

丝状真菌液体深层发酵过程菌丝聚集的调控机制

刘瑞桑^{1,2}, 汤亚杰², 白凤武^{1,3}

1 大连理工大学 环境与生命学院, 辽宁 大连 116024

2 湖北工业大学 发酵工程教育部重点实验室 工业微生物湖北省重点实验室 工业发酵湖北省协同创新中心, 湖北武汉 430068

3 上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200240

刘瑞桑, 汤亚杰, 白凤武. 丝状真菌液体深层发酵过程菌丝聚集的调控机制. 生物工程学报, 2019, 35(5): 749–758.

Liu RS, Tang YJ, Bai FW. Regulatory mechanism underlying mycelium aggregation during filamentous fungi submerged fermentation. Chin J Biotech, 2019, 35(5): 749–758.

摘 要: 丝状真菌是微生物发酵产品的重要表达体系, 其液体深层发酵过程的典型特征是环境因素显著影响菌丝聚集, 菌丝聚集影响发酵体系流变特性, 进而影响质量传递、热量传递和动量传递, 最终影响目标产物生物合成和生产效率。文中首先综述了丝状真菌形态调控的方法和策略, 在此基础上针对丝状真菌菌丝生长和聚集过程的两大典型特征——顶端延伸生长和分枝生长, 综述和展望了钙信号传导途径和几丁质生物合成途径对调控菌体聚集这一形态的重要意义。

关键词: 丝状真菌, 液体深层发酵, 菌丝聚集, 钙信号传导, 几丁质生物合成

Regulatory mechanism underlying mycelium aggregation during filamentous fungi submerged fermentation

Ruisang Liu^{1,2}, Yajie Tang², and Fengwu Bai^{1,3}

1 School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China

2 Hubei Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei Provincial Cooperative Innovation Center of Industrial Fermentation, Key Laboratory of Fermentation Engineering (Ministry of Education), Hubei University of Technology, Wuhan 430068, Hubei, China

3 School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: Filamentous fungi are one of the platforms for producing fermented products. The specific characteristic of their

Received: September 25, 2018; **Accepted:** December 5, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (No. 21625602), National Natural Science Foundation of China (Nos. 21206035, 21838002, 81503112, 21506049, 31570054), Hubei Provincial Science and Technology Innovation Major Project (No. 2017ACA173).

Corresponding authors: Yajie Tang. Tel/Fax: +86-27-59750491; E-mail: yajietang@qq.com

Fengwu Bai. Tel/Fax: +86-21-34208028; E-mail: fwbai@sjtu.edu.cn

国家杰出青年科学基金 (No. 21625602), 国家自然科学基金 (Nos. 21206035, 21838002, 81503112, 21506049, 31570054), 湖北省科技创新重大专项 (No. 2017ACA173) 资助。

网络出版时间: 2019-01-04

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190102.1453.002.html>

submerged fermentation is the aggregation of mycelia that is affected by environmental conditions, leading to significantly different rheology for fermentation broth. Such a rheological change not only affects the transfer of mass, heat and momentum, but also the biosynthesis of target products and the efficiency of their production. In this article, strategies for morphological regulation of filamentous fungi are reviewed, and the impact of calcium signal transduction and chitin biosynthesis on apical growth of hyphae and branching of mycelia for their aggregation are further commented.

Keywords: filamentous fungi, submerged fermentation, mycelium aggregation, calcium signal transduction, chitin biosynthesis

丝状真菌 (Filamentous fungi) 是微生物发酵产品的重要表达体系^[1]。丝状真菌属于多细胞微生物,形态上的多样性远复杂于单细胞的细菌或酵母菌。液体深层发酵过程中丝状真菌呈现丝状 (Filamentous form) 或球状 (Pellet form),丝状又分为自由散丝 (Mycelium) 和菌丝聚集体 (Clump),球状又分为表面粗糙型 (Rough pellet) 和表面光滑型 (Smooth pellet)^[1-2]。丝状真菌液体深层发酵过程的典型特征是发酵环境影响菌丝聚集,菌丝聚集影响发酵体系流变特性,流变特性影响传质、传热、传动,从而影响目标产物生物合成和发酵过程效率 (图 1)^[3]。一方面,同一种丝状真菌在不同的形态下可以生产完全不同的产品。以黑曲霉 *Aspergillus niger* 为例^[4],菌丝缠绕形成大小适

宜的致密菌球后,发酵产品是柠檬酸;而自由散丝则高产淀粉酶。另一方面,丝状菌体缠绕在感应电极 (如温度电极、pH 电极、溶氧电极等) 上影响发酵参数的读取,误导发酵过程的控制,将对生产造成不可逆转的经济损失^[5-6]。当菌丝聚集形成菌球后导致培养体系从高粘度非牛顿型流体向低粘度近牛顿型流体转变,有利于生物反应器工程水平上的传质、传热、传动,从而有利于产物合成^[1-2]。因此,调控菌丝聚集对丝状真菌液体深层发酵过程具有重要意义^[1-2]。文中首先综述了丝状真菌形态调控过程常用的方法和策略,然后针对丝状真菌顶端延伸生长和分枝生长综述了钙信号传导途径和几丁质生物合成途径对调控菌体聚集这一形态的重要意义。

