RP = const \cdot X_{BDM}^\alpha (R)^\beta (C)^\gamma X_{BDM} \quad (15)$$

不同体系下得到的模型参数有所差异, 但该模型都表现了很好的适用性, 成功预测了发酵体系中流变性的变化^[35], 为发酵体系的优化提供了强有力的理论基础。

3 工程学角度优化丝状真菌形态的策略

在发酵工业中, 通过控制丝状真菌形态达到增加产量的目的, 是丝状真菌形态学研究的重要目标。工程学角度优化控制丝状真菌形态是指利用工程学的原理从发酵培养环境以及其他工程学角度来控制形态, 达到优化发酵过程的目的。

3.1 优化培养环境控制丝状真菌形态

3.1.1 发酵培养基对丝状真菌形态控制的影响

根据微生物生长的特性,通过优化培养基的成分以及组成,如碳源、氮源、金属离子的浓度及种类,控制丝状真菌形态。Nielsen 等研究了不同葡萄糖浓度下黑曲霉 *Aspergillus niger* 菌丝体的生长情况,研究发现在不同糖浓度下,菌丝体的分支情况会有所区别^[17]。氮源也是影响菌丝体形态的重要因素,在丝状真菌的培养中,如果氮源过于丰富,菌丝体生长速率过快,生物量会急剧增加不受控制,由于发酵液的流变性是与菌丝体的生物量相关联的,生物量过大将导致发酵体系中菌丝体粘连成团块状,导致发酵失败。在实际生产中,培养基常常是氮源或者磷源限制的^[38]。例如,Shi 等在利用顶头孢霉菌 *Cephalosporins acremonium* 发酵产头孢菌素 C (CPC) 的过程中发现,通过采用硫酸—豆油偶联型流加策略,将氨态氮浓度控制在 3~6 g/L 的范围,使得细胞在发酵中期正常分化为高度膨胀菌丝体,并为发酵后期利用豆油进行 CPC 的合成奠定基础,实现了 CPC 的高产^[39]。常见的必需微量金属离子,对菌丝体的形态发育是非常重要的。 Ca^{2+} 离子被证明参与了丝状真菌菌丝体生长合成过程中蛋白质激酶的合成,而 Na^+ 、 K^+ 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 离子都与菌丝体合成过程有关^[3]。Liao 等则综合考察了接种孢子浓度,葡萄糖、尿素、磷酸盐、金属离子的浓度,发酵体系 pH 以及微粒子添加对米根霉生长形态的影响规律,所建立的模型能很好预测环境变化的因素对菌球形态的综合影响^[40]。

3.1.2 发酵条件对丝状真菌形态控制的影响

发酵培养条件一般包括接种量、温度、pH、

发酵液流场情况以及供氧等。实践证明,发酵条件的优化是控制丝状真菌形态的有效手段。

由于丝状真菌为多细胞结构,假设菌丝体在发酵过程中不被打碎,基于种群的数量平衡原理,孢子的接种浓度直接决定了其种群的数量^[41]。适合的接种浓度,对于控制发酵体系中的生物量以及最佳形态的获得都十分重要。

pH 对菌丝体形态的影响主要表现为孢子的聚集状态与环境 pH 密切相关,推测其机理是 pH 与孢子表面带电特性相关;不适的 pH 也会抑制胞内酶的活性、细胞壁通透性等从而影响菌体生长。本课题组在研究 pH 与米根霉形态关系时发现: pH 小于 2.1 时,孢子不能萌发; pH 2.3~2.7 时,形成分散的菌球; pH 为 2.9 时,形成菌球与絮状菌丝的混合物; pH 大于 3.1 时,呈团块状^[42]。综上所述可以认为,低 pH 对米根霉的形态影响主要表现为对生长的抑制作用。根据这个原理,我们开发了针对工业放大的菌球形态多级预培养技术^[43]。

搅拌是影响丝状真菌发酵过程相当重要的因素,也是相对容易改变的因素。搅拌转速会影响温度、质量及动量的传递,搅拌对菌丝体的物理剪切作用也是引起众多研究者兴趣的课题之一。

发酵系统是一个包括固相、液相、气相的非均相系统,质量的传递过程受不同相间湍动程度的影响,搅拌则是这种湍动的主要动力来源。随着搅拌转速的增加,球状菌丝体直径会变小,变得更加致密,同时还有破碎菌丝体的存在^[44]。研究人员提出了菌球破坏的 3 种机理:菌丝球与漩涡之间的相互作用^[45]、搅拌桨边缘或者挡板剪切

