

## Spis treści

1. Wprowadzenie .....	7
1.1. Krótka historia inżynierii morfologicznej .....	8
1.2. Cel i adresat monografii .....	9
2. Wzrost oraz rozwój promieniowców i grzybów strzępkowych .....	11
2.1. Budowa i cykl życia promieniowców na przykładzie <i>Streptomyces</i> sp. ....	11
2.2. Budowa i cykl życia grzybów strzępkowych na przykładzie grzybów strzępkowych <i>Aspergillus</i> sp. i <i>Penicillium</i> sp. ....	14
2.2.1. Kiełkowanie konidiospor .....	16
2.2.2. Wzrost strzępek .....	17
2.2.3. Tworzenie rozgałęzień .....	19
2.2.4. Sporulacja .....	20
2.3. Hodowla mikroorganizmów strzępkowych w bioreaktorach .....	20
2.3.1. Morfologia mikroorganizmów strzępkowych w hodowli wglębnej .....	23
2.3.2. Mechanizm tworzenia aglomeratów przez mikroorganizmy strzępkowe w hodowlach wglębnych w bioreaktorach .....	25
2.4. Mierzalne parametry wykorzystywane dla form morfologicznych mikroorganizmów strzępkowych .....	31
3. Morfologia mikroorganizmów strzępkowych a wytwarzanie metabolitów pierwotnych i wtórnych oraz enzymów .....	35
4. Wpływ morfologii mikroorganizmów strzępkowych na prowadzenie ich hodowli wglębnych w bioreaktorach .....	41
4.1. Reologia zawiesin mikroorganizmów strzępkowych .....	41
4.2. Mieszanie zawiesin mikroorganizmów strzępkowych .....	46
4.3. Napowietrzanie bioreaktorów: konwekcja i dyfuzja tlenu w bioreaktorze .....	52
5. Sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych .....	61
5.1. Tradycyjne metody sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych .....	63
5.1.1. Liczba spor w podłożu .....	63
5.1.2. Wpływ poziomu pH .....	66
5.1.3. Wpływ naprężeń mechanicznych na morfologię mikroorganizmów strzępkowych .....	67
5.1.4. Inne czynniki wpływające na morfologię grzybni i ich przydatność do tradycyjnego sterowania morfologią grzybni .....	73
5.2. Nowoczesne techniki inżynierii morfologicznej .....	74
5.2.1. Mikroorganizmy strzępkowe a inżynieria morfologiczna .....	75
5.2.2. Hodowla z mikrocząstkami .....	78
5.2.2.1. Dobór mineralnych mikrocząstek dla maksymalizacji biosyntezy pożądaných metabolitów .....	78
5.2.2.2. Mechanizm działania mikrocząstek .....	84
5.2.2.3. Efekty oddziaływania mikrocząstek na mikroorganizmy strzępkowe .....	85
5.2.3. Inne nowoczesne techniki sterowania morfologią mikroorganizmów strzępkowych .....	101

5.2.3.1. Dodatek substancji zmieniających lepkość i napięcie powierzchniowe podłoża hodowlanych .....	101
5.2.3.2. Osmolalność podłoża a morfologia grzybni .....	104
5.2.3.3. Sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych przez modyfikacje genetyczne .....	109
6. Perspektywy rozwoju inżynierii morfologicznej .....	113
Literatura .....	115
Summary .....	123

# 1. Wprowadzenie

Wykorzystanie w biotechnologii mikroorganizmów strzępkowych, do których zalicza się prokariotyczne promieniowce oraz eukariotyczne grzyby strzępkowe, trwa już od wielu dekad. Te mikroorganizmy są źródłem wartościowych metabolitów pierwotnych (kwasów organicznych), wtórnych (antybiotyków, chemioterapeutyków i innych substancji używanych w medycynie) oraz enzymów, przede wszystkim enzymów hydrolitycznych. Na skalę przemysłową mikroorganizmy strzępkowe hodowane są najczęściej w zawieszynie (hodowla wgłębna). Po wielokroć opisywano w literaturze dobór optymalnych warunków procesowych dla hodowli tych mikroorganizmów, optymalizowano składy podłoża lub modyfikowano genetycznie szczepy produkcyjne. Prace te były prowadzone zarówno przez mikrobiologów, jak i inżynierów.

W czasie tych badań tylko w ograniczonym stopniu uwzględniano istotny czynnik leżący na granicy mikrobiologii i inżynierii biochemicznej, a mianowicie formę morfologiczną promieniowców i grzybów strzępkowych w danej hodowli. W naukach biologicznych mianem morfologii organizmu określa się jego kształt zewnętrzny wynikający przede wszystkim z faktu przynależności do konkretnej grupy systematycznej organizmów. Jednakże warunki wzrostu również oddziałują na tworzenie konkretnej formy morfologicznej. Morfologia mikroorganizmów w procesach bioreaktorowych nie ma praktycznie znaczenia, jeżeli ma się do czynienia z takimi organizmami jednokomórkowymi, jak bakterie i drożdże (te ostatnie są także grzybami). Jednak w przypadku kolonijnych promieniowców tworzących coś w rodzaju strzępek oraz wielokomórkowych grzybów strzępkowych ze względu na różnicowanie się komórek tychże mikroorganizmów oraz odmienny sposób ich wzrostu w porównaniu do mikroorganizmów jednokomórkowych morfologia odgrywa znaczącą rolę. Co więcej, zgromadzono dowody, że sposób wzrostu mikroorganizmu strzępkowego może się łączyć z jego zdolnością do biosyntezy wybranych metabolitów. W niektórych przypadkach udało się powiązać tworzenie konkretnej formy morfologicznej mikroorganizmu z wydajnością produkcji metabolitów, w innych pozostaje to nierozstrzygnięte.

Co więcej, konkretna forma morfologiczna mikroorganizmów strzępkowych występująca w bioreaktorze niesie ze sobą konsekwencje techniczne. Zagadnienie napowietrzania hodowli wgłębnej, w tym konwekcja tlenu do podłoża i jego dyfuzji do komórek mikroorganizmów czy też mieszanie zawiesiny o zmiennych właściwościach reologicznych (wysoka lepkość niutonowska czy właściwości nieniuonowskie) są wyzwaniem dla inżynierii biochemicznej.

Ponieważ istotą działania każdego inżyniera jest jak najpełniejsza kontrola nad prowadzonym procesem, stąd przypadkowe zmiany właściwości zawiesin mikroorganizmów strzępkowych powodowane zmianami ich morfologii, pozostają dość znaczącym problemem.

Z potrzeby sterowania formą morfologiczną promieniowców i grzybów strzępkowych w hodowlach wgłębnych narodziła się na początku XXI wieku gałąź nauki, czy też technika, chyba jeszcze trochę za wcześnie to rozstrzygać, zwana inżynierią morfologiczną (ang. *morphological/morphology engineering*),

która stawia sobie za cel jak najbardziej zaawansowaną kontrolę i sterowanie morfologią mikroorganizmów strzępkowych hodowanych w bioreaktorach w celu maksymalizacji wytwarzanych przez nie metabolitów. I właśnie inżynierii morfologicznej, temu czym ona jest oraz korzyściom wynikającym z wykorzystywania jej technik, będzie poświęcona ta monografia. Jest to pierwsze takie opracowanie w Polsce.

