

# Sledovanie rastových kriviek pri fermentácii L-lyzinu kmeňom *Brevibacterium flavum*

663.1 664.38

Ing. MILAN HUŠŤÁK, Ing. MILAN MÓCIK, Ing. MICHAL BUČKO, CSc., ALEXANDER HANO, Ing. PETER KREMPA, Biotika, n. p., Slovenská Ľupča

**Kľúčová slova:** *fermentace, L-lyzin, aminokyseliny, mikroorganismus, Brevibacterium flavum*

## Úvod

Aplikáciou esenciálnych aminokyselín vo výžive hospodárskych zvierat je možné doceliť zvýšenie produkcie mlieka a mäsa pri súčasnej úspore jadrového krmiva. Z tohoto dôvodu sa rozvíja a aj naďalej bude rozvíjať fermentačná výroba aminokyselín, a to najmä L-lyzinu. Monopolným výrobcom tohoto produktu v ČSSR je n. p. Biotika v Slovenskej Ľupči.

Určiť optimálnu dĺžku kultivácie inokula producenta L-lyzinu má z hľadiska produkcie L-lyzinu prvoradý význam [1]. Naším cieľom bolo proto aplikovať takú metódu merania rastu mikroorganizmov, ktorou by bolo možné objektívne posúdiť kvalitu inokulačných pôd z hľadiska dosiahnutej koncentrácie biomasy, dĺžky lag fázy, produkcie L-lyzinu s perspektívou aplikovať výsledky vo výrobe L-lyzinu.

## Metódy

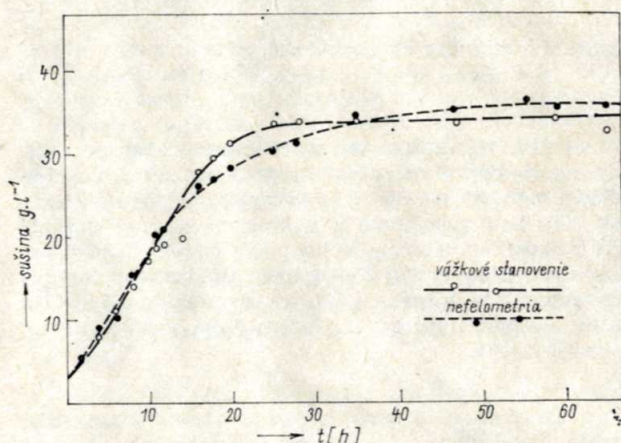
Boli odskúšané viaceré metódy stanovenia koncentrácie biomasy, a to stanovenie % sedimentu, stanovenie

sušiny odseparovanej biomasy, stanovenie počtu živých mikroorganizmov rozsevom a stanovenie zákalu [2, 3]. Pretože stanovenie % sedimentu je možné považovať len za orientačnú metódu, stanovenie sušiny biomasy a stanovenie počtu mikroorganizmov rozsevom je veľmi pracné a náročné na čas, začali sme stanovovať koncentráciu biomasy metódou merania zákalu bakteriálnej suspenzie, ktorú sme aplikovali na naše podmienky [3, 4].

Pracovali sme na prístroji Spekol fy Zeiss Jena so špeciálnym náradím pre zákalové meranie. Pri malých zákaloch existuje lineárna závislosť medzi koncentráciou čistočiek spôsobujúcich zákal a podielom rozptýleného svetelného toku. Na jeho charakteristiku má vplyv veľkosť čistočiek suspenzie a vlnová dĺžka svetla použitého k meraniu. Hoci pri tejto metóde sledujeme stupeň zakalenia vzorky, nemôžeme zanedbať absorbanciu svetla farebnými zložkami, napr. produktami Maillardových reakcií. Preto je nutné merať zákal v takých oblastiach spektra, kde je absorbancia svetla farebnými zložkami minimálna. Pre nájdenie vhodnej vlnovej dĺžky sme použili spektrofotometer Unicam SP 700 s plynule meniteľnou vlnovou dĺžkou v rozsahu 200—700 nm. Vzorku sme rie-



