

菌丝形态分化与头孢菌素 C 合成的关系*

万 平¹ 冀志霞¹ 储 炬^{1**} 庄英萍¹ 张嗣良¹

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)¹

(浙江海正药业股份有限公司 台州 318000)²

摘要: 利用显微图像分析法对顶头孢霉菌的菌丝形态进行了定量研究, 并统计分析了头孢菌素 C 发酵过程中的菌丝形态的变化规律, 具体对菌丝长度、菌丝宽度和菌丝生长单位进行了定量分析, 分析了菌丝形态分化与头孢菌素 C 合成的关系。研究表明头孢菌素 C 的合成是在细长菌丝分化成膨大菌丝片段后才启动的, 头孢菌素 C 可能主要是在膨大菌丝分化成节孢子的过程中被合成。

关键词: 顶头孢霉菌, 图像分析, 菌丝形态分化, 菌丝生长单位, 头孢菌素 C

中图分类号: TQ920.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 01-0015-07

A Relationship Between Cephalosporin C Synthesis and Morphological Differentiation by *Cephalosporium acremonium*

WAN Ping¹ JI Zhi-Xia¹ CHU Ju^{1*} ZHUANG Ying-Ping¹ ZHANG Si-Liang¹

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, ECUST, Shanghai 200237)¹

(Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co. Ltd., Taizhou 318000)²

Abstract: The morphologies of *Cephalosporium acremonium* were quantitatively analysed by bio-image analysis. The variations of the cell morphologies during cephalosporin C fermentation were studied statistically. In particular, the parameters representing the mycelia growth, such as total hyphal length, hyphal width, mean hyphal growth unit, were quantitatively analysed, and the relationship between cephalosporin C synthesis and morphological differentiation was investigated systematically. The cephalosporin C synthesis was initiated when morphological differentiation from filamentous hyphae into highly swollen hyphal fragments was happened. Further more, cephalosporin C was mainly produced during the process of making highly swollen hyphal fragments into conidias.

Key words: *Cephalosporium acremonium*, Image analysis, Morphological differentiation, Mean hyphal growth unit, Cephalosporin C

由于顶头孢霉菌的形态分化似乎与 β -内酰胺抗生素产生有关, 故一些学者曾对此作过研究。Nash 和 Huber^[1] 报道, 在合成培养基中顶头孢霉菌在发酵过程中有 4 个不同的菌丝形态: 菌丝, 膨大的菌丝片段 (粗、短), 节孢子和出芽节孢子; 富集的断裂菌丝是产生头孢菌素 C 最有效的形态。Matsumura 等^[2] 报道, 顶头孢霉菌的菌丝形态对产量的影响很大。而菌丝形态又与培养液中葡萄糖和蛋氨酸浓度有关。菌丝体同化葡萄糖和蛋氨酸, 分化成具有高生产能力的膨大菌丝片段, 而葡萄糖缺乏时, 膨大菌丝片段则形成节孢子。

本文通过分析拍摄下来的菌丝图片, 对菌丝形态特征进行定量分析, 并分析其变

* 上海市科委重点科技攻关项目 (No. 034319220)

作者还有: 罗家立² 白 骅²

** 联系人 E-mail: juchu@ecust.edu.cn

收稿日期: 2004-03-05, 修回日期: 2004-04-23

化规律以及菌丝分化与头孢菌素 C 合成的关系。

1 材料与方法

1.1 菌种

菌种：顶头孢霉菌 (*Cephalosporium acremonium*) 由浙江海正药业股份有限公司提供。

1.2 培养基

斜面培养基：麦芽汁 12g，蛋白胨 12g，琼脂 22g，定容至 1L；消前 pH 为 7.0；

种子培养基：玉米浆 30g，乙酸胺 4g，蔗糖 20g，DL-蛋氨酸 0.2g， CaCO_3 0.5g，定容至 1L；消前 pH 为 6.5；

发酵培养基：玉米浆 70g，淀粉 40g， α -淀粉酶 0.3g，豆油 10g，DL-蛋氨酸 2.0g， KH_2PO_4 4g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8.0g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g， CaCO_3 10g，定容至 1L；消前 pH 为 6.2。

1.3 培养方法

由试管斜面采用挖块法接入种子培养基，置回转式摇床（偏心距 5cm）220r/min，28℃ 培养 88h，按 20% 接种量接入发酵罐，28℃ 发酵培养，40h 后温度控制在 25℃，继续培养至 132h 放罐。