## 1.1. Krótka historia inżynierii morfologicznej

Pisząc o inżynierii morfologicznej i używając w tytule słowa „krótka”, nie należy tego słowa interpretować jako skrócona, ponieważ minęło dopiero około 15 lat od pojawienia się tego pojęcia w literaturze naukowej z dziedziny inżynierii biochemicznej i pierwszych badań na ten temat.

W 2001 roku w cenionej serii monograficznej z dziedziny inżynierii biochemicznej i biotechnologii *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* wydawanej przez wydawnictwo Springer ukazał się artykuł zatytułowany: *Metabolic engineering of the morphology of Aspergillus* autorstwa Mhairi'ego McIntyre'a, Christiana Müllera, Jensa Dynesena oraz Jensa Nielsena z Politechniki Duńskiej w Lyngby. Artykuł ten nie traktował bezpośrednio o inżynierii morfologicznej, ale wyrażenie *morphological engineering* pojawiło się jako słowo kluczowe. Pojawiło się także w nim znaczące zdanie, które zostanie tu zacytowane w oryginale:

*...when considering tailoring morphologies for specific bioprocesses, here referred to as morphological engineering, it is not known which genes, either structural or regulatory, would be of interest.*

Autorzy rozumieli inżynierię morfologiczną jako technikę sterowania morfologią w procesach z udziałem grzybów strzępkowych i doszukiwali się sposobu zmiany tejże morfologii poprzez modyfikowanie genów za nią odpowiedzialnych u grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus* (McIntyre *et al.*, 2001).

Co więcej, używając tego wyrażenia McIntyre *et al.* (2001), odnosili się do klasycznych publikacji traktujących o wpływie morfologii na biosyntezę metabolitów (zwykle na przykładzie *Penicillium chrysogenum* i penicyliny), ale jednocześnie potraktowali oni inżynierię morfologiczną jako nową koncepcję wymagającą rozwinięcia.

Już w 2002 roku ten sam zespół tym razem z Christianem Müllerem jako pierwszym autorem zaproponował modyfikację genetyczną *Aspergillus oryzae* polegającą na uszkodzeniu genów syntaz chitynowych w celu zmiany morfologii grzywni (Müller *et al.*, 2002a). Później koncepcja inżynierii morfologicznej została rozwinięta na Uniwersytecie w Dublinie (Irlandia). W roku 2005 Cormac O'Cleirigh obronił pracę doktorską na temat: *Quantification and regulation of pellet morphology in Streptomyces hygroscopicus var. geldanus cultures*, w której po raz pierwszy wykazał możliwości wpływania na morfologię promieniowców poprzez manipulację lepkością i napięciem powierzchniowym

podłoża hodowlanego (O’Cleirigh, 2005). O’Cleirigh wraz ze współpracownikami opublikowali dwie oryginalne prace na ten temat (O’Cleirigh *et al.*, 2005, Dobson *et al.*, 2008).

W 2006 roku Gilles van Wezel wraz ze współpracownikami w Politechnice w Delft (Holandia) zastosowali manipulacje genetyczne, a dokładnie wzmocnienie działania genu SsgA odpowiedzialnego za biosyntezę peptydoglikanu, składnika ścian komórkowych, w celu zmiany morfologii kilku gatunków promieniowców z rodzaju *Streptomyces* (van Wezel *et al.*, 2006).

W 2008 roku Bjorn-Arne Kaup i współpracownicy z Karl-Winnacker-Institut we Frankfurcie nad Menem (Niemcy) pierwszy raz zmierzili się z kilkoma grzybami strzępkowymi, w tym z *Caldariomyces fumago*, proponując dodatek mikrocząstek mineralnych do podłoża hodowlanych. Stało to się później nową techniką inżynierii morfologicznej nazwaną *microparticle-enhanced cultivation* (MPEC). I właśnie u *Caldariomyces fumago* uzyskali zwielowokrotnienie wydajności wytwarzania chloroperoksydazy. Ciekawostką jest to, że w tym artykule jednak nie padło określenie inżynieria morfologiczna (Kaup *et al.*, 2008). Od roku 2009 zespół Christopha Wittmanna, a następnie Rainera Krulla z Politechniki w Brunzswiku (Niemcy), zajął się stosowaniem takich technik inżynierii morfologicznej\*, jak MPEC oraz zwiększania osmolalności podłoża, wobec różnych szczepów *Aspergillus niger* wytwarzających  $\alpha$ -glukoamylazę i  $\beta$ -fruktofuranozydazę, publikując około 10 artykułów naukowych na ten temat. Od 2012 badania nad zastosowaniem MPEC wobec producenta lowastatyny *Aspergillus terreus* oraz grzybów białej zgnilizny należących do klasy *Basidiomycetes* *Cerrena unicolor* i *Pleurotus sapidus* są prowadzone w Politechnice Łódzkiej pod kierunkiem autora tej monografii.

W ostatnich latach (2015-2016) pojawiły się także publikacje tureckich naukowców (Uniwersytet w Antalyi, Turcja oraz Uniwersytet Stanowy Pensylwanii, USA) dotyczące zastosowania MPEC wobec grzybów z rodzaju *Rhizopus* i *Aspergillus*. Zaś chiński zespół z uniwersytetu stanowego stanu Waszyngton (USA) zajął się użyciem mikrocząstek mineralnych wobec grzyba *Mortierella isabellina* produkującego lipidy.

### 1.2. Cel i adresat monografii

Celem niniejszej monografii jest wprowadzenie czytelników w zagadnienia inżynierii morfologicznej mikroorganizmów strzępkowych. Aby ułatwić zrozumienie tych zagadnień, w pierwszych rozdziałach zostały zwięźle przedstawione podstawowe informacje na temat wzrostu i rozwoju promieniowców oraz grzybów strzępkowych wraz z tworzeniem przez nie różnych form morfologicznych. Dodatkowo przedstawiono wybrane zagadnienia inżynierii biochemicznej (mieszanie, napowietrzanie, ruch masy) dotyczące, w szczególności hodowli

---

\* Ci autorzy w języku angielskim używają pojęcia *morphology engineering* zamiast pierwotnego *morphological engineering*. W innych publikacjach te wyrażenia też bywają stosowane zamiennie.

mikroorganizmów strzępkowych w bioreaktorach. Opracowanie to również w dużej części zostało poświęcone konkretnym przykładom zastosowań technik inżynierii morfologicznej w celu sterowania morfologią grzybni.

Niniejsze opracowanie ma charakter pionierski, gdyż zagadnienia inżynierii morfologicznej mikroorganizmów strzępkowych nie zostały jeszcze ujęte, wedle wiedzy autora, w ramy żadnego podręcznika czy monografii w języku angielskim. Istnieją jedynie artykuły przeglądowe na ten temat. W języku polskim jest to oczywiście pierwsze takie opracowanie.

