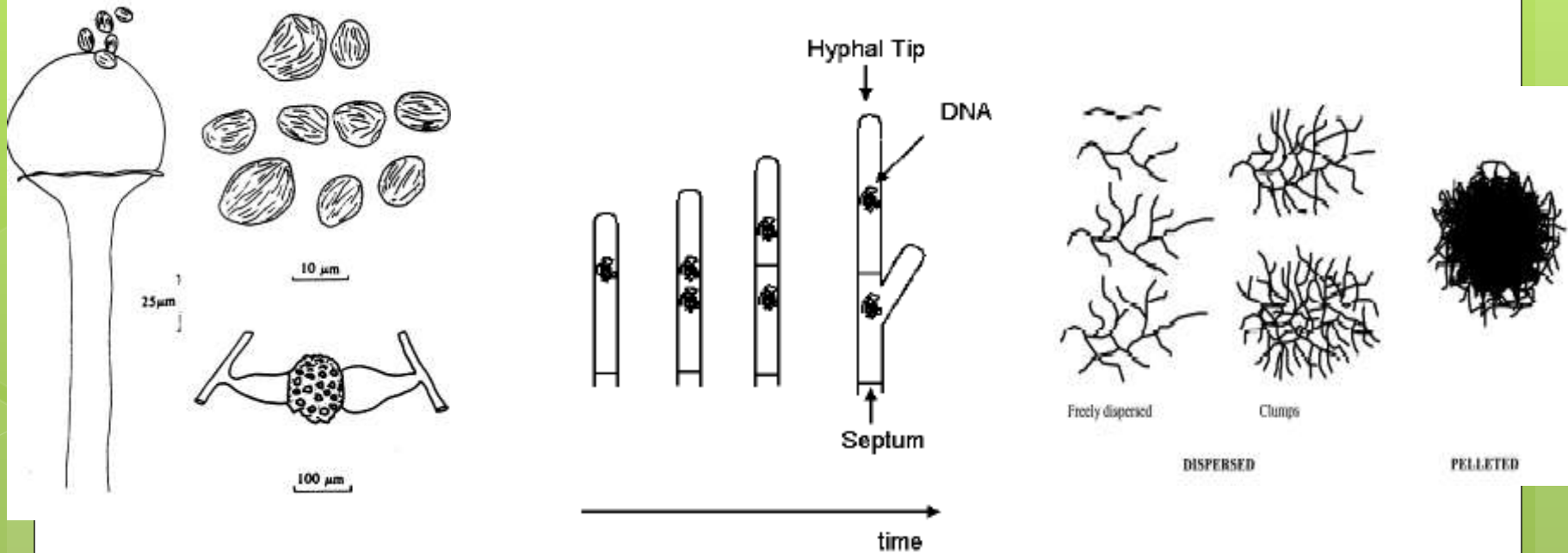




Submerzna rast
nitastih gliv

Submerzna rast nitastih gliv



spore



hife

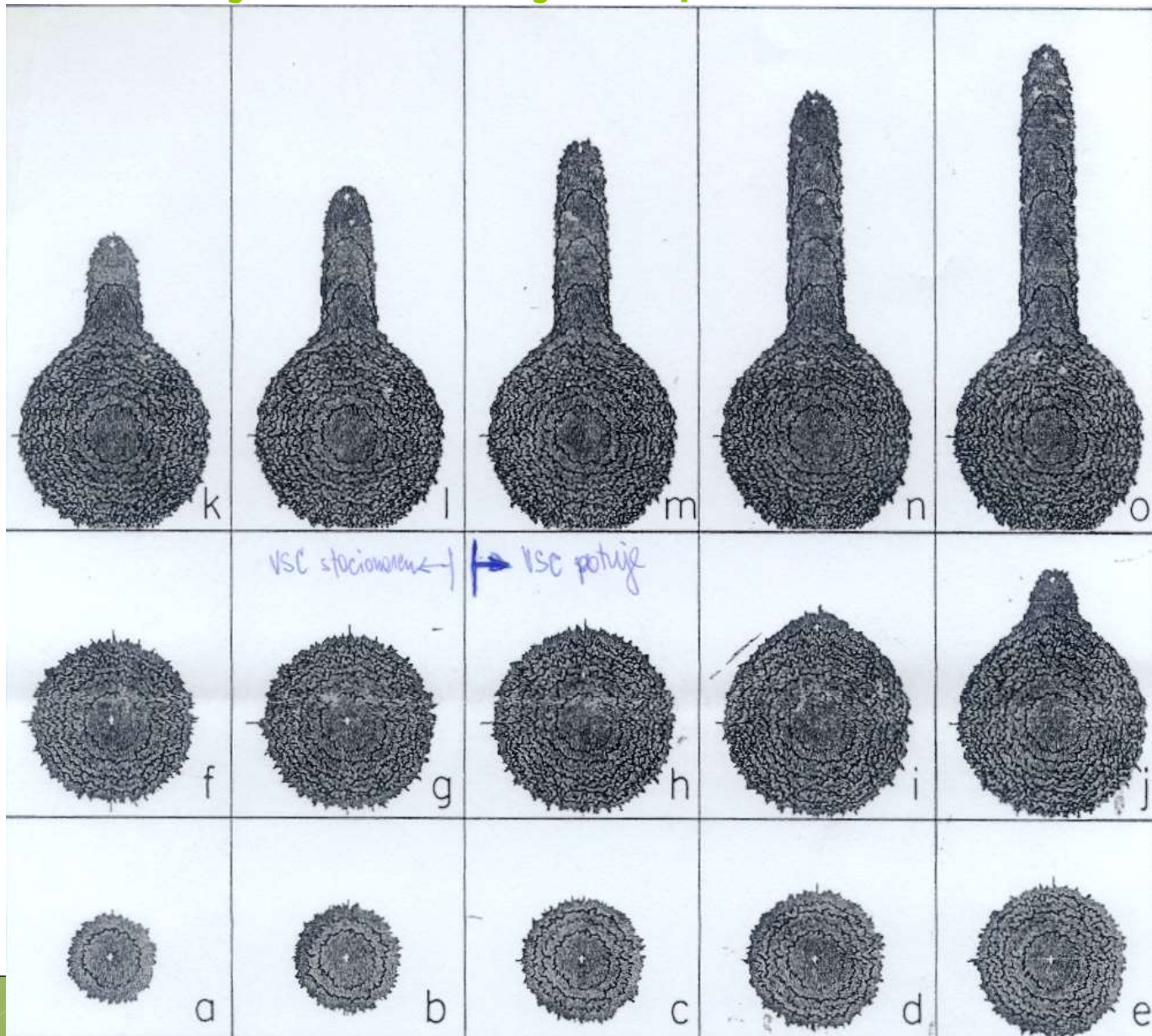


micelij

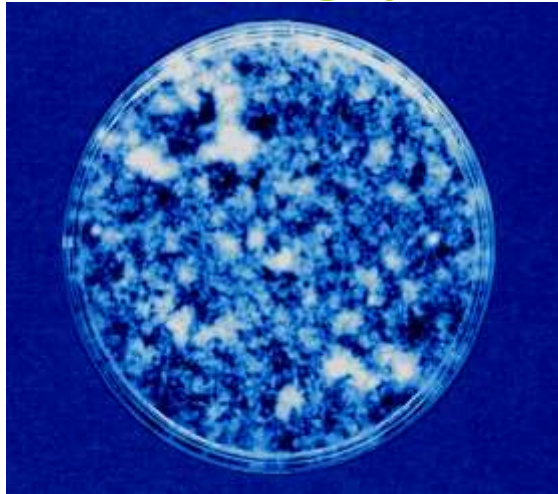
Apikalna rast hif

- 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

Simulacija vzklitja spore



Morfologija nitastih gljiv



