

基于宏微观结合的甾体微生物羟化 反应中菌体形态的表征

李晓静^{1*} 嵇赞喆¹ 阳葵²

(1. 海军工程大学天津校区 天津 300450)

(2. 天津大学 理学院 天津 300072)

摘要: 为考察生长调节剂对甾体微生物转化过程中菌体生长状况的影响, 利用沉降密度宏观定量表征菌体的形态和扫描电镜微观观测菌体形态相结合的方法, 描述了生长过程中菌体形态的变化。结果表明: 与未加调节剂的空白体系对照, 加调节剂体系菌体在各个生长时期均呈现出较小的沉降密度。通过 SEM 图像可以明显看出加调节剂体系菌体表面光滑, 长势丰满、挺拔, 生长状况优良。两种方法均表明调节剂的加入明显促进了菌体的生长。

关键词: 生长调节剂, 沉降密度, 形态分析, 甾体微生物转化, 丝状微生物

Characterization of fungal morphology based on the combination of macroscopic and microscopic view in steroid microbial hydroxylation

LI Xiao-Jing^{1*} JI Yun-Zhe¹ YANG Kui²

(1. Naval University of Engineering Tianjin Campus, Tianjin 300450, China)

(2. School of Science, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: To research the effects of growth regulator on the status of mycelia growth during steroid biotransformation, morphology of filamentous microorganisms was characterized in combination with both sedimentary density method in macroscopic view, and using Scanning Electron Microscope (SEM) method in microscopic view during the whole strain growth phases. The results showed that in comparison with strain growing without adding growth regulator, the strains growing, which was added growth regulator, showed relatively lower sedimentation densities during all different stages than the one not added. Through SEM, it can be clearly seen that the bacteria with the regulator presents better conditions such as smooth surfaces, rounded plump as well as excellent shapes. Both methods prove adding regulator are able to promote the exuberant growth of the bacteria.

Keywords: Growth regulator, Sedimentary density, Morphology analysis, Steroid biotransformation, Filamentous microorganisms

微生物的形态与产率间并没有直接联系,但由于形态影响培养基的流变性,从而影响反应体系的传质、传热及通气能力,进而波及菌体生长及甾体转化,最终影响转化率。同时由于形态具有可观测性,所以关于微生物形态的研究一直是微生物反应体系研究的焦点^[1]。真菌的形态通常分为两大类:松散菌丝体和密实弹丸^[2]。不同的形态对培养基的流变性具有不同的影响,如菌丝体呈弹丸形态时,培养基呈较低的粘度;菌丝体呈分散形态并大量生长时,培养基粘度较高^[3]。菌体形态包括表观形态、生长密实度和抗拉强度等多方面。直接观测法是最传统的形态分析方法,包括肉眼观察和显微镜观察。作为人类视力的补充,显微镜成为研究微生物形态构造的一项非常有效的手段。但无论是光学或电子显微镜图像,传统的观测与分析主要靠视觉,凭经验,获取的信息量有限且难以量化。

在我们前期的研究工作中考察了生长调节剂对甾体微生物转化反应体系中菌体生长的影响^[3]。实际上,在微生物生长过程中,不仅菌体量、发酵液 pH、菌体酶活等特征显示明显的变化规律,菌体的形态特征也会随着生长的进行产生显著的变化。因此广义而言,有效描述菌体生长状况的生长曲线不仅应包括菌体量、发酵液 pH、菌体酶活曲线,还应包括菌体形态曲线。但简单、有效、实用的菌体形态量化表征尚待探讨。本文将尝试用沉降密度(菌体干重与沉降体积的比值)宏观定量表征菌体的形态和扫描电镜微观观测菌体形态相结合的方法来描述生长过程中菌体形态的变化。

1 材料与仪器

实验所用的材料和仪器:黑根酶,天津药业有限公司;16 α ,17 α -环氧黄体酮(16 α ,17 α -epoxy-4-pregnene-3,20-dione),天津药业公司;生长调节剂,自行研制的 WSTJ-I 型极性生长激素,主要配方是硝基酚钠类一元酚的复合物;HZS-D 型水浴振荡器,哈尔滨市东联技术开发有限公司;X-650 扫描电镜,