Adresatem monografii są naukowcy, w tym doktoranci, zajmujący się hodowlą mikroorganizmów strzępkowych. Również mogą z niego korzystać studenci studiów magisterskich. Niewykluczone jest również to, że inżynierowie pracujący w przemyśle biotechnologicznym znajdą w tej lekturze pewne inspiracje.

## 2. Wzrost oraz rozwój promieniowców i grzybów strzępkowych

Promieniowce (*Actinobacterium*) należą do nadkrólestwa *Prokaryota*, a dokładniej są bakteriami gramdodatnimi, tworzącymi charakterystyczne kolonijne struktury. Poprzez podobieństwo morfologiczne do grzybów strzępkowych promieniowce były przez wiele lat z nimi mylone i nadal w biotechnologii są technicznie traktowane wraz z grzybami strzępkowymi jako jedna grupa mikroorganizmów strzępkowych. Grzyby (*Mycota*) zaś są organizmami wielokomórkowymi należącymi od nadkrólestwa *Eukaryota*. Za grzyby strzępkowe w biotechnologii i inżynierii biochemicznej uznajemy tę część królestwa grzybów *Mycota*, które rosną w postaci strzępek, czyli wydłużonych nitkowych wielokomórkowych struktur. Wyłączone są z tej grupy nietworzące strzępek drożdże (niektórzy przedstawiciele klasy *Ascomycetes*). Do grzybów strzępkowych należą przede wszystkim przedstawiciele grzybów właściwych *Eumycota*, klasy *Zygomycetes* (sprzężniaki) oraz *Ascomycetes* (workowce). Chociaż z racji kapeluszowych owocników oraz braku tworzenia bezpłciowych spor stojące ewolucyjnie najwyżej grzyby klasy *Basidiomycetes* czasami nie określa się mianem grzybów strzępkowych, to tak naprawdę tworzą one strzępki podziemne. Wobec nich także zastosowano techniki inżynierii morfologicznej. Zarówno promieniowce, jak i grzyby strzępkowe są organizmami tlenowymi, a zainteresowanie nimi w biotechnologii wynika głównie z ich bogatego metabolizmu wtórnego. O tych metabolitach będzie mowa w podrozdziale 3.1. Głównym miejscem bytowania mikroorganizmów strzępkowych na Ziemi jest gleba, chociaż istnieją gatunki żyjące zarówno w wodach słodkich, jak i słonych.

Zastanówmy się jeszcze, co łączy z technologicznego punktu widzenia promieniowce i grzyby strzępkowe. Otóż w ciekłych hodowlach wgłębnych jedne i drugie rosną w postaci strzępek, form typu *clump* i peletek (*vide*: rozdz. 2.3). Sprawia to, że opis matematyczny ich wzrostu oraz bioreaktora, w którym prowadzona jest hodowla, jest taki sam. Chociaż nie zawsze da się znaleźć jednoznaczna korelację między wytwarzaniem metabolitów pierwotnych, wtórnych i enzymów a morfologią promieniowców i grzybów (*vide*: rozdz. 3.1), to i tak złożona morfologia tych mikroorganizmów jest uważana za jeden z najsilniejszych czynników oddziałujących zarówno pozytywnie, jak i negatywnie na przebieg takiego procesu bioreaktorowego (*vide*: rozdz. 4).

### 2.1. Budowa i cykl życia promieniowców na przykładzie *Streptomyces* sp.

Promieniowce są mikroorganizmami o prokariotycznej budowie komórki. Posiadają nukleoid zamiast jądra komórkowego, a ich rybosomy co do wielkości są takie same, jak te należące do zwykłych bakterii. Są blisko spokrewnione

z bakteriami między innymi z rodzaju *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* i *Cellulomonas* i nie mają filogenetycznie nic wspólnego z grzybami strzępkowymi. Do promieniowców tradycyjnie zaliczamy następujące rodzaje tlenowych bakterii gramdodatnich: *Thermoactinomyces*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Streptomyces* i *Nocardia*. Cechą charakterystyczną promieniowców jest tworzenie „grzybni”<sup>\*</sup> w postaci „strzępek”. Również rozmnażanie się promieniowców nie przypomina typowego podziału komórek bakterii. Wytwarzają one egzospory poprzez fragmentację „grzybni”, co przypomina nieco artrospory występujące u grzybów niższych z klasy *Zygomycetes*. I tę właśnie nazwę spor najczęściej stosuje się dla promieniowców. Wyjątkiem są promieniowce z rodzaju *Thermoactinomyces*, wytwarzające termooporne endospory podobne do tych u *Bacillus* czy *Clostridium*. Ze względu na bogaty metabolizm wtórny oraz wytwarzanie szerokiej gamy antybiotyków promieniowce z rodzaju *Streptomyces* odgrywają największą rolę w przemyśle, są szeroko badane i stosuje się wobec nich techniki inżynierii morfologicznej. Stąd w niniejszej monografii będą reprezentatywną grupą promieniowców.

Wzrost „strzępek” u promieniowców z rodzaju *Streptomyces* przebiega następująco. Artrospory *Streptomyces* mają różną zdolność do kiełkowania zależnie od ich wieku. Najlepiej kiełkują spory 2-4 tygodniowe. Do kiełkowania artrospor niezbędne jest uwodnienie środowiska. Zwilżenie spor prowadzi do modyfikacji ich powierzchni, co umożliwia zarówno wnikanie wody, jak i transport różnych substancji zarówno do wewnątrz spory, jak i ze spory na zewnątrz. Proces zwilżania spor zależy od obecności jonów wapnia, magnezu lub żelaza w podłożu. Obecność niskocząsteczkowych związków stymulujących kiełkowanie przyspiesza ten proces. Należą do nich niektóre aminokwasy, jak L-alanina, kwas L-glutaminowy, L-tyrozyna, zasady purynowe, kwas p-aminobenzoowy oraz dwutlenek węgla. Ciekawą cechą spor promieniowców jest obecność w nich metabolitów wtórnych o cechach antybiotycznych, które mogą hamować ich kiełkowanie. Zaobserwowano to zjawisko u *Streptomyces viridichromogenes*, który wytwarza streptazolinę, będącą substancją bakterio- i grzybobójczą. Wydzielenie substancji antybiotycznej na zewnątrz jest prawdopodobnie warunkiem uruchomienia procesu kiełkowania spor.

