

Fyziologicko-inženýrská analýza přechodových stavů v kontinuální kultuře *Candida utilis*

RNDr. DAGMAR VRANÁ, CSc., Ing. JAROSLAV VOTRUBA, CSc., Ing. IVO HAVLÍK, Ing. MIROSLAV SOBOTKA, CSc.,
Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Klíčová slova: cyklovaná kontinuální kultivace, Candida utilis, fyziologický stav, simulace neidealit míchání, dynamika přechodových stavů.

Úvod

Jednou ze základních úloh procesního inženýrství mikrobiologických technologií je vypracování exaktních metod pro převod těchto technologií do většího měřítka a dále i způsobů jejich automatizovaného řízení. Při zvětšování reaktorů pro reakce plyn—kapalina v chemických technologiích je kladen hlavní důraz na hydrodynamiku zařízení [1], tzn. dobu homogenizace, mezifázový přenos hmoty a tepla, rychlostní pole atd., přitom se mlčky předpokládá, že mechanismus lokální kinetiky reakce, ani hodnoty rychlostních součinitelů v kapalné fázi se s rozdílnou hydrodynamikou nemění. Když je tento pří-

stup užit pro mikrobiologické procesy a při zvětšování není respektována fyziologie růstu a produkce, která je závislá na hydrodynamice, nemusíme být při převodu do většího měřítka úspěšní [2]. Při návrhu optimálního řízení pomocí metod vyvinutých pro chemické reaktory, můžeme proces přeregulovat i tehdy, nerespektujeme-li časovou hierarchii vzniku fyziologické aktivity, jako je tomu např. při produkci sekundárních metabolitů.

V naší práci jsme se na příkladu kultivace *C. utilis* pokusili analyzovat přechodové stavy v kontinuální kultuře právě z hlediska vztahu fyziologických změn a podmínek navozených neidealitami v míchání, popř. regulačním zá-
sahem.

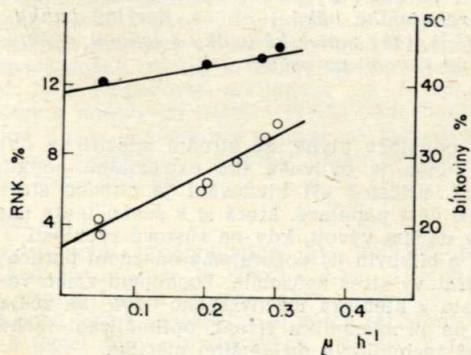
V kontinuální kultivaci lze v ustáleném stavu dlouhodobě dosáhnout definovaného fyziologického stavu kultury mikroorganismů. Spojíme-li kontinuální kultivaci s vhodně programovaným řídicím počítačem, lze v laboratorních podmínkách experimentálně simulovat a detailně studovat vliv nehomogenit v míchání nebo vliv regulační poruchy na fyziologii růstu. V naší práci jsme užili experimentální uspořádání, které umožnilo střídání živění a hladovění řízením přítoku substrátu. Při pění dochází ve fermentoru k vyfotování většího množství biomasy do pěny, kde velmi rychle nastane substrátový limit a značně se zpomalí rychlost růstu. Z pěny je biomasa postupně účinkem míchání zpětně dispergována do substrátem bohaté kapalně fáze. Po určité době zdržení biomasy v kapalině je tato opět vyfotována do pěny a situace se opakuje. V kontinuální kultivaci lze tento případ imitovat cyklováním v přítoku živin. Doba, po kterou je pumpa zapnuta, simuluje situaci, v níž je organismus v promíchávané kapalině a nehladoví. Doba, po kterou je pumpa vypnuta, simuluje stav hladovění organismu v pěně.

Materiál a metody

Při studiu byla užita kvasinka *Candida utilis* A49 ze sbírky Mikrobiologického ústavu ČSAV. Ke kultivaci bylo užito minerálního média a laboratorního fermentoru LF-2 [3]. Metody stanovení koncentrace sušiny, obsahu RNK a bílkovin v sušině a metody pro stanovení morfologického obrazu buněčné populace jsou uvedeny jinde [3]. Řízení pumpy bylo zprostředkováno pomocí mikro-počítače SAPI-1 (Tesla Liberec) a software, vyvinutého v Mikrobiologickém ústavu ČSAV. Při experimentech byla zřetřovací rychlost D nastavena na hodnotu $D = 0.2 \text{ h}^{-1}$. Použili jsme následujícího časového schématu cyklování mezi živěním a hladověním: 30:15; 30:30; 30:60; 30:120:30:180, kde první číslo udává dobu vypnutí pumpy, druhé její zapnutí v minutách.

