

RAST CELIC MODELI RASTI

Hitrost rasti biomase

Določanje koncentracije biomase

Kinetika šaržnega procesa

Povečanje biomase

- ③ Posledica povečanja števila in velikosti celic
- Poraba hranil za:
 - Proizvodnjo energije
 - Povečanje mase celic
 - Tvorba produkta

substrati + celice → izvencelični produkti + več celic



Hitrost rasti biomase

8 Avtokatalitska reakcija 1. reda

$$r_x = \mu \cdot X \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

r_x ... hitrost rasti biomase [$\text{kg}/\text{m}^3 \text{ h}$]

μ ... specifična hitrost rasti [h^{-1}]

X ... koncentracija biomase [kg/m^3]

$$\mu_R = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt}$$

N ... število celic

μ_R ... specifična hitrost podvojevanja [h^{-1}]

$$\mu = \mu_g - k_d$$

μ_g ... bruto specifična hitrost rasti [h^{-1}]

k_d ... hitrost izgube mase na račun smrti celic ali endogenega metabolizma [h^{-1}]

Šaržni bioproces

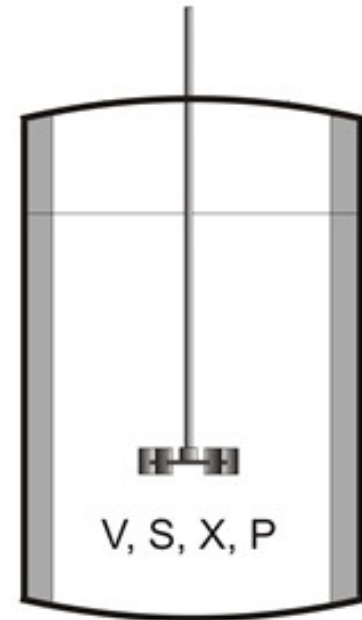
- Nestacionarni pogoji
- Snovna bilanca za biomaso:

$$V \frac{dX}{dt} = r_x \cdot V \quad \text{oz.} \quad \frac{dX}{dt} = r_x$$

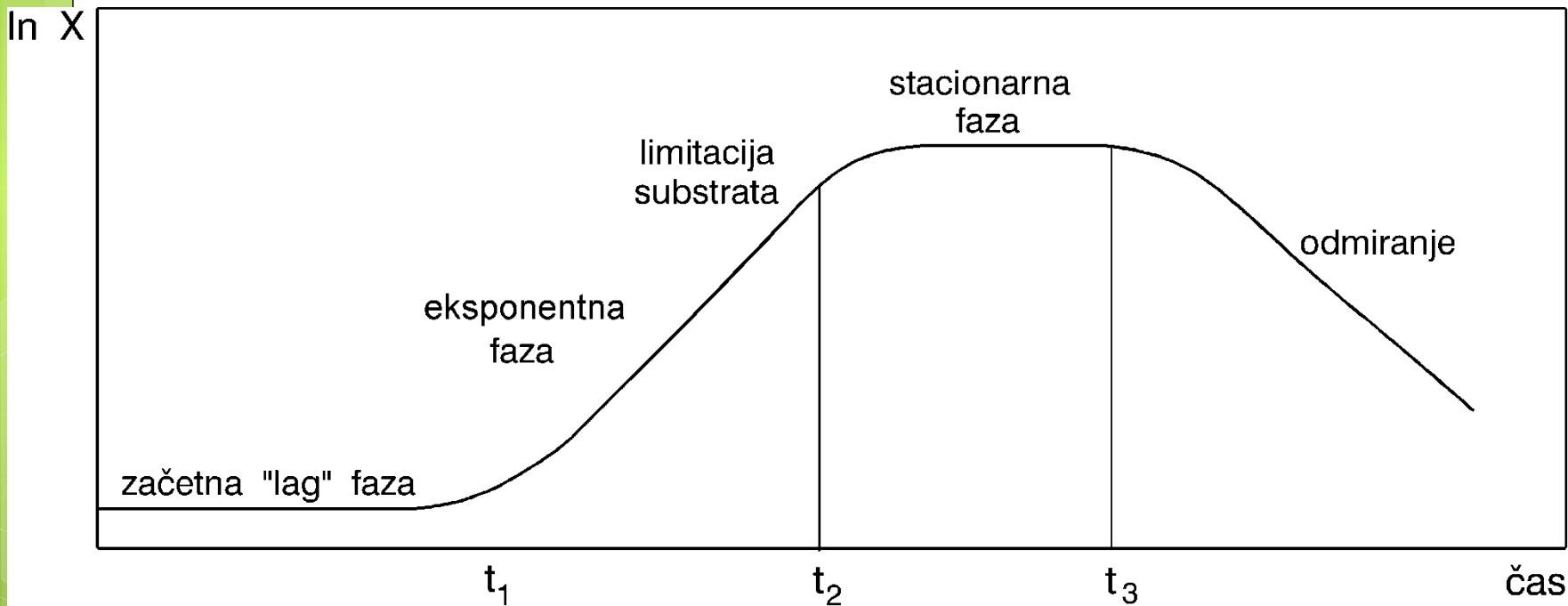
Robni pogoji: $X=X_0, t=0; X=X, t=t$

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

μ se s časom v šaržnem bioprocesu spreminja!

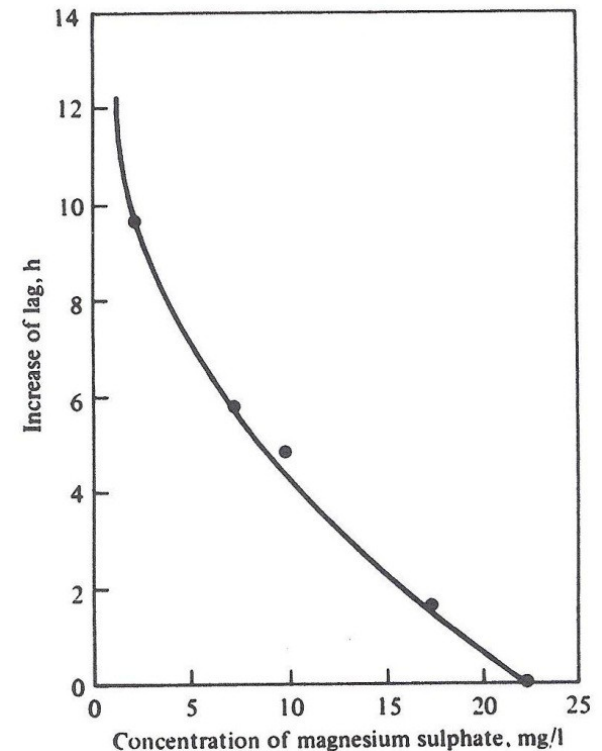


Rastna krivulja v šaržnem procesu



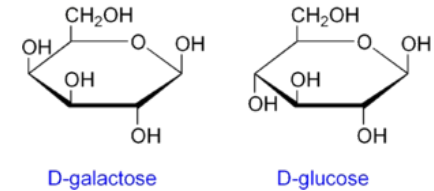
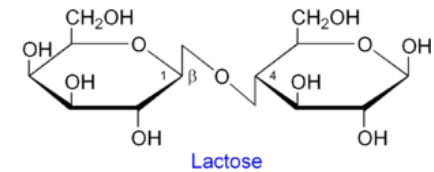
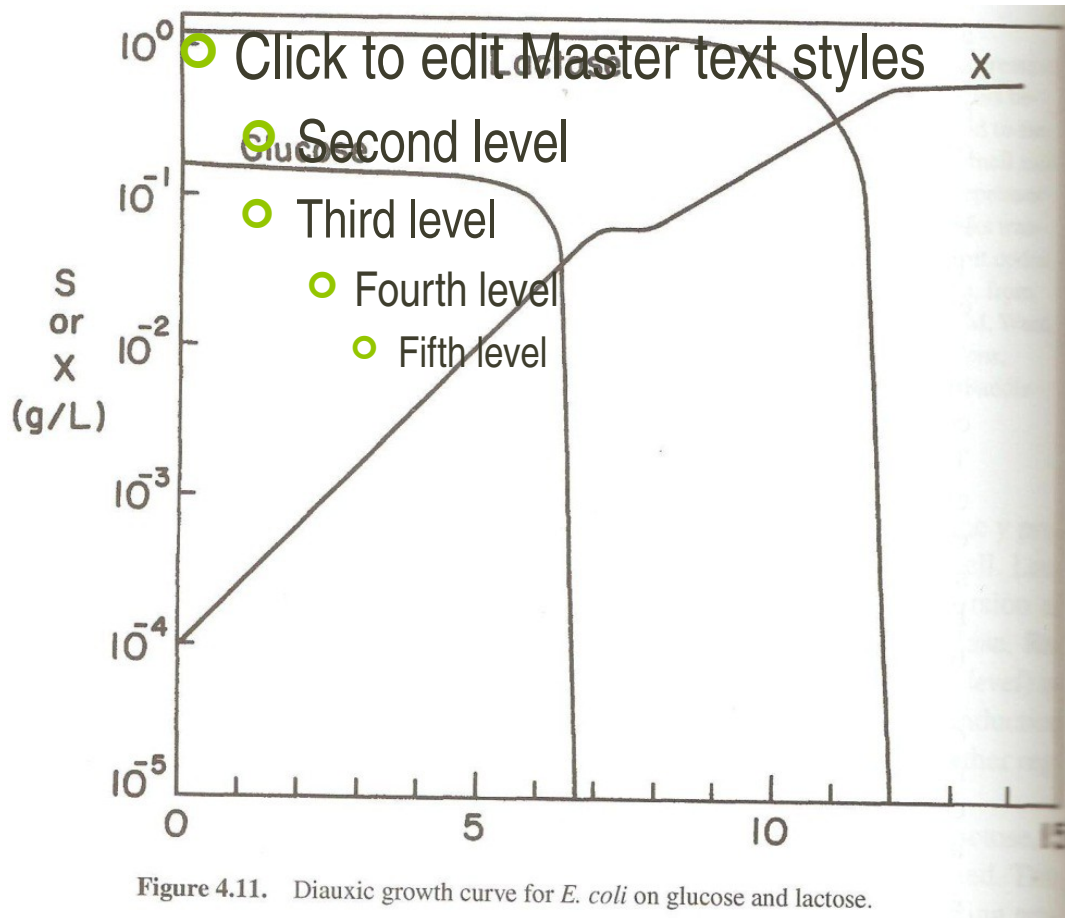
Faze rasti v šaržnem bioprocesu

- **Faza prilagajanja (lag faza):** Takoj po inokulaciji je μ praktično nič. Celice se v tej fazi prilagajajo novemu okolju s sintetiziranjem novih encimov ali sestavnih delov celic, medtem ko ostane njihovo število konstantno. Dolžina te faze je odvisna od fiziološkega stanja celic v vcepku (celice iz eksponentne faze rasti se hitreje prilagajajo kot celice iz stacionarne ali celo faze odmiranja) ter sprememb glede na predhodno gojenje (sestava gojišča, temperatura...).
- **Faza pospešene rasti:** Koncentracija biomase začne naraščati, celice se prično intenzivno razmnoževati. $\mu < \mu_{max}$.