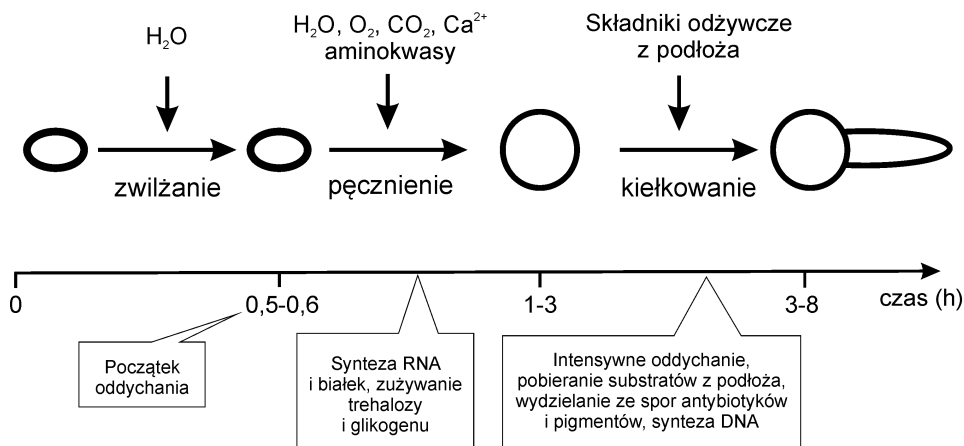
Kiedy spora pęcznieje, uruchamianie są procesy kataboliczne, a jako źródło węgla są wykorzystywane trehaloza i glikogen. Rozpoczyna się również synteza RNA i białek. Pierwsza replikacja DNA jest uruchamiana w momencie wyrastania kiełka. Najczęściej od wprowadzenia wody do pojawienia się kiełka mija od 3 do 8 godzin (rys. 2.1).

---

<sup>\*</sup> Ponieważ u promieniowców z biologicznego punktu widzenia nie występuje prawdziwa strzępka czy grzybnia, a technicznie łatwiej jest używać tych pojęć, to w kontekście tych mikroorganizmów będzie stosowany cudzoślów.



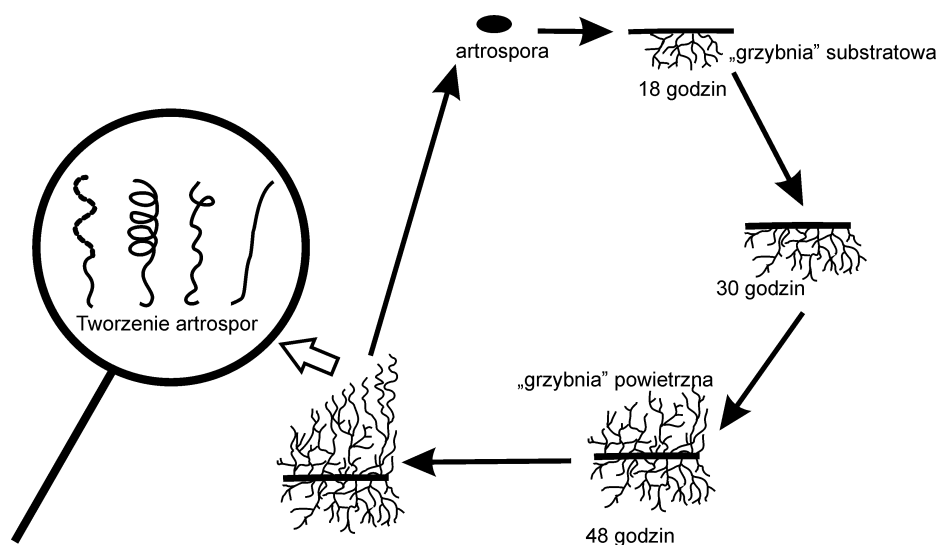
## 2. Wzrost oraz rozwój promieniowców i grzybów strzępkowych



Rys. 2.1. Początkowe stadia wzrostu promieniowców z rodzaju *Streptomyces*

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Chmiel (1998).

Pojedynczy kiełek („strzępka” wegetatywna) wyłania się z kiełkującej spory, a następnie się wydłuża. Za wydłużanie się „strzępek” odpowiadają komórki zlokalizowane na ich wierzchołkach i szacuje się, że te obszary mają długość około 20  $\mu\text{m}$ . W tym obszarze nie ma rozgałęzień. Jednak następujący co jakiś czas podział komórek, prowadzi do rozgałęziania „strzępek”. W efekcie powstaje spleciona struktura „strzępek”, która wraść w podłoże i jest ona nazywana „grzybnią” substratową lub wegetatywną (rys. 2.2).



Rys. 2.2. Cykl życia promieniowców (wzrost na podłożu stałym) z rodzaju *Streptomyces*

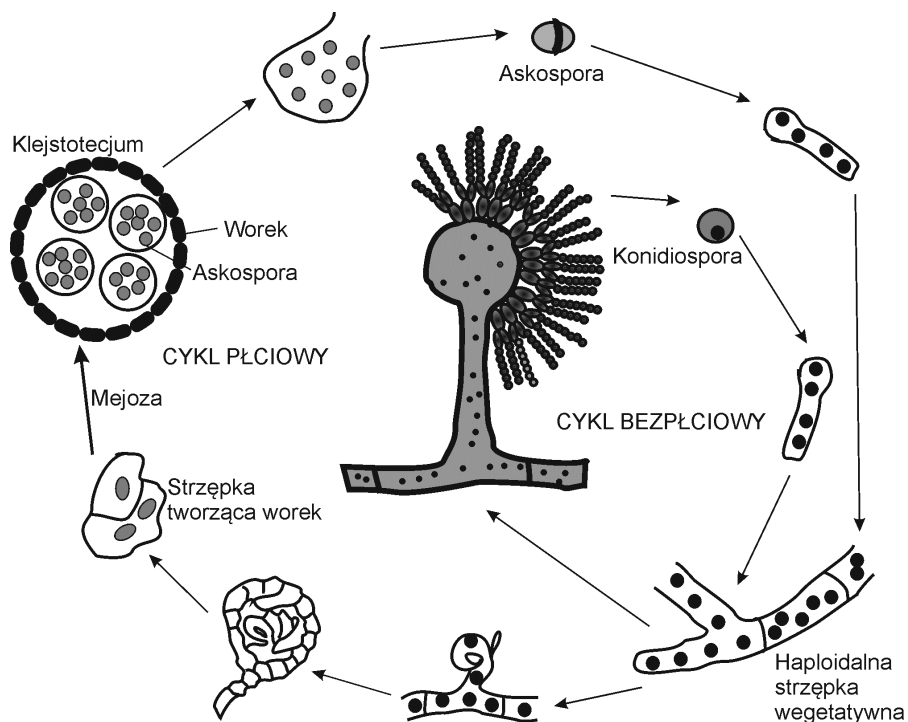
Źródło: opracowanie własne na podstawie: Angert (2005).

Pojawianie się sept (przegród) między komórkami nie jest zbyt częste, przeważnie tworzą się długie komórki zawierające większą liczbę nukleoidów. Kiedy następuje wyczerpanie składników odżywczych, włącza się biochemiczna kaskada sygnałów w celu wyprodukowania surfaktanta pokrywającego komórki. Ten surfaktant pozwala na wzrost strzępek bez dostępu do substratu. Tworzy się w ten sposób „grzybnia” powietrzna zwana też „grzybnią” generatywną. Nierozgałęzione „strzępki” „grzybni” powietrznej ulegają różnicowaniu. Dzielią się szybko, tworząc komórki, z których każda zawiera pojedynczy nukleoid. Te komórki przekształcają się ostatecznie w artrospory. Zależnie od gatunku promieniowca forma morfologiczna „grzybni” generatywnej może być różna, np. rozgałęziona lub w postaci skręconych śrub. Jedna „strzępka” generatywna wytwarza dużą liczbę artrospor. Artrospory *Streptomyces* pod względem struktury różnią się od komórek wegetatywnych. Mają bardziej zagęszczoną cytoplazmę oraz grubszą ścianę komórkową zawierającą barwnik i pojedynczy nukleoid (Chmiel, 1998; Angert, 2005).