1.4 分析方法

1.4.1 还原糖测定方法：斐林试剂法^[3]。

1.4.2 总糖测定方法：斐林试剂法^[3]。

1.4.3 氨氮测定方法：凯氏定氮法^[3]。

1.4.4 菌体浓度的测定：PMV 法：转速 3,000r/min，时间 20min。

1.4.5 头孢菌素 C 的测定（CPC-Na 盐 HPLC 测定方法）：流动相：ODS C_{18} 分析柱，200 mm × 4.6 mm i. d.，20 mmol/L 醋酸铵缓冲液（pH5.6）： CH_3CN （V:V）= 94:6，流量：1.0mL/min，紫外检测，波长：254nm，室温，进样量 20 μL 。

1.4.6 菌丝图像参数分析：（1）系统结构及工作原理：发酵液经一定稀释后，染色并固定在载玻片上。顶头孢霉菌显微图像经显微镜放大，经 CCD 摄象机转化为视频信号，经图像采集卡输入计算机中形成数字图像。用图像分析软件分析菌丝的显微图像，可获得顶头孢霉菌的形态特征。（2）显微图像处理过程：原始图像经图像优化后，选定一个灰度阈值分割图像获得二值图（黑白图），二值图中菌丝（也包括菌丝碎片和一些杂质）为黑色，背景为白色。经过分割联菌、填空等处理后，由程序自动计算菌丝形态参数。（3）菌丝参数：（a）菌丝片段长度（lengths）；（b）菌丝片段直径（widths）：widths = 菌丝面积/菌丝长度；（c）菌丝生长单位（G）：G = 菌丝总长度/菌丝尖分支数目^[4]。（4）图像采集与分析：图像采集用 SmartScape2000 系统（上海复日公司）。图像分析软件为华东理工大学国家生化工程技术研究中心（上海）自主开发。

2 结果与讨论

2.1 菌丝形态的变化规律

在头孢菌素 C 发酵中，顶头孢霉菌的菌丝形态明显地被分为 4 个时期：菌丝；高度膨大的菌丝片段、中度膨大的菌丝片段；节孢子；出芽孢子。

菌丝被定义成瘦长的细长菌丝（直径一般不超过 $1\mu\text{m}$ ）（图 1A）。随着培养时间的进行，菌丝突然膨大，并断节。根据膨大的程度，菌丝片段分别被分为中度和高度膨大菌丝片段。中度的膨大菌丝片段一般包括一些小的、椭圆或杆状的细胞（图 1B），它的直径从 $2\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ ；相反高度膨大的菌丝片段一般包括一些大的、圆的细胞（图 1C），它的直径从 $5\mu\text{m} \sim 8\mu\text{m}$ 。节孢子被分二类：一类大的球形节孢子（图 1D），它的直径从 $5\mu\text{m} \sim 8\mu\text{m}$ ；一类较小的椭圆球节孢子（图 1E），它的直径从 $2\mu\text{m} \sim 5\mu\text{m}$ ；在发酵末期，出现出芽孢子（图 1F）。