Vpliv koncentracije Mg^{2+} na dožino lag faze bakterije *Enterobacter aerogenes*

Diauxična rast

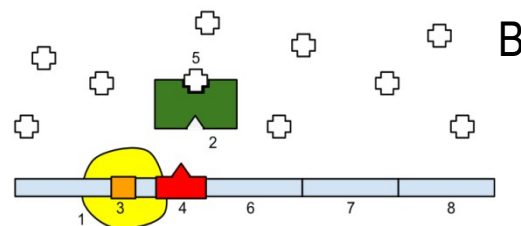
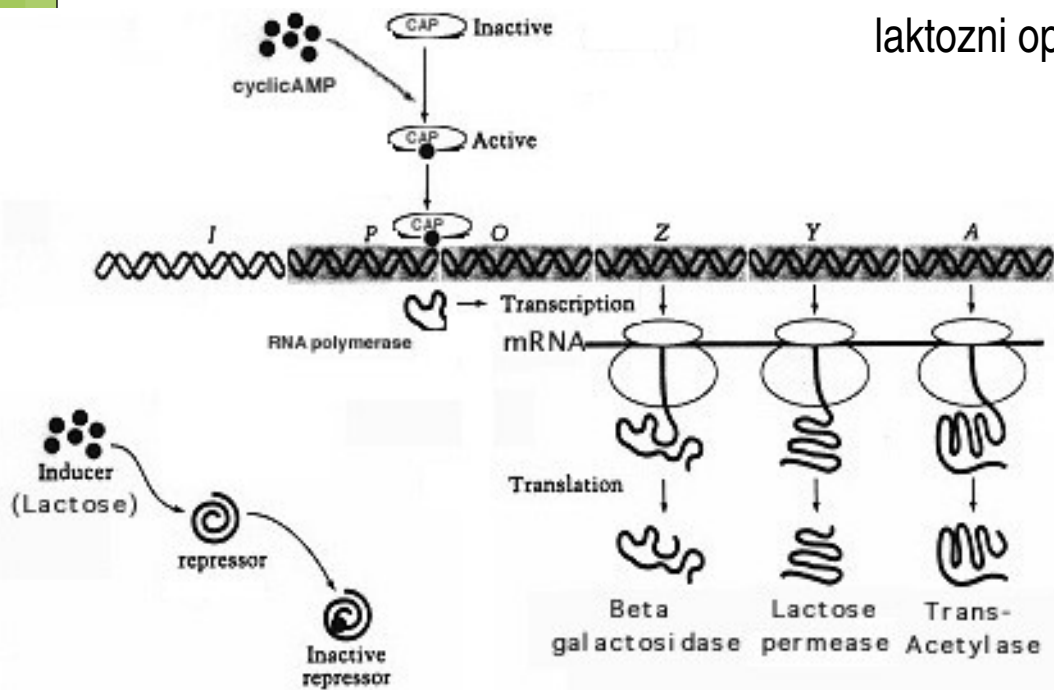
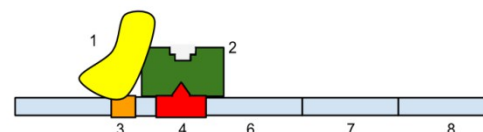


vez cepi β -galaktozidaza, ki je produkt gena lacZ

Regulacija



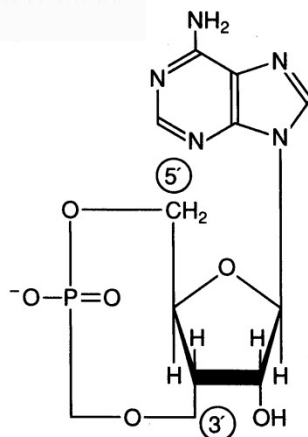
laktozni operon



- 1: RNA-polimeraza
 - 2: represor
 - 3: promotor
 - 4: operator
 - 5: laktoza
 - 6: lacZ gen
 - 7: lacY gen
 - 8: lacA gen
- } operon

CAP = katabolni aktivatorski protein
(alosteričen, aktivira ga cAMP)

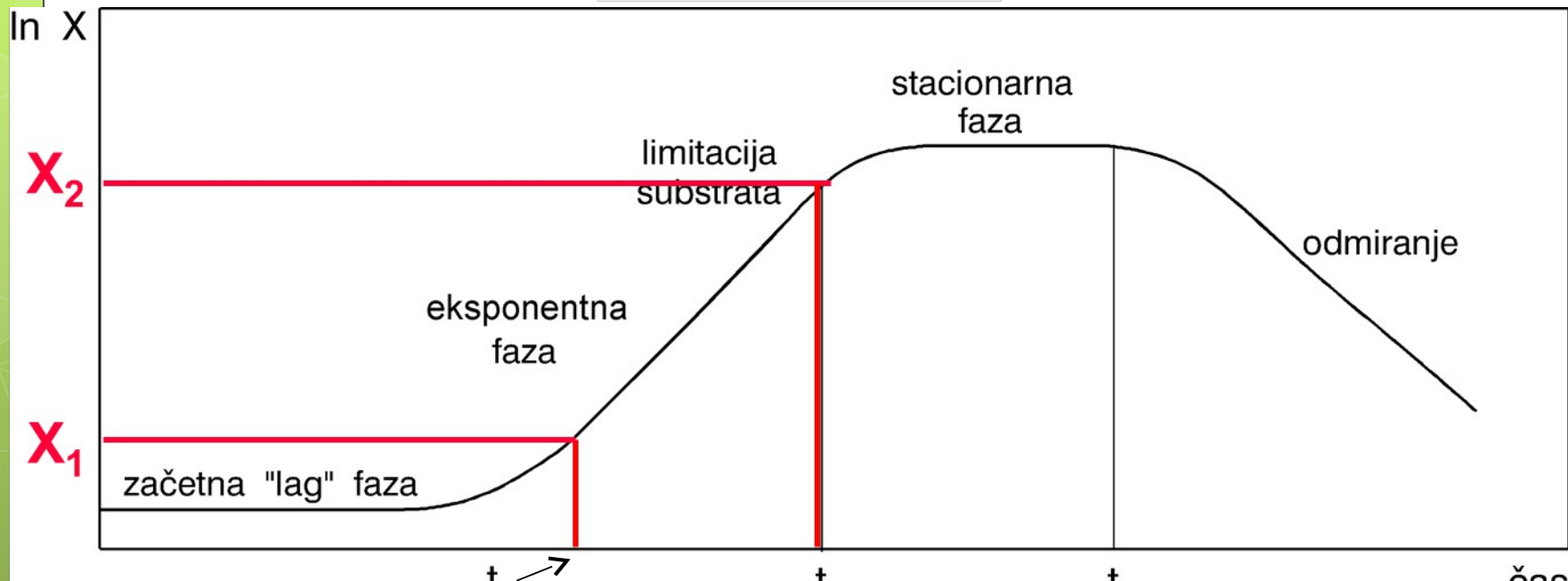
cAMP = ciklični AMP,
njegova konc. se poviša, ko celici zmanjka
energije



Faze rasti v šaržnem bioprocesu

- **Eksponentna faza rasti:** Mikroorganizmi se razmnožujejo s konstantno, maksimalno specifično hitrostjo rasti ($\mu = \mu_{max}$)

$$\mu_{max} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$$



Maksimalna specifična hitrost rasti

- $\mu_{\max} = f(T, \text{pH, gojišče})$, pri določenih pogojih je konst.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

Robni pogoji: $X=X_0, t=0$; $X=X, t=t$

Če je μ konst. in enak μ_{\max} ter ob upoštevanju robnih pogojev:

$$X = X_0 e^{\mu_{\max} \cdot t}$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{\max} \cdot t$$

mikroorganizmi	virusi	bakterije	kvasovke	nitaste glive
μ_{\max} (h ⁻¹)	3,5	1,4	0,35	0,14

Čas podvojevanja t_d

- t_d , ko je $X = 2X_0$

$$\ln \frac{2X_0}{X_0} = \mu \cdot t_d$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$$

mikroorganizmi	virusi	bakterije	kvasovke	nitaste glive
t_d (h)	~0,2	~0,5	~2	~5
μ_{max} (h ⁻¹)	~3,5	~1,4	~0,35	~0,14

Faze rasti v šaržnem bioprocesu

- **Faza upočasnjene rasti:** Rast se upočasni zaradi izrabe hranil in/ali nakopičenja metabolitov, ki zavirajo rast. $\mu < \mu_{max}$.
- **Stacionarna faza rasti:** Zaradi pomanjkanja vira energije, hranilnih snovi (lahko kisik) ali nakopičenja zaviralnih metabolitov se mikroorganizem ne more več razmnoževati, koncentracija biomase pa ostane konstantna. Rast biomase se ustavi, $\mu = 0$. Tvorijo se sekundarni metaboliti (= niso vezani na rast; primarni metaboliti = vezani na rast celic).