filamentozna rast



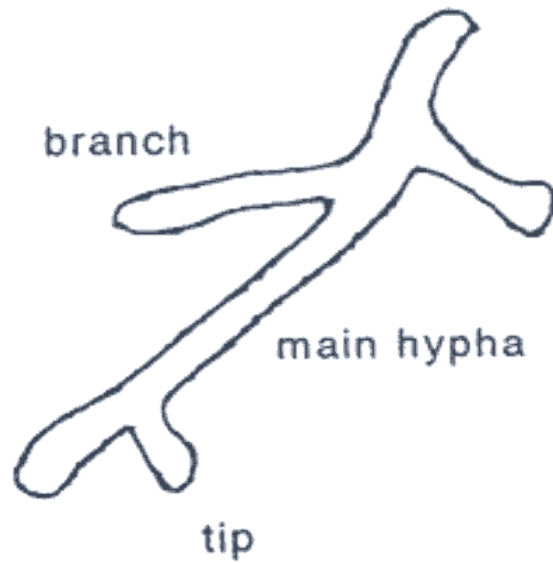
dispergirane flokule, peleti,
kepe, sprijeta biomasa

- sestava celic
- metabolizem celic
- reološke lastnosti fermentacijskih brozg

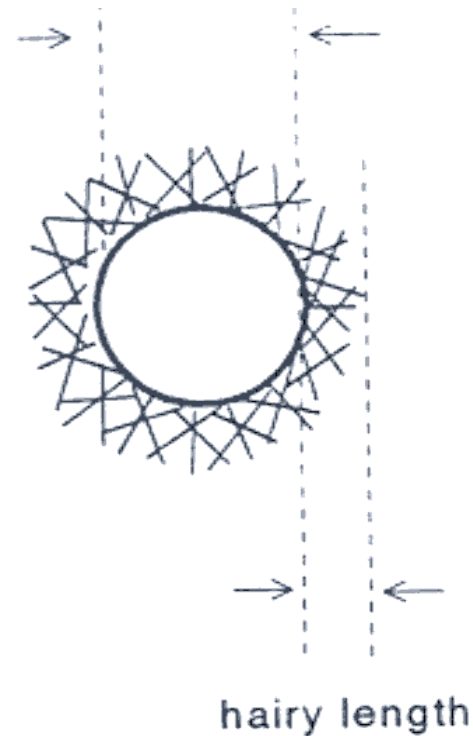
Karakterizacija morfologije

- Kvantitativna analiza slike (image analysis)
 - Mikroskopski nivo: dimenzije hif, razvejanje, diferenciacija celic