日本日立公司;PHS-2 型酸度计,上海第二分析仪器厂;乌氏粘度计,自制;沉降筒,自制。

2 实验方法

2.1 菌体干重测定

抽滤摇瓶发酵液;将滤饼在 95 °C 下烘干至恒重,精确称量。

2.2 培养基粘度的测定

取处于不同生长时期的摇瓶培养基溶液,用比重瓶测定 27 °C 下培养基密度;取适量培养基溶液于乌氏粘度剂中,27 °C 恒温 20 min;测定培养基粘度。

2.3 菌体 SEM 样品的制备

取材——漂洗(生理盐水)——固定(3%戊二醛 2 h 以上)——漂洗(0.1 mol/L 磷酸缓冲液,3 次,45 min)——后固定(1%锇酸,2 h)——酒精脱水(50%、70%、80%、90%、95%各 15 min,换醋酸异戊酯 15 min 或叔丁醇 15 min)——干燥(零界点干燥或冷冻干燥)——镀膜(真空镀膜仪或离子溅射仪)。

2.4 菌体沉降体积的测定^[4]

选择一个内径均匀,内壁光滑并带有刻度的长筒作为沉降筒,做一个外壁光滑外径与沉降筒内径相吻合的活塞并准确称重;选择一定质量范围的砝码分别置于活塞上,根据活塞的截面积,计算活塞与不同质量砝码相配合产生的序列压强值;选择不同培养时期的菌液,将其缓慢置于沉降筒中;将载有砝码的活塞轻轻放入沉降筒,记录沉降体积。

2.5 发酵实验

发酵实验及转化率分析具体步骤见参考文献[5-7]。

3 结果与讨论

3.1 沉降压强的选择

沉降实验示意图如图 1 所示。分析沉降实验中活塞的受力:活塞所受的向上的力有培养基对活塞的浮力、菌体对活塞的支撑力和活塞外壁与沉降筒

内壁的摩擦力; 向下的力为活塞自身的重力。其中活塞所受的重力和浮力是恒定的, 而活塞与沉降筒之间的摩擦力也可看作一个定值或可忽略不计(活塞外壁和沉降筒内壁均很光滑), 因此在整个沉降过程中, 菌体支撑力的变化控制活塞的运动状态直至沉降平衡。沉降平衡时菌体的体积为沉降体积。单位沉降体积内的菌体干重为沉降密度。

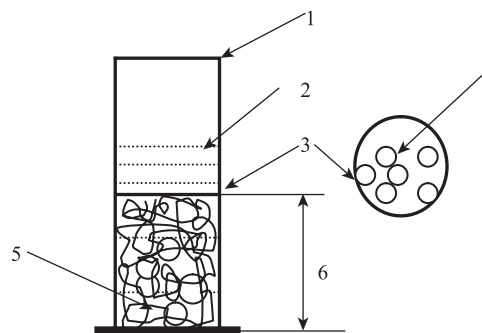


图1 菌体沉降实验示意图

Fig. 1 Mycelial sedimentation experiment

Note: 1: Sedimentary container; 2: Culture; 3: Piston; 4: Hole; 5: Mycelium; 6: Sedimentary volume.

沉降压强的选择非常必要。如果沉降压强过大, 菌体形态易发生变形甚至遭到破坏; 如果沉降压强太小, 达到沉降平衡所需的时间过长, 导致菌体生长及其它理化参数的改变。为此我们自制了能产生图2所示4种沉降压强的活塞用于沉降实验。综合考虑达到平衡所需的时间及沉降体积在单位时间的变化率, 选定 27.95 N/m^2 为最适于该体系沉降体积测定的沉降压强。以下沉降实验将在该压强下测定。