Stacionarna faza rasti

☺ Lahko pride do enega ali več pojavov:

- Celotna masa celic ostane konstantna, toda število živih celic pade.
- Pride do lize celic, število živih celic pade. Nastopi druga rastna faza, celice izrabljajo produkte lize (kriptična rast)
- Mikroorganizmi ne rastejo, a ostanejo živi zaradi ohranitvenega metabolizma na račun rezervnih snovi – endogeni metabolizem.

$$r_x = -k_d \cdot X$$

k_d ... konstanta endogenega metabolizma [h^{-1}]

Faze rasti v šaržnem bioprocesu

8 Faza odmiranja: Vedno več celic odmira ali pa razpade (liza celic), kar je lahko posledica sinteze strupenih metabolitov (npr. kislin) ali avtolitičnih procesov, $\mu_g = 0$, $\frac{dX}{dt} < 0$.

$$r_x = -k'_d \cdot X$$

k'_d ...konstanta hitrosti odmiranja [h^{-1}]

Določanje hitrosti rasti

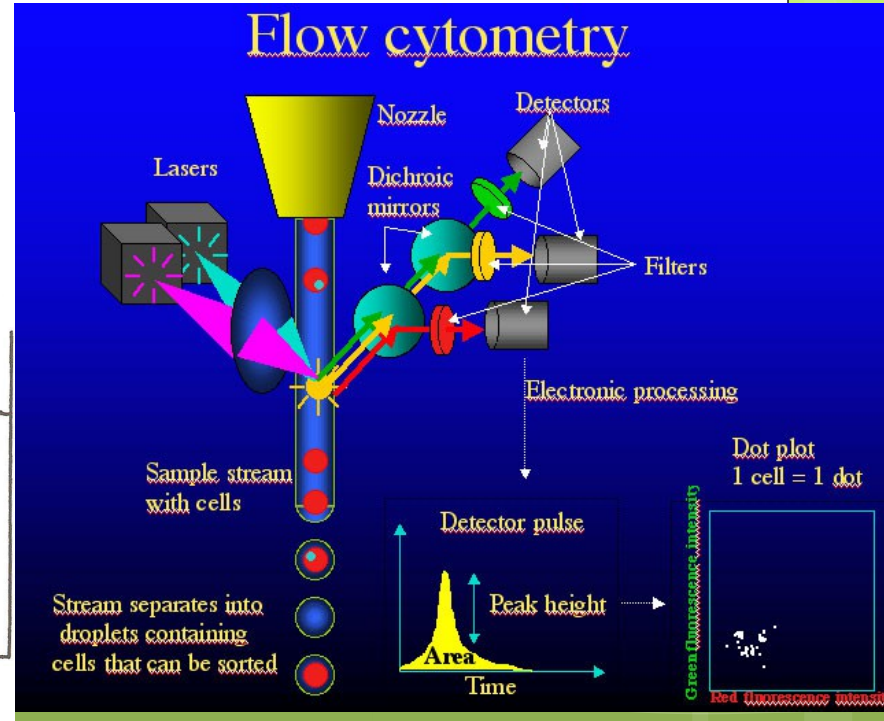
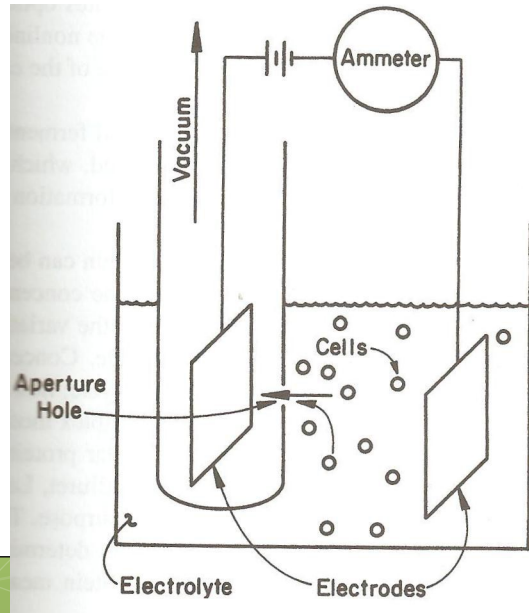
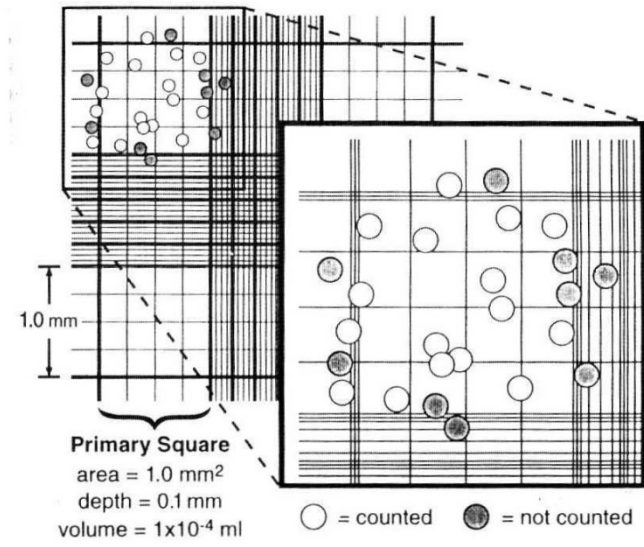
- Direktno določanje koncentracije celic
- Direktno določanje koncentracije biomase
- Posredno:
 - iz spremljanja sestavnih delov celic
 - iz porabe substrata
 - iz tvorbe metabolitov

Določanje koncentracije celic

- Določanje gostote celic

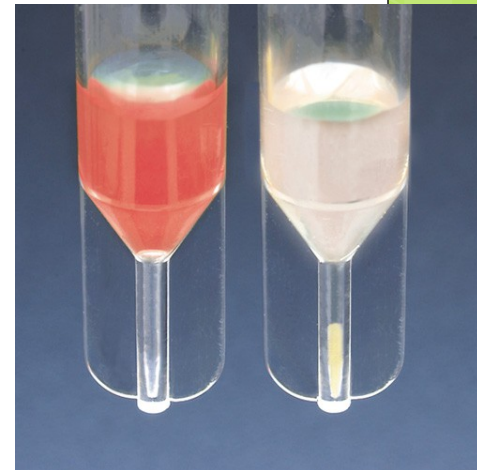
- štetje s hemocitometrom
- pretočni citometer (več 10000 celic/s)
- gojenje na petrijevkah (CFU)
- štetje na

osnovi
električnega
upora celic
v raztopini
elektrolita



Določanje koncentracije celic

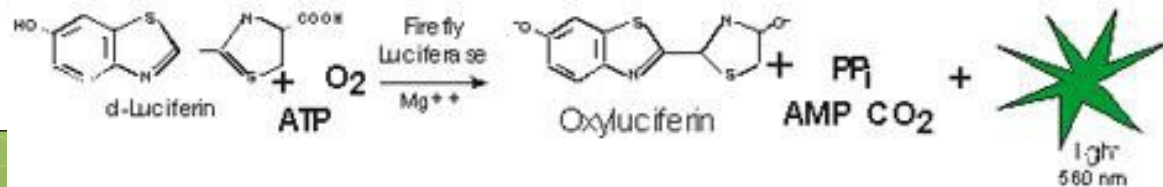
- Določanje koncentracije biomase
 - Neposredno
 - **Suha snov (DW):** odstranitev celic od gojišča (centrifugiranje, filtriranje preko membranskih filtrov s premerom por 0,22-0,45 mm), spiranje, sušenje, tehtanje
 - **Prostornina strnjenih celic (PCV):** centrifugiranje, meritev V (ni natančno)
 - **Optična gostota (OD)** - turbidimetrija: merimo motnost razredčenih suspenzij mikroorganizmov, λ med 420 in 660 nm, linearnost meritev le v območju do $A_{\lambda} = 0,3$



Določanje koncentracije celic

- Določanje koncentracije biomase
 - Posredno
 - **Merjenje intracelularnih komponent:** (problem: v šaržnem procesu se vsebnost spreminja)
 - Nukleinske kisline (RNA, DNA)
 - Lipidi
 - Polisaharidi (PHB)
 - Proteini
 - Biuretska reakcija: reakcija peptidnih vezi s CuSO_4 , manj odvisna od strukture proteinov
 - Folin-Lowry: specifično reagira z aromatskimi AK, širok spekter neproteinskih snovi moti reakcijo, 60-krat občutljivejša metoda od biuretske
 - Bradfordov reagent: nastane modro obarvan kompleks

○ ATP



Primerjava različnih tehnik merjenja koncentracije biomase

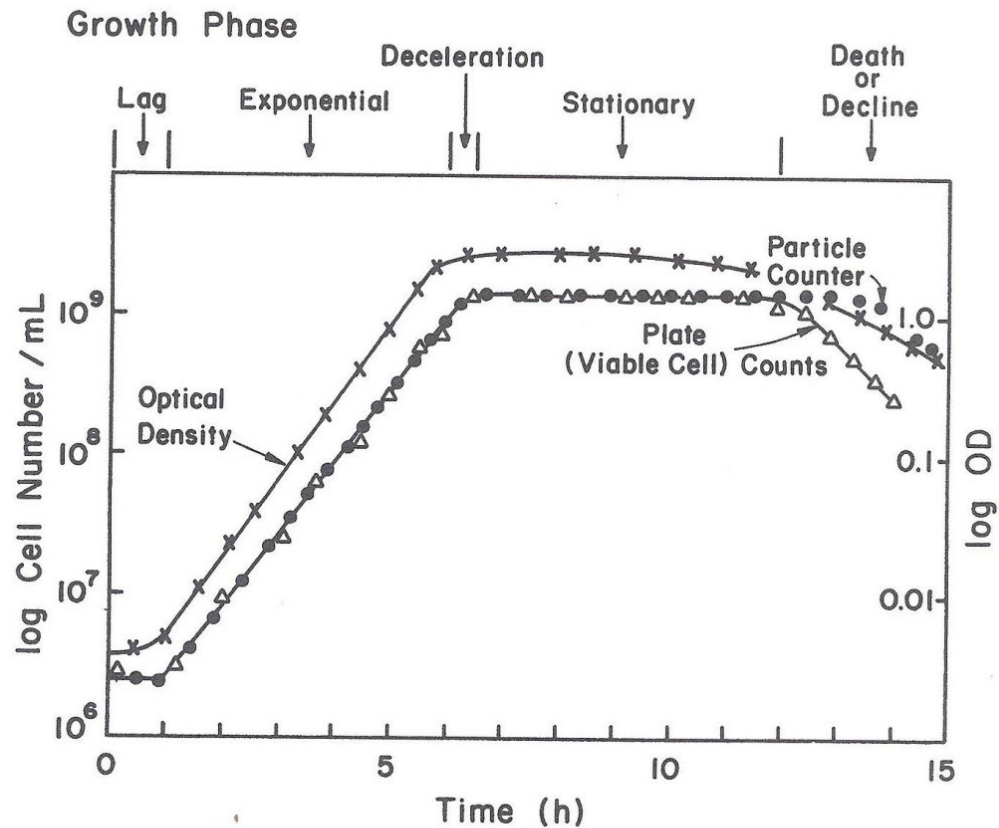


Figure 6.3. Typical growth curve for a bacterial population. Note that the phase of growth (shown here for cell number) depends on the parameter used to monitor growth.

