

RAST CELIC V ŠARŽNEM BIOPROCESU

Faze rasti v šaržnem
bioprocesu

Določanje koncentracije
biomase

Kinetika šaržnega procesa

Stopnje biotehnološkega procesa

substrat, organizem (biokatalizator)

priprava reakcijske
zmesi in vcepka

sterilizacija

izbor in priprava surovin ter
biokatalizatorja (encimi, celice)
(*upstream processing*)

fermentacija/
biotransformacija

biotransformacija (bioproces,
fermentacija)

ločevanje biomase

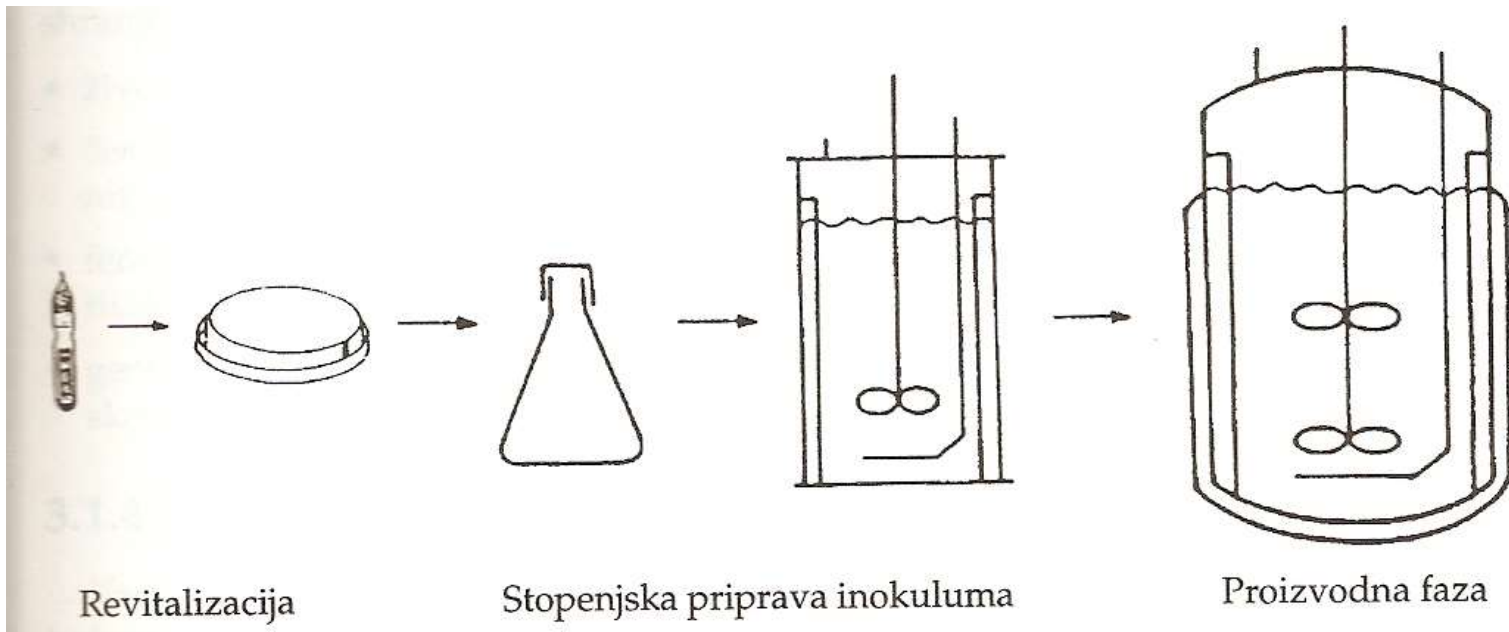
izolacija produkta

čiščenje
produkta

bioseparacija (*downstream processing*)

produkt

Priprava aktivne biokulture



Povečanje biomase

- 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

- Avtokatalitska reakcija 1. reda

$$r_x = \mu \cdot X$$

r_x ... hitrost rasti biomase [kg/m³ h]

μ ...specifična hitrost rasti [h⁻¹]

X ... koncentracija biomase [kg/m³]

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

N ... število celic

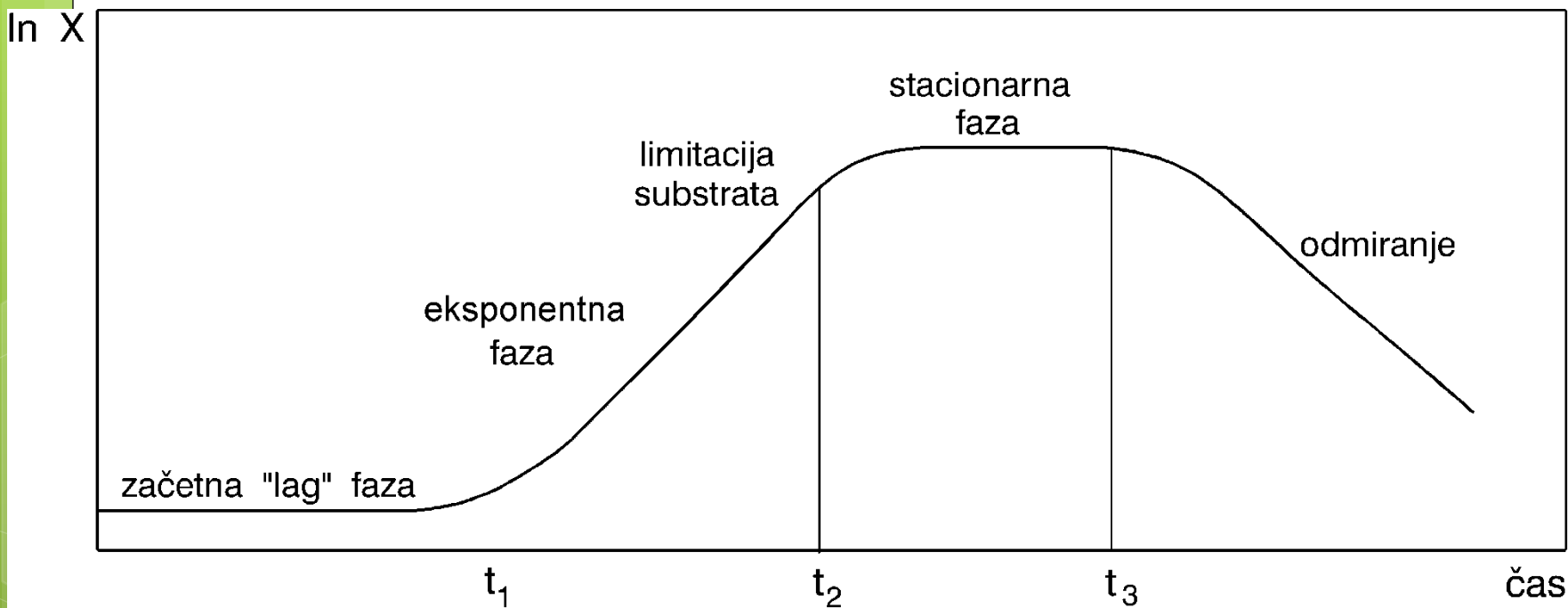
μ_R ... specifična hitrost podvojevanja [h⁻¹]

$$\mu = \mu_g - k_d$$

μ_g ... bruto specifična hitrost rasti [h⁻¹]