Výsledky a diskuse

Ke sledování změn ve fyziologickém stavu kultury, podrobené vnějším zásahům do růstu pomocí limitace substrátem, jsme užili jako markerů fyziologického stavu vedle morfologických parametrů (rozměrů buněk, frekvence pučení, distribuce relativního věku) také markerů biochemických (obsah proteinů a RNK v sušině).



Obr. 1. Průběh závislosti obsahu RNK (○) a bílkovin (●) v sušině na specifické růstové rychlosti $\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$ pro ustálený stav v kontinuální kultivaci a exponenciální fázi ve vsádkové kultivaci.

Na obr. 1 je vynesena závislost obsahu bílkovin a RNK proti růstové rychlosti. Data byla získána jednak v podmínkách ustáleného stavu v kontinuální kultivaci, jednak ve vsádkové kultivaci v blízkosti exponenciální fáze růstu. Závislosti mají známý, pro většinu kvasinek typický, lineární průběh. Chceme-li hodnotit vliv přerušovaného živění při nehomogenním míchání na fyziologii růstu,

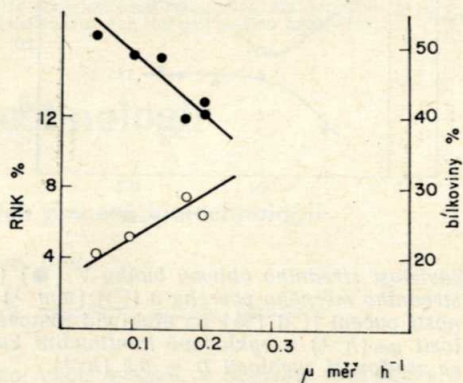
je užitečné zavést pojem pozorované specifické rychlosti růstu, definované takto:

$$\mu_m = (t_p \mu_p + t_k \mu_k) / (t_p + t_k)$$

Tato rychlost je složena z rychlosti růstu v míchané části vsádky (μ_k), ve které je střední doba zdržení organismu t_k a z rychlosti růstu v pěně ($\mu_p \ll \mu_k$) s dobou prodloužení (t_p). Pro naše experimentální uspořádání, které imitovalo vliv nehomogenit v tanku na fyziologii růstu je μ_m dána vztahem mezi zřetřovací rychlostí D , dobou přerušování t_s a dobou cyklu t_c mezi dvěma po sobě následujícími cykly hladovění. Předpokládaná rychlost růstu v pěně je nulová. Vztah pro výpočet μ_m je pak definován takto:

$$\mu_m = D (t_c - t_s) / t_c$$

Na obr. 2 je znázorněna experimentálně zjištěná závislost obou zvolených biochemických markerů fyziologického stavu na pozorované specifické rychlosti růstu μ_m .



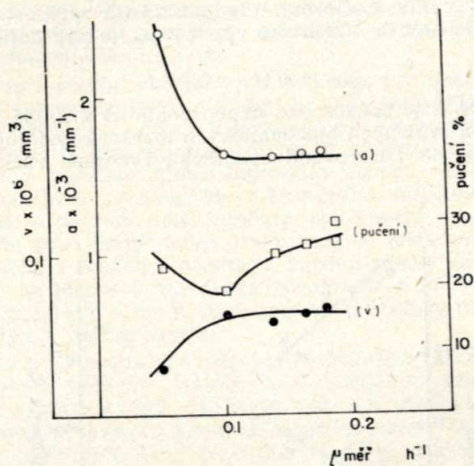
Obr. 2. Průběh závislosti obsahu RNK (○) a bílkovin (●) v sušině na efektivní růstové rychlosti $\mu_m \text{ (h}^{-1}\text{)}$ v cyklované kontinuální kultivaci se zřetřovací rychlostí $D = 0,2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$.