3.2 沉降密度的计算及菌体生长与形态的分析

由沉降密度的计算公式(沉降密度=菌体干重/沉降体积)可以看出: 对相同形态的菌体来说, 沉降密度值越小, 说明单位体积的菌体量越小, 反映了单位质量的菌体所具有的支撑力越大。但沉降密度的大小不仅与菌体生长的旺盛程度有关, 还与菌体的形态有关。对于霉菌而言, 其形态有自由菌丝体和弹丸(粗糙弹丸和光滑弹丸)两种^[2,8]。自由菌丝体由于具有多分枝, 单位菌体量可表现出较强劲的支撑力和较大的沉降体积; 而弹丸的形成是由于

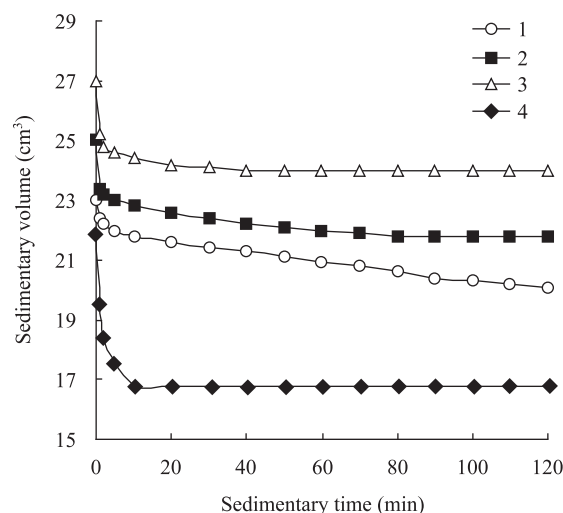


图2 沉降压强的选择

Fig. 2 Selectivity of sedimentary pressure

Note: 1: 18.78 N/m^2 ; 2: 22.76 N/m^2 ; 3: 27.95 N/m^2 ; 4: 36.37 N/m^2 .

菌丝相互交缠及剪切力对外沿毛发的削减所致, 由此单位菌体量常表现出较弱的支撑力和较小的沉降体积。因此通过研究微生物生长过程中沉降密度的变化, 可以宏观定量地反映菌体生长状况和形态的变化。

沉降密度的计算结果如图3所示, 其中调节剂种类与浓度依照前期工作筛选出的适合菌体转化的最佳配比调节剂添加^[3]。由此可见: (1) 在菌体生长全过程中, 加调节剂体系和空白对照体系的沉降密度变化呈现相似的变化趋势, 在生长初期沉降密度呈递增趋势, 生长至约22 h时, 沉降密度达最大值, 之后呈现递减趋势, 表明两体系中菌体形态的变化规律基本一致。(2) 菌体生长初期沉降密度较小, 这是因为生长初期的菌体主要呈自由菌丝状态, 即使形成弹丸, 初期形成的弹丸在结构上也比较疏松。随着生长的进行, 自由菌丝交织缠绕逐渐形成密实的弹丸, 导致单位干重菌体的沉降体积降低、沉降密度增大。当生长至22 h左右时, 菌体生长接近对数生长后期, 由于弹丸的致密程度接近最大, 沉降密度也达到了最大值。随后, 菌体生长经对数期进入了稳定期, 经对数期营养物质大量消耗及代谢产物的积累导致发酵环境的恶化, 使弹丸核心由于氧和营养物质供应不足而产生部分自溶和弹丸破裂的