dili 1 : 200 a prefiltrovali cez membránový filter Sympor č. 6. Z grafických priebehov vzoriek rozličných fermentačných pód sme zistili, že pri 600 nm majú všetky vzorky nulovú absorbanciu, preto sme túto vlnovú dĺžku použili na meranie. Ako štandard sme použili zákalový normál z príslušenstva prístroja Spekol, ktorý predstavoval 15% zákal. Vzorky sme riedili 1 : 100 a použili na meranie. Všetky merania sa vzťahovali k uvedenému štandardu. Pre porovnanie uvádzame koreláciu medzi vázkovým stanovením koncentrácie biomasy a nami aplikovanou metódou merania zákalu — nefelometriou. Vázkové stanovenie prebiehalo tým spôsobom, že sme cez vysušený a odvážený membránový filter Sympor č. 6 fy Syntesia prefiltrovali vhodný objem vzorky nariadenej destilovanou vodou a filter sa potom vysušil v sušiarňi do konštantnej hmotnosti. Od hmotnosti sušiny sme odčítali hmotnosť sušiny sterilnej fermentačnej pôdy v nulte hodine a túto hodnotu, ktorá predstavovala hmotnosť suchej biomasy, sme prepočítali na 1 liter fermentačnej pôdy. Výsledky sú uvedené na obr. 1. Ako vidieť z obrázku, je korelácia medzi uvedenými spôsobmi merania dobrá.



Obr. 1. Korelácia medzi vázkovým stanovením a nefelometriou

Fermentácie prebiehali na laboratórnom fermentačnom tanku fy Giovanola, ktorý je vybavený plynulou reguláciou otáčok, pH a kyslíkovou elektródou. pH sme upravovali roztokom amoniaku, miešanie bolo realizované dvoma turbínovými miešadlami pri 450 ot. min<sup>-1</sup>, vzdušenie 20 l vzduchu . min<sup>-1</sup>. Tank pracuje bez pretlaku.

#### Matematické spracovanie výsledkov

Pretože priebeh rastových kriviek L-lyzinu je pomerne pravidelný, bolo možné na vyrovnávanie nameraných údajov použiť metódu tzv. logistickej krivky [5]. Vychádzali sme zo základného vzťahu

$$y(t) = \frac{A}{1 + 10^{a+b \cdot t}} + C \quad (1)$$

Hodnote  $C$  zodpovedá počiatočná koncentrácia mikroorganizmov  $y_{\min}$ . Hodnote  $A$  zodpovedá maximálna koncentrácia mikroorganizmov  $y_{\max}$ .  $y(t)$  je koncentrácia mikroorganizmov v čase  $t$ . Dosadením týchto hodnôt do vzťahu (1) po úprave dostaneme

$$\log \left( \frac{y_{\max}}{y(t) - y_{\min}} - 1 \right) = a + b \cdot t \quad (2)$$

Tabuľka 1. Vypočítané koeficienty  $a$ ,  $b$ , rovnice (1)

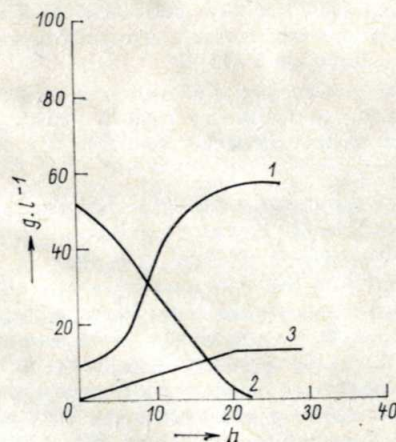
Druh experimentu	koeficient $a$	koeficient $b$
očkovanie pôdy 10 obj. % inokula obr. 2.	1,73	-0,1675
očkovanie pôdy 1 obj. % inokula obr. 3.	3,03	-0,1293
fermentácia na komplexnej pôde obr. 4.	3,45	-0,1715
fermentácia bez kyslého hydrolyzáta arašidovej múky obr. 5.	3,54	-0,1420