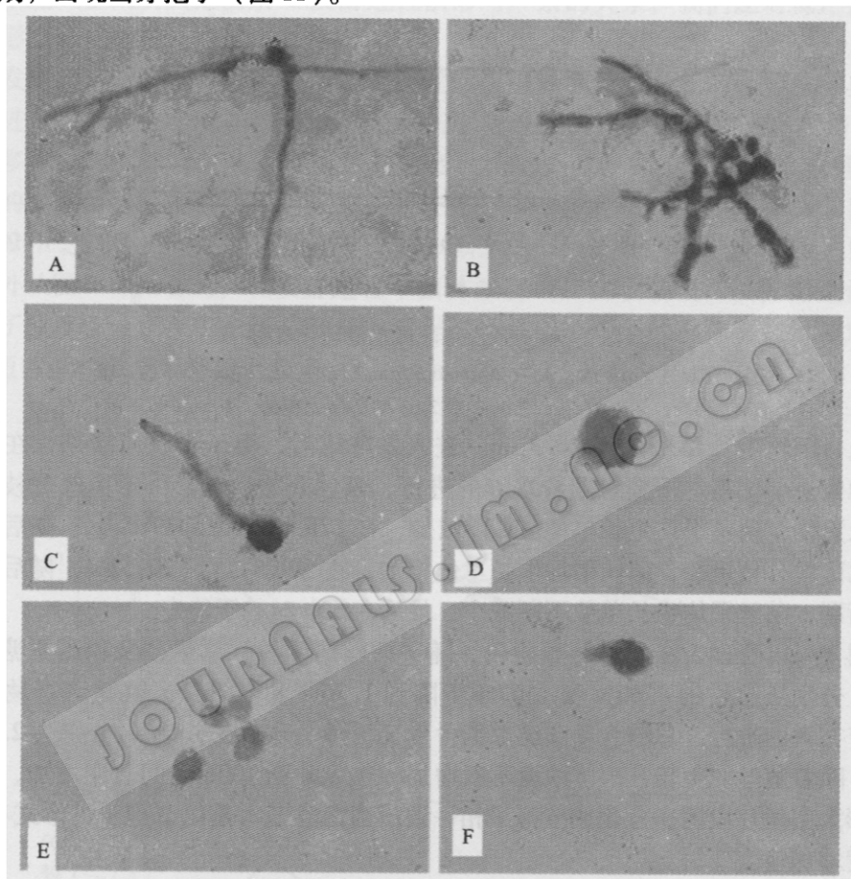


图 1 发酵过程菌丝形态图

A 细长菌丝, B 中度膨大菌丝片断, C 高度膨大菌丝片断, D 大的球形节孢子,
E 小的椭圆球节孢子, F 出芽孢子

2.2 高产头孢菌素 C 的菌丝形态分化规律

我们统计了高产发酵罐批的不同菌丝形态分布规律。

在发酵的开始阶段，占优势地位的菌丝形态是具有分枝、瘦长的菌丝。随着培养过程的进行，菌丝长度增加，菌丝膨大成高度或中度的膨大菌丝片段。据文献报道，蛋氨酸可以促进形成膨大、不规则、高度断裂的菌丝^[5,6]。图 2 结果表明在培养到 46h 时，大多数长的、膨大菌丝断开成短的、膨大菌丝。随着长的膨大菌丝数量的下降，短的膨大菌丝数量上升，节孢子的数量也上升。在培养到 100h 时，菌丝基本是以节孢子的形式存在。

菌丝早期的分枝状况可以用菌丝生长单位（G）来表征。从种子罐移入的菌丝已经

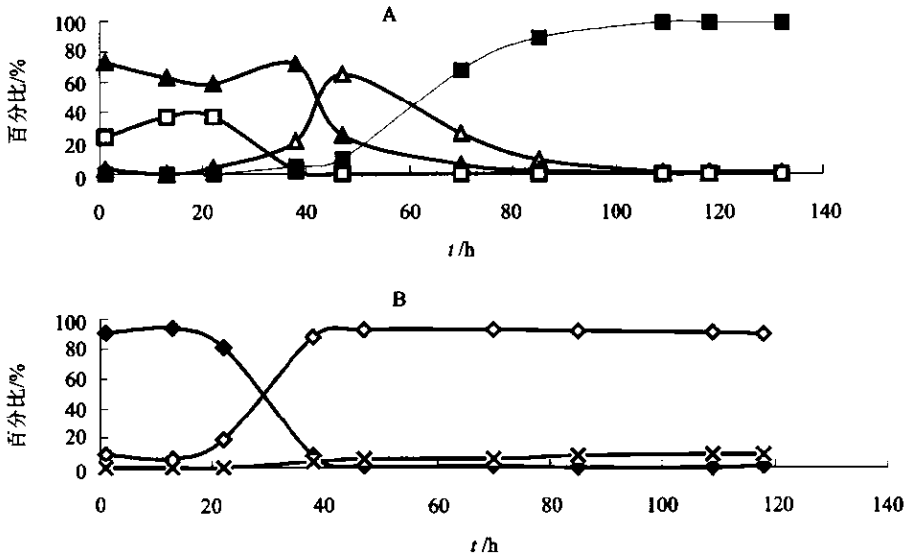


图2 高产批次菌丝形态定量分布图

长度 (A) : \square 超过 50 μm 的, \blacktriangle 在 20 μm 到 50 μm 之间的, \triangle 20 μm 以下的, \blacksquare 节孢子
直径 (B) : \times 超过 5 μm 的, \diamond 在 2 μm 到 5 μm 之间的, \blacklozenge 2 μm 以下的