Z obrázku je patrné, že závislost obsahu RNK na efektivní rychlosti růstu se nemění a je totožná s průběhem závislosti RNK v ustáleném stavu (obr. 1). Závislost obsahu bílkovin v sušině se však výrazně změnila. Vyšší frekvence cyklování vede ke zvýšení obsahu bílkovin.

Na obr. 3 jsou vyneseny hodnoty získané vyhodnocením morfologických markerů fyziologického stavu kultury. Střední objem buňky je podobný jako střední povrch buňky prakticky nezávislý na poruchách v živěním, pouze v podmínkách silného hladovění ($\mu_m \leq 0.05 \text{ h}^{-1}$) jsme nacházeli menší buňky, což je ostatně v souladu s daty, získanými v kontinuální kultuře *C. utilis* v ustáleném stavu [4]. Vliv periodického střídání živění a hladovění se na morfologických markerech fyziologického stavu výrazně neprojevil, zajímavý je pouze poměr mezi pučícími a nepučícími buňkami. Četnost pučení s rostoucí μ_m stoupá, pouze v podmínkách hlubokého substrátového limitu, kdy klesá střední objem buňky, dochází k mírnému zvýšení intenzity pučení, která zřejmě souvisí se zintenzivněním pochodů, které připravují buněčnou populaci na přežití v podmínkách hladovění.

Ve druhé části pokusů, prováděných v popsaném experimentálním uspořádání, jsme se zaměřili na studium vlivu regulační poruchy ve vztahu k fyziologii růstu. Na obr. 4a—e jsou vyneseny experimentální výsledky získané detailnější časovou analýzou morfologických a biochemických markerů fyziologického stavu mikrobiální populace. Na obr. 4a je znázorněn časový průběh přítoku živin. Na obr. 4b je znázorněn průběh koncentrace sušiny a z bilance vypočtené růstové rychlosti μ . Průběh rychlosti růstu v první půlhodině byl odhadnut podle změn v koncentraci rozpuštěného kyslíku. Z obrázku je patrné, že účinek poruchy v živěním se projeví v dalším růstu

asi po půlhodinovém prodlení. V této době se ve fermentoru akumuluje nespotebíbovaný substrát, který je v další fázi růstu spotřebováván rychlostí růstu větší než zředovací rychlost D . Na obr. 4c je vynesena závislost obsahu RNK a bílkovin v sušině. Porucha v živině má za následek pokles obsahu RNK a bílkovin v sušině. Při spuštění živině nastává opět vzestup obou křivek, ale časová prodleva mezi zastavením a obnovením tvorby bílkovin a RNK je u bílkovin asi o polovinu kratší než

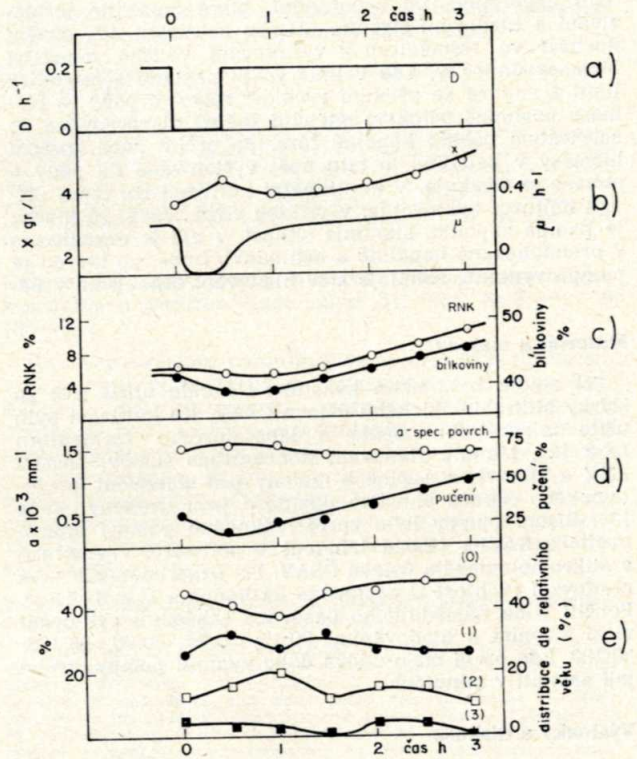


Obr. 3. Závislost středního objemu buňky V (●) (mm^3), středního měrného povrchu a (○) (mm^{-1}) a četnosti pučení (□) (%) na efektivní růstové rychlosti μ_m (h^{-1}) v cyklované kontinuální kultivaci se zředovací rychlostí $D = 0,2$ (h^{-1}).