力与菌丝球的作用以及菌丝球与菌丝球之间的相互冲击^[46]。Cui 等的研究发现, 菌丝球表面菌丝体的长度与反应容器中输入的功率存在关联, 即菌丝体长度正比于单位体积输入功率 ε 的 0.25 次方^[47], 以此推断菌球破坏的机理是漩涡的剪切作用对菌丝体做功导致了菌丝体的破坏, 其以胡克定律建立的菌丝体破坏机理模型很好地预测了菌球在发酵体系中的破坏情况。

搅拌还会改变菌球与液相主体之间边界层的质量传递情况。以氧气的传递为例, 搅拌转速的增加可以增强氧气传递。在搅拌速度增加的时候, 菌球的致密度会增加, 但是, 到底是由于剪切的改变还是由剪切引起的溶氧改变引起了菌球致密度的改变, 其结果待进一步深入研究。Cui 等在不改变搅拌速度和通气量的情况下, 改变通入反应器中氧的比例, 将反应过程中的溶氧情况从 5% 增加至 330%, 结果发现, 单位面积的菌丝体生物量随着溶氧的增加而增加 (认为氧的生长为生物量的关键基质), 但是并不受外界搅拌速度的改变影响; 由此推断, 在菌球内部的传质机理为分子扩散, 液相主体的对流与湍流对菌球内部的传质影响甚微^[48]。但是 Cui 等的解释中忽略了风量的输入不仅伴随着氧气的输入也伴随着能量的输入, 即通风也会给发酵体系输入能量, 最明显的例子是在气升式的发酵罐中, 通风会给发酵体系输入能量。Lin 等则研究了在相同的总功率下, 分别改变搅拌功率和通风功率对黑曲霉菌球形态的影响; 结果发现, 随着通风输入功率的增加, 菌丝球在直径上会明显减小, 在数量上会明显增加, 而且偏向于形成致密度不高的小球, 非常利于黑曲霉菌株糖化酶的生产^[49]。

3.2 微粒子控制丝状真菌形态

自 2008 年以来, 从工程学角度, 利用微粒子在流场中的作用, 通过调整所使用微粒子类型与微粒子粒径来定向控制丝状真菌的生长形态成为新的技术前沿^[50]。

该技术的适用对象是针对趋向自然生长成球的聚集型菌株, 将球状的菌丝体控制成丝状的菌丝体; 如曲霉属真菌的丝状形态更利于蛋白质的合成和分泌, 用于酶制剂的生产。该技术方法的原理为, 在孢子早期的聚集阶段, 由于流场中的微粒子增强了孢子间的剪切或者冲撞作用, 破坏了孢子的聚集, 导致了菌丝体在发酵中呈现丝状的形态^[51]。

常用的微粒子包括硅酸盐、硅氧化物、金属钛氧化物等等; 微粒子的粒径范围和浓度均可显著影响菌体形态。微粒子用于控制丝状真菌生长形态最先报道于 Kaup 等用 Al_2O_3 来控制海洋真菌 *Caldariomyces fumago* 形态生产过氧化物酶 (CPO), 添加 Al_2O_3 的粒径达到 $42\ \mu\text{m}$ 时候, 生物量和分散菌丝体量均显著增加, 酶产量的增加达 $1\ 000\ \text{U/mL}$ ^[52], 但是粒径超过 $500\ \mu\text{m}$ 时却对形态的影响不大。本课题组通过在合成培养基中添加适量的秸秆稀酸水解液, 成功地将米根霉形态控制成大小均一的球状; 推测与秸秆酸解液中的微粒子等组分有关^[53]。

4 结论与展望

丝状真菌发酵过程中的形态控制一直是研究的热点与难点; 生理学上的极性生长决定了其多细胞结构的复杂性。随着现代分子生物学的发展, 虽然在一定程度上从基因层面揭示了丝状真菌尖端延伸以及分支形成的生理学机理。但是,

由于丝状真菌形态发育受环境中多因素的影响,单纯从基因工程角度来控制丝状真菌的宏观形态仍然难以实现。在丝状真菌形态发育研究中,采用数学模型描述生长状态与环境及产物的关系,极大地丰富和发展了丝状真菌形态学,并在过程的描述、诊断与预测中发挥了重要的作用,基于形态生理学的数学模型展现了其强大功能。丝状真菌形态学在工程中的运用则提高了发酵产物的产量、产率以及生产强度。