充分生长, 菌丝生长单位达到 26.3 μm 。进入发酵罐后, 由于存在停滞期, 在 8h 前, 菌丝平均生长单位基本不变。随着培养的进行, 菌丝开始生长, 由于菌丝分枝速度比菌丝伸长更快, 菌丝平均生长单位 (G) 减少, 在 17h 时降低到 17.2 μm ; 随后由于菌丝生长比菌丝分枝更快, 菌丝平均生长单位增加, 在 30h 时达到 20.5 μm ; 随后由于菌丝膨大断裂, 菌丝平均生长单位不断减少, 最后在 65h 时趋于稳定。

从图 3 可以看出, 在发酵开始阶段, 随着菌丝的生长, 总糖含量和还原糖含量不断下降, 分别从起始的 4.60% 和 1.67% 下降到 1.26% 和 0.28%。在进入产物合成期后, 随着补料的进行, 总糖含量和还原糖含量又缓慢上升, 在 132h 时分别为 2.28% 和 1.57%。随着菌丝的生长, 菌体浓度不断增加, 在 40h 到 100h 之间急剧增加, 这与这段时间膨大菌丝片段迅速分化成节孢子相一致。当菌丝基本是以节孢子的形式存在后, 菌体浓度增加速度变缓。

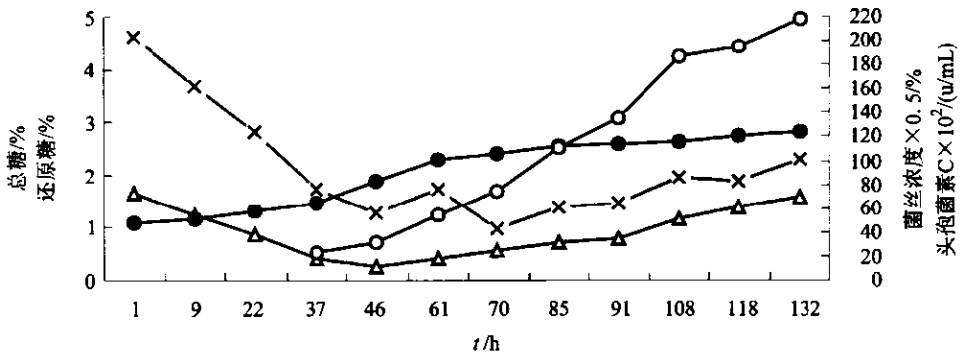


图3 高产批次代谢曲线

\times 总糖, \triangle 还原糖, \bullet 菌丝浓度, \circ 头孢菌素 C

在生长期只有很小部分的头孢菌素 C 被合成。大概在 46h 时, 随着培养基中的还原糖被耗尽, 头孢菌素 C 合成明显加快。60h 到 110h 是头孢菌素 C 合成的高峰期, 70% 以上的头孢菌素 C 在这个阶段被合成。培养到 110h 产素速率迅速下降; 120h 后产素速率又有所上升, 但总的来说, 在膨大菌丝完全分化成节孢子后, 产素能力下降了。培养 132h 放罐, 放罐单位为 21, 800u/mL。

2.3 低产头孢菌素 C 菌丝形态分化规律

为了进一步阐明头孢菌素 C 发酵过程菌形与产素的关系, 我们还对低产发酵罐批的菌丝形态分化规律进行了研究 (图 4)。

在发酵的开始阶段, 占优势地位的菌丝形态是具有分枝、长的、瘦的菌丝。随着培养的进行, 菌丝长度增加, 菌丝膨大成高度或中度的膨大菌丝片段。在培养到 37h 时, 大多数长的、膨大菌丝断开成短的、膨大菌丝; 随着长的膨大菌丝数量的下降, 中、短的膨大菌丝数量上升, 但节孢子的数量上升比较缓慢, 将近 90% 的节孢子是在 50h 到 120h 之间内产生的, 而高产批次 90% 以上的节孢子是在 50h 到 100h 之间内产生的。另外从图 5 可以看到, 在发酵过程中菌体浓度增加比较缓慢, 从侧面也说明了形成节孢子速度较慢。在培养到 120h 时, 菌丝基本是以节孢子的形式存在。随后节孢子发芽, 短菌丝的数量又开始上升。