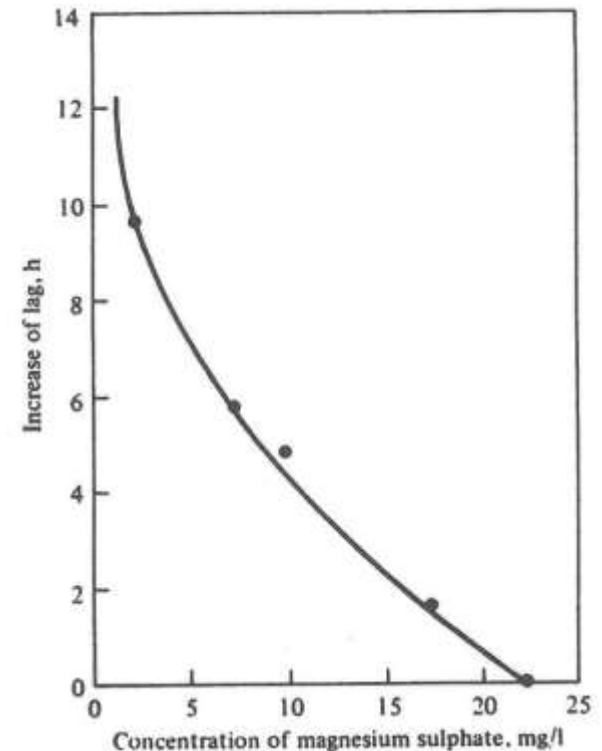
k_d ... hitrost izgube mase na račun smrti celic ali endogenega metabolizma [h⁻¹]

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. $\mu < \mu_{max}$.

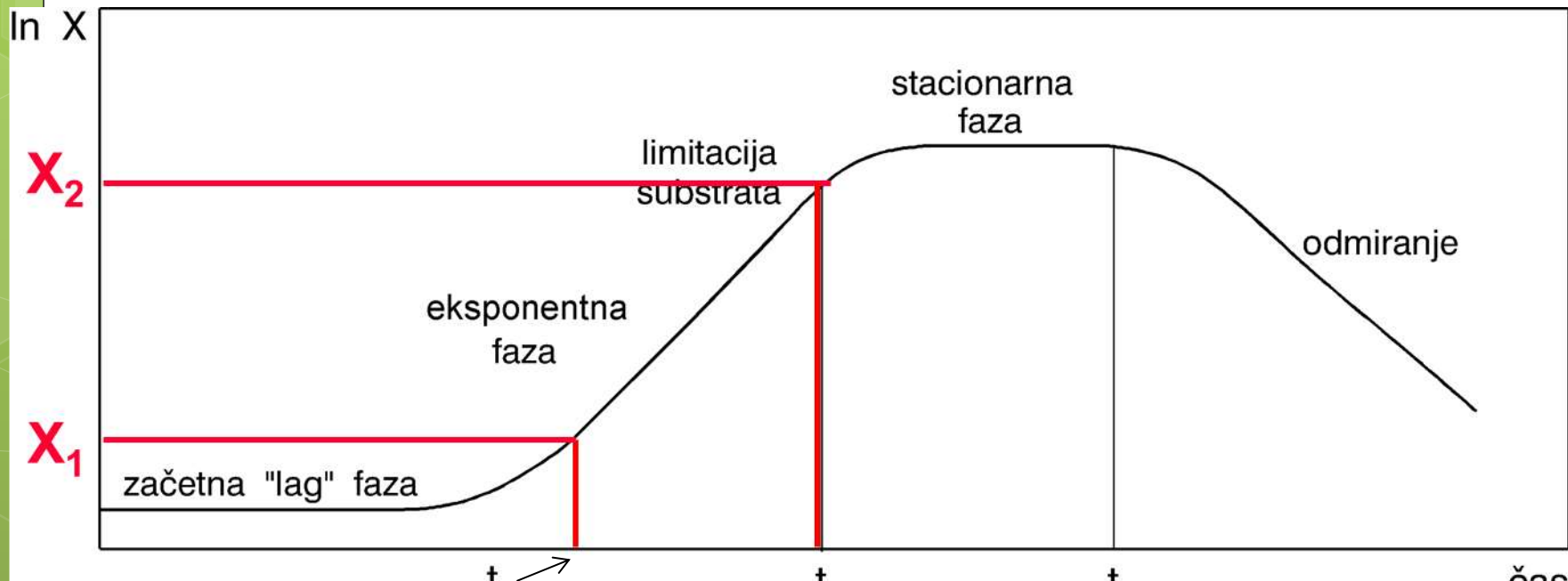


Vpliv koncentracije Mg^{2+} na dožino lag faze bakterije *Enterobacter aerogenes*

Faze rasti v šaržnem bioprocesu

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

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



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).

Faze rasti v šaržnem bioprocesu

- **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}]