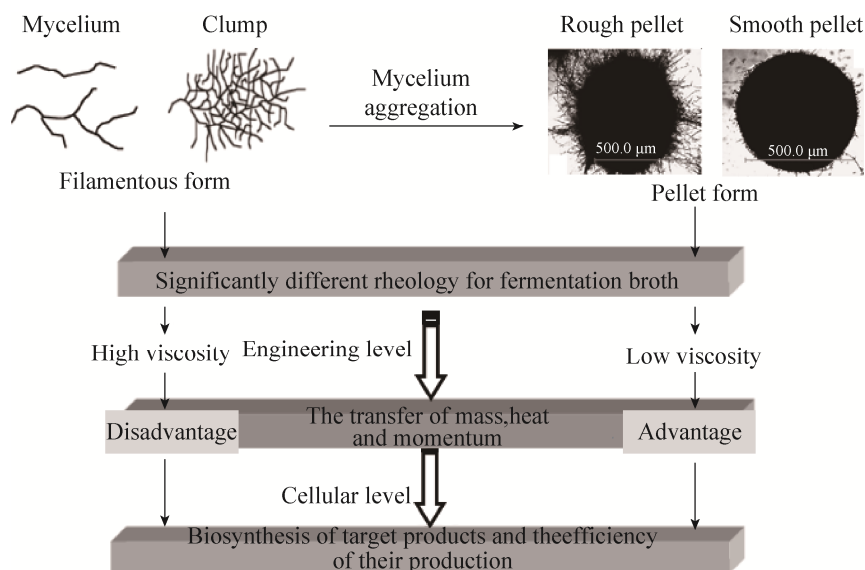


图 1 丝状真菌液体深层发酵菌体形态的影响

Fig. 1 Significance of mycelium aggregation during filamentous fungi submerged fermentation.

1 形态表征

要对丝状真菌形态进行调控,就必须对形态进行定性和定量表征。将图像分析技术运用于丝状真菌形态学,对菌体大小和形状进行定量表征,是认识研究菌体形态特征的一个有力工具^[7-9]。获取菌体形态照片后,通过电子图像二值化,使分析对象与背景及其他杂质能够明显区分开来,然后对二值图进行修正除杂后用于菌体形态的定性和定量分析^[7-9]。通过定义 8 个特征参数(如平均灰度、灰度的标准偏差、面积、圆度因子、周长、形态因子 α 、 β 和 OP 等),运用模式识别对丝状菌体形态(Pellet aggregates, rough pellets, smooth pellets, mycelia flocks)进行自动识别分类,准确率达到 98%^[10]。此后,利用人工神经网络^[11]、形态学参数过滤器^[12]等图像分析手段可以提高图像分析的快捷性和准确性。然而,由于区分菌体形态种类的边界条件难以界定,菌体形态定性分类相对困难;此外,在定量分析方面亦无一定的标准,主观因素可能带来更多的误差。

2 形态代谢工程与形态基因挖掘

形态工程(Morphology engineering)对丝状真菌液体深层发酵过程的重要性已经被广泛认可。科学家们通过改变发酵环境变量(如培养基成分、pH、剪切、溶氧、CO₂浓度、渗透压等)^[13-15]和添加微粒促进剂(Microparticle-enhanced cultivation,如硅酸盐、硅氧化物、金属钛氧化物等)^[16-17]来研究菌体形态形成规律,关联菌体形态与目标产物合成的关系,获得发酵环境变量、菌体形态以及产物合成之间的相互关系。国际代谢工程领域的权威 Jens Nielsen 教授率先在分子水平研究丝状真菌培养过程菌丝缠绕聚集对代谢途径和目标产物合成的影响,开创了形态代谢工程(Metabolic engineering of morphology)^[18-19]。由基因 *chsB* 编码合成的几丁质合成酶 B 是野生型米

曲霉 *Aspergillus oryzae* 菌丝正常生长分泌 α -淀粉酶所必需的,然而野生型的 *A. oryzae* 在液体深层发酵过程中菌丝聚集形成不规则的团状菌体,不利于发酵过程控制^[20-22]。Nielsen 课题组运用代谢工程手段,阻断了编码几丁质合成酶 B 的基因 *chsB*,发现改造后的 *A. oryzae* 菌丝顶端生长速率比野生型慢 88%,菌丝分叉频率却提高了 188%;并且在液体深层发酵过程中改造后的 *A. oryzae* 菌丝没有聚集成团状菌体,虽然产物 α -淀粉酶产量没有增加,但却有利于整个发酵过程的控制^[19]。进一步研究发现基因 *chsB* 表达水平受“氮源-调节启动子”NiiA1 影响^[19]。这说明通过控制发酵环境可以调节 *chsB* 基因表达水平,进而影响 *A. oryzae* 菌丝分枝频率,有望提高目标产物生物合成。Nielsen 课题组为深入分子水平理解菌丝聚集和目标产物代谢途径之间的关系进行了有益探索。在产黄青霉 *Penicillium chrysogenum* 中,III类几丁质合成酶基因 *chs4* (与曲霉 *chsB* 序列一致性高)的沉默表达显著改变菌丝体形态,形成分枝多、易结球的形态,*chs4* 静默表达筛选得到的两突变株,其目标产物青霉素产量比野生型分别提高了 27%和 41%^[23]。