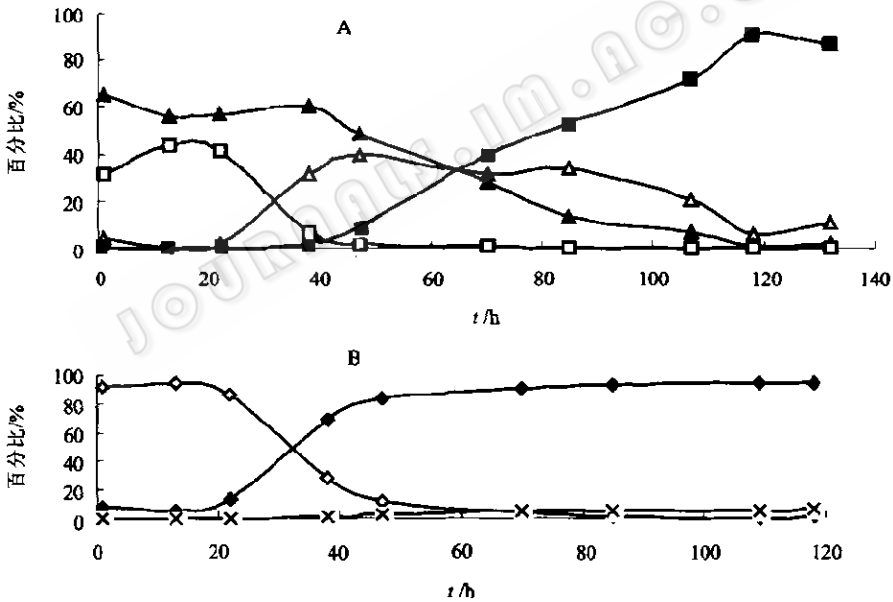


图 4 低产批次菌丝形态定量分布图

长度 (A): □ 超过 50μm 的, ▲ 在 20μm 到 50μm 之间的, △ 20μm 以下的, ■ 节孢子
直径 (B): × 超过 5μm 的, ◇ 在 2μm 到 5μm 之间的, ◆ 2μm 以下的

低产批次菌丝生长单位变化趋势与高产批次的基本相同。从种子罐移入的菌丝已经充分生长, 菌丝生长单位达到 27.8μm。进入发酵罐后, 由于菌丝生长缓慢, 菌丝分枝较少, 菌丝平均生长单位 (G) 下降缓慢, 在 22h 时才降低到 24.2μm; 随后由于菌丝生长比菌丝分枝更快, 菌丝平均生长单位增加, 在 30h 时达到 25μm; 随后由于菌丝膨大断裂, 菌丝平均生长单位不断减少, 但下降的幅度远远低于高产批次的, 最后在

80h 时趋于稳定。

从图 5 可以看出, 在进入产物合成期的前 15h, 由于部分菌体还在生长, 产素速率很低, 在 60h 后头孢菌素 C 合成明显加快。60h 到 110h 是头孢菌素 C 合成的高峰期, 但产素速率不是很高; 110h 后产素基本停止。培养 132h 放罐, 放罐单位为 12.320u/mL。