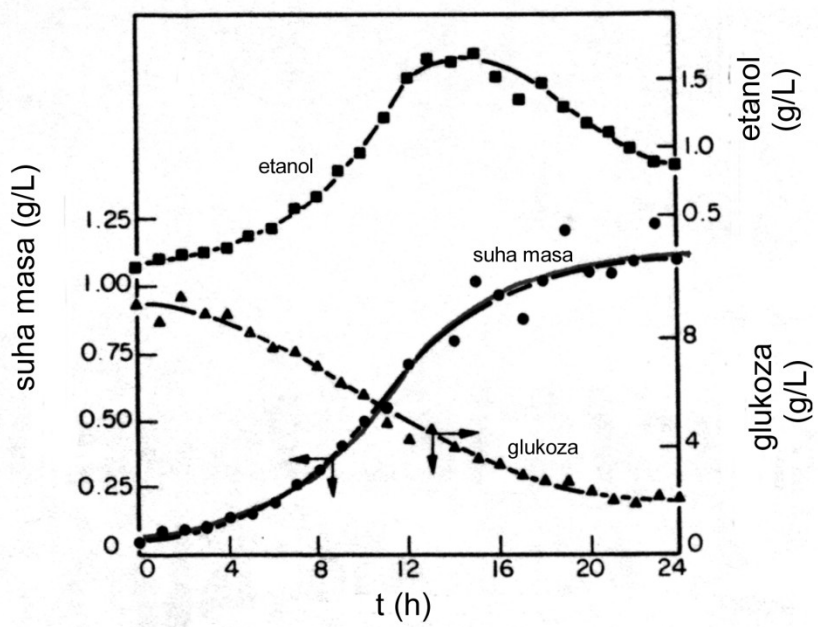
Click to edit Master text styles

Second level

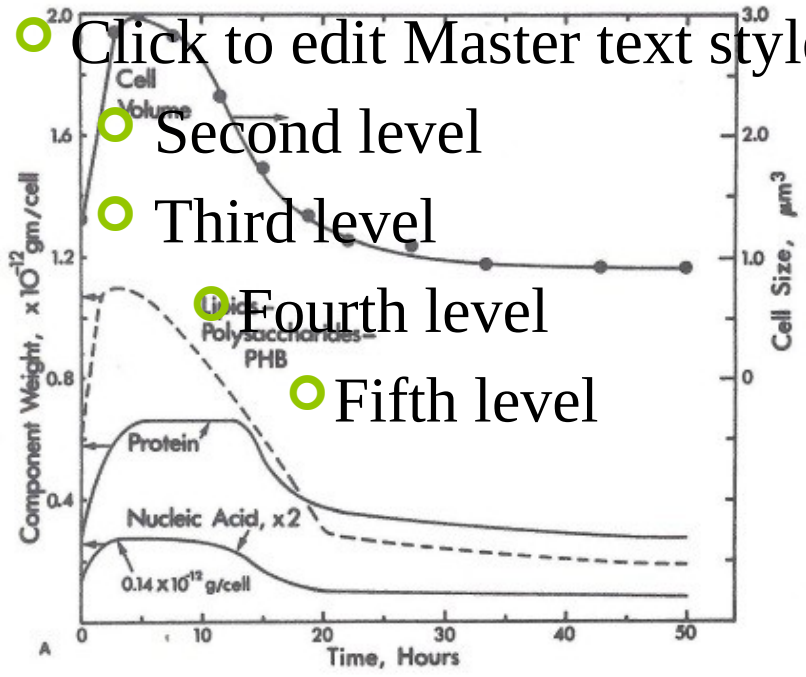
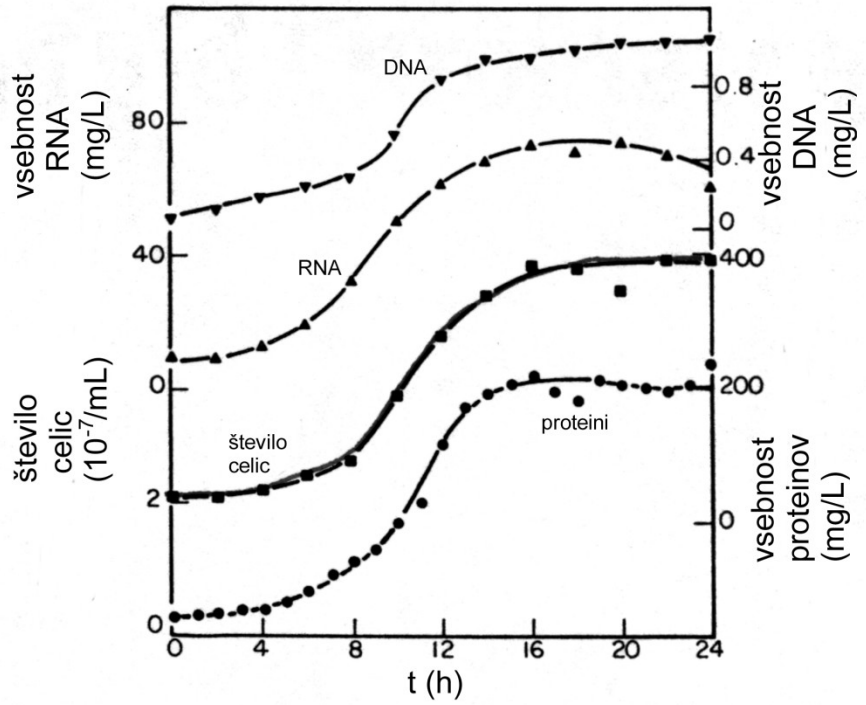
Third level

Fourth level

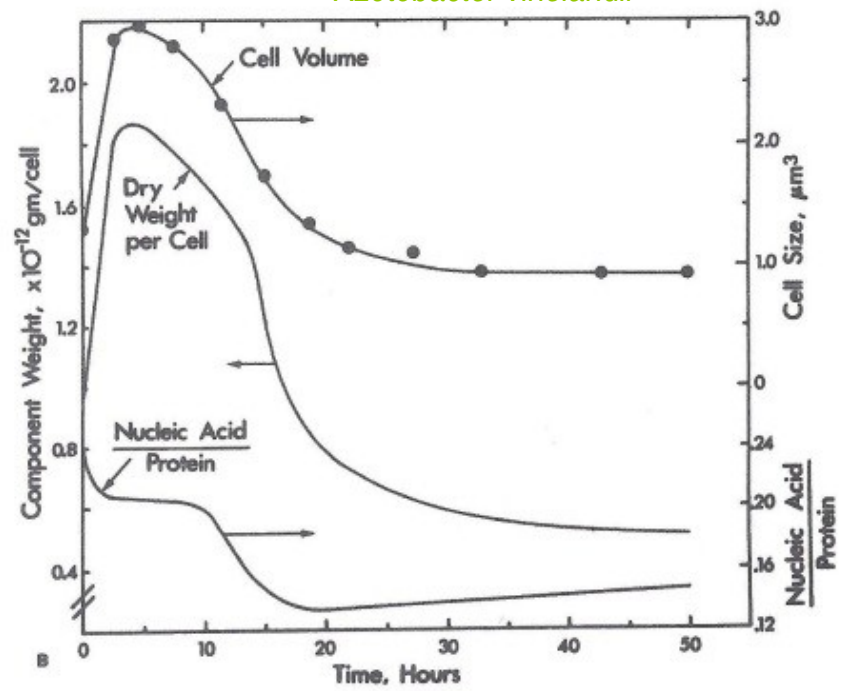
Fifth level



Schizosaccharomyces pombe



Azotobacter vinelandii



Izkoristki

- Izkoristek substrata:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

- Ob koncu šaržne rasti- navidezni izkoristek:

$$Y_{x/s} = \frac{X_2 - X_1}{S_2 - S_1}$$

- Če je vir C tudi vir energije:

$\Delta S = \Delta S_{za\ biomaso} + \Delta S_{za\ produkt} + \Delta S_{za\ E\ za\ rast} + \Delta S_{za\ vzdrževanje}$

- Za ostale substrate in produkte:

$$Y_{x/O_2} = \frac{\Delta X}{\Delta O_2}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

Click to edit Master text styles

Second level

Third level

Fourth level

Fifth level

Organism	Substrate	$Y_{X/S}$				Y_{X/O_2}^a
		g/g	g/mol	g/g-C	g/g	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Maltose	0.46	149.2	1.03	1.50	
	Maltose	0.52	95.2	1.32	1.18	
	Fructose	0.42	76.1	1.05	1.46	
	Glucose	0.40	72.7	1.01	1.11	
	Glucose	0.51	91.8	1.28	1.32	
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glucose	0.46	77.4	1.08	1.35
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Glucose	0.38	68.4	0.95	0.85
	<i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	Glucose	0.45	81.0	1.12	1.46
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Glucose	0.50	90.0	1.25	0.97
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Ribose	0.35	53.2	0.88	0.98
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Succinate	0.25	29.7	0.62	0.62	
	Glycerol	0.45	41.8	1.16	0.97	
	Lactate	0.18	16.6	0.46	0.37	
	Pyruvate	0.20	17.9	0.49	0.48	
	Acetate	0.18	10.5	0.43	0.31	
	<i>Candida utilis</i>	Acetate	0.36	21.0	0.90	0.70
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Acetate	0.28	16.8	0.70	0.46
	<i>Candida utilis</i>	Ethanol	0.68	31.2	1.30	0.61
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ethanol	0.49	22.5	0.93	0.42
	<i>Klebsiella</i> sp.	Methanol	0.38	12.2	1.01	0.56
	<i>Methylomonas</i> sp.	Methanol	0.48	15.4	1.28	0.53
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Methanol	0.41	13.1	1.09	0.44
	<i>Methylococcus</i> sp.	Methane	1.01	16.2	1.34	0.29
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Methane	0.80	12.8	1.06	0.20
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Methane	0.60	9.6	0.80	0.19
	<i>Pseudomonas methanica</i>	Methane	0.56	9.0	0.75	0.17

^a Y_{X/O_2} is the yield factor relating grams of cells formed per gram of O_2 consumed.