形态代谢工程的典型策略是通过实现形态基因表达水平的调控,进而影响丝状真菌形态发育,最终获得利于目标产物生物合成的菌体形态。而该策略中最为关键的是筛选形态基因,丝状真菌液体深层发酵过程中菌体形态对产物合成的影响,在分子水平上其本质是基因组中相关基因差异表达对细胞群体生理和代谢功能的影响。筛选出具有调控菌丝聚集功能的调节基因和结构基因,进而通过调控这些基因的表达水平去影响菌丝聚集^[23]。差异表达基因筛选技术是快速获得目标功能基因的有效途径。抑制性消减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)具有假阳性率低、敏感性强、效率高等优点,被广泛

运用于差异表达基因的筛选。SSH 通过两次差减杂交使目的基因得以富集,在差减杂交过程中采用了基因表达丰度均一化与抑制 PCR 技术,使得低丰度的目标基因也可被获得,而非目标基因的扩增得到抑制^[24]。SSH 不仅提高了基因克隆的效率,而且可同时分离上百个不论高低丰度的差异表达基因。在灵芝 *Ganoderma lucidum* 液体深层发酵过程中,振荡培养和静置培养导致了菌体形态明显不同,前者菌丝聚集形成菌球,后者则分化形成了无性孢子。通过 SSH 技术构建了不同菌体形态的消减差异杂交文库,从 601 个差异表达基因中筛选到了调控菌丝聚集的 10 多个关键基因,如灵芝 GR367308、GR367360、GR367378 和 GR367405 等^[25]。黑曲霉 *A. niger* 液体深层发酵过程中菌球的形成强化了目标产物柠檬酸的生物合成。通过 SSH 技术筛选到了 22 个与 *A. niger* 菌体形态发育相关的基因,并且这些基因的表达水平受到 Mn^{2+} 浓度的调控:1 000 $\mu g/L$ Mn^{2+} 时,15 个基因表达并调控菌丝聚集形成丝状;10 $\mu g/L$ Mn^{2+} 时,7 个基因表达并调控菌丝聚集形成菌球^[23]。因此,运用 SSH 技术可以高效筛选到调控菌丝聚集引起菌体形态变化的结构基因和调节基因,为后续深入研究这些差异基因的分子调控机制奠定基础。

科学家们已经陆续筛选到了调控菌丝聚集的相关基因,如调控米曲霉 *A. oryzae* 菌丝顶端生长速率和菌丝分枝频率的 *chsB*^[19]、与灵芝 *G. lucidum* 菌丝聚集形成菌球或是分化形成无性孢子的 GR367308 等 10 多个基因^[25]、与黑曲霉 *A. niger* 菌体形态发育相关的 22 个基因^[23]。在构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 中,分离鉴定了至少 6 个形态基因:*hypA/podA* 与保持菌丝极性生长密切相关,失活该基因菌丝变宽且细胞壁变厚^[24-25]; *hypC* 控制细胞尺寸和隔膜的分割,该基因失活后顶体细胞变短,分叉频率变高^[24]; *podB* 与菌丝极性生长

和顶端细胞骨架组成密切相关,失活该基因菌丝膨胀^[25]; *sepA* 控制激动蛋白微丝在细胞壁的定位,失活该基因菌丝变宽,分叉频率增加^[26]; *swoA* 和 *swoF* 与菌丝体极性生长相关,且各自基因失活后菌体膨胀^[27]。

但是,在液体深层发酵过程中,如何通过控制发酵环境影响这些形态基因的表达水平,进而调控菌丝聚集,最终强化目标产物合成的研究则未见相关报道。

3 顶端延伸与分枝生长

丝状真菌在极性生长的过程中,多种细胞骨架成分(包括微丝、微管和中间纤维)、蛋白质、脂类、细胞器、信号分子以及能量分子都会参与,丝状真菌主要由运输蛋白以及含有合成细胞壁所需物质的分泌小泡沿着细胞骨架中的微管运输至顶体。顶体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、不同的功能酶等。顶体在细胞的延伸与分枝的形成过程中决定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。囊泡以水泡状形态从内质网转移到高尔基体,再浓缩加工释放,使顶端质膜增加。同时,顶端的囊泡内含物也被运到细胞壁附近,这些内含物包括了细胞壁的溶解酶类、合成酶类以及一些细胞壁合成前体物质。溶壁酶破去原细胞壁间的化学键,顶体在壁合成酶的作用下进入细胞壁中,从而使质膜增大、细胞壁增加、菌丝生长(图 2)^[28]。