 - Makroskopski nivo: struktura peletov (določanje merila krožnosti peletov)
- Reološke lastnosti brozg
 - Peleti: newtonske karakteristike
 - Dispergirani micelij: običajno psevdoplastične ali plastične

Morfološke karakteristike

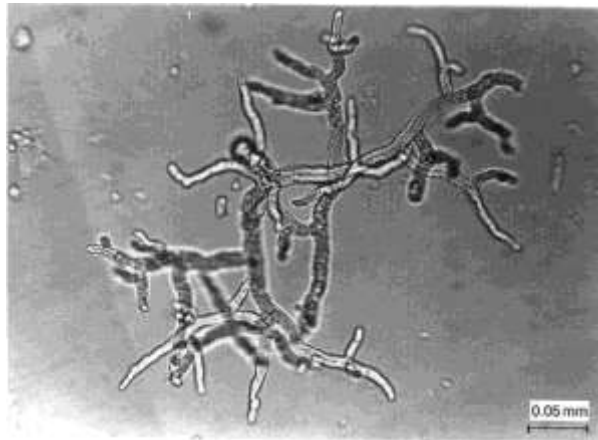
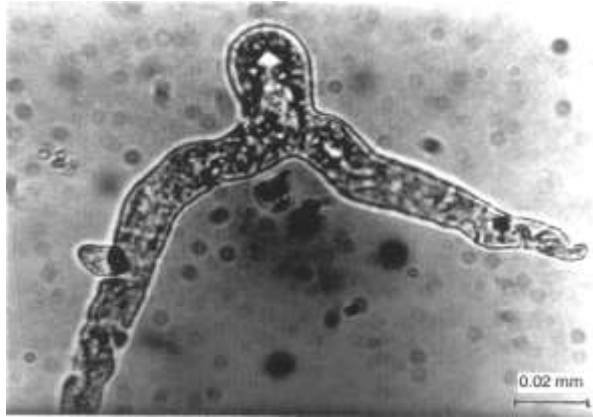