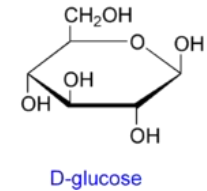
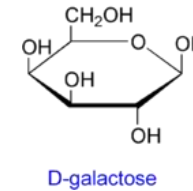
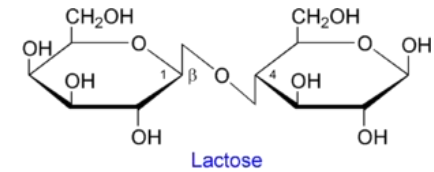
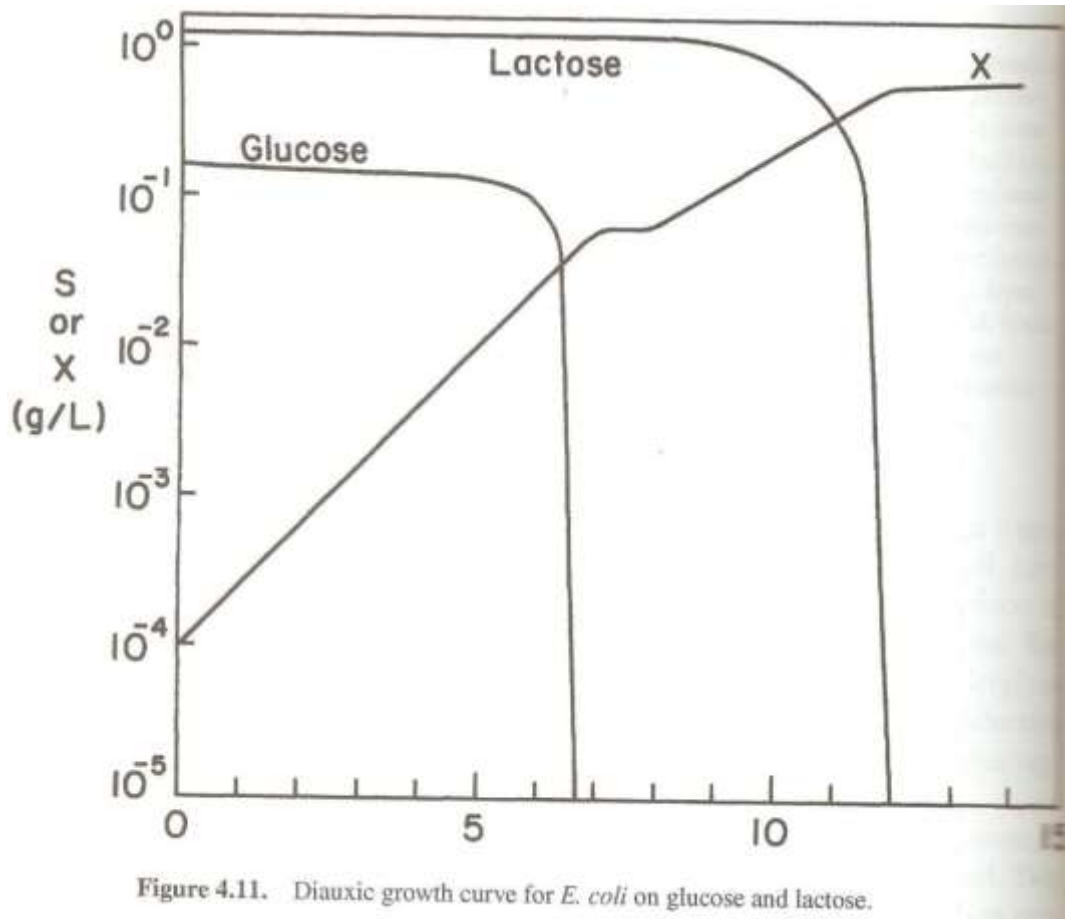
Stacionarna faza rasti

- 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}]

Diavksična rast

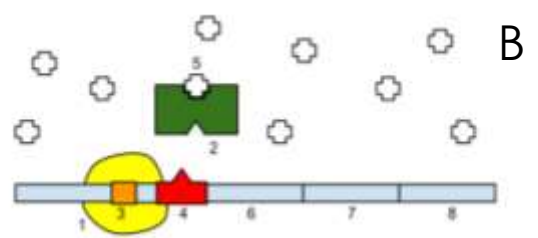
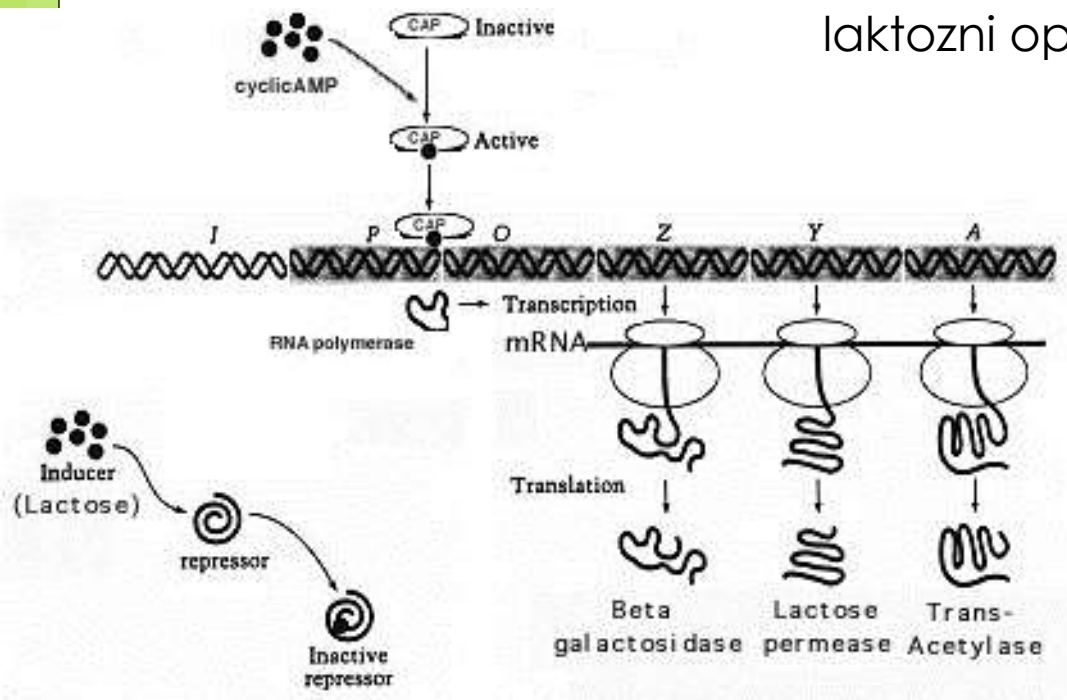
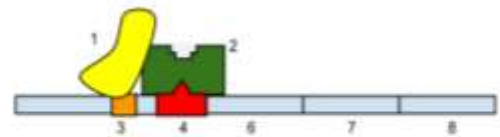


vez cepi β -galaktozidaza, ki je produkt gena lacZ

Regulacija



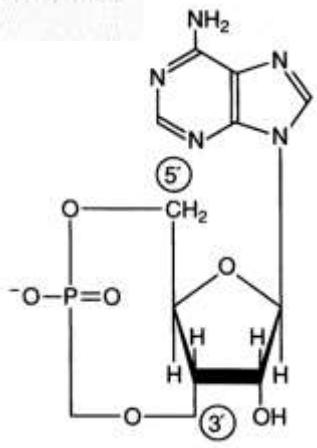
laktozni operon



- 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 poveša, ko celici zmanjka energije



Šaržni bioproces

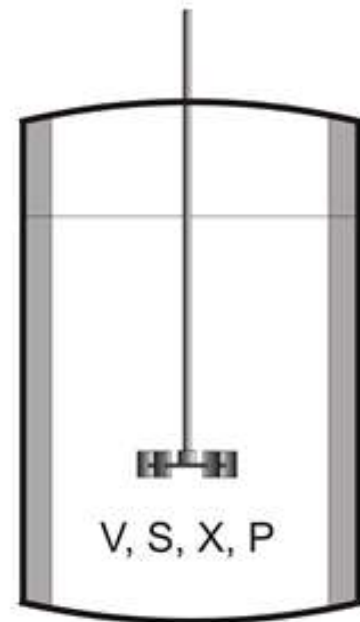
- Nestacionarni pogoji
- Snovna bilanca za biomaso:

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

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!