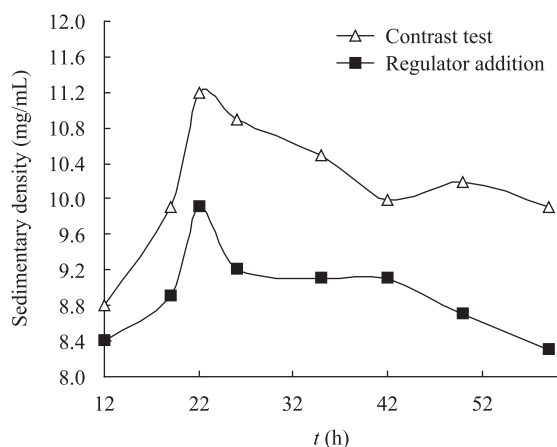


图3 沉降密度曲线

Fig. 3 Time courses of sedimentary density

现象, 发酵液中自由菌丝的量相应增多, 导致单位干重菌体的沉降体积增加, 沉降密度减小。以上分析表明, 沉降密度可以较好地定量表征霉菌培养过程中菌体形态随菌体生长过程的递变规律。(3) 在菌体生长的全过程中, 加调节剂体系的沉降密度均低于空白对照体系。在两种体系中, 菌体生长至某一阶段时其形态大体相似。对于具有相同形态的菌丝体而言, 沉降密度值越小, 说明单位质干重的菌丝体具有的支撑力越大, 表明菌体生长越旺盛。与未加调节剂的空白体系对照, 加调节剂体系菌体在各个生长时期均呈现出较大的菌体量和较小的沉降密度, 表明该最佳浓度、最佳配比调节剂的加入明显地促进了菌体的旺盛生长。

图4为菌体生长22 h时的弹丸形态菌丝体扫描电镜图像, 更直观地反映了调节剂的加入对菌体的生长状况的影响。对比在加入最佳浓度与配比的调节剂的培养基中和在普通培养基中生长的菌丝体图像, 可以明显看出, 前者表面光滑, 个体长势丰满、挺拔, 生长状况优良。

3.3 生长调节剂对微生物生长过程中发酵液粘度的影响

生长调节剂的加入影响微生物生长过程中菌体生长状况的变化, 而菌体生长状况的改变可导致发酵培养基流变性能的变化, 如发酵液粘度的变化。通常发酵液粘度变化可由以下两种原因引起: (1) 菌体新陈代谢消耗营养物和排出代谢物导致发酵培养基组成变化; (2) 菌体生长至不同阶段形态发生变化。因此发酵液粘度变化是菌体新陈代谢强度和菌体形态的综合体现。

图5为加入最佳浓度和配比的调节剂体系和未加调节剂的空白对照体系培养基粘度随培养时间变化的曲线。由图可以看出: (1) 菌体生长至47 h前, 随着菌体的生长, 培养基粘度呈下降趋势。在生长初期培养基的粘度较高, 主要原因是培养基的主要成分葡萄糖含量较高而且在培养初期菌体呈自由菌丝体的形态。生长至对数期, 粘度急剧下降。这是因为菌体在生长过程中不断消耗培养基中的营养成分如葡萄糖等, 新陈代谢产生粘度较小的代谢产物如有机酸等, 同时菌体的形态也由高度分散的自由

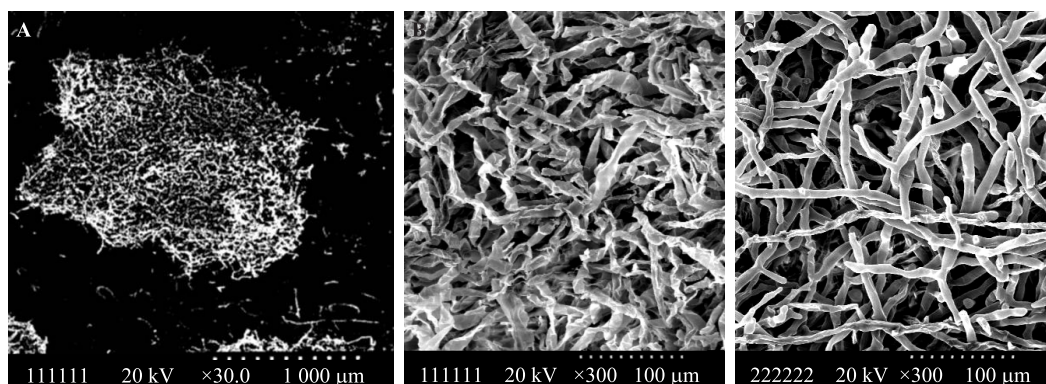


图4 菌丝体 SEM 图像

Fig. 4 SEM images of mycelia

Note: A: Pellet; B: Contrast test; C: Regulatory addition.