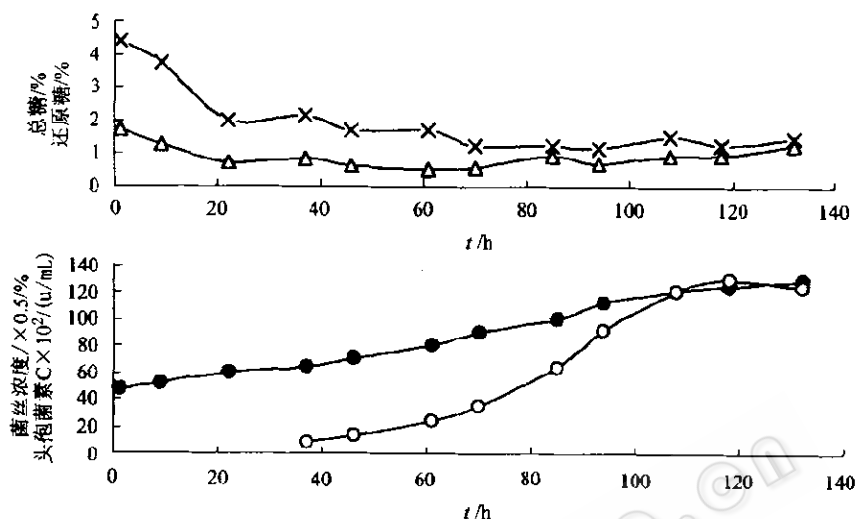


图 5 低产批次代谢曲线

× 总糖, Δ 还原糖, ● 菌丝浓度, ○ 头孢菌素 C

2.4 讨论

为了澄清头孢菌素 C 合成与菌丝形态分化的关系, 我们研究了整个发酵过程中的顶头孢霉菌的菌丝形态的分布, 以及高产批次与低产批次之间的菌丝形态和代谢上的差异。

在生长期, 菌丝的直径主要处在 $20\mu\text{m}$ ~ $80\mu\text{m}$ 之间。虽然在生长中后期长的、膨大的菌丝占大部分, 但只有小部分头孢菌素 C 被合成; 这可能是由于葡萄糖的分解代谢阻遏作用造成的, 也就是说培养基中的高浓度葡萄糖抑制了头孢菌素 C 的合成。从这点上看, 头孢菌素 C 主要不是在细长菌丝膨大的过程被合成, 这个结果与 Matsumura 等所得出的结论一致。

在产素期, 大部分的节孢子是在 50h 到 100h 的这段时间形成的, 而 60h 到 110h 是头孢菌素 C 合成的高峰期; 在膨大菌丝完全分化成节孢子后, 产素速率明显下降。根据以上结果我们可以推测, 头孢菌素 C 的合成可能主要在膨大菌丝分化成节孢子的过程中被完成, 而不是在节孢子形成后被合成。

另外菌丝生长单位也可以看到, 高产批次在菌丝膨大断开后, 迅速进入产物合成期, 膨大菌丝不断断开, 菌丝平均生长单位不断减少; 而低产批次菌丝膨大断开后, 菌丝仍然存在生长, 产物合成期被推迟, 菌丝平均生长单位下降缓慢。

Matsumura 等人认为膨大菌丝片段是最具有生产能力的菌丝形态, 但是我们的实验结果表明只满足这个条件并不一定高产。从图 4、图 5 可以看到, 虽然发酵液中存在大量的膨大菌丝片段, 但产量不高。通过对高产批次与低产批次的菌丝形态和代谢的比较发现, 膨大菌丝转化成节孢子的速度成为高产的关键。高产批次培养到 40h 后, 长的膨大菌丝迅速转化为长度不超过 $20\mu\text{m}$ 粗短菌丝, 并转化为节孢子, 菌体浓度急剧增

加, 形成头孢菌素 C 合成的高峰期, 发酵单位较高; 而低产批次, 长的膨大菌丝转化为粗短菌丝的时间被拉长, 节孢子形成速度缓慢, 菌体浓度逐步增加, 头孢菌素 C 合成的高峰期被缩短, 单位不高。所以在培养过程中, 为了得到好的结果, 不但要有大量的膨大菌丝, 还要提供膨大菌丝能迅速转化成节孢子的各种条件, 也就是说要提供各种条件使菌体能迅速从生长期转入产物合成期。

根据我们对该生产菌株特性的研究发现, 头孢菌素 C 的生物合成, 除了种子质量外, 还受很多其它因素的影响, 如移种、培养基成分、温度、pH 值、DO、剪切力和补料方式、葡萄糖、甲硫氨酸、氮氮值、微量金属离子浓度等。其中大部分影响因素又是通过对菌丝形态分化的影响来决定头孢菌素 C 的效价。

3 结论

通过对整个发酵过程的菌丝形态的分析发现, 头孢菌素 C 合成的过程实际就是一个菌丝形态不断分化的过程, 也是一个共生到自生的过程。头孢菌素 C 的合成是菌体由共生转化到自生的过程中众多变化的一种, 也就是说, 头孢菌素 C 的合成是建立在菌体形态分化的基础上的。膨大菌丝是细长菌丝转化为节孢子的一种过渡菌丝形态。膨大菌丝转化为节孢子可能是头孢菌素 C 的合成主要时期。在保证一定的菌浓后, 膨大菌丝迅速转化为节孢子, 可能更有利于头孢菌素 C 的合成。

参考文献

- [1] Nash C H, Huber F M. *Appl Microbiol*, 1971, **22** (1): 6 ~ 10.
- [2] Matsumura M, Imanaka T, Yoshida T, *et al.* *J Ferm Tech*, 1981, **59** (2): 115 ~ 123.
- [3] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导. 北京: 人民教育出版社, 1980. 24 ~ 27.
- [4] 储 炬, 李友荣. 现代工业发酵调控学. 北京: 化学工业出版社, 2002. 46.
- [5] 廖福荣. 国外医药抗生素分册, 1998, **19** (4): 241 ~ 243.
- [6] 廖福荣. 国外医药抗生素分册, 2000, **21** (6): 255 ~ 257.