丝状真菌形态发育过程是高度极化生长的过程。顶端延伸生长和分枝生长是丝状真菌形态发育的两大特征。顶端延伸生长被认为是“细胞壁水解”、“新细胞壁合成”和“细胞壁膨压”三者之间的动力平衡。菌丝进行顶端延伸生长后通过不断的分枝生长形成新的菌丝,进而通过“网结现象”聚集在一起形成菌丝体。菌丝体的顶端延伸离不开

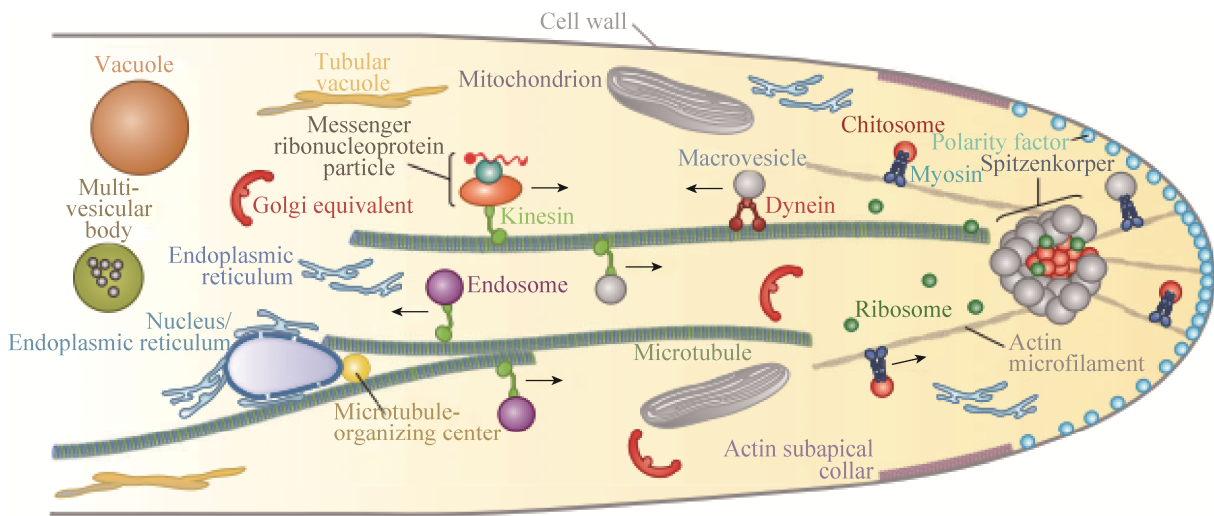


图2 丝状真菌顶端生长时细胞内部细胞器的分布图^[28]

Fig. 2 Overview of a hypothetical hyphal apex displaying some of the major components participating in tip growth^[28]. The polarity machinery maintains sites of growth by activating a set of cascade pathways that lead to polymerization of the actin cytoskeleton. Vesicles move along microtubules or actin cables until they reach the Spitzenkörper. From there they are delivered to the apical plasma membrane.

胞内钙离子浓度调节和细胞壁主要成分几丁质的生物合成。因此,钙信号传导途径和几丁质生物合成途径对丝状真菌形态调节具有重要意义。

3.1 钙信号传导途径与形态发育

Ca^{2+} 信号通路广泛存在于真核生物细胞中。研究发现,在生长的菌丝顶端,其细胞内都会形成较高的钙离子浓度,尤其在分枝生长出现的前期,而菌丝没有生长的顶端却不存在这种现象。这预示着在顶端细胞存在较高的 Ca^{2+} 浓度是菌丝生长所必需的。因此,扰动胞外环境中的 Ca^{2+} 浓度,能影响菌丝顶端延伸和分枝生长模式,进而最终影响到菌丝体形态^[29]。

一般,细胞外钙离子浓度是细胞内钙离子浓度的数千倍。在钙信号传导途径中(图3),当细胞受到外界环境胁迫时,细胞膜上的钙离子通道被激活,胞外钙离子流入胞内。与此同时,胞内钙离子亦可通过胞内钙库(如内质网、高尔基体和液泡等)在胞内获得补充。一旦胞内钙离子浓度增加的信号被钙调蛋白(Calmodulin, CaM)感知,将形成 Ca^{2+} /钙调蛋白复合物(Ca^{2+} /CaM)。随

后, Ca^{2+} /CaM 激活钙调神经磷酸激酶(Calcineurin)中的调节亚基 CnB,继续作用于具有去磷酸化功能的催化亚基 CnA,促使转录因子 CRZ (Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor, 钙调神经磷酸激酶响应的锌指转录因子)去磷酸化。去磷酸化后的 CRZ 进入到细胞核中与 CDRE (Calcineurin-dependent response element, 钙调神经磷酸激酶依赖型响应元件)基因(如钙泵编码基因或其他胁迫应激基因等)的启动子结合,从而实现转录水平对下游基因的调控作用^[30-32]。