Aerobna rast bakterij in kvasovk na glukozi:
 $Y_{X/S} = 0,4$ do $0,6$ g/g in
 $Y_{X/O_2} = 0,9$ do $1,4$ g/g

Anaerobna rast je manj učinkovita.

Izkoristek glukoze

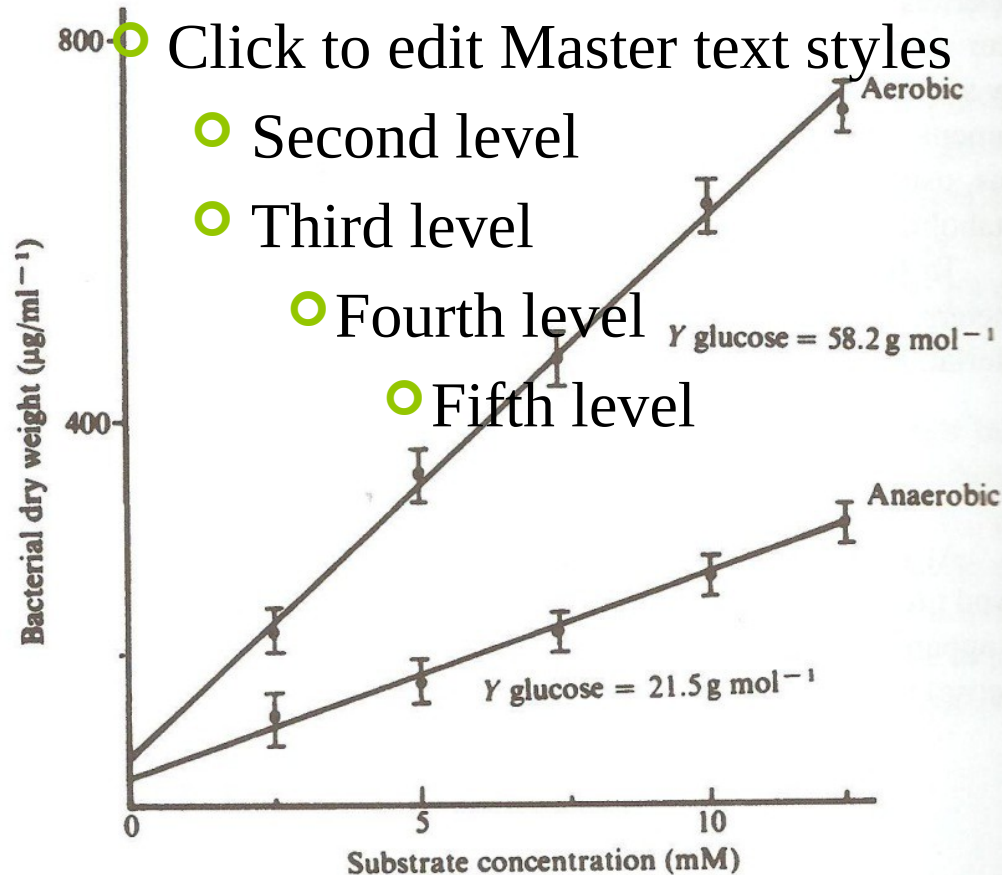


Figure 6.5. Aerobic and anaerobic growth yields of *Streptococcus faecalis* with glucose as substrate. (With permission, from B. Atkinson and F. Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan, Inc., New York, 1983.)

Hitrost porabe substrata

- Povezava s hitrostjo rasti biomase

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}}$$

- Ob upoštevanju porabe substrata za vzdrževanje (poraba energije za sintezo celičnih sestavin, izmenjava snovi z okolico, gibanje, ...):

$$r_s = -\frac{r_x}{Y_{x/s}} - m_s X$$

m_s ... koeficient vzdrževanja [h⁻¹]

Hitrost nastajanja produkta

- Produkti, povezani z rastjo (primarni metaboliti)- npr. konstitutivni encimi $r_p = \alpha \mu X$
- Produkti, nepovezani z rastjo (veliko sekundarnih metabolitov) – npr. antibiotiki $r_p = \beta X$
- Model Luedekinga in Pireta (mešan tip) – med počasno rastjo v stacionarni fazi: mlečna kislina, ksantan, nekateri sekundarni metaboliti

$$r_p = (\alpha\mu + \beta) X$$

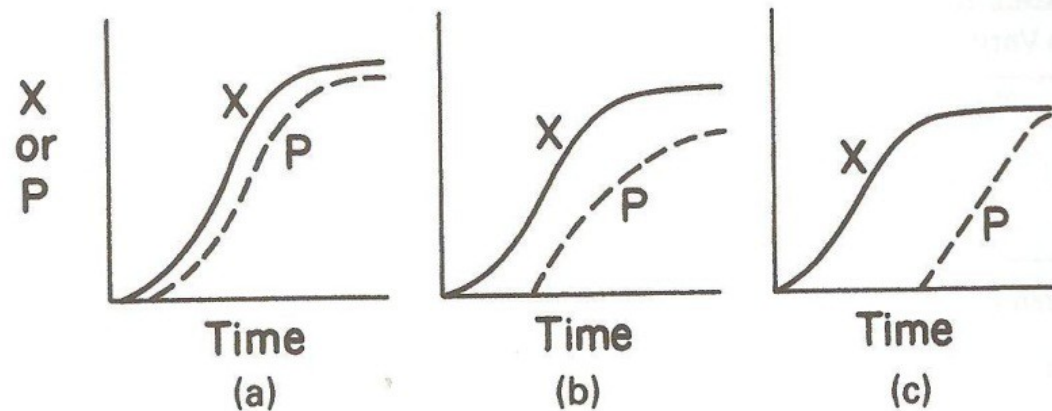


Figure 6.6. Kinetic patterns of growth and product formation in batch fermentations: (a) growth-associated product formation, (b) mixed-growth-associated product formation, and (c) nongrowth-associated product formation.

Primer

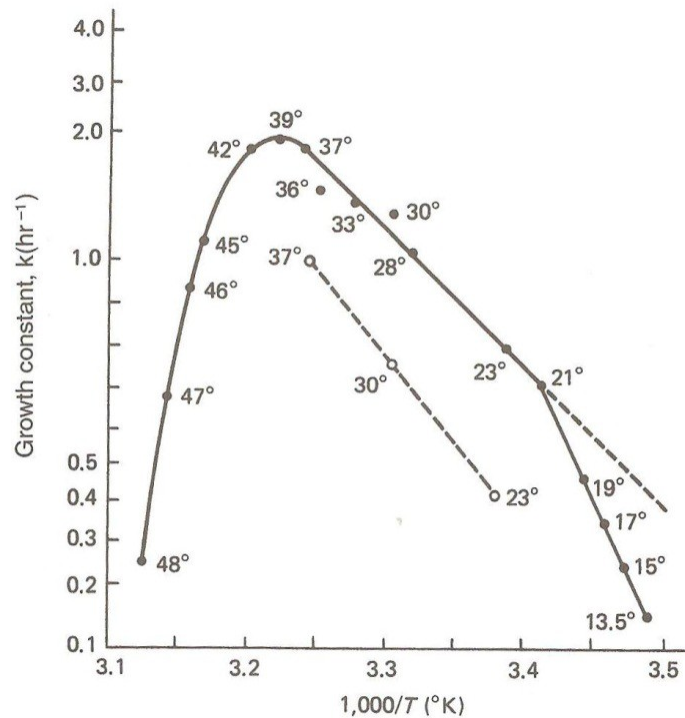
Mikroorganizem smo šaržno razraščali v gojišču z glukozo. Prodobili smo naslednje podatke:

t (h)	Koncentracija celic (g/L)	Koncentracija glukoze (g/L)
0	1,25	100
9	2,45	97
16	5,1	90,4
23	10,5	76,9
30	22	48,1
34	33	20,6
36	37,5	9,38
40	41	0,63

- Izračunajte maksimalno specifično hitrost rasti.
- Izračunajte navidezni izkoristek biomase glede na glukozo.
- Kakšno konc. biomase bi dobili, če bi proces začeli s 150 g/L glukoze?

Vpliv okolja na rast celic

- temperatura



E.coli na različnih gojiščih. Točke so °C.

$$\frac{dN}{dt} = (\mu'_R - k'_d)N$$

$$\mu'_R = A e^{-E_a/RT}$$

$$k'_d = A' e^{-E_d/RT}$$

Vpliv okolja na rast celic

○ pH

Optimalni pH:

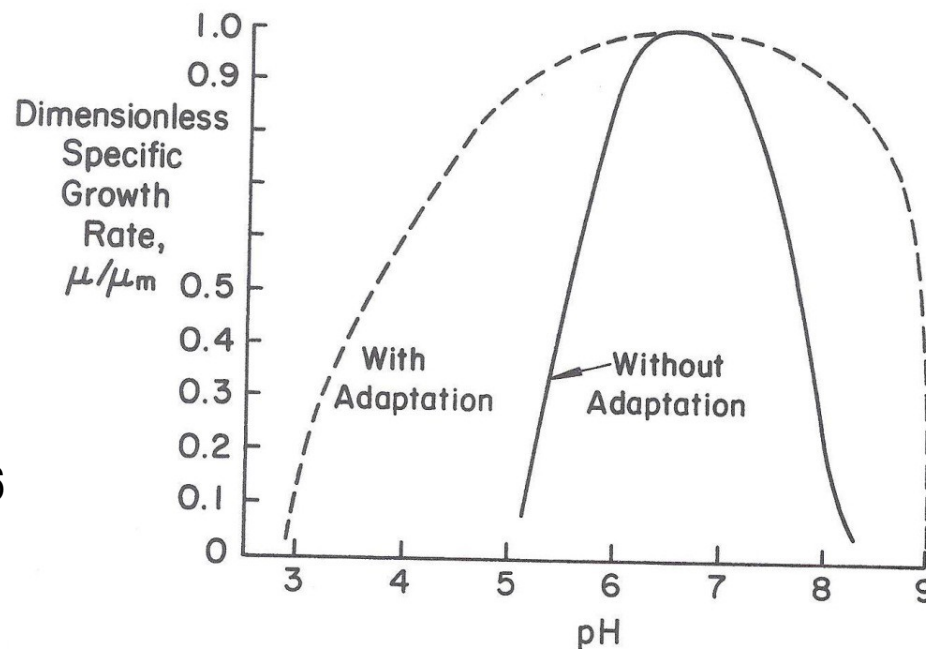
bakterije: pH=3-8

kvasovke: pH=3-6

Nitaste glive: pH=3-7

Rastlinske celice: pH=5-6

Živalske celice: 6,5-7,5



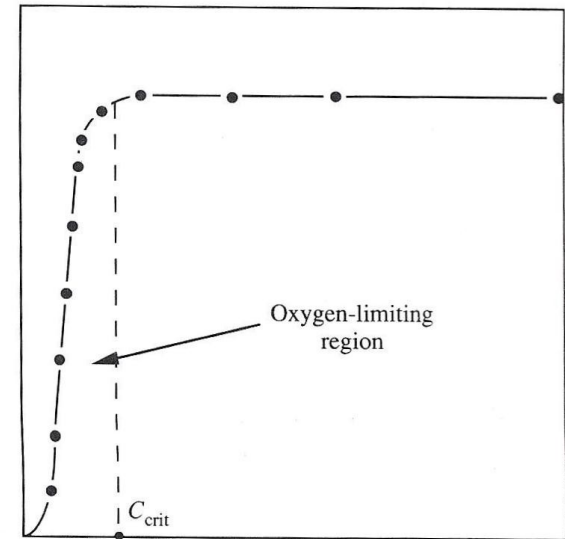
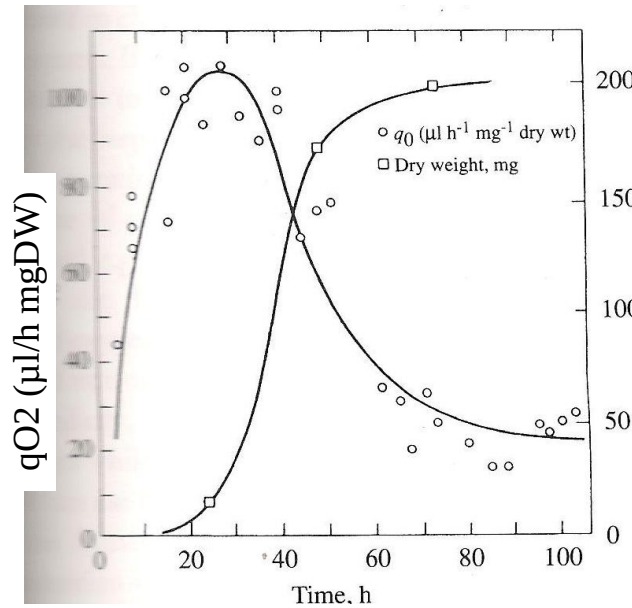
Sprememba pH med bioprocesom:

Padec: izraba NH_3 , raztapljanje CO_2 v vodi, nastajanje organskih kislin...

Naraščanje: pretvorba nitratov v NH_3 , deaminacija proteinov

Vpliv okolja na rast celic

o pO₂



$$k_L a (C^* - C) = OTR$$

$$V \frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C)V + r_{O_2} V$$

$$r_{O_2} = -q_{O_2} X = \frac{\mu_g \cdot X}{Y_{x/O_2}} = OUR$$

Če je transport kisika limitni dejavnik rasti, je hitrost porabe enaka hitrosti prenosa v kapljevino:

$$\frac{\mu_g \cdot X}{Y_{x/O_2}} = k_L a (C^* - C)$$

$$\frac{dX}{dt} = Y_{x/O_2} k_L a (C^* - C)$$

Nestrukturni nesegregirani modeli rasti biomase

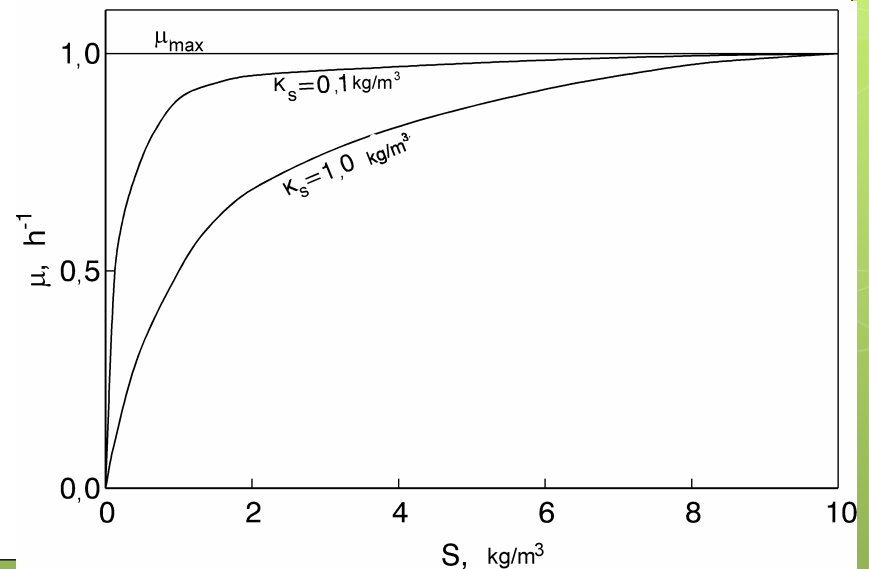
- Hitrost rasti, omejena s substratom

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

Monodov model

K_s ... konstanta nasičenja s substratom [kg/m³]

mikroorganizem (rod)	limitni substrat	K_s (mg/L)
<i>Saccharomyces</i>	glukoza	25
	glukoza	4,0
<i>Escherichia</i>	laktoza	20
	fosfat	1,6
<i>Aspergillus</i>	glukoza	5,0



Nestrukturni nesegregirani modeli rasti biomase

- Model z inhibitorji rasti
 - Inhibicija s substratom – nekompetitivna

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 + \frac{K_i}{S}\right) \left(1 + \frac{S}{K_i}\right)}$$

Če je $K_i \gg K_s$:

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}$$

- Inhibicija s substratom - kompetitivna

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{K_s \left(1 + \frac{S}{K_i}\right) + S}$$

Modeli z inhibicijo rasti

- Inhibicija s produktom

Nekompetitivna inhibicija s produktom

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 + \frac{K_S}{S}\right) \left(1 + \frac{P}{K_P}\right)}$$

Kompetitivna inhibicija s produktom

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{K_S \left(1 + \frac{P}{K_P}\right) + S}$$

Modeli z inhibicijo rasti

- Inhibicija s strupenimi (toksičnimi) snovmi – kinetika kot pri encimih

Nekompetitivna

$$\mu = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 + \frac{K_s}{S}\right) \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)}$$

Kompetitivna

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S}$$

Akompetitivna Z upoštevanjem celične smrti

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{\left(\frac{K_s}{(1 + I/K_I)} + S\right) \left(1 + \frac{I}{K_I}\right)}$$

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S} - k'_d$$

Šaržni proces

- Rast celic

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu X = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} X$$

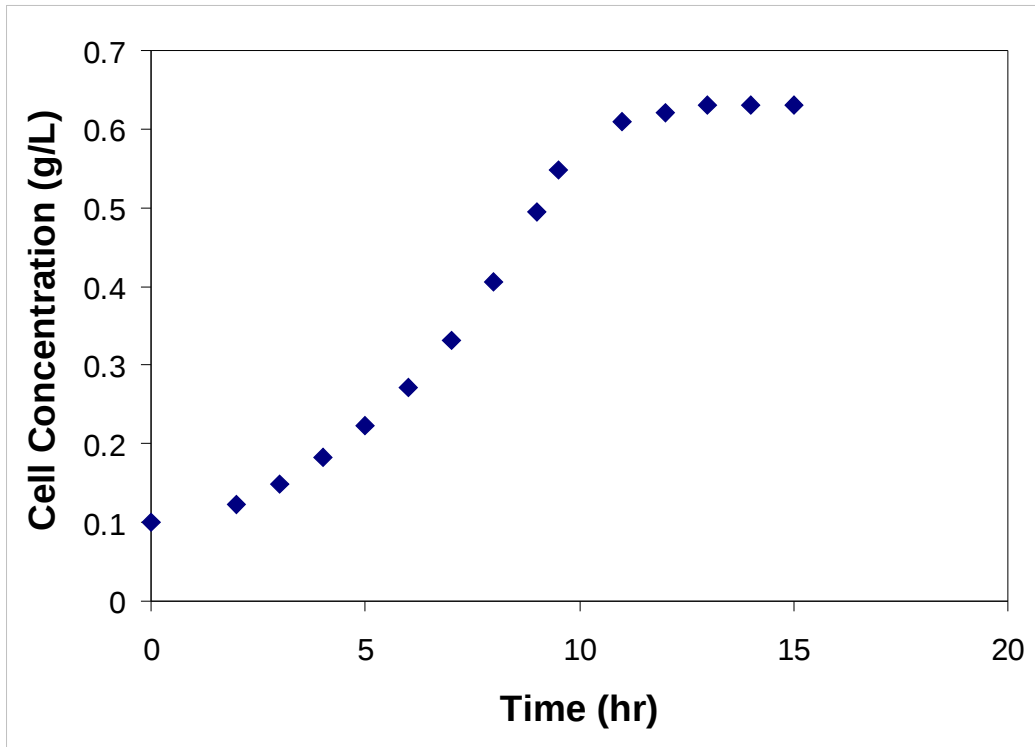
- Poraba substrata

$$r_S = \frac{dS}{dt} = -\frac{\mu X}{Y_{X/S}} = -\frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \frac{X}{Y_{X/S}}$$

- Produkt

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \mu_g = \alpha \mu_g + \beta$$
$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} + \beta$$

Logistična enačba



○

○

○

Logistična enačba

Rast biomase

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_{max}^{(1)} \frac{S}{K_s + S} X$$

