

**Marcin Bizukojć**

**WPROWADZENIE DO INŻYNIERII MORFOLOGICZNEJ  
MIKROORGANIZMÓW STRZĘPKOWYCH**

Monografie  
Politechniki Łódzkiej 2017

Recenzenci:  
**prof. dr hab. Jerzy Długoński**  
**prof. dr hab. inż. Krzysztof Warmuziński**

Redaktor Naukowy Wydziału Inżynierii Procesowej  
i Ochrony Środowiska  
**dr hab. Zofia Modrzejewska**

© Copyright by Politechnika Łódzka 2017

**WYDAWNICTWO POLITECHNIKI ŁÓDZKIEJ**

90-924 Łódź, ul. Wólczańska 223

tel. 42-631-20-87, 42-631-29-52

fax 42-631-25-38

e-mail: [zamowienia@info.p.lodz.pl](mailto:zamowienia@info.p.lodz.pl)

[www.wydawnictwa.p.lodz.pl](http://www.wydawnictwa.p.lodz.pl)

**ISBN 978-83-7283-784-4**

Nakład 200 egz. Ark. druk. 8,0. Papier offset. 80 g, 70 x 100  
Druk ukończono w kwietniu 2017 r.  
Wykonano w Drukarni Quick-Druk, 90-562 Łódź, ul. Łąkowa 11  
Nr 2188

*Mojej córce Rozalii*



## 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 lowstatyny *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 ściśle 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.