mikroskopsko

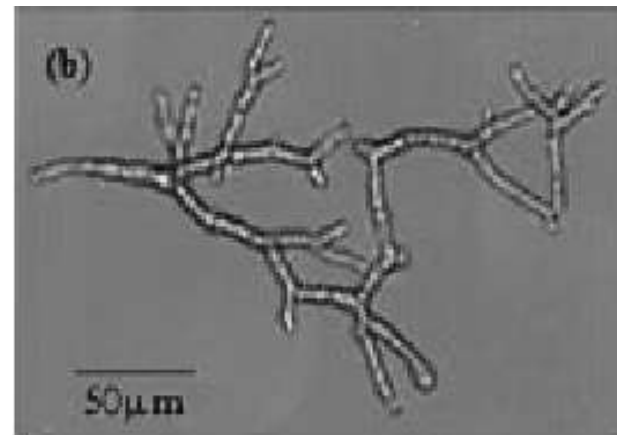
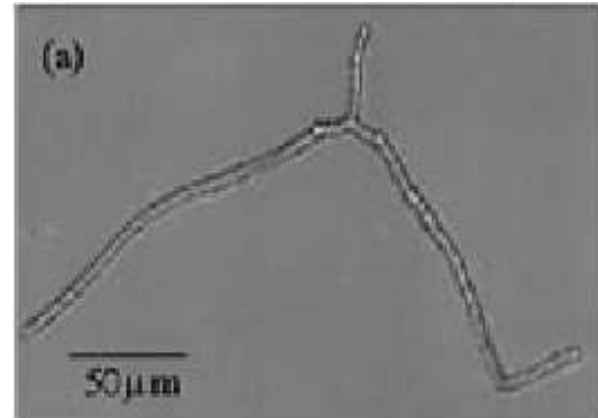


makroskopsko

Mikromorfologija nitastih gljiv



Rhizopus nigricans



Aspergillus niger

Indeksi mikroskopske morfologije

- Dolžina glavne hife (efektivna dolžina), L_e
- Celokupna dolžina vseh hif v delcu, L_t
- Povprečna dolžina vseh vej, L_b
- Število vej, n
- Premer hif (ocenjeno povprečje), d
- Enota rasti hife, G

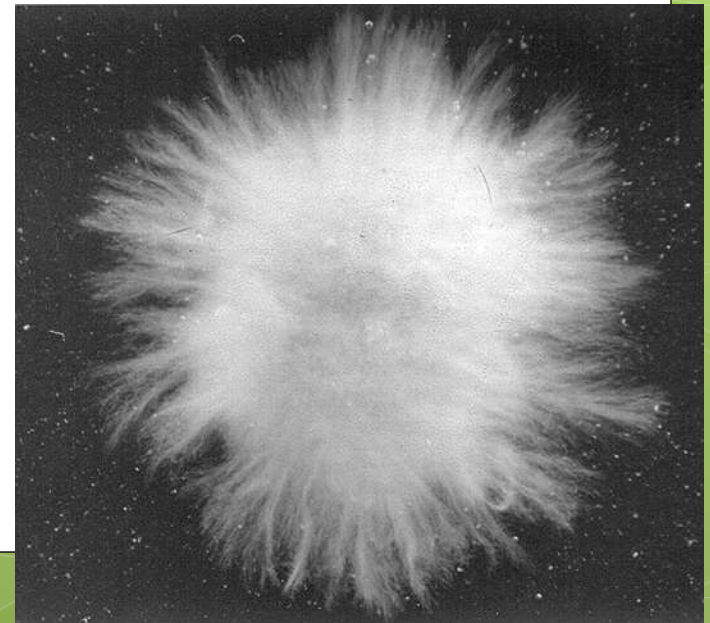