Izkoristek substrata

$$X - X_0 = Y_{X/S} (S_0 - S)$$

Vstavitev S iz enačbe (2) v enačbo (1) daje:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} (Y_{X/S} S_0 + X_0 - X)}{(K_s Y_{X/S} + Y_{X/S} S_0 + X_0 - X)} X$$

Integracija:

$$\frac{(K_s Y_{X/S} + Y_{X/S} S_0 + X_0)}{(Y_{X/S} S_0 + X_0)} \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) - \frac{K_s Y_{X/S}}{(Y_{X/S} S_0 + X_0)} \ln\left[\frac{(Y_{X/S} S_0 + X_0 - X)}{Y_{X/S} S_0}\right] = \mu_{max} t$$

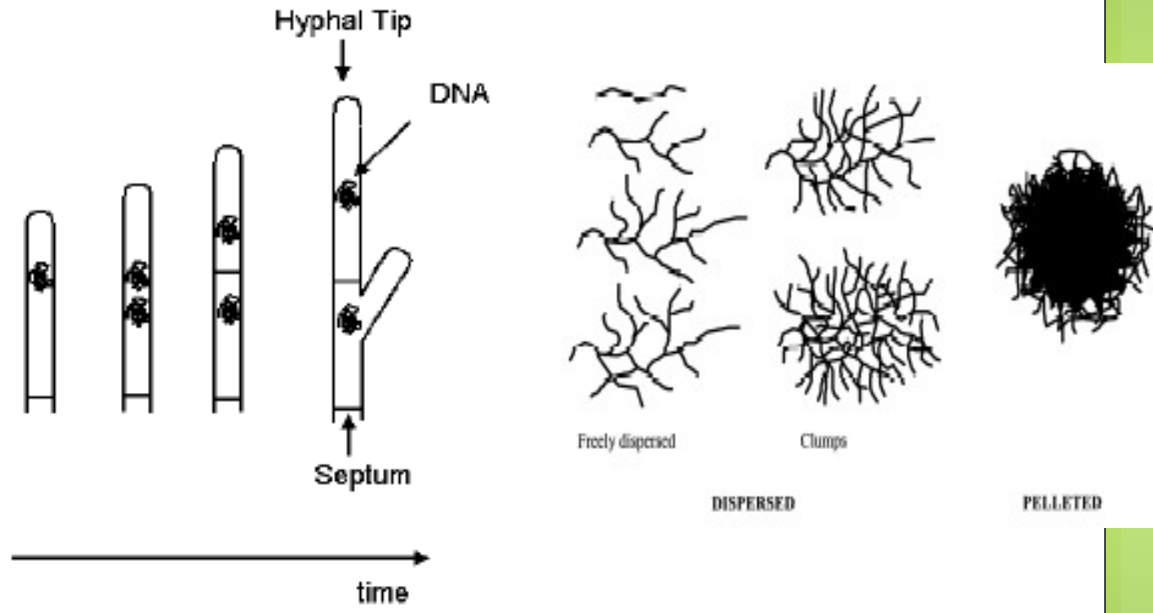
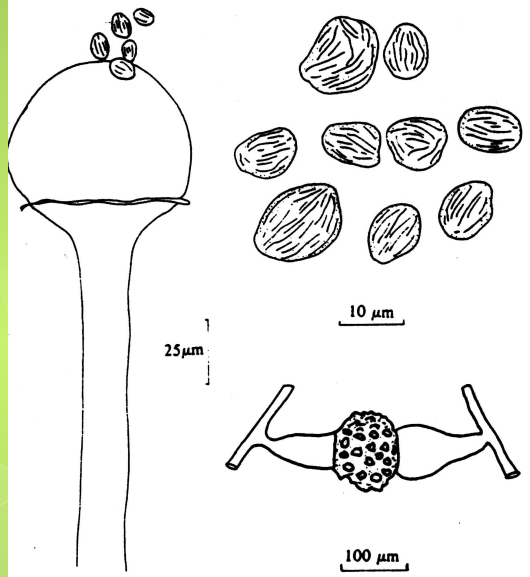
Opiše sigmoidalno krivuljo rasti

Nestrukturni, nesegregirani modeli

○ Slabosti:

- Ne upoštevajo in ne prepoznavajo celičnega metabolizma in regulacije
- Ne vključujejo lag faze
- Ne dajejo vpogleda v spremenljivke, ki vplivajo na rast
- Predpostavljajo „črno skrinjo“ oz angl. „black box“
- Predpostavljajo, da so za dinamičen odziv celic ključni notranji procesi, ki imajo časovni zamik v redu velikosti odzivnega časa
- Za večino procesov se predpostavlja, da so prehitri (psevdo stacionarno stanje) ali prepočasni, da bi vplivali na opazovan odziv

Submerzna rast nitastih gljiv



spore



hife



micelij

Apikalna rast hif

- Podaljševanje hife:
 - podvojevanje DNA
 - transport podenot celične stene ter encimov za njeno razgradnjo in sintezo
- Delitev materinske in hčerinske celice
 - Tvorba septe
 - Apikalna in subapikalna celica
- Razvejanje
 - naraščajoče št. rastočih apeksov eksponentna rast
~~celotne~~ → dolžine micelija
 - bogato gojišče → več vej

Mikromorfologija nitastih gljiv

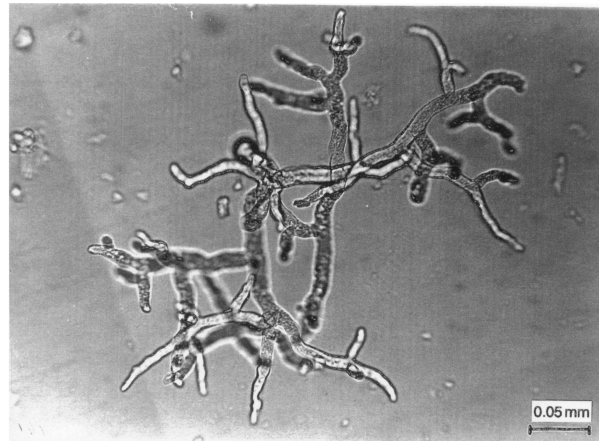
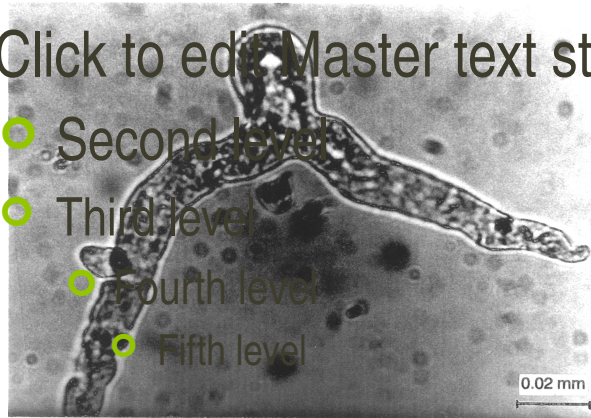
○ Click to edit Master text styles

○ Second level

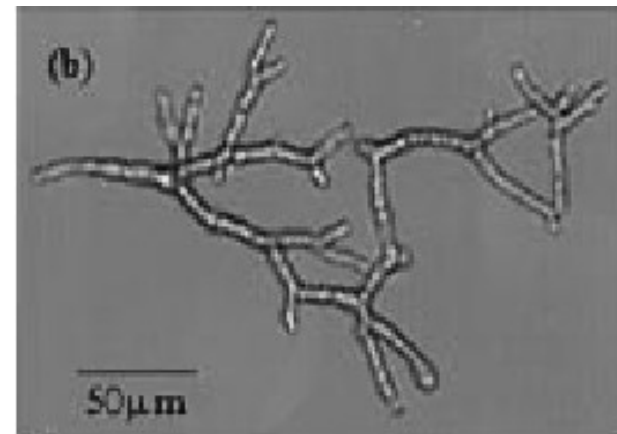
○ Third level

○ Fourth level

○ Fifth level



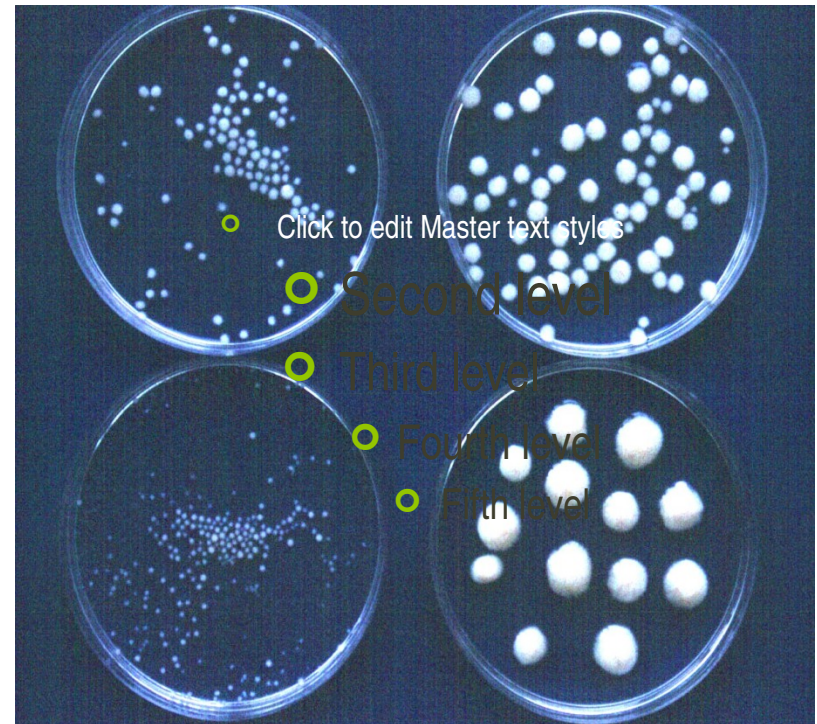
Rhizopus nigricans



Aspergillus niger

Peletna oblika rasti gliv

- Sferični aglomerati, sestavljeni iz prepleta hif
- Makromorfologija: velikost in oblika peletov