通过对钙信号传导途径中的关键节点进行调控(图3),是探索该途径与表型关系的主要方法。一方面,通过外源添加抑制剂可以间接调控胞内钙离子浓度。这些抑制剂主要是指能够与胞内钙离子浓度变化起响应的元件——钙调蛋白或钙调神经磷酸激酶的抑制剂。如吩噻嗪盐酸盐 CPZ (Chlorpromazine hydrochloride)^[33],其能够抑制钙调蛋白的活性;亲脂性环状多肽化合物环孢菌素 CsA (Cyclosporin A)^[34]和大环内酯类抗生素 FK506 (Tacrolimus)^[35]是钙调神经磷酸激酶的抑

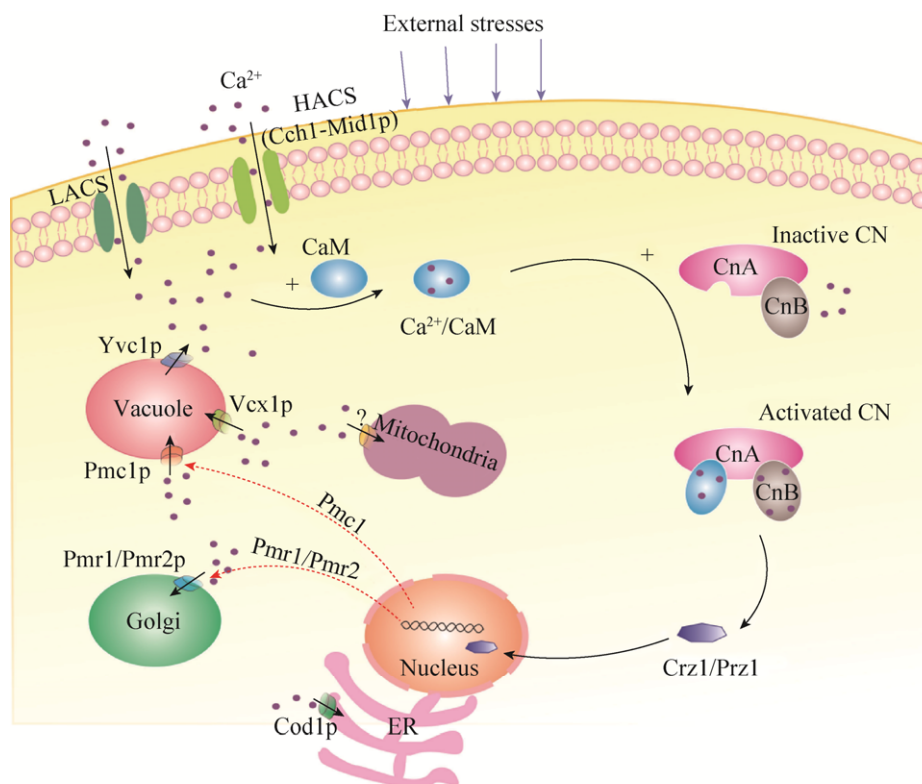


图3 真菌细胞内的钙信号传导途径^[30]

Fig. 3 Calcium signal transduction pathway in fungal cells^[30]. CaM: calmoduline; CN: calcineurin; ER: endoplasmic reticulum; LACS: low-affinity Ca^{2+} influx system; HACS: high-affinity Ca^{2+} influx system.

制剂。其中, FK506 和 CsA 进入到细胞内与其各自的配体结合以后形成的二元复合物可以与 Calcineurin 的调节亚基 CnB 的活性位点结合, 从而影响催化亚基 CnA 的生物活性。本课题组在研究粉红粘帚霉 *Clonostachys rosea* 液体深层发酵过程中菌丝聚集, 外源添加 FK506 可以使菌丝体内的钙离子浓度明显增加, 且最终形成更多的菌球形态。另一方面, 通过静默/敲除或者过表达 CRZ 研究其与下游基因的相互关系成为理解钙信号传导途径与表型 (比如形态发育、抗逆性等) 的纽带。

转录因子 CRZ 是酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* CRZ1 的同源蛋白, 是钙调神经磷酸酶下游的主要元件, 包含 1 个 C_2H_2 锌指基序, 用于结合启动子区域含有 CDRE 基序的基因^[31]。其

经过去磷酸化后, 能够进入细胞核内, 参与调控含有 CDRE 基序的基因表达^[32]。目前, CRZ 研究主要聚焦于模式丝状真菌和致病菌。如构巢曲霉 *A. nidulans* 转录因子 *crzA* 基因能够调控 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ 离子交换基因的表达, 调控胞内钙离子浓度的平衡^[30]; 致病菌新生隐球菌 *Cryptococcus neoformans* 缺失同源蛋白 CRZ1 后, 细胞壁的完整性降低, 且几丁质合成酶 Chs6 的表达量明显降低^[36]。