Zavedením novej premennej

$$yH(t) = \log \left( \frac{y_{\max}}{y(t) - y_{\min}} - 1 \right) \quad (3)$$

$$\text{dostávame } yH(t) = a + b \cdot t \quad (4)$$

Pre viacero meraní sme dostali systém rovníc a metódou najmenších štvorcov sme vyriešili hodnoty koeficientov  $a$ ,  $b$ . Na riešenie sme vypracovali program na počítači SM 3/20 s grafickým výstupom na BAK 4T. Systém rovníc sme riešili pomocou rotácie elementárnej matice. Túto metódu sme zvolili preto, že pri numerickom riešení Gaussovou metódou nemusíme dostať úplne presný výsledok. Sústava rovníc z technickej úlohy má totiž koeficienty získané experimentálne a potom je nutné poznať vplyv zmien koeficientov na riešenie. Môže sa stať, že aj malá zmena koeficientov vedie k veľkým zmenám výsledkov (malá stabilita systému). Nami použitá metóda vyžaduje síce viac výpočtových operácií oproti Gaussovej metóde, má však väčšiu stabilitu a je málo citlivá na nepresnosti vzniknuté malými hodnotami determinantov pomocných sústav rovníc [7, 8, 9].



Obr. 2. Časový priebeh fermentácie pri naočkovaní 10 obj. % inokula  
1 — biomasa %, 2 — sacharóza g.l<sup>-1</sup>, 3 — L-lyzín g.l<sup>-1</sup>

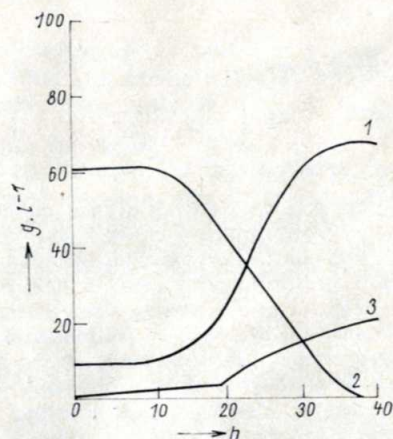


## Výsledky a diskusia

V prvom pokuse sme sledovali, ako sa prejaví rozličné množstvo inokula na tvare rastovej krivky. Na kultiváciu sme použili tzv. bohatú inokulačnú pôdu nasledovného zloženia:

sacharóza — 5 %  
kyslý hydrolyzáť arašidovej múky — 6,65 %  
melasa — 1 %  
kukurličný extrakt (60 % sušiny) — 4,5 %  
dihydrogénfosforečnan draselný — 0,1 %  
síran horečnatý — 0,03 %

Na obr. 2 je časový priebeh fermentácie pri naočkovaní horeuvedenej pôdy 10 obj. % inokula kmeňa *Brevibacterium flavum*, na obr. 3 je časový priebeh fermentácie na tej istej pôde naočkovanej len 1 obj. % inokula. Ako je zrejmé z porovnania oboch grafických priebehov, v prvom prípade je dĺžka lag fázy minimálna, kým v druhom prípade sa dĺžka lag fázy pohybuje od 12 do 15 h. Východzu koncentráciu biomasy pri meraní nefelometrickou metódou ovplyvňujú najmä suspenzné častice vo fermentačnej pôde pochádzajúce z kukuričného extraktu, melasy



Obr. 3. Časový priebeh fermentácie pri naočkovaní 1 obj. % inokula

1 — biomasa %, 2 — sacharóza g.l<sup>-1</sup>, 3 — L-lyzín g.l<sup>-1</sup>

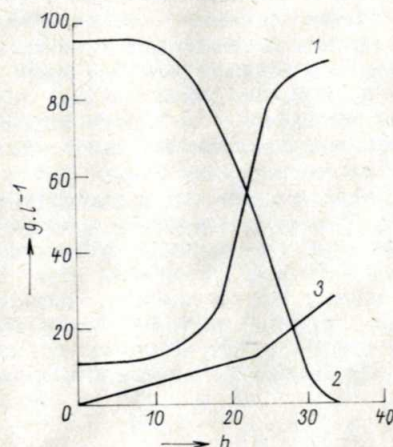
a najmä z kyslého hydrolyzáta arašidovej múky, v ktorom obsah suspenzných častíc je daný kvalitou filtrácie pri jeho príprave. Hodnoty počiatočných koncentrácií biomasy sa pri spôsobe merania, ako bol popísaný vyššie, pohybovali v intervale 5–12 %.

