

doi:10.3969/j.issn.1672-3678.2011.06.006

菌丝空泡形态比例与青霉素合成的关系

王辉¹, 桂芳¹, 王鹏¹, 刘会¹, 蔡晓春², 胡以华², 郑之明¹

(1. 中国科学院合肥物质科学研究院离子束生物工程重点实验室, 合肥 230031;
2. 解放军电子工程学院, 合肥 230037)

摘要:采用图像处理技术量化菌丝空泡区域比例,并研究菌丝空泡与青霉素合成的关系。结果表明:当空泡区域比例达到20%时,青霉素开始大量合成;当空泡比例达到30%~35%时,青霉素合成最为旺盛;当空泡区域比例超过40%时,青霉素效价下降。菌丝空泡的过度膨胀是发酵进入衰退期的重要标志。

关键词:空泡形态;图像处理;产黄青霉;青霉素

中图分类号:TQ465.1

文献标志码:A

文章编号:1672-3678(2011)06-0026-04

Production of penicillin from *P. chrysogenum* corresponding with proportions of hyphal vacuolization

WANG Hui¹, GUI Fang¹, WANG Peng¹, LIU Hui¹, CAI Xiaochun², HU Yihua², ZHENG Zhiming¹

(1. Key Laboratory of Ion Beam Bioengineering, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China; 2. Electronics Engineering Institute, Hefei 230037, China)

Abstract: An image analysis method was used to quantify hyphal vacuolization. The results showed that the production of penicillin started when proportion of vacuolated hyphae reached 20% and decreased once the proportion exceeded 40%. The highest yield was obtained when vacuolization occupied 30% to 35% of hyphae. Extensive fungal vacuoles showed decaying phase of fermentation.

Key words: hyphal vacuolization; image process; *P. chrysogenum*; penicillin

青霉素是一种重要的抗生素。目前,工业上主要利用产黄青霉发酵生产青霉素。作为次级代谢产物,青霉素合成的调控机制相对复杂^[1]。经过几十年的演变,传统的发酵调控手段显然已经无法进一步提高青霉素的产量。已有采用工程菌构建氧化还原酶系实现产物过表达的报道^[2],表明实现青霉素这种次级代谢物合成过程中的生物改造需要系统生物学的全局理念。大量工业实践也证明,发酵过程中产黄青霉的形态与青霉素合成具有很大的相关性。因此,基于形态发生的青霉素合成动力学研究显得尤为重要。

产黄青霉菌丝形态的改变包括菌丝生长、延伸以及断裂^[3-4]。Klionsky等^[5]研究了此过程中空泡的作用,空泡参与糖蛋白的翻转和水解、Ca²⁺的储存以及离子的动态平衡等。Richards等^[6]研究发现空泡还参与菌丝中营养成分的长距离运输,并且通过自噬的方式参与菌丝的衰老过程。

笔者采用图像处理方法定量分析菌丝形态变化,研究产黄青霉菌丝中空泡形态与青霉素合成之间的对应关系,将为进一步从分子层面理解形态与代谢的关系,构建优化菌株,以期青霉素发酵的

收稿日期:2011-04-06

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2009AA02z305)

作者简介:王辉(1987—),男,江苏连云港人,硕士研究生,研究方向:工业微生物;郑之明(联系人),研究员,E-mail:zmzheng@ipp.ac.cn

精确调控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌种

产黄青霉(*P. chrysogenum*) P-120-18-③, 华北制药公司提供。

1.2 培养基

种子培养基:蔗糖(20 g/L),玉米浆(67 g/L, 50%干质量)

发酵培养基:乳糖(130 g/L),玉米浆(46.5 g/L, 50%干质量), KH_2PO_4 (4 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.5 g/L),苯乙酸铵2滴/瓶,初始pH为5.8。

1.3 发酵流程

250 mL 摇瓶,25 ℃、转速220 r/min 下种子培养48 h,装量为50 mL;种子接入250 mL 发酵摇瓶,25 ℃、转速220 r/min 下培养,装量为30 mL。