钙信号传导途径中 CRZ 作为转录因子, 可调控下游基因 (如形态基因) 影响菌丝聚集模式, 最终影响菌丝形态。

3.2 几丁质生物合成途径与菌体形态发育

对于丝状真菌, 细胞壁是决定其形态的重要因素。几丁质作为真菌细胞壁的主要成分, 在决

定顶端生长、分枝以及细胞壁分化等形态变化的相关过程中处于核心地位。因此,几丁质生物合成过程势必会影响菌丝生长。

在几丁质生物合成过程中,其关键酶是几丁质合成酶。几丁质合成酶存在于壳质体(Chitosome)内。壳质体是一种特殊的微管,含有非活化态的几丁质合成酶。几丁质合成酶被壳质体运输到细胞表面,进而合成几丁质微纤丝^[28]。几丁质合成酶是一种跨膜蛋白质,需要在磷脂环境中活动,并且从细胞质中吸收底物来合成几丁质的初生链,并供给细胞壁进行生长。这个过程中,几丁质合成酶需要二价金属离子来激活。研究表明,氟标记的乙酰氨基葡萄糖(GlcNAc)与几丁质的结合在菌丝顶端是高度极性的,它只与菌丝顶端的细胞壁结合,很少结合在周边的壁上。遗传证据表明,几丁质合成酶需要复合蛋白来把它们定位到细胞膜的适当位置上。在活细胞中,正是壳质体运送几丁质合成酶与细胞质膜结合后,这时酶原被激活,利用底物GlcNAc-UDP合成细胞壁的必需成分几丁质^[37-38]。尼可霉素(Nikkomycins)和多氧霉素(Polyoxins)是底物GlcNAc-UDP的结构类似物。茴香脑(反式茴香脑,茴香烯)是从茴香油(俗称八角油)分离得到,并且通过结合几丁质合成酶的活性部位而抑制其酶活性^[39]。

根据几丁质合成酶氨基酸序列的相似性和差异性,几丁质合成酶在酿酒酵母中分为3大类,假丝酵母菌中分为4大类,而在丝状真菌中则存在7大类,且不同丝状真菌中存在的几丁质合成酶基因数目也不同^[40]。如粗糙脉孢菌*Neurospora crassa*几丁质合成酶Chs1-7都发现存在于新生的隔膜和顶体(Spitzenkörper)的中心,其中几丁质合成酶Chs6和Chs7对顶端延伸生长和最终菌丝形态有明显影响^[41];植物致病菌稻瘟病菌*Magnaporthe oryzae*中几丁质合成酶基因*chs6*缺失的突变株存在菌丝生长减缓的现象^[42];产青黄霉菌*P. chrysogenum*中,几丁质合成酶基因*chs4*

的沉默表达则使得发酵过程中松散的分散菌丝体聚集形成团块状的菌球^[23]。构巢曲霉*A. nidulans*几丁质合成酶基因*chsB*的缺失导致菌体生长极度缓慢,并且形成菌丝高度分枝的小克隆(Small colonies)^[43],而在烟曲霉*Aspergillus fumigatus*中敲除几丁质合成酶基因*chsG*后,菌体生长形态与敲除*chsB*情况类似^[44]。可见,几丁质合成酶因不同的丝状真菌具有不同的形态发育调控功能。

3.3 钙信号传导途径与几丁质合成途径对菌丝聚集调控的分子机制

钙信号传导途径中的转录因子CRZ通过与CDRE基因的启动子结合,实现其对下游基因转录水平的调控。因此,挖掘CRZ与形态基因(如几丁质合成酶基因)的结合位点(CDRE),有望进一步理解钙信号传导途径与几丁质合成途径对菌丝聚集调控的分子机制。从*A. nidulans*中筛选25个依赖于CrzA表达调控的基因,预测5'-G[T/G]GGC[T/A]G[T/G]G-3'为其结合位点,这与酿酒酵母*S. cerevisiae*中Crz1p的结合位点5'-GNGGC[G/T]CA-3'和5'-CGGTGGCTGTGC-3'类似。*A. nidulans*中转录因子Crz结合几丁质合成酶基因*chsB*启动区序列为GTGGCTC^[45]。本课题组在研究粉红粘帚霉*C. rosea*液体深层发酵过程中菌丝聚集的分子机制时,发现CRZ对该菌的几丁质合成酶基因(*chs1-6*)的启动子区都有一个相似的结合位点,并且调控了*chs1-6*的基因表达水平,进而显著影响到菌丝体形态发育。

综上,如图4所示,当丝状真菌受外界压力时(如外源扰动Ca²⁺或者添加抑制剂吩噻嗪盐酸盐CPZ、环孢菌素CsA、FK506等),胞内Ca²⁺浓度的瞬态涨落激发后续钙信号传导通过转录因子Crz与下游几丁质合成酶基因*chs*的启动子区结合,从而调控到几丁质的生物合成,最终影响菌丝聚集形态。