V druhom pokuse sme sledovali, ako ovplyvní vynechanie jedného zo substrátov rastovú krivku. Pracovali sme na pôde nasledovného zloženia:

sacharóza — 8 %  
kyslý hydrolyzáť arašidovej múky — 6,65 %  
kukurličný extrakt (60 % sušiny) — 6 %  
dihydrogénfosforečnan draselný — 0,1 %  
síran horečnatý — 0,03 %

Na obr. 4 je časový priebeh fermentácie. Tank bol naočkovaný 1 obj. % inokula kmeňa *Brevibacterium flavum*. Na obr. 5 je časový priebeh fermentácie na tej istej pôde, ale z pôdy bol vynechaný kyslý hydrolyzáť arašidovej múky. Množstvo inokula bolo 1 obj. %. Z porovnania oboch grafických priebehov vyplýva, že vynechanie kyslého hydrolyzáta arašidovej múky z pôdy sa neprejaví v dĺžke lag fázy, ktorá je u oboch priebehov 12–15 h, ale prejaví sa v rozdielnej koncentrácii biomasy. Pretože hydrolyzáť arašidovej múky obsahuje okrem iných ami-

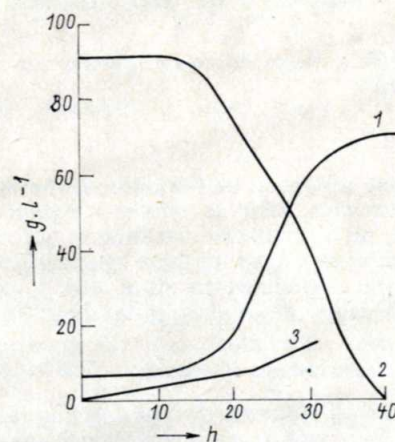
nokyselín tiež metionín a treonín, ktoré sú nevyhnutné pre rast kmeňa *Brevibacterium flavum*, možno predpokladať, že zníženie koncentrácie biomasy v druhom prípade o 20 % je spôsobené limitáciou rastu týmito aminokyse-



Obr. 4. Fermentácia na komplexnej pôde

1 — biomasa %, 2 — sacharóza g.l<sup>-1</sup>, 3 — L-lyzín g.l<sup>-1</sup>

linami [10, 11]. K limitácii rastu došlo zrejme po utlizácii metionínu a treonínu, ktorý sa nachádzal v kukuričnom extrakte. Na obr. 2–5 sú vynesené rastové křivky tak, ako boli vypočítané a nakreslené na počítači SM 3/20 z experimentálnych údajov podľa matematického modelu uvedeného vyššie. Pre úplnosť uvádzame v tabuľke 1 koeficienty a, b rovnice (1). So vzrastom koeficientu a rastie aj dĺžka lag fázy, koeficient b ovplyvňuje strmosť rastovej křivky.



Obr. 5. Fermentácia na pôde s redukovaným zdrojom organického dusíka

1 — biomasa %, 2 — sacharóza g.l<sup>-1</sup>, 3 — L-lyzín g.l<sup>-1</sup>

Ako vyplýva z pokusov, je možné metódu merania nárastu biomasy tak, ako bola uvedená v úvode práce, použiť pri sledovaní koncentrácie biomasy v očkovacích tankoch. Po vyrovnaní nameraných údajov pomocou matematického modelu získame spoľahlivý obraz o vplyve surovín, inokulačného materiálu, vzdušenia a ďalších podmienok na koncentráciu narastenej biomasy v závislosti na čase.

Lektoroval Ing. Petr Pilát, CSc.