## **2.2. Budowa i cykl życia grzybów strzępkowych na przykładzie grzybów strzępkowych *Aspergillus* sp. i *Penicillium* sp.**

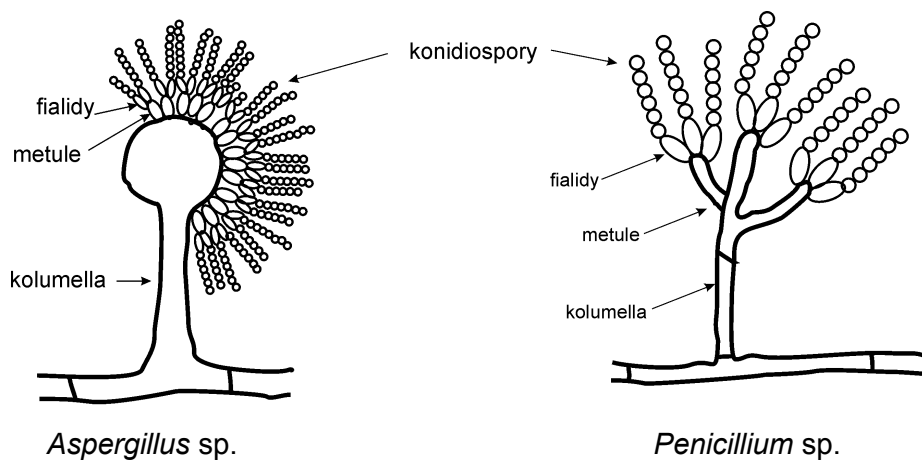
Wzrost grzybów strzępkowych to proces wieloetapowy i charakteryzuje się silnym różnicowaniem się morfologicznym mikroorganizmu. Poniższy opis dotyczy grzybów strzępkowych z klasy workowców (*Ascomycetes*) z tego względu, że te mikroorganizmy zostały najdokładniej opisane w literaturze. Wynika to z tego, że należące między innymi do workowców grzyby strzępkowe z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus* są najczęściej wykorzystywane w biotechnologii ze względu na bogaty metabolizm i użyteczność ich metabolitów dla człowieka (*vide*: rozdz. 3).

Na rys. 2.3 został przedstawiony cykl życia grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*. Cykl życiowy grzybów strzępkowych, jak *Aspergillus* sp. zaczyna się od kiełkowania haploidalnych spor bezpłciowych (konidiospor) i wzrostu grzybni wegetatywnej w postaci strzępek podzielonych zwykle septami. U grzybów niższych (np. *Zygomycetes*) sept nie ma i mamy do czynienia z komórkami wielojądrowymi zwanymi komórczakami. Następnie wytworzony zostaje aparat konidionośny charakterystyczny dla danego grzyba strzępkowego. Jest on swego rodzaju wizytówką, wskazującą, do jakiego rodzaju należy grzyb strzępkowy (rys. 2.4). Na aparacie konidionośnym powstają bezpłciowe spory.



Rys. 2.3. Cykl życia *Ascomycetes* na przykładzie *Aspergillus* sp.

Źródło: opracowanie własne na podstawie: Casselton i Zolan (2002).



Rys. 2.4. Układ konidialny grzybów z rodzaju *Penicillium* i *Aspergillus*

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Grzyby z klasy *Ascomycetes* wytwarzają także klejstotecja (worki, forma owocnika), w których znajdują się spory płciowe zwane askosporami (rys. 2.3). Mówiąc o rozmnażaniu płciowym grzybów, należy pamiętać, że grzybnia wegetatywna jest prawie zawsze haploidalna (wyjątkiem u workowców są niektóre drożdże). Spory płciowe powstają w wyniku trój etapowego procesu, na który składają się plazmogamia (połączenie się strzępek o różnej „płci”), kariogamia (połączenie się haploidalnych jąder tych strzępek i powstanie diploidalnego jądra komórkowego) oraz podział mejotyczny (redukcyjny) jądra komórkowego, w wyniku którego powstają cztery haploidalne askospory. Rozmnażanie płciowe grzybów strzępkowych nie ma większego znaczenia w biotechnologii, gdyż w warunkach hodowli przemysłowych nie dochodzi do procesu płciowego. Co więcej, uśpienie askospor ma charakter konstytutywny. Oznacza to, że ich wykiełkowanie wymaga szeregu takich bodźców, jak wysoka lub niska temperatura, energia świetlna czy obecność określonych substancji chemicznych. Takie spory, w przeciwieństwie do spor bezpłciowych, zwykle nie kiełkują po umieszczeniu ich w podłożu hodowlanym. Te grzyby z klasy *Ascomycetes*, u których nie zaobserwowano tworzenia bezpłciowych spor zaliczamy do specjalnie stworzonej klasy grzybów niedoskonałych (*Deuteromycetes*).

Z punktu widzenia przemysłowej hodowli grzybów strzępkowych ich pełny cykl życia nie jest aż tak istotny, natomiast etapy wzrostu strzępek wegetatywnych są znacznie ważniejsze, gdyż to one mają bezpośredni wpływ na morfologię grzybni. Te etapy to: (1) kiełkowanie konidiospor, (2) wydłużanie się kielków i tworzenie strzępek, (3) rozgałęzianie się strzępek oraz (4) wytwarzanie narządów (konidiofor) do tworzenia konidiospor (sporulacja). Poniżej zostaną szczegółowo omówione.

### 2.2.1. Kielkowanie konidiospor

Konidiospora jest stadium spoczynkowym grzyba strzępkowego. W konidiosporze nie zachodzą żadne reakcje syntezy materiału komórkowego. Metabolizm jest bardzo wolny, zawartość wody jest niewielka i nie obserwuje się ruchów cytoplazmy. Do uruchomienia procesu kiełkowania spor konieczna jest obecność w podłożu związków niskocząsteczkowych, które są cząsteczkami sygnałowymi dla uśpionych spor. Należą do nich sacharydy (źródło węgla), aminokwasy (źródło azotu) czy sole mineralne. Na przykład w przypadku *Neurospora crassa* obecność źródła węgla i mikroelementów jest wystarczająca do uruchomienia procesu kiełkowania spor, zaś *Aspergillus nidulans* potrzebuje jedynie glukozy (Osheroi i May, 2001). Co ciekawe przez około 14-16 godzin od wprowadzenia konidiospor *Aspergillus niger* do podłoża inokulacyjnego zawierającego glukozę, fruktozę, jony amonowe oraz inne składniki mineralne, nie obserwuje się pobierania źródła węgla, choć po tym czasie dawno faza kiełkowania spor się kończy i zaczyna się faza rozgałęziania strzępek (Bizukojć i Ledakowicz, 2006). Jednak bez obecności źródła węgla u *Aspergillus* sp. do kiełkowania konidiospor w ogóle nie dochodzi. Co więcej, pomimo tego, że grzyby strzępkowe są organizmami tlenowymi, w pierwszych godzinach kiełkowania spor zapotrzebowanie na tlen jest minimalne i jeżeli spory kiełkują

w podłożu ciekłym, ciągłe napowietrzanie podłoża jest właściwie niepotrzebne (Grimm *et al.*, 2005). Należy jeszcze pamiętać, że warunki sprzyjające kiełkowaniu spor różnią się od tych, które są optymalne dla dalszego wzrostu vegetatywnego grzybni. Z tego względu skład podłoża wykorzystywanego jako prekultura jest często odmienny od podłoża hodowlanych (produkcyjnych).