每24 h 取样,染色并采集显微图像。根据国家药典规定,按碘量法测定效价。

上罐发酵:Bio KLF2000 小试发酵罐,3.7 L(瑞士比欧公司生产)。

1.4 染色步骤

1)取100 μL 发酵液,经48 μm 的网筛过滤冲洗,去除发酵液中有色杂质的干扰;2)滤后菌丝置于小离心管中,加生理盐水稀释至1 mL,吸取100 μL 均匀涂在载玻片;3)滴加200 μL 亚甲基蓝染色液,染色10 min;4)滴加100 μL 苯酚品红染色液,染色5 min;5)蒸馏水冲洗玻片,盖片观察。

1.5 图像处理

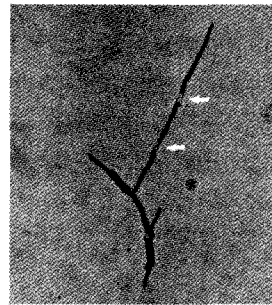
利用上述染色方法,可以使得处于不同生理活性状态的菌丝呈现不同的颜色。通过图像处理,就可以对菌体的生长状况有更清晰的认识。在对菌丝形态图像进行处理时,运用了伪彩色增强的处理方法^[7]。为了表征图像中“红绿蓝”三原色所占的比例,笔者引入了“灰度”的概念。经处理,特定的颜色就可以表示为一定范围的灰度值,此步骤称为二值化,至此得到黑白图像^[8]。计算机根据图像中不同的灰度值进行计算和判定,将4种不同的颜色自动加到黑白图像上,从而得到所需的伪彩色增强的图像。图像采集用Olympus TH4-200 显微成像系统;图像处理利用与解放军电子工程学院联合开发软件处理。

2 结果与讨论

2.1 染色样图及图像处理所得形态参数的计算

亚甲基蓝经活性线粒体氧化成为无色,因此可

以作为反映细胞活性的指示剂。为了区分同样呈无色的高活性和空泡区域,采用苯酚品红复染的方法。苯酚品红可将细胞质部分染成橙红色^[9]。复染的结果是:高活性区域主要呈现橘红色,随着活性的降低,颜色从紫色向蓝灰色渐变,且染色效果可保持1 h。经此染色方法处理的菌丝形态图像在相差显微镜下色差对比明显,因此低活性即空泡区域容易被识别,结果如图1所示。



(白色箭头所指为空泡区域)

图1 染色后菌丝图像($\times 400$)

Fig.1 Hypha of *P. chrysogenum* after staining($\times 400$)

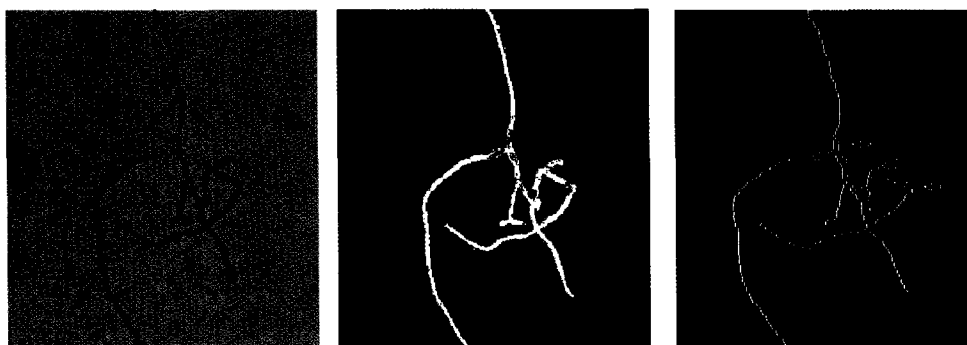
利用图像软件对菌丝显微照片进行二值化和伪彩色增强处理,得到新的菌丝图像一共包含4种颜色(图2),对应关系如下:黄色为顶端生长区域;绿色为亚顶端活性区域;蓝色为空泡区域;红色为低活性(死亡)区域。

从图2可以看出:菌丝的原始图像是放大400倍后所得,通过对二值化图像的分析,计算得到菌丝投影面积为728.52 μm^2 ,菌丝总长为369.70 μm ,平均直径为3.43 μm 。经软件统计,得到黄绿蓝红4个区域所占比例分别为16.58%、47.46%、29.07%和6.89%。在这4个区域中,主要研究空泡区域(蓝色部分)所占比例的变化。相关数据是对同一批菌丝采集的50张图片进行统计所得。