Rast celic v šaržnem bioprocesu s tvorbo produkta

● Rast celic

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

Specifična hitrost rasti biomase

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S}$$

● Poraba substrata

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

● Tvorba produkta

$$r_p = \frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \mu_g X = (\alpha \mu_g + \beta) X$$

Specifična hitrost tvorbe produkta

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

$$r_p = \frac{dP}{dt} = \left(\alpha \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} + \beta \right) X$$

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

Maksimalna specifična hitrost rasti

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

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Robni pogoji: } X=X_0, t=0; X=X, t=t$$

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

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

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

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 $X = 2X$

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

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

mikroorganizmi	virusi	bakterije	kvasovke	nitaste glive
t_d (h)	~0,2	~0,5	~2	~5

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}]

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:

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

- Za ostale substrate in produkte:

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

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

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.

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
	Mannitol	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
<i>Candida utilis</i>	Glucose	0.51	91.8	1.28	1.32
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Glucose	0.43	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
	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
<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.

Izkoristek glukoze

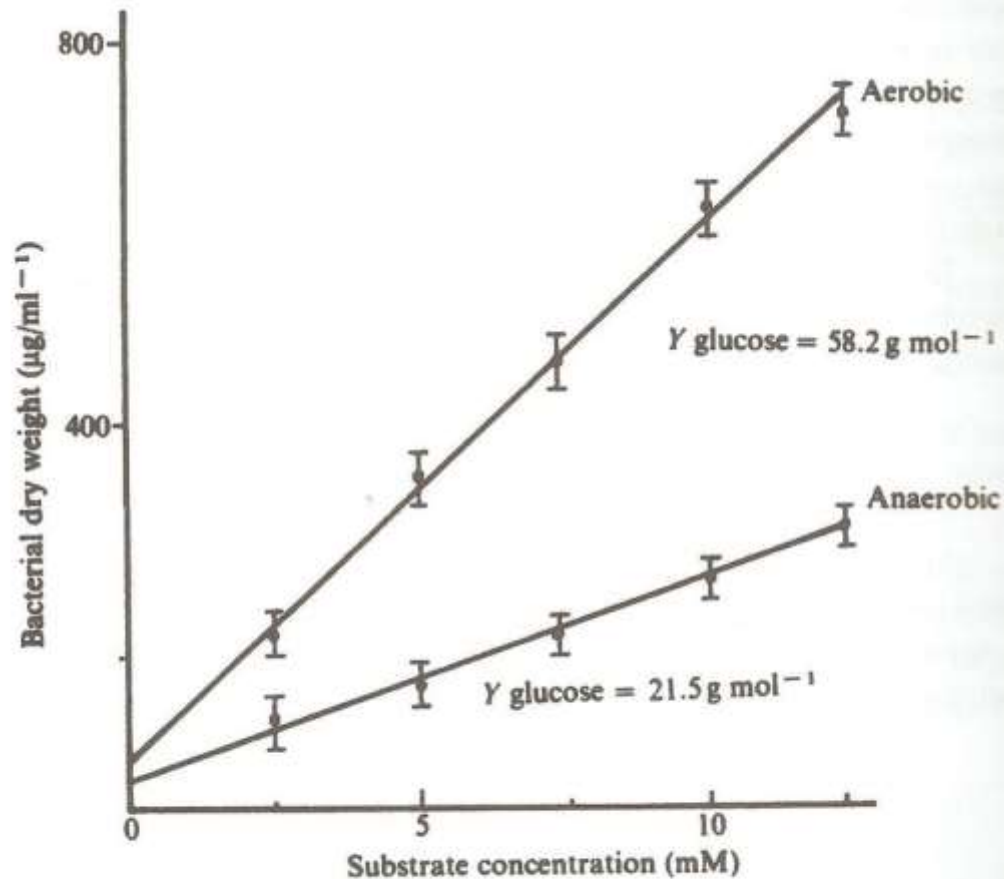


Figure 6.5. Aerobic and anaerobic growth yields of *Streptococcus faecalis* with glucose as substrate. (With permission, from B. Atkinson and F. Mavituna, *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Macmillan, Inc., New York, 1983.)