u RNK. Při přechodových dějích musí tedy nutné docházet k časovému rozpojení křivek obsahu RNK a bílkovin v závislosti na měnící se růstové rychlosti μ . Obsah RNK totiž celkem těsně kopíruje změnu v růstové rychlosti, zatímco syntéza bílkovin ji mírně předbývá. Rozdílnými časovými prodlevami v biosyntéze bílkovin a RNK lze vysvětlit i pozorovanou akumulaci bílkovin v cyklované kontinuální kultivaci, jak je znázorněno na obr. 2. Je zajímavé, že k akumulaci bílkovin následkem substrátového stresu dochází dříve než k vzestupu křivky sušiny a množství bílkovin v biomase, jak plyne z obr. 4d, těsně koreluje se zvýšeným výskytem pučících buněk, i když celkový střední měrný povrch buněk má tendenci spíše klesat. To je zřejmě dáno také tím, že velikost buněk se zvětšuje se zvyšující se růstovou rychlostí, jak bylo pro *C. utilis* zjištěno dříve [4]. Podobný vztah mezi četností pučení a substrátovým stresem v kontinuální kultivaci pro kvasinku *Loederomyces elongisporus* publikoval Heinritz et al. [5]. Vliv periodického režimu živině na zvýšení obsahu proteinů u bakterií popsal rovněž Pickett et al. [6], takže naše nálezy, i když v několika bodech překvapující, jsou ve shodě se známými pracemi a mají obecnější platnost.

Na obr. 4e je znázorněn pozorovaný průběh ve změnách distribuce relativního věku populace kvasinek, tedy četnosti mateřských buněk s jednou, dvěma a třemi jizvami po oddělení pupence a bezjizvných buněk dceřiných. Následkem poruchy v živině stoupne v populaci počet buněk mateřských. Po odeznění poruchy se tento trend udrží u vícejizvných buněk a dceřiných buněk, které nejlépe snesly substrátový stres, se po jistou dobu nedělí, takže četnost mateřských buněk s jednou jizvou v populaci klesne. Na četnosti mateřských buněk se dvěma jizvami se porucha v živině projevuje až za hodinu po spuštění přítoku, což odpovídá střední době zdržení buňky v morfologickém stadiu mateřské buňky [4] a u buněk se třemi jizvami je pokles v četnosti posunut o dvojnásobek této doby, což je v souladu s dříve publikovaným modelem morfologické diferenciaci kvasničné populace [7].

Výsledky získané v této studii ukazují, že následek stresu, vyvolaného limitací substrátem, která byla navozována buď regulační poruchou nebo nehomogenitou vsádky, se projeví nejvíce v syntéze bílkovin. Z analýzy



Obr. 4. Odezva fyziologického stavu kultury *C. utilis* na regulační poruchu v přítoku živin. a) průběh poruchy živině (—) v čase, b) průběh koncentrace sušiny (○) g/l a specifické růstové rychlosti μ (h^{-1}) (plná čára —), c) průběh obsahu bílkovin (●) a RNK (○) v sušině, d) průběh závislosti specifického povrchu buněk (○) a četnosti pučení (●) po regulační poruše e) distribuce relativního věku (○) — dceřiné buňky, (●) — mateřské buňky s jednou, dvěma a třemi jizvami po pučení.

chování populace plyne, že střední specifický objem a povrch buněk je ovlivněn jen extrémními podmínkami hladovění, přičemž při hladovění je nejvíce stresována nejmladší část populace, která si s sebou tento následek nese i v dalším vývoji, kdy na růstové rychlosti, i obsahu RNK a bílkovin již pozorujeme odeznění poruchy, která substrátový stres způsobila. Pochopení změn ve fyziologii růstu z hlediska inženýrského dává tak zcela nový pohled na problematiku řízení, optimalizaci technologií a převod technologie do většího měřítka.