Kiełkowanie konidiospor przebiega w trzech fazach. Rozpoczyna się od pęcznienia konidiospory, następnie wysuwa się kiełek. Trzecią fazą jest wydłużanie się kielka (Paul *et al.*, 1992). Niektórzy autorzy dzielą jeszcze proces pęcznienia spor na endogenny i egzogenny (Ynagita, 1957). Podczas pęcznienia endogennego następuje głównie wchłanianie wody i ten etap jest niezależny od warunków środowiska. Pęcznienie egzogenne jest natomiast zależne od składu podłoża inokulacyjnego i obecności w nim wyżej wspomnianych cząsteczek sygnałowych.

Na etapie kiełkowania spor uruchamiane są procesy syntezy komórkowej. Rośnie liczba mitochondriów i zwiększa się rozmiar retikulum endoplazmatycznego, na którym zlokalizowane są rybosomy. Organelle te są odpowiedzialne za syntezę białek w komórce. Zaobserwowano również dużą aktywność szlaku pentozofosforanowego u kiełkujących spor *Penicillium chrysogenum* (Kornfeld i Knight, 1962). Często również są uruchamiane szlaki anaplerotyczne, czyli bezpośredniego wiązania dwutlenku węgla do fosfoenolpirogrobianu i pirogrobianu, co sprawia, że proces kiełkowania spor niektórych grzybów jest wrażliwy na stężenie dwutlenku węgla w otoczeniu (Nielsen, 1997).

Po pewnym czasie zależnym od gatunku grzyba strzępkowego spora traci swój okrągły kształt i pojawia się kiełek. Uznaje się, że jeżeli kolistość konidiospory definiowana jako:

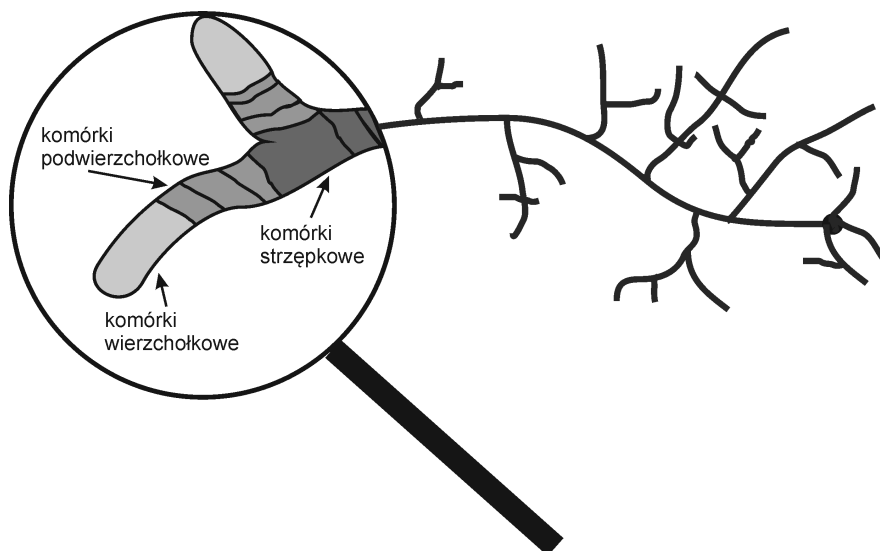
$$C = \frac{P}{2\sqrt{\pi \cdot A}} \quad (2.1)$$

gdzie:  $P$  jest obwodem spory ( $\mu\text{m}$ ), zaś  $A$  to pole powierzchni rzutu spory ( $\mu\text{m}^2$ ) i jeśli przekroczy 1,2, to można ją uznać za wykiełkowaną (Paul *et al.*, 1993). Liczba kielków, jaka może wyrosnąć z jednej spory, zależy od gatunku mikroorganizmu. Na przykład u *Penicillium megasporium* obserwowano od jednego do trzech kielków (Fletcher, 1969) zaś u *Aspergillus niger* (producent kwasu cytrynowego) dwa kielki (Bizukojć i Ledakowicz, 2006).

### 2.2.2. Wzrost strzępek

Wydłużanie się strzępek vegetatywnych, a zatem ich wzrost, odbywa się wyłącznie na wierzchołkach. Kilka komórek wierzchołkowych bierze udział we wzroście strzępki, dostarczając odpowiednią ilość cytoplazmy i prekursorów do budowy ściany komórkowej. Te komórki wierzchołkowe nie są oddzielone od siebie septami, ale każda z nich posiada wyraźnie umiejscowione własne jądro komórkowe. Tę część strzępki nazywa się obszarem wierzchołkowym (*apical cells*). Tuż za nim znajdują się oddzielone septą komórki podwierzchołkowe

(*subapical cells*). Septa oddzielająca komórki wierzchołkowe od podwierzchołkowych jest perforowana i dlatego między nimi następuje wymiana protoplazmy. Wakuole w miarę oddalania się od wierzchołka strzępki są coraz większe, a jedną z ich funkcji jest stworzenie odpowiedniego ciśnienia wewnątrzkomórkowego, żeby umożliwić transport protoplazmy do wierzchołka (Nielsen, 1992). Dalszy obszar określa się jako komórki strzępkowe (*hyphal cells*). Na rys. 2.5 przedstawiono schematycznie różnicowanie się strzępek grzybni.



Rys. 2.5. Rozgałęziona strzępka. Powiększony fragment pokazuje podział strzępki na przedziały wierzchołkowy, podwierzchołkowy oraz strzępkowy. Na przedziale podwierzchołkowym zaznaczone zostały septy

Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.