Hitrost 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

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

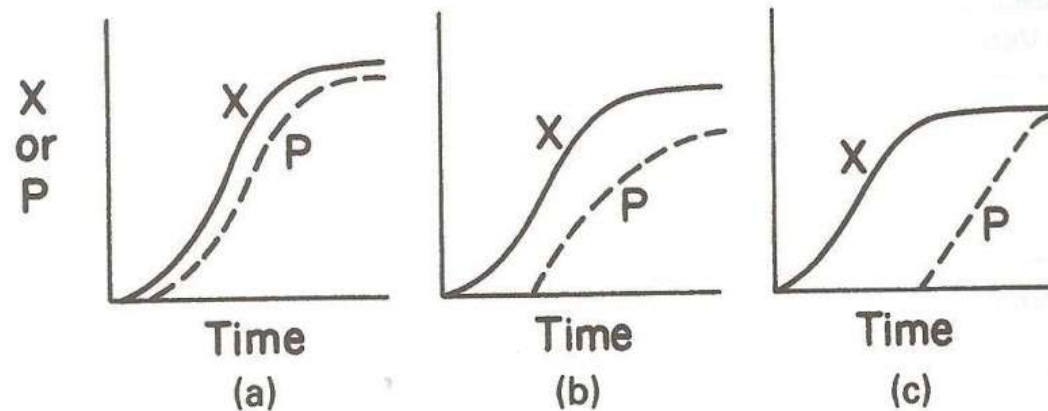


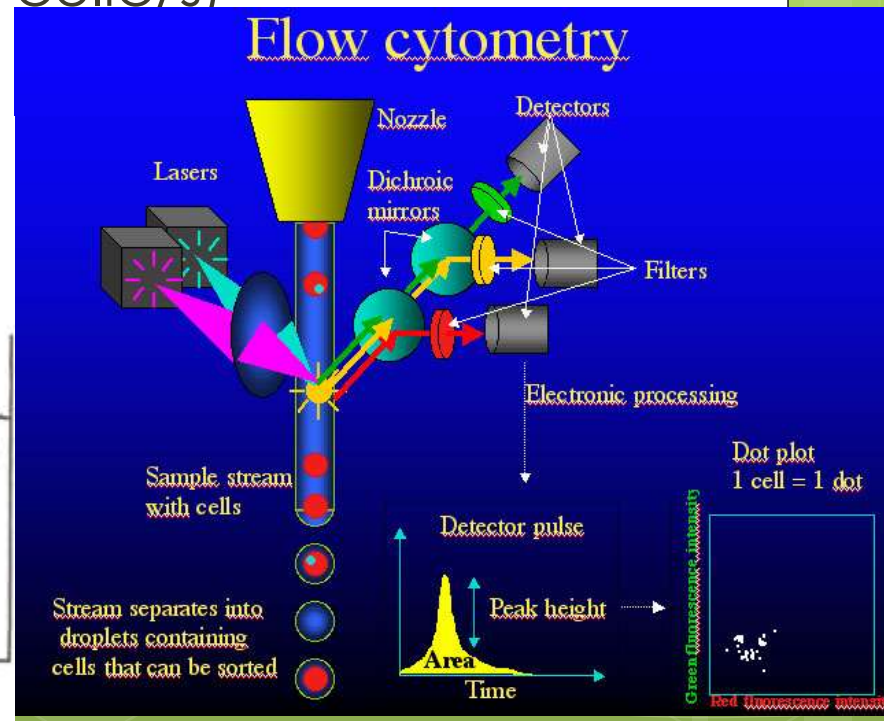
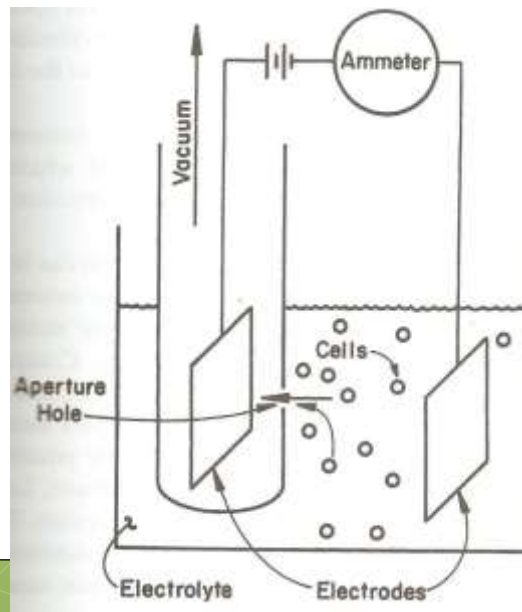
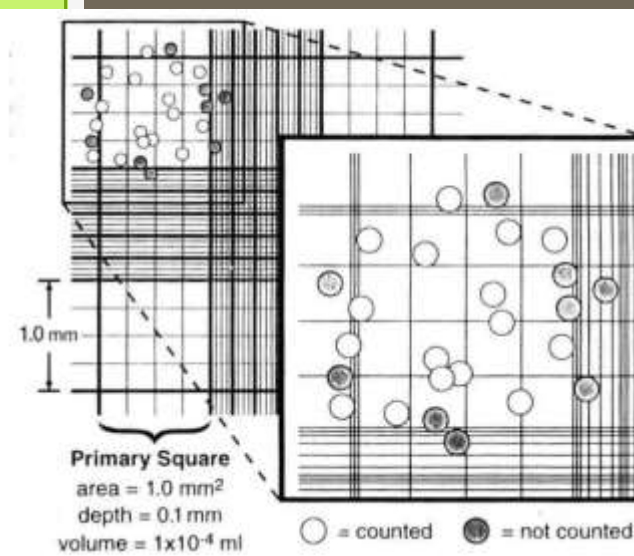
Figure 6.6. Kinetic patterns of growth and product formation in batch fermentations: (a) growth-associated product formation, (b) mixed-growth-associated product formation, and (c) nongrowth-associated product formation.

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

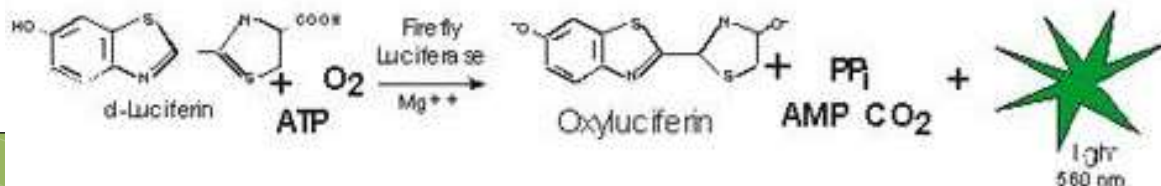
- Določanje koncentracije biomase
 - Neposredno
 - **Suha snov (DW):** odstranitev celic od gojišča (centrifugiranje, filtriranje preko membranskih filtrov s premerom por 0,22-0,45 μm), spiranje, sušenje, tehtanje
 - **Prostornina strnjenih celic (PCV):** centrifugiranje, meritev V (ni natančno)
 - **Optična 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