以黑曲霉、青霉等为代表的聚集型真菌在形态发育动力学及形态控制与目标产量间的关联得到了较深入的研究,而以根霉为代表的孢子非聚集型真菌,由于形态发育存在多因素作用导致形态控制极其复杂,对这类真菌的发育动力学及结构化模型研究尚存在难度,是目前亟需解决的难题。

REFERENCES

- [1] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv*, 2004, 22(3): 189–259.
- [2] Du GC, Liu LM, Li Y, et al. Optimization of fermentation process for achieving high product concentration, high yield and high productivity. *Chem Ind Eng Prog*, 2006, 25(10): 1128–1133.
堵国成, 刘立明, 李寅, 等. 以高产量、高产率、高生产强度为目标的发酵过程优化技术. *化工进展*, 2006, 25(10): 1128–1133.
- [3] Wucherpennig T, Kiep KA, Driouch H, et al. Morphology and rheology in filamentous cultivations. *Adv Appl Microbiol*, 2010, 72: 89–136.
- [4] Krull R, Cordes C, Horn H, et al. Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Adv Biochem Eng Biot*, 2010, 121: 1–21.
- [5] Driouch H, Sommer B, Wittmann C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(6): 1058–1068.
- [6] Driouch H, Hänsch R, Wucherpennig T, et al. Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 109(2): 462–471.
- [7] Meyer V, Arentshorst M, Flitter SJ, et al. Reconstruction of signaling networks regulating fungal morphogenesis by transcriptomics. *Eukaryot Cell*, 2009, 8(11): 1677–1691.
- [8] Harris SD, Read ND, Roberson RW, et al. Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(2): 225–232.
- [9] Osiewacz HD. *Molecular Biology of Fungal Development*. Florida: CRC Press, 2002: 32–33.
- [10] Grosse C, Heinekamp T, Kniemeyer O, et al. Protein kinase A regulates growth, sporulation, and pigment formation in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(15): 4923–4934.
- [11] Knechtle P, Dietrich F, Philippsen P. Maximal polar growth potential depends on the polarisome component AgSpa2 in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Mol Biol Cell*, 2003, 14(10): 4140–4150.
- [12] Harris SD. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, 2008, 100(6): 823–831.
- [13] McIntyre M, Müller C, Dynesen J, et al. Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus*. *Metab Eng*, 2001, 73: 103–128.
- [14] Willaert RG, Baron GV, De Backer L. *Immobilised Living Cell Systems: Modeling and Experimental Methods*. New Jersey: John Wiley & Son Ltd Press, 1996: 58–60.
- [15] Spohr A, Carlsen M, Nielsen J, et al. Morphological characterization of recombinant strains of *Aspergillus oryzae* producing alpha-amylase during batch cultivations. *Biotechnol Lett*, 1997, 19(3):

- 257–262.
- [16] Tucker KG, Kelly T, Delgrazia P, et al. Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnol Progr*, 1992, 8(4): 353–359.
- [17] Christiansen T, Spohr AB, Nielsen J. On-line study of growth kinetics of single hyphae of *Aspergillus oryzae* in a flow-through cell. *Biotechnol Bioeng* 1999, 63(2): 147–153.
- [18] Grimm LH, Kelly S, Hengstlerb J, et al. Kinetic studies on the aggregation of *Aspergillus niger* conidia. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 87(2): 213–218.
- [19] Lejeune R, Baron GV. Simulation of growth of a filamentous fungus in 3 dimensions. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 53(2): 139–150.
- [20] Lejeune R, Baron GV. Modeling the exponential growth of filamentous fungi during batch cultivation. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 60(2): 169–179.
- [21] Liao W, Liu Y, Frear C, et al. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus-*Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technol*, 2007, 98(18): 3415–3423.
- [22] Paul GC, Priede MA, Thomas CR. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. *Biochem Eng J*, 1999, 3(2): 121–129.
- [23] Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, et al. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 59(6): 762–775.
- [24] Cui YQ, Ouwehand JNW, van Der Lans RGJM, et al. Aspects of the use of complex media for submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. *Enzyme Microb Technol*, 1998, 23(1/2): 168–177.
- [25] Hille A, Neu TR, Hempel DC, et al. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103(6): 1202–1213.
- [26] Rinas U, El-Enshasy H, Emmeler M, et al. Model-based prediction of substrate conversion and protein synthesis and excretion in recombinant *Aspergillus niger* biopellets. *Chem Eng Sci*, 2005, 60(10): 2729–2739.
- [27] Wanner O, Gujer W. A multispecies biofilm model. *Biotechnol Bioeng*, 1986, 28(3): 314–328.
- [28] Trinci APJ. The duplication cycle and vegetative development in moulds. *Filament Fungi*, 1978, 3: 132–163.
- [29] Nielsen J. A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnol Bioeng*, 1993, 41(7): 715–727.
- [30] Megee RD III, Kinoshita S, Fredrickson AG, et al. Differentiation and product formation in molds. *Biotechnol Bioeng*, 1970, 12(5): 771–801.
- [31] Paul GC, Thomas CR. A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 51(5): 558–572.
- [32] Birol G, Ündey C, Parulekar SJ, et al. A morphologically structured model for penicillin production. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77(5): 538–552.
- [33] Gupta K, Mishra PK, Srivastava P. A correlative evaluation of morphology and rheology of *Aspergillus terreus* during lovastatin fermentation. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2007, 12(2): 140–146.
- [34] Riley GL, Tucker KG, Pauln GC, et al. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 68(2): 160–172.
- [35] Petersen N, Stocks S, Gernaey KV. Multivariate models for prediction of rheological characteristics of filamentous fermentation broth from the size distribution. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 100(1): 61–71.
- [36] Tucker K, Thomas C. Effect of biomass concentration and morphology on the rheological parameters of *Penicillium chrysogenum* fermentation broths. *Food Bioprod Process*, 1993, 71(2): 111–117.
- [37] Paul GC, Thomas CR. Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Adv Biochem*