Ze względu na naturę wzrostu grzybów nitkowych nie istnieje pojęcie cyklu komórki, tak jak jest to w przypadku organizmów jednokomórkowych (bakterie i drożdże) rozmnażających się przez podział. Z tego powodu wprowadzono pojęcie cyklu podwojenia, składającego się z czterech etapów: (1) liniowego wzrostu długości nowo uformowanego wierzchołka, (2) wzrostu objętości cytoplazmy przypadającej na jądro, aż do osiągnięcia krytycznej wartości, przy której następuje podział jądra, (3) wykładniczej syntezy nowych jąder komórkowych aż do podwojenia ich liczby, (4) uformowania nowego przedziału wierzchołkowego, gdy objętość poprzedniego podwoi się i powstanie dzieląca je septa. Ten opis dokładnie odzwierciedla mechanizm wzrostu komórek grzybów strzępkowych, co ilościowo udowodniono, mierząc czas podwojenia ilości biomasy i czas wyżej opisanego cyklu duplikacji. Okazały się one identyczne dla *Aspergillus nidulans* (Fiddy i Trinci, 1976).

W obrębie komórek wierzchołkowych znajduje się duża liczba drobnych pęcherzyków-wodniczek, które w odróżnieniu od prawdziwych wakuol (*vacuoles*) nazwano w języku angielskim *vesicles* (Trinci i Collinge, 1975). Zaproponowano następujące wyjaśnienie znaczenia obecności tych pęcherzyków w komórkach wierzchołkowych. Pęcherzyki te niosą w sobie przede wszystkim enzymy lityczne (chitynazy), prekursorzy do syntezy ścian komórkowych oraz enzymy syntetyzujące. Aby strzępka grzybni uległa wydłużeniu, musi najpierw ulec hydrolizie gruba i sztywna chitynowa ściana komórkowa, bo tylko wtedy może się zwiększyć ilość cytoplazmy i innych składników komórkowych. Po wydłużeniu ściana komórkowa musi zostać odbudowana. Pęcherzyki te powstają w wyspecjalizowanych obszarach strefy wierzchołkowej i podwierzchołkowej. Następnie są transportowane do samego wierzchołka. Tam po zetknięciu się ze ścianą komórkową wydzielają swoją zawartość. Enzymy lityczne osłabiają konstrukcję ściany komórkowej, która przez to ulega ciśnieniu cytoplazmy i rozszerza się, powodując wydłużenie się strzępki. Następnie enzymy syntetyzujące umacniają rozszerzoną strzępkę bez utraty przez ścianę komórkową pierwotnych własności (Bartnicki-Garcia, 1973).

Bartnicki-Garcia (1990) opracował także teorię opisującą mechanizm transportu pęcherzyków. Jest to tzw. teoria VSC (*Vesicle Supply Center*) i przeprowadził symulację numeryczną transportu pęcherzyków. Według tej teorii VSC nie jest miejscem syntezy pęcherzyków, lecz punktem ich gromadzenia, od którego zaczynają migrację do wierzchołków strzępek. Model ten zakłada również stałą szybkość dostarczenia pęcherzyków we wszystkich kierunkach. Obliczenie położenia VSC w strzępce ma duże znaczenie fizjologiczne. Jeśli uzupełni się tego typu model o opis procesu rozgałęziania, to otrzymane zostanie narzędzie do sprawdzania różnych hipotez na temat mechanizmu wzrostu grzybów nitkowych. Jednakże model ten ma pewną wadę. Nie może być użyty do opisu całej kultury grzybów nitkowych, gdyż nie bierze pod uwagę wpływu środowiska oraz nie opisuje mechanizmów przemieszczania się VSC (Nielsen, 1992).

### 2.2.3. Tworzenie rozgałęzień

Wydłużanie strzępek grzybni nie może trwać w nieskończoność. Nie byłoby możliwe dostarczenie wszystkich substancji niezbędnych do wzrostu wierzchołka na większą odległość. Z tego powodu w pewnym momencie rozwoju grzybni zaczyna się rozgałęziać (*branching*). Istnieją pewne preferowane punkty tworzenia się rozgałęzień na strzępce. Tymi punktami są miejsca, gdzie z różnych przyczyn następuje nagromadzenie pęcherzyków (*vesicles*) (Trinci, 1978). Ponieważ są one wytwarzane ze stałą prędkością, to w miejscu gdzie przepływ cytoplazmy jest zmniejszony, czyli wokół perforowanych sept nastąpi ich akumulacja. Pozwala to na wyciągnięcie wniosku o ścisłym powiązaniu między powstawaniem sept i rozgałęzieniami. Liczba i wielkość tworzących się rozgałęzień jest cechą przypisywaną danemu szczepowi grzyba nitkowego (Nielsen, 1992).

W celu ilościowego scharakteryzowania morfologii rozgałęzionych form grzybów strzępkowych wprowadzono (Caldwell i Trinci, 1973) pojęcie długości jednostki wzrostu strzępki (*hyphal growth unit*, HGU). Jest ona definiowana jako całkowita długość strzępki dzielona przez liczbę wierzchołków. Długość HGU ( $L_{HGU}$ ) jest bardzo wartościowym parametrem ilościowym opisującym morfologię grzybów nitkowych, a z tego powodu, że strzępki grzybnia się rozgałęziają podczas wzrostu, wynika duża różnorodność morfologiczna grzybów strzępkowych w hodowlach wglębnych, o czym będzie mowa w rozdziale 2.3.

#### 2.2.4. Sporulacja

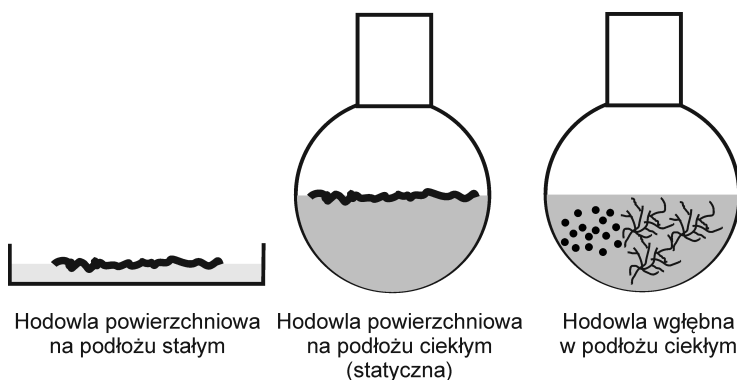
U przemysłowych szczepów *Penicillium* i *Aspergillus* hodowanych metodą wglębną rzadko obserwuje się proces sporulacji z wytworzeniem bezpłciowych konidiospor. Wynika to z faktu, że fizyczna natura ścian komórkowych w hodowli wglębnej utrudnia ten proces (Smith, 1978). Badania procesów ciągłych wykazały jednak, że głównym czynnikiem wpływającym na sporulację jest stosunek węgla do azotu w podłożu hodowlanym. Sporulacja pojawia się wyłącznie w warunkach silnego deficytu azotu i raczej przy niewielkich szybkościach rozcieńczania w bioreaktorach o działaniu ciągłym. Natomiast w hodowli powierzchniowej układy konidialne naturalnie powstają i ten typ hodowli jest rezerwuarem konidiospor niezbędnych do inokulacji kolejnych procesów wglębnych.