Literatura

- MARCOLEVIČ, N. A., PROTODJAKONOV, I. O., ROMANKOV, P. G.: Teor. Osnovy Chim. Technol. 18, 1984, s. 3.
- VARDAR, F.: Process Biochem. 18, 5, 1983, s. 21.
- VRANÁ, D.: Biotech. Bioeng. 18, 1976, s. 297.
- VRANÁ, D., VOTRUBA, J.: Wiss. Zeit. E. Moritz-Arndt Universität Greifswald. Math. Naturwiss. Reihe 29, 3, 1980, s. 9.
- HEINRITZ, B., ROGGE, G., STICHEL, E., BLEY, TH.: Acta Biotechnol. 2, 1983, s. 125.
- PICKETT, A. M., TOPIWALA, H. H., BAZIN, M. J.: Process Biochem. 14, 11, 1980, s. 10.
- VOTRUBA, J., VRANÁ, D.: Mathematical method of morphological differentiation in a yeast population in Continuous cultivation of microorganisms s. 31 (editoři B. SIKYTA, Z. FENCL a V. PO-LÁČEK), Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha, 1980.

Vraná, D. - Votruba, J. - Havlík, I. - Sobotka, M.: Fyziologicko-inženýrská analýza přechodových stavů v kontinuální kultuře *Candida utilis*. Kvas. prům. 31, 1985, č. 7—8, s. 188—191.

K simulaci regulační poruchy a vlivu neidealit v míchání na změny fyziologického stavu kultury byla užita cyklovaná kontinuální kultivace *Candida utilis*. Bylo zjištěno, že přechodné hladovění mikroorganismu na substrát nejvíce ovlivní syntézu bílkovin. Střední objem a povrch buněk nebyl periodickým přerušováním živění ovlivněn. Simulovaná regulační porucha se nejdéle projevuje ve změně věkového složení mikrobiální populace.

Врана, Д., Вотруба, И., Гавлик, И., Сobotka, М.: Инженерно-физиологический анализ переходных состояний в континуальной культуре *Candida utilis*. Квас. прум. 31, 1985, № 7—8, стр. 188—191.

Для имитации влияния процессов неидеального перемешивания и перерыва в добавке сырья на физиологическое состояние микроорганизмов была использована непрерывная культура дрожжей *Candida utilis*. Было установлено, что периодическое голодание по субстрату имеет самое большое влияние на биосинтез белка. Наоборот периодическая добавка субстрата не проявила большого впечатления на средний объем и поверхность клеток. Имитированный перерыв в управлении добавки

субстрата необходимое время возможно наблюдать в возрастной структуре микробной популяции.

Vraná, D. - Votruba, J. - Havlík, I. - Sobotka, M.: Engineering-physiological analysis of transient states in continuous culture of *Candida utilis*. Kvas. prům. 31, 1985, No. 7—8, pp. 188—191.

The cyclic continuous culture of *Candida utilis* was used for a simulation of feeding disturbances and nonideal mixing on physiological state of microbial culture. It was found that by the transient substrate limitation in cyclic continuous culture the protein content in biomass was mostly influenced. Mean volume and surface of cells have not been changed by cyclic substrate feeding strategy. The starvation caused by stopping in substrate feed has the long-term effect on the relative age distribution of the population.

Vraná, D. - Votruba, J. - Havlík, J. - Sobotka, M.: Engineering-physiological Analyse der Übergangszustände in kontinuierlicher Kultur von *Candida utilis*. Kvas. prům. 31, 1985, Nr. 7—8, S. 188—191.

Zur simulation der Regulationsstörung und den Einflusses der nicht idealen Rührung auf den physiologischen Zustand der Hefekultur wurde eine zyklisierte kontinuierliche Kultur der *Candida utilis* benutzt. Es wurde festgestellt, daß durch vorübergehendes Hungern vor allem die Eiweißstoffsynthese beeinflusst wird. Das durchschnittliche Volumen sowie die Zelloberfläche wurde durch den periodischen Abbruch des Nährstoffzuflusses nicht geändert. Die simulierte Regulationsstörung wird am längsten in der Änderung der Altersstruktur der Hefepopulation beobachtet.