- Eng Biotechnol, 1998, 60: 1–59.
- [38] Maiti SK, Singh KP, Lantz AE, et al. Substrate uptake, phosphorus repression, and effect of seed culture on glycopeptide antibiotic production: process model development and experimental validation. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(1): 109–120.
- [39] Sang MN, Yuan GQ, Li HF, et al. Cephalosporin C fermentation performance under different ammonium sulfate and soybean oil feeding strategies. *Microbiol China*, 2011, 38(9): 1321–1330.
桑美纳, 袁国强, 李红飞, 等. 不同补料控制方式发酵生产头孢菌素 C 的性能比较. *微生物学通报*, 2011, 38(9): 1321–1330.
- [40] Liu Y, Liao W, Chen SL. Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(1): 117–128.
- [41] Nielsen J, Villadsen J. Modelling of microbial kinetics. *Chem Eng Sci*, 1992, 47(17/18): 4225–4270.
- [42] Xu Q, Gao Z, Fu YQ, et al. Morphology control of *Rhizopus oryzae* ME-F12 in fumaric acid production. *Chin J Bioproc Eng*, 2009, 7(2): 48–51.
徐晴, 高振, 付永前, 等. 米根霉 ME-F12 发酵产富马酸的菌体形态控制. *生物加工过程*, 2009, 7(2): 48–51.
- [43] Fu YQ, Xu Q, Li S, et al. A novel multi-stage preculture strategy of *Rhizopus oryzae* ME-F12 for fumaric acid production in a stirred-tank reactor. *World J Microb Biot*, 2009, 25(10): 1871–1876.
- [44] Metz B. From pulp to pellet[D]. Delft: Delft University of Technology, 1976.
- [45] Ayazi Shamlou P, Makagiansar HY, Ison AP, et al. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem Eng Sci*, 1994, 49(16): 2621–2631.
- [46] Cherry RS, Papoutsakis ET. Physical mechanisms of cell damage in microcarrier cell culture bioreactors. *Biotechnol Bioeng*, 1988, 32(8): 1001–1014.
- [47] Cui YQ, van der Lans R, Luyben KCAM. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 55(5): 715–726.
- [48] Cui YQ, Okkerse WJ, van der Lans RG, et al. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations. *Biotechnol Bioeng*, 1998, 60(2): 216–229.
- [49] Lin PJ, Scholz A, Krull R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. *Biochem Eng J*, 2010, 49(2): 213–220.
- [50] Kaup BA, Ehrich K, Pescheck M, et al. Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(3): 491–498.
- [51] Driouch H, Sommer B, Wittmann C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(6): 1058–1068.
- [52] Huang H, Li S, Xiong Q, et al. The way to control the morphology of filamentous fungi: CN, 102212484. 2011-05-05.
黄和, 李霜, 熊强, 等. 控制丝状真菌生长形态的方法: CN, 102212484. 2011-05-05.