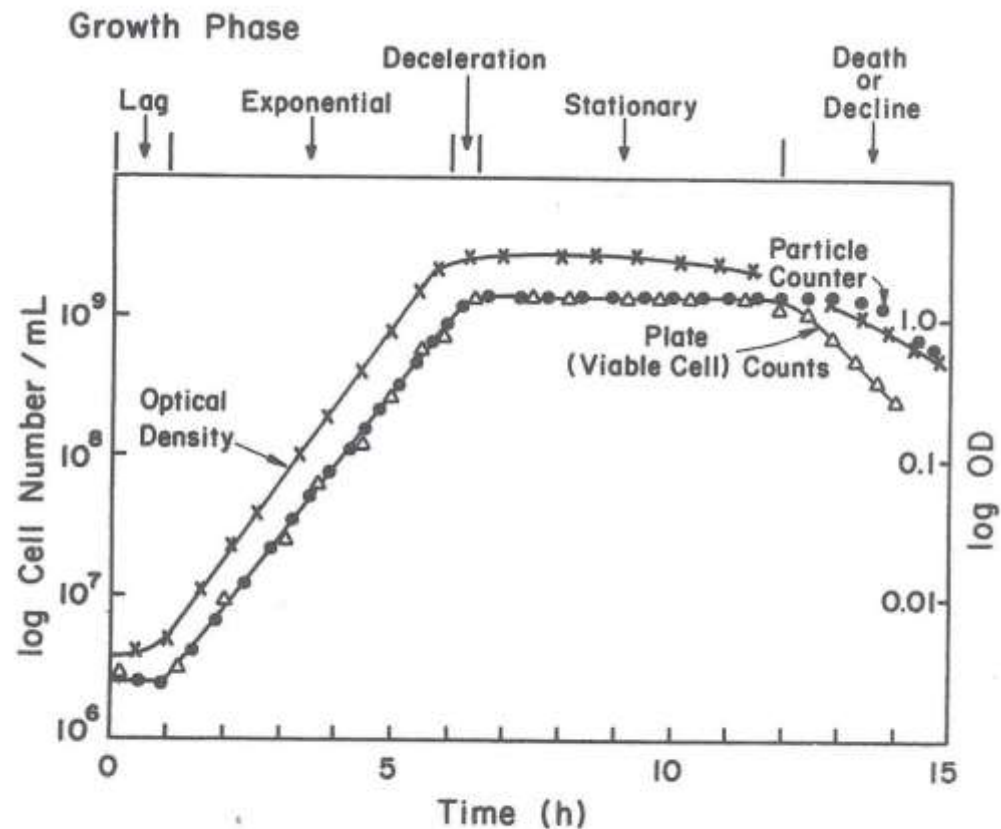
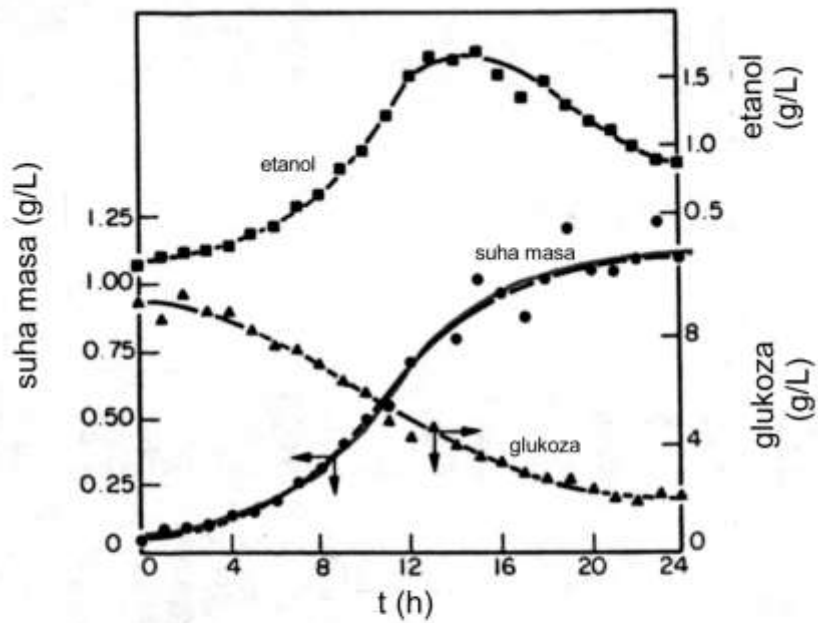
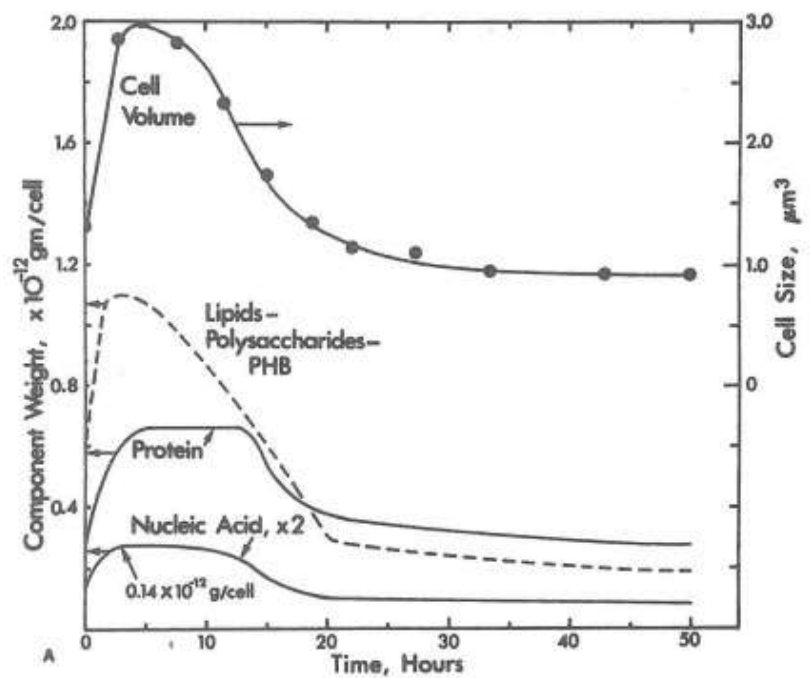


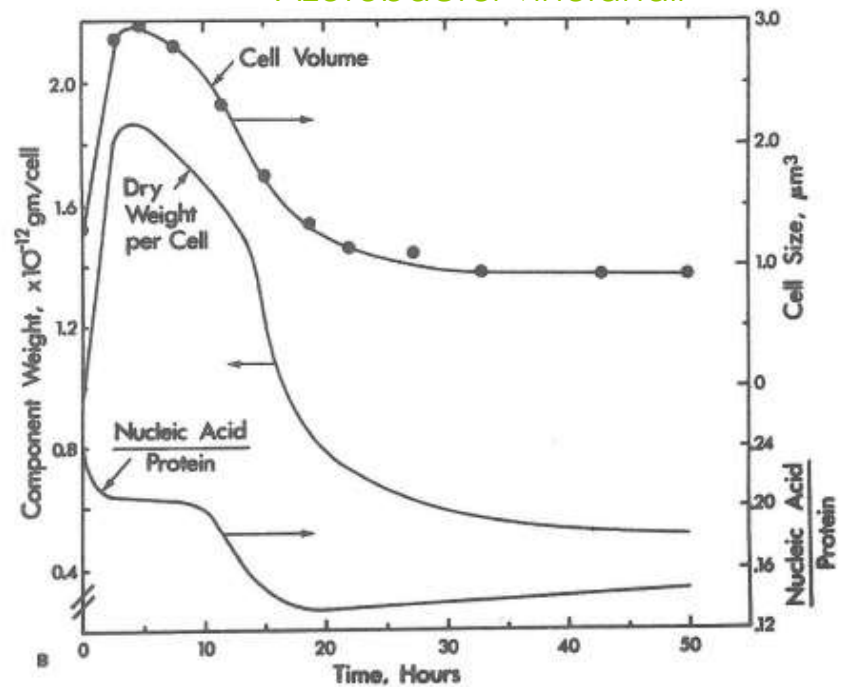
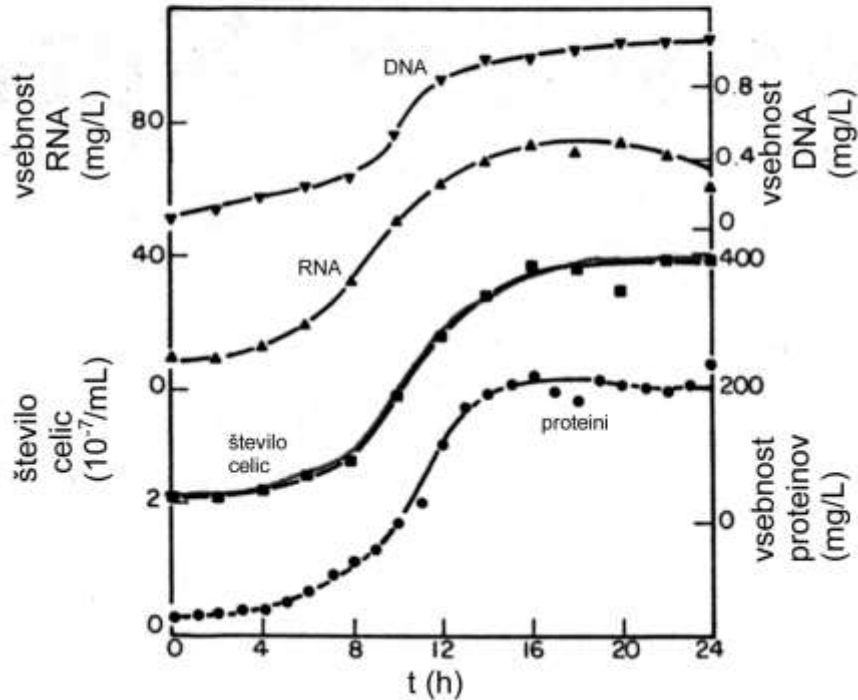
Figure 6.3. Typical growth curve for a bacterial population. Note that the phase of growth (shown here for cell number) depends on the parameter used to monitor growth.