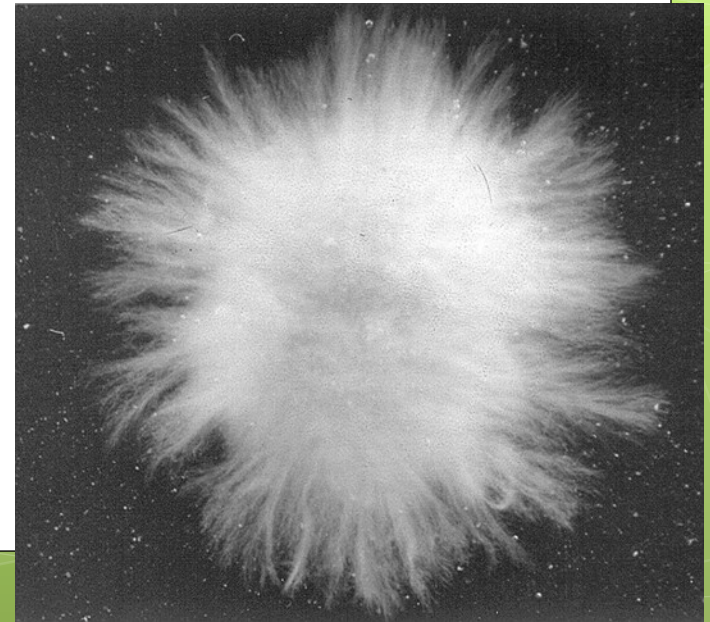
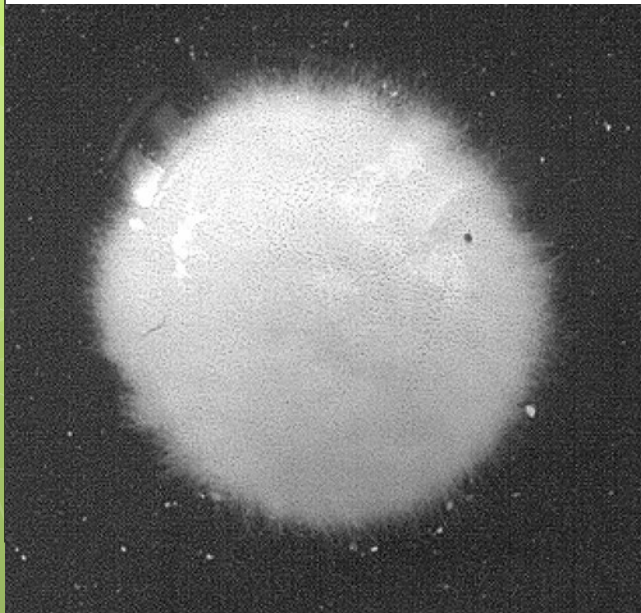


Indeksi makroskopske morfologije

Merilo krožnosti peleta (angl. *core circularity*)

$$MKP = \frac{(\text{obseg peleta})^2}{4 \cdot \pi \cdot \text{površina gostega jedra peleta}}$$

- Gladki, okrogli peleti: $MKP \cong 1$
- Puhasti peleti: $MKP > 1$ (npr. 3,5)



Tvorba peletov

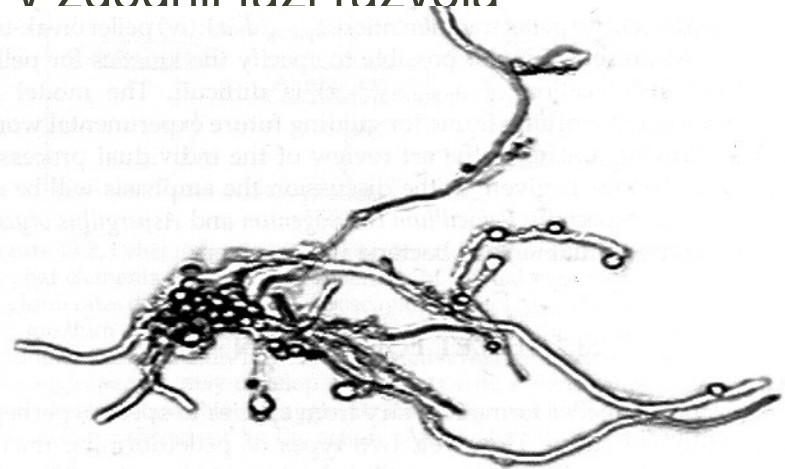
Tradicionalna delitev:

- koagulativni tip: aglomeracija spor v zgodnji fazi razvoja

Aspergillus oryzae

- nekoagulativni tip: 1 spora

1



Nastanek peletov preko aglomeratov

Click to edit Master text styles

Second level

Third level

Fourth level

Fifth level



mikroskopska morfologija

rast micelija

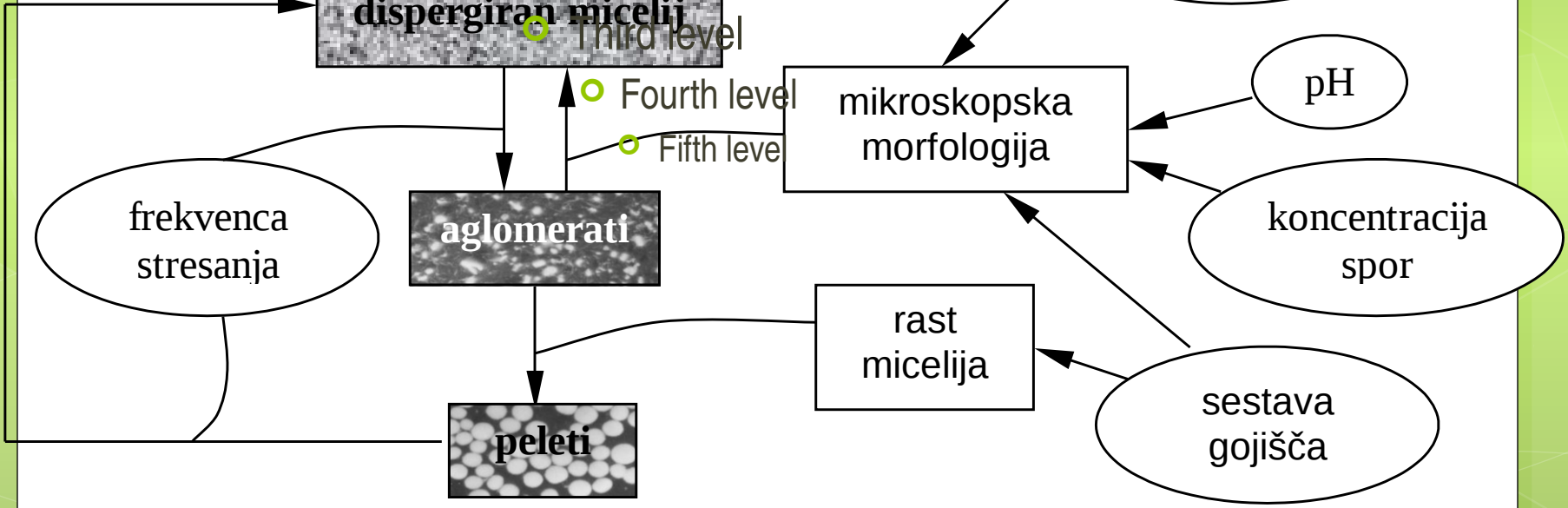
frekvenca stresanja

pH

koncentracija spor

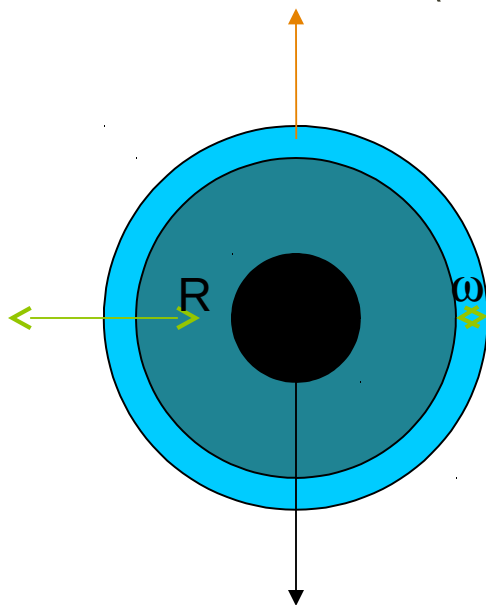
sestava gojišča

frekvenca stresanja



Rast peletov

periferna cona, ki prispeva k radialni rasti (ω)



nerastna cona, ki počasi avtolizira

masa peleta specifična hitrost rasti

$$\frac{dm_p}{dt}$$

hif

$$= \mu_h \cdot m_\omega$$

masa cone ω

$$m_p = \frac{4}{3} \pi R^3 \cdot \rho_p$$

$$\frac{dm_p}{dt} = \frac{dm_p}{dR} \cdot \frac{dR}{dt} = 4 \cdot \pi \cdot R^2 \cdot \rho_p \cdot \frac{dR}{dt}$$

($R \gg \omega$, $\omega = \text{konst.}$, $\rho_p = \text{konst.}$)

$$m_\omega = 4 \cdot \pi R^2 \cdot \omega \cdot \rho_p$$

$$\frac{dm_p}{dt} = 4 \cdot \pi \cdot R^2 \cdot \rho_p \cdot \frac{dR}{dt} = \mu_h \cdot \omega \cdot 4 \cdot \pi \cdot R^2 \cdot \rho_p$$

$$\frac{dR}{dt} = \mu_h \omega = k_p$$

robni pogoji: $R = R_0, t = t_0$ in $R = R, t = t$

Rast nitastih organizmov

- Model – ni omejitev s prenosom snovi

$$\frac{dR}{dt} = k \cdot R = konst.$$

R - radij flokule celic, peleta ali kolonije

Hitrost rasti biomase (M) lahko opišemo kot:

$$M = \left(M_0^{\frac{1}{3}} + \frac{\gamma \cdot t}{3} \right)^3 \approx \left(\frac{\gamma \cdot t}{3} \right)^3$$

Nitasti (filamentozni) organizmi

- Po integraciji dobimo:

$$M = \left(M_0^{1/3} \frac{\mathcal{N}}{3} \right)^3 \approx \left(\frac{\mathcal{N}}{3} \right)^3$$

- M_0 je ponavadi zelo majhen, zato:

$$M \propto t^3$$

- Model potrjujejo eksperimentalni podatki.