## Literatúra

- [1] Autorské osvedčenie ČSSR č. 199 775, 1982
- [2] SIKYTA B.: Metódy technické mikrobiologie, SNTL, Praha 1978
- [3] FERENCÍK M., ŠKÁRKA B.: Biochemické laboratórne metódy, ALFA, Bratislava 1981
- [4] DAVES E.: Kvantitatívni problémy v biochemii, naklad. ČSAV Praha 1965
- [5] BETINA V., NĚMEC P.: Všeobecná mikrobiológia, ALFA, Bratislava 1977
- [6] HAEAMA D.: Technická mikrobiológia, SVTL, Bratislava 1967
- [7] FADĚJEV D., FADĚJEVOVÁ V.: Numerické metódy lineárni algebry, SNTL, Praha 1964
- [8] OLEHLA M., VĚCHET V., OLEHLA J.: Řešení úloh matematické statistiky ve Fortranu, Naklad. dopravy a spojů, Praha 1982
- [9] OLEHLA M., FIŠER J.: Praktické použití Fortranu. Naklad. dopravy a spojů, Praha 1979
- [10] YAMADA K., KINISHITA S.: The microbial production of amino acids, Tokyo 1972
- [11] LEIT M. P., RUKLIŠA M. P., VIESTURS U. E., ŠVINKA J. E.: Acta Biotechnologica 2, 1982, č. 1, s. 79

**Hušťák M., Mócik M., Bučko M., Hano A., Krempa P.: Sledovanie rastových kriviek pri fermentácii L-lyzínu kmeňom Brevibacterium flavum.** Kvas. prům., 31, 1983, č. 6, s. 132—135.

Bola vypracovaná metóda na meranie rastu biomasy pri fermentácii L-lyzínu, ktorej princíp spočíva v meraní zákalu bakteriálnej suspenzie. Metóda je veľmi rýchla a je porovnateľná s klasickými metódami merania rastu mikroorganizmov. Experimentálne hodnoty boli vyrovnané metódou logistickej krivky na počítači. Boli porovnané rastové krivky získané pri inokulácii očkovacích pôd jedným a desiatimi objemovými percentami inokula ako aj rastové krivky získané na rôznych druhoch očkovacích pôd.

**Гуштак, М., Моцик, М., Бучко, М., Гано, А., Кремпа, П.: Наблюдение кривых роста штамма B. flavum при ферментации L-лизина.** Квас. прум. 31, 1985, № 6, стр. 132—135.

Разработан метод измерения роста биомассы при ферментации L-лизина, принцип которой заключается в измерении мутности бактериальной суспензии. Метод

является очень быстрым и сравнительным с классическими методами измерения роста микроорганизмов. Величины, полученные в эксперименте, выравнивались методом логистической кривой на вычислительной машине. Сравнивались кривые роста, полученные при посеве сред 1 и 10 объёмными процентами посевного материала и на разных видах посевных сред.

**Hušťák M., Mócik M., Bučko M., Hano A., Krempa P.: Investigation of the growth curves in L-Lysin fermentation by the strain of Brevibacterium flavum.** Kvas. prům., 31, 1985, No. 6, pp. 132—135.

The method for the measurement of the biomass growth in the fermentation of L-Lysin, principle of which is based on the measurement of bacterial suspension turbidity, was worked out. The method is quick and comparable with the classical methods for the measurement of microorganisms growth. The experimental values were corrected by a method of the logistic curve on computer. The growth curves obtained by the 1 % and 10 % v/v of inoculum as well as those ones with various kinds of the inoculating medium were compared.

**Hušťák, M., Mócik M., Bučko M., Hano A., Krempa P.: Verfolgung der Wachstumskurven bei der Fermentation von L-Lysin mit dem Stamm Brevibacterium flavum.** Kvas. prům., 31, 1985, No. 6, S. 132—135.

Es wurde eine Methode zum Messen des Wachstums der Biomasse bei der Fermentation von L-Lysin gearbeitet, deren Prinzip im Messen der Trübung der bakteriellen Suspension besteht. Die Methode ist sehr schnell und mit den klassischen Methoden der Wachstumsmessung von Mikroorganismen vergleichbar. Die experimentell gemessenen Werte wurde mit einem Computer mit der Methode der logistischen Kurve ausgeglichen. Es wurden Wachstumskurven verglichen, die bei der Inokulation von Impfmedien mit 1 Vol. % und 10 Vol. % Inokulum, wie auch Wachstumskurven die mit verschiedenen Impfmedien gewonnen wurden.