2.2 青霉素效价与空泡区域的关系研究

将测定的青霉素效价曲线与空泡区域所占比例随时间变化关系进行比较,结果如图3所示。

从图3可以看出:青霉素从发酵第3天开始大量合成,第6天达到效价最高值,随后合成量有所下降。而对于空泡区域所占比例而言,则一直呈上升趋势,第3天达到20%左右,至第6天大约占菌丝的37%左右。对此现象可能的解释是:菌丝空泡在丝状菌生长分化及细胞生理活动中起着重要作用。发酵起始时,培养基中营养充足,菌体主要进行初



注:从左至右为原始图像、二值化图像和伪彩色增强后的图像;第三幅图中白色箭头所指蓝色部分为空泡区域

图2 处理后的菌丝图像($\times 400$)

Fig.2 Main stages of image analysis($\times 400$)

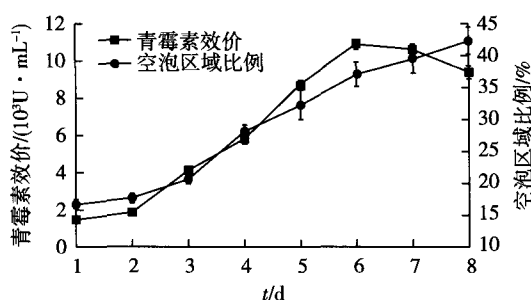


图3 青霉素效价及空泡比例随发酵时间变化的曲线

Fig.3 Curves of penicillin yields and vacuolization proportions (control group)

级代谢,菌丝顶端生长旺盛,分支大量产生,空泡比例有限;进入发酵第3、4天,菌体初级代谢基本完成,伴随着营养物质的大量消耗,菌丝空泡膨胀逐渐替代细胞质的生物合成。

为了验证青霉素合成与菌丝空泡比例之间是否存在一定的对应关系,又进行如下实验:发酵第3天调节发酵培养基的pH(前3天为菌体初级代谢旺盛期,之后开始次级代谢),此时对照组pH大约为6.5,通过滴加稀HCl和稀NaOH溶液分别调节pH为3和8。对这2组实验中青霉素效价和空泡比例对应关系进行比较,分别如图4(a)、4(b)所示。

将图4中结果与图3对照进行对比分析发现:改变发酵液的pH,菌丝形态和产物代谢状况都存在一定差异。发酵第3天将培养基pH调节为3后,青霉素最高效价低于对照组,空泡比例持续上升,但至发酵结束,最大比例不超过30%;调节pH为8,青霉素效价最高值在第5天就出现,仍低于对照组,此时空泡比例约37%,第6天起空泡比例继续上升至超过40%,青霉素效价降低明显。这表明pH的改变影响

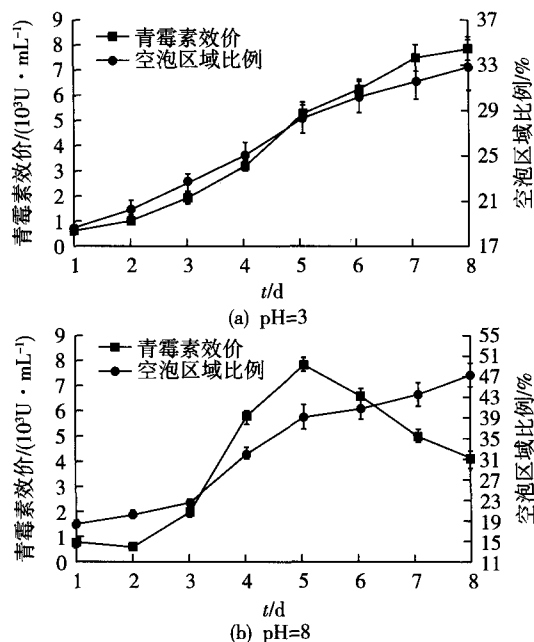


图4 不同pH条件下青霉素效价及空泡比例随发酵时间变化的曲线

Fig.4 Curves of penicillin yields and vacuolization proportions with pH at day 3

青霉素合成以及菌丝空泡比例的变化,同时表明青霉素效价与菌丝空泡比例之间存在对应关系。对于青霉素合成而言,一定比例的菌体异化,即空泡形态是十分必需和重要的。青霉素大量合成时,菌丝空泡比例为20%~40%。已有研究证实,一定比例空泡的存在一方面可以增大菌体接触基质的面积,另一方面可以减少顶端生长对于生物合成的需求,从而更好地满足次级代谢的需要^[10]。