Proces wytworzenia konidiospor przebiega w trzech etapach. Pierwszym etapem jest wyrastanie konidiofora. Polega to na tym, że jedna z komórek wegetatywnych przekształca się w komórkę stożę, z której wyrośnie konidiofor. Sygnałem do jego wytworzenia jest deficyt substancji odżywczych. W drugim etapie na szczycie konidioforu powstaje główka (*Aspergillus*) lub rozwidlenie (*Penicillium*). Te elementy są wyraźnie zaznaczone na rys. 2.4. Na nich powstają specjalne komórki zwane fialidami, które następnie przez pączkowanie wytworzą konidiospory (etap trzeci). Konidiospory posiadają barwniki, które nadają im kolor i są ważną cechą charakterystyczną dla danego gatunku grzyba.

### 2.3. Hodowla mikroorganizmów strzępkowych w bioreaktorach

Grzyby strzępkowe oraz promieniowce hodowane są w laboratoriach i w przemyśle na kilka sposobów. Niezależnie od skali bioreaktora, to znaczy od tego, czy jest to płytka Petriego, taca o powierzchni kilku metrów kwadratowych, kolba o objętości kilkuset mililitrów czy też bioreaktor o objętości od kilku do kilkuset litrów, wyróżnia się trzy sposoby hodowli (formy wzrostu) mikroorganizmów strzępkowych (rys. 2.6).



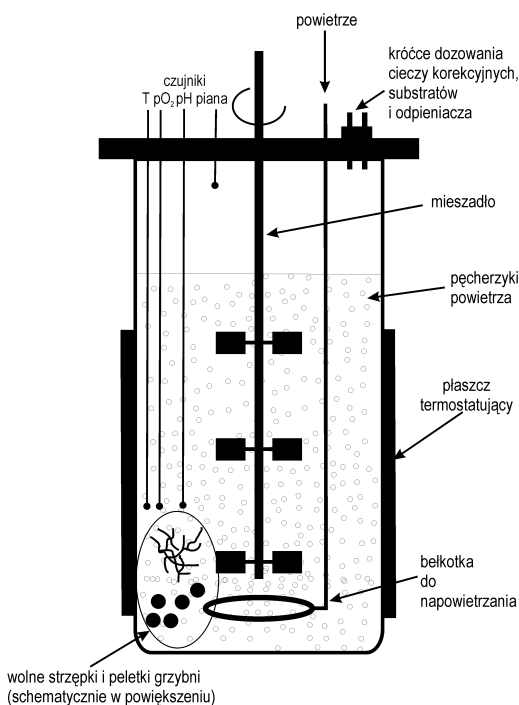


Rys. 2.6. Schematyczne porównanie wzrostu mikroorganizmów strzępkowych w hodowli głębokiej i powierzchniowej

Źródło: opracowanie własne.

Naturalnym sposobem wzrostu grzybów i promieniowców (tak zazwyczaj rosną one w przyrodzie) jest hodowla powierzchniowa na podłożu stałym. Strzępki wyrastają z kielkujących spor, wydłużając się zarówno w głąb podłoża, jak i w górę w kierunku powietrza. Również istnieją bioreaktory przemysłowe, w których taki wzrost grzybni jest wykorzystywany. Taką technikę w różnych konfiguracjach bioreaktorów o różnej konstrukcji nazywa się *Solid State Fermentation* (SSF). W hodowlach laboratoryjnych mamy również do czynienia ze wzrostem powierzchniowym na ciekłym podłożu i taką hodowlę nazywamy statyczną. Jednak najczęściej stosowanym typem hodowli jest hodowla głęboka, która charakteryzuje się tym, że spory i kielkujące z nich strzępki są w pełni zanurzone w ciekłym podłożu, które jest mieszane. I właśnie inżynieria morfologiczna, będąca przedmiotem tego opracowania, dotyczy tego ostatniego typu hodowli. Hodowla głęboka nie jest naturalna dla mikroorganizmów strzępkowych, ale ze względu na łatwość sterowania takimi parametrami procesowymi, jak temperatura, pH, nasycenie tlenem podłoża ( $pO_2$ ) oraz wymieszanie zawiesiny jest ona tak chętnie stosowana. Istnieje wiele rozwiązań konstrukcyjnych bioreaktorów do takiej hodowli. Klasyfikuje się je często pod względem sposobu dostarczenia energii mechanicznej do bioreaktora. Mamy więc bioreaktory mieszane tylko fazą gazową przez napowietrzanie, jak kolumny barbotażowe czy *air-lift* oraz bioreaktory zbiornikowe mieszadłowe, w których energię wprowadza się zarówno poprzez fazę gazową (napowietrzanie), jak i fazę ciekłą (proces mieszania za pomocą mieszadła). Ponieważ niniejsza monografia jest poświęcona morfologii i inżynierii morfologicznej mikroorganizmów strzępkowych, omawiane zagadnienia będą odnoszone do napowietrzanych bioreaktorów zbiornikowych mieszadłowych. Wynika to z tego, że jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój mikroorganizmów strzępkowych z utworzeniem określonej formy morfologicznej są naprężenia mechaniczne występujące podczas hodowli w takim bioreaktorze. W napowietrzanym bioreaktorze zbiornikowym mieszadłowym są dwa źródła dostarczania energii mechanicznej (mieszadło i pęcherzyki powietrza), dlatego naprężenia oddziału-

jące na morfologię mikroorganizmów strzępkowych w nich hodowanych są najsilniejsze. Z tego też powodu większość badań na temat wpływu morfologii mikroorganizmu na przebieg procesu hodowli prowadzi się właśnie w tego typu bioreaktorach. Nie oznacza to jednak, że ten typ bioreaktora jest optymalny do każdej hodowli z udziałem mikroorganizmów strzępkowych. Jednak te rozważania wykraczają poza tematykę niniejszej monografii. Na rys. 2.7 jest przedstawiony typowy bioreaktor zbiornikowy mieszadłowy do hodowli mikroorganizmów.



Rys. 2.7. Typowy bioreaktor zbiornikowy mieszadłowy do hodowli wglębnej mikroorganizmów w tym promieniowców i grzybów strzępkowych

*Źródło: opracowanie własne na podstawie różnych danych literaturowych.*

Składa on się ze zbiornika o stosunku wysokości do średnicy równym 2. Zazwyczaj jest wyposażony w mieszadła turbinowo-tarczowe Rushtona umieszczone po kilka sztuk na wale. Napowietrzanie prowadzone jest przez perforowaną rurkę zwaną bełkotką. Każdy bioreaktor jest termostatowany, z tego względu że większość procesów biotechnologicznych prowadzi się w stałej temperaturze. Niezbędnymi podstawowymi czujnikami są czujnik nasycenia tlenem podłoża pO<sub>2</sub> (sonda tlenowa), często sprzężona z układem sterowania poziomem nasycenia tlenem podłoża przez mieszanie i napowietrzanie, czujnik (elektroda) pH z możliwością sterowania jego poziomem przez wprowadzenie do bioreaktora cieczy korekcyjnych (kwasy i alkalia) oraz czujnik piany. Ten ostatni daje sygnał do włączenia zbijacza piany lub pompy dozującej chemiczny odpieniacz (olej silikonowy lub rzadziej olej jadalny).