菌丝体发展成密实的弹丸导致发酵液粘度降低。(2) 菌体生长 47 h 后, 加调节剂体系粘度变化平缓, 表明菌体新陈代谢减缓, 生长几乎停止; 空白体系培养基粘度呈上升趋势, 表明可能有菌体发生自溶, 菌体碎片及其它自溶物进入培养基使粘度增大。

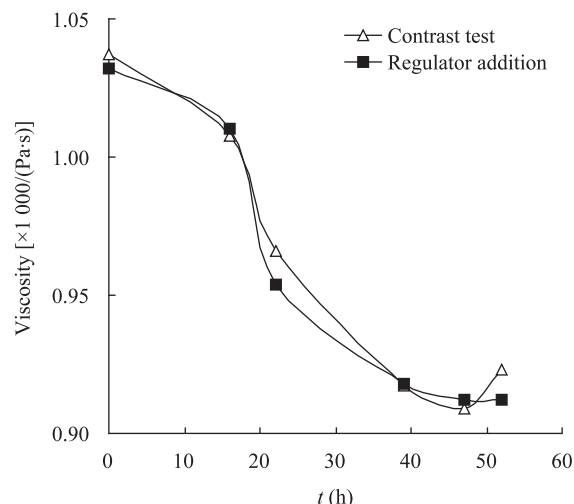


图 5 粘度变化曲线

Fig. 5 Time course of viscosity

4 结语

生物体形态对工业生产过程的影响, 在近代生产实践中已日益引起注目, 在生产抗生素、菌株激素的丝状微生物发酵过程中更为突出。环境固然影响微生物形态的形成, 而形成的形态反过来又会影响生存环境的性质, 进而影响其自身的生长与性能。环境、形态、性能三者彼此反馈, 互为因果。然而, 值得注意的是, 作为反馈过程的中间环节、联系环境与性能的纽带——形态, 仅凭显微镜视觉定性观测所给的“模糊”信息远远不足。沉降密度法宏观表征菌株形态实现了菌株形态描述的量化, 且操作简单, 结果实用、有效。然而沉降密度法与发酵过程中其它参数的关联性比较差, 很难用于过程优化。计算机技术的发展在客观上为人们提供了对

复杂生化过程及其机制的认识。用计算机视觉代替人的视觉来获取信息并量化, 再结合人工智能专家系统等方法实现计算机控制, 为发酵产业的智能化奠定了基础。简单的图像二值化方法获得的信息量小, 采用能处理“簇”的算法和能实现形貌并取的图像识别技术将极大的改善菌株形态的定量描述。另外生物全息率和分形理论的创立能提供认识物体形态与生长的新尺度, 也能为形态的定量解析带来启迪。

参考文献

- [1] 李晓静, 阳葵, 冯霞. 丝状微生物形态分析方法及影响形态的因素[J]. 化学工业与工程, 2002, 19(3): 233-237.
- [2] Cui YQ, Okkerse WJ, van der Lans RGJM, et al. Modeling and measurements of fungal growth and morphology in submerged fermentations[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 60(2): 216-229.
- [3] 李晓静, 郭建喜, 阳葵. 生长调节剂对微生物生长及菌株微生物转化的影响[J]. 海军工程大学学报, 2009, 21(1): 26-31.
- [4] Gehrig I, Bart HJ, Anke T, et al. Influence of morphology and rheology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyathus striatus*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 59(5): 525-535.
- [5] 阳葵, 李晓静, 冯霞, 等. 底物的分散和溶解对菌株微生物酶反应的影响[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 68-71.
- [6] Yang K, Wang JF, Li XJ, et al. Strain selection of *Metarhizium anisopliae* by image analysis of colony morphology for consistency of steroid biotransformation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 75(1): 53-62.
- [7] 李晓静, 冯霞, 阳葵. 底物的溶解对菌株微生物羟化反应的影响[J]. 天津大学学报, 2004, 37(11): 941-944.
- [8] Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KChAM. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1998, 57(4): 409-419.