在实验中,pH调低至3,菌体生长相比对照组呈现迟滞状态,生长相对缓慢,具体表现为空泡形

态出现和膨胀迟缓,所占比例增长缓慢,并且由于培养基中有效营养成分有限,最终可用于次级代谢的底物在初级代谢中消耗过多,青霉素最高效价低于对照组;与之相反,pH调高至8加速了菌丝衰老和断裂的过程,菌丝缩短加剧,空泡比例迅速增大,虽然青霉素效价可以较快地达到相对较高值,但是菌丝衰老引发的断裂和自溶现象又会使得产物合成迅速降低。这是因为到了发酵后期,培养基中有效成分消耗殆尽,空泡比例进一步增大至菌体细胞壁无法承受时,就会发生菌体自溶现象,意味着菌体进入衰老期。

采用相同培养基配方,在3.7 L发酵罐中进行实验(转速220 r/min,通气量4.8 L/min,装量2.5 L),结果如图5所示。

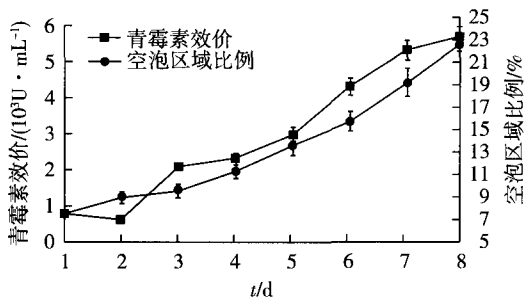


图5 3.7 L发酵罐中青霉素效价及空泡比例
随时间变化的曲线

Fig. 5 Curves of penicillin yields and vacuolization proportions fermented in 3.7 L bioreactor

由图5可知:当发酵环境由摇瓶改为3.7 L发酵罐后,相对对照组而言,菌丝空泡区域比例增加缓慢,到发酵结束也仅有25%左右,与之相对应的是青霉素合成也很少。这表明发酵环境改变也对产物合成和菌丝空泡产生影响,并且在菌丝空泡比例较低的情况下,青霉素合成有限,从侧面说明当菌丝空泡达到一定比例时,青霉素才会大量合成。

3 结论

青霉素合成与菌丝空泡比例关系密切。当空泡区域所占比例达到20%时,青霉素开始大量合成。

而当此比例上升至30%~35%时,产物代谢到达顶峰。一旦空泡区域所占比例超过40%,也就意味着菌体衰退的到来,伴随着菌丝自溶现象的出现,产物合成明显下降。通过小罐发酵与摇瓶对照的结果发现,罐中菌丝空泡比例增长缓慢,最大值不超过25%,与之相对应的是青霉素效价水平也很低,同样验证了一定的空泡比例对于青霉素合成的重要性。

参考文献:

- [1] Paul G C, Thomas C R. A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 51(15): 195-197.
- [2] Theilgaard H, van den Berg M, Mulder C, et al. Quantitative analysis of *Penicillium chrysogenum* Wis54-1255 transformants overexpressing the penicillin biosynthetic genes [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72(4): 379-388.
- [3] Tucker K G, Thomas C R. Effect of biomass concentration and morphology on the rheological parameters of *Penicillium chrysogenum* fermentations broths [J]. *Trans IChem E*, 1993, 71: 111-117.
- [4] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes [J]. *Biotechnol Adv*, 2004, 22(3): 189-259.
- [5] Klionsky D J, Herman P K, Emr S D. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis [J]. *Microbiol Rev*, 1990, 54(3): 266-292.
- [6] Richards A, Veses V, Gow N A R. Vacuoles dynamics in fungi [J]. *Fungal Biology Reviews*, 2010, 24(3/4): 93-105.
- [7] Tucker K G, Kelly T, Delgrazia, et al. Fully-automated measurement of mycelial morphology by image analysis [J]. *Biotechnol Prog*, 1992, 8(4): 353-359.
- [8] Vanhoutte B, Pons M N, Louvel L, et al. Characterization of *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 48(1): 1-11.
- [9] Conn H J. Staining procedures [M]. 4th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1981.
- [10] Veses V, Richards A, Gow N A. Vacuoles and fungal biology [J]. *Cur Opin Microbiol*, 2008, 11(6): 503-510.