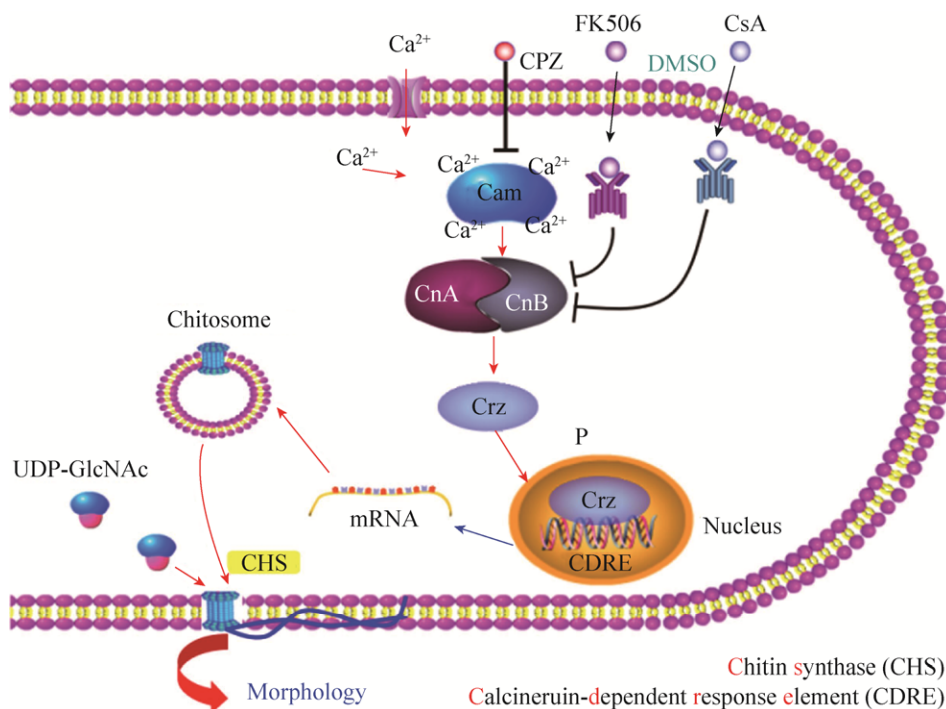


图4 钙信号传导途径与几丁质合成途径调控菌丝聚集的作用机制

Fig. 4 Schematic representation of the crosstalk between calcium signaling pathways and chitin biosynthesis.

4 展望

丝状真菌作为微生物发酵产品的重要表达体系，围绕着其形态发育与调控，科学家们开展了过程工程调控策略研究和形态代谢工程研究。前者将菌丝聚集作为一个“黑箱”，后者需快速筛选到调控菌丝聚集的形态基因。如何将两者进行有机结合，实现“发酵环境影响调节基因和结构基因表达水平、进而调控菌丝聚集，最终强化目标产物合成”的递进调控策略将是研究的最终落脚点。菌丝体延伸生长和分叉生长是丝状真菌形态发育的两大特征，其内在的生理生化过程与钙信号传导途径、几丁质生物合成途径都密切相关。而菌体形态的形成和变迁，其本质是分子水平相关基因差异表达，即调控菌丝聚集的调节基因和结构基因表达水平的差异。因此，后续深入解析丝状真菌液体发酵过程中菌丝聚集的分子调控机制，从分子水平认知丝状真菌液体深层发酵菌体形态

多样化，将丰富对菌丝聚集的认识，对正向调控菌丝聚集、强化目标产物合成具有重要的理论和现实意义。

REFERENCES

- [1] Kossen NWF. The morphology of filamentous fungi. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2000, 70: 1–33.
- [2] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv*, 2004, 22(3): 189–259.
- [3] Grimm LH, Kelly S, Krull R, et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biot*, 2005, 69(4): 375–384.
- [4] López JLC, Pérez JAS, Sevilla JMF, et al. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *J Biotechnol*, 2005, 116(1): 61–77.
- [5] Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol*, 2000, 20(1): 17–48.