Schizosaccharomyces pombe

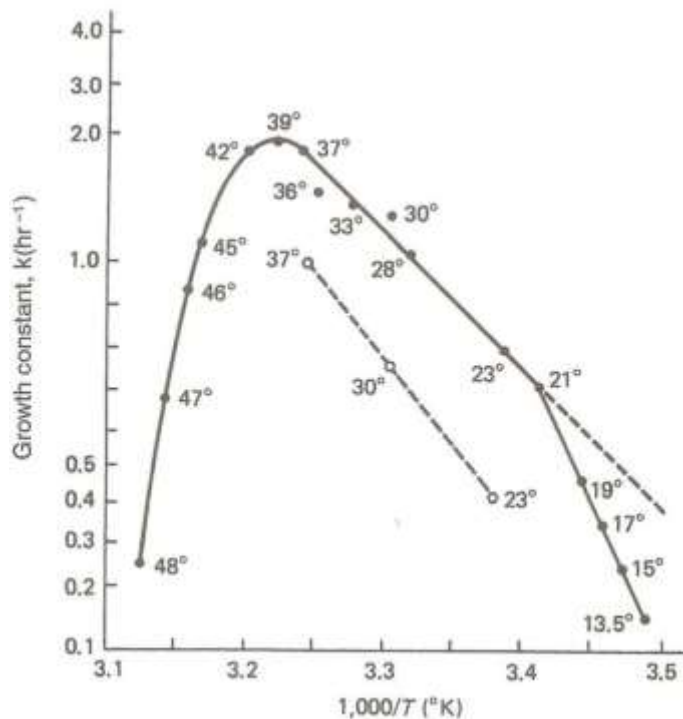


Azotobacter vinelandii



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:

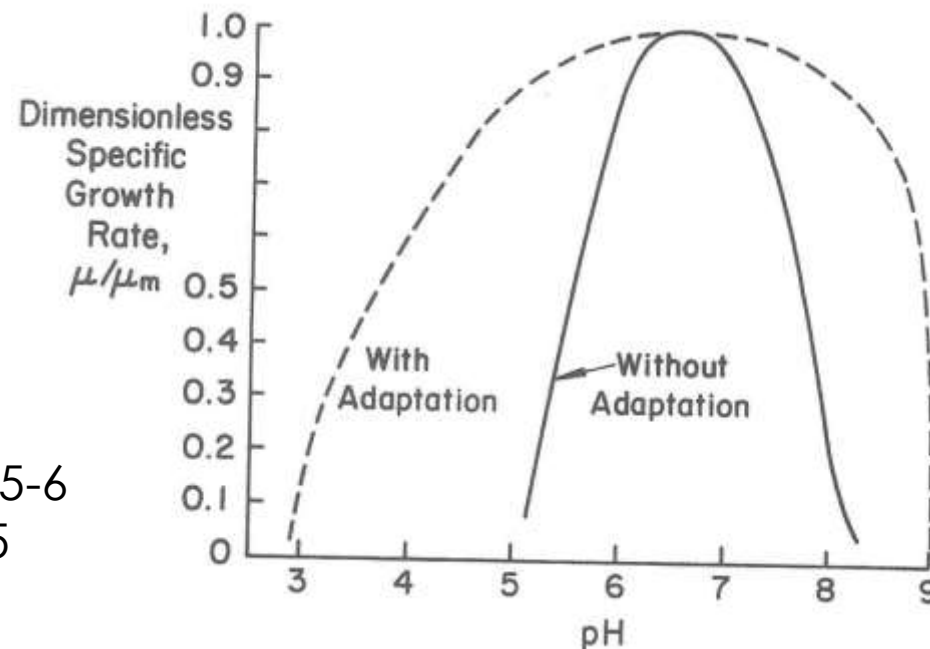
bakterije: pH=3-8

kvasovke: pH=3-6

Nitaste glive: pH=3-7

Rastlinske celice: pH=5-6

Živalske celice: 6,5-7,5



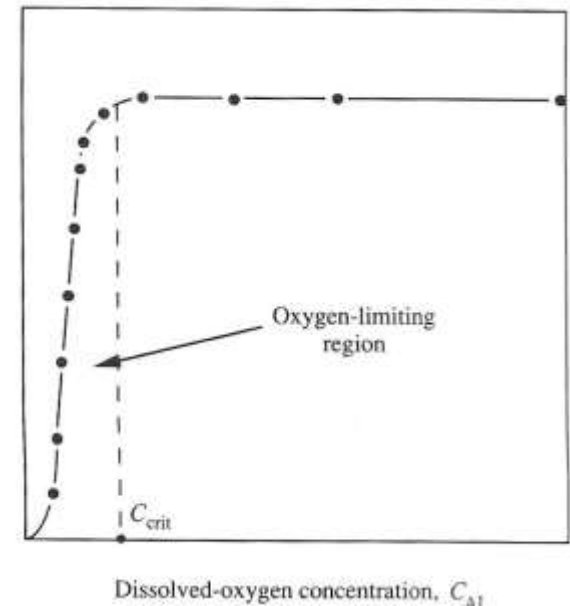
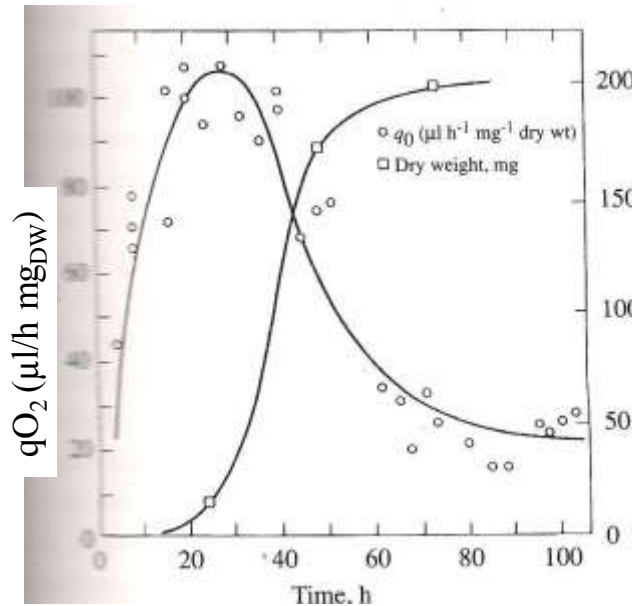
Sprememba pH med bioprocesom:

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

● pO₂



$$k_L a (C^* - C) = \text{OTR}$$

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

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

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

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

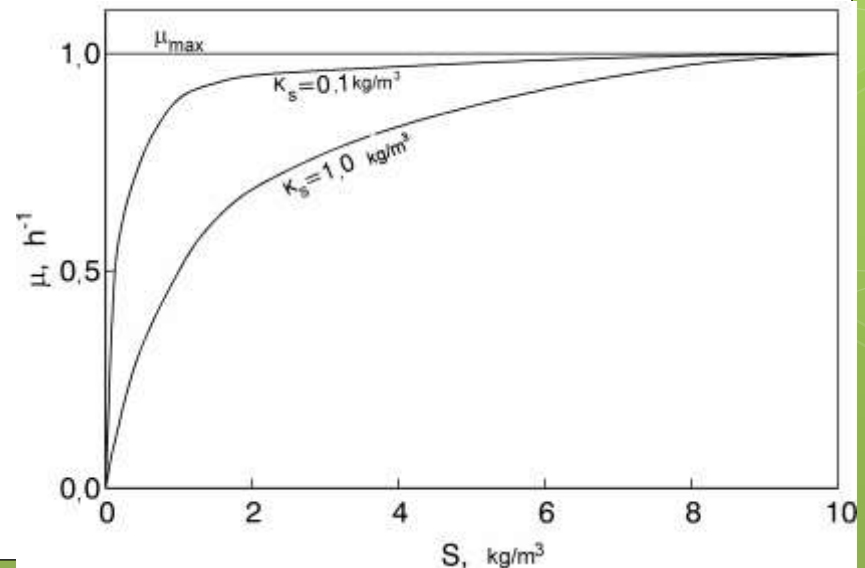
Nestrukturni nesegregirani modeli rasti biomase

- Hitrost rasti, omejena s substratom

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Monodov model}$$

K_s ... konstanta nasičenja s substratom [kg/m^3]

mikroorganizem (rod)	limitni substrat	K_s (g/m^3)
<i>Saccharomyces</i>	glukoza	25
<i>Escherichia</i>	glukoza	4,0
	laktoza	20
	fosfat	1,6
<i>Aspergillus</i>	glukoza	5,0



Nestrukturni nesegregirani modeli rasti biomase

- Model z inhibitorji rasti
 - Inhibicija s substratom – nekompetitivna

$$\mu_g = \frac{\mu_{\max}}{\left(1 + \frac{K_s}{S}\right)\left(1 + \frac{S}{K_I}\right)} \quad \text{Če je } K_I \gg K_S: \quad \mu_g = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}}$$

- Inhibicija s substratom - kompetitivna

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

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

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

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

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

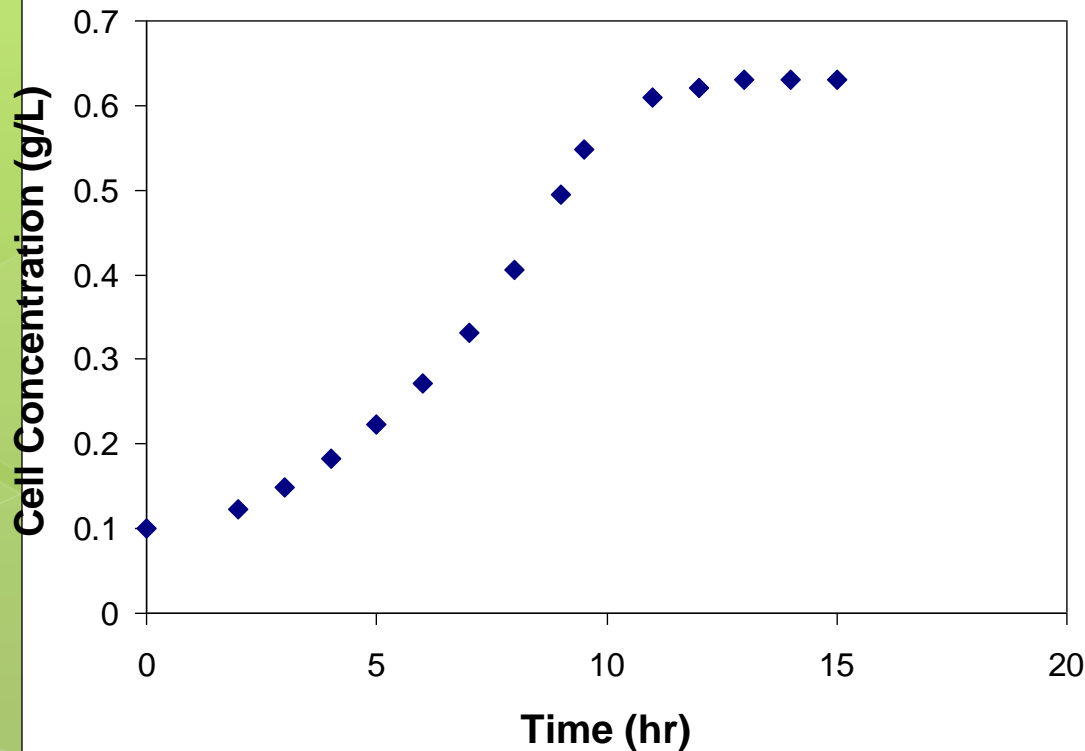
Akompetitivna

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

Z upoštevanjem celične smrti

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

Logistična enačba



- Enačbe šaržnega bioprocasa
- Združujejo šaržo rast, Monodovo kinetiko in izkoristke
- Ni upoštevanega vzdrževanja celic

Logistična enačba

Rast biomase

$$r_X = \frac{dX}{dt} = \mu X = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} X \quad (1)$$

Izkoristek substrata

$$X - X_0 = Y_{X/S} (S_0 - S) \quad (2)$$


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



Rast nitastih organizmov

- Model – ni omejitev s prenosom snovi

$$\frac{dR}{dt} = k_p = konst.$$

R - radij flokule celic, peleta ali kolonije

Hitrost rasti biomase (M) lahko zapišemo kot:

$$\frac{dM}{dt} = \rho 4\pi R^2 \frac{dR}{dt} = k_p \rho 4\pi R^2$$

ali

$$\text{Kjer je: } \gamma = k_p (36\pi\rho)^{1/3}$$

$$\frac{dM}{dt} = \gamma M^{2/3}$$

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

Nitasti organizmi

- Po integraciji dobimo:

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

- M_0 je ponavadi zelo majhen, zato:

$$M \propto t^3$$

- Model potrjujejo eksperimentalni podatki.