- [6] Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv*, 2007, 25(3): 244–263.
- [7] Adams HL, Thomas CR. The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms. *Biotechnol Bioeng*, 1988, 32(5): 707–712.
- [8] Cox PW, Paul GC, Thomas CR. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology*, 1998, 144(4): 817–827.
- [9] Justen P, Paul GC, Nienow AW, et al. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 52(6): 672–684.
- [10] Treskatis SK, Orgeldinger V, Wolf H, et al. Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 53(2): 191–201.
- [11] Papagianni M, Matthey M. Morphological development of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology. *Microb Cell Fact*, 2006, 5: 3.
- [12] Rühl M, Kües U. Automated image analysis to observe pellet morphology in liquid cultures of filamentous fungi such as the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*. *Curr Trends Biotechnol Pharmacy*, 2009, 3(3): 241–253.
- [13] O’Cleirigh C, Casey JT, Walsh PK, et al. Morphological engineering of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*: regulation of pellet morphology through manipulation of broth viscosity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 68(3): 305–310.
- [14] Driouch H, Sommer B, Wittmann C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(6): 1058–1068.
- [15] Wucherpennig T, Hestler T, Krull R. Morphology engineering-osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 58.
- [16] 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.
- [17] 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*, 2012, 109(2): 462–471.
- [18] McIntyre M, Müller C, Dynesen J, et al. Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus*/Nielsen J, ed. *Metabolic Engineering*. Berlin: Springer, 2001, 73: 103–128.
- [19] Müller C, McIntyre M, Hansen K, et al. Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis. *Appl Environ Microb*, 2002, 68(4): 1827–1836.
- [20] Borgia PT, Iartchouk N, Riggle PJ, et al. The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genet Biol*, 1996, 20(3): 193–203.
- [21] Horiuchi H, Takagi M. Chitin synthase genes of *Aspergillus species*. *Contrib Microbiol*, 1999, 2: 193–204.
- [22] Yanai K, Kojima N, Takaya N, et al. Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(10): 1828–1835.
- [23] Liu H, Zheng ZM, Wang P, et al. Morphological changes induced by class III chitin synthase gene silencing could enhance penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(8): 3363–3372.
- [24] Kaminskyj SGW, Hamer JE. Hyp loci control cell pattern formation in the vegetative mycelium of *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 1998, 148(2): 669–680.
- [25] Harris SD, Hofmann AF, Tedford HW, et al. Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 1999, 151(3): 1015–1025.
- [26] Harris SD, Hamer L, Sharpless KE, et al. The *Aspergillus nidulans sepA* gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *EMBO J*, 1997, 16(12): 3474–3483.
- [27] Momany M, Westfall PJ, Abramowsky G. *Aspergillus nidulans* swo mutants show defects in

- polarity establishment, polarity maintenance and hyphal morphogenesis. *Genetics*, 1999, 151(2): 557–567.
- [28] Riquelme M. Tip growth in filamentous fungi: a road trip to the apex. *Annu Rev Microbiol*, 2013, 67(1): 587–609.
- [29] Torralba S, Heath IB. Cytoskeletal and Ca^{2+} regulation of hyphal tip growth and initiation. *Curr Top Dev Biol*, 2001, 51: 135–187.
- [30] Liu SY, Hou YL, Liu WG, et al. Components of the calcium-calcieneurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryot. Cell*, 2015, 14(4): 324–334.
- [31] Hagiwara D, Kondo AT, Fujioka T, et al. Functional analysis of C_2H_2 zinc finger transcription factor CrzA involved in calcium signaling in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet*, 2008, 54(6): 325–338.
- [32] Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Gene Dev*, 1999, 13(7): 798–803.
- [33] Liu YC, Storm DR. Dephosphorylation of neuromodulin by calcineurin. *J Biol Chem*, 1989, 264(22): 12800–12804.
- [34] Huai Q, Kim HY, Liu YD, et al. Crystal structure of calcineurin-cyclophilin-cyclosporin shows common but distinct recognition of immunophilin-drug complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19): 12037–12042.
- [35] Griffith JP, Kim JL, Kim EE, et al. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell*, 1995, 82(3): 507–522.
- [36] Lev S, Desmarini D, Chayakulkeeree M, et al. The Crz1/Sp1 transcription factor of *Cryptococcus neoformans* is activated by calcineurin and regulates cell wall integrity. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e51403.
- [37] Rogg LE, Fortwendel JR, Juwadi PR, et al. Regulation of expression, activity and localization of fungal chitin synthases. *Med Mycol*, 2012, 50(1): 2–17.
- [38] Martín-Udóroz M, Madrid MP, Roncero MI. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology*, 2004, 150(10): 3175–3187.
- [39] Yutani M, Hashimoto Y, Ogita A, et al. Morphological changes of the filamentous fungus *Mucor Mucedo* and inhibition of chitin synthase activity induced by anethole. *Phyther Res*, 2011, 25(11): 1707–1713.
- [40] Lenardon MD, Munro CA, Gow NA. Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(4): 416–423.
- [41] Fajardo-Somera RA, Jöhnk B, Bayram Ö, et al. Dissecting the function of the different chitin synthases in vegetative growth and sexual development in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*, 2015, 75: 30–45.
- [42] Kong LA, Yang J, Li GT, et al. Different chitin synthase genes are required for various developmental and plant infection processes in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathog*, 2012, 8(2): e1002526.
- [43] Fukuda K, Yamada K, Deoka K, et al. Class III chitin synthase ChsB of *Aspergillus nidulans* localizes at the sites of polarized cell wall synthesis and is required for conidial development. *Eukaryot Cell*, 2009, 8(7): 945–956.
- [44] Mellado E, Aufauvre-Brown A, Gow NAR, et al. The *Aspergillus fumigatus* *chsC* and *chsG* genes encode Class III chitin synthases with different functions. *Mol Microbiol*, 1996, 20(3): 667–679.
- [45] Spielvogel A, Findon H, Arst HN Jr, et al. Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*. *Biochem J*, 2008, 414(3): 419–429.

(本文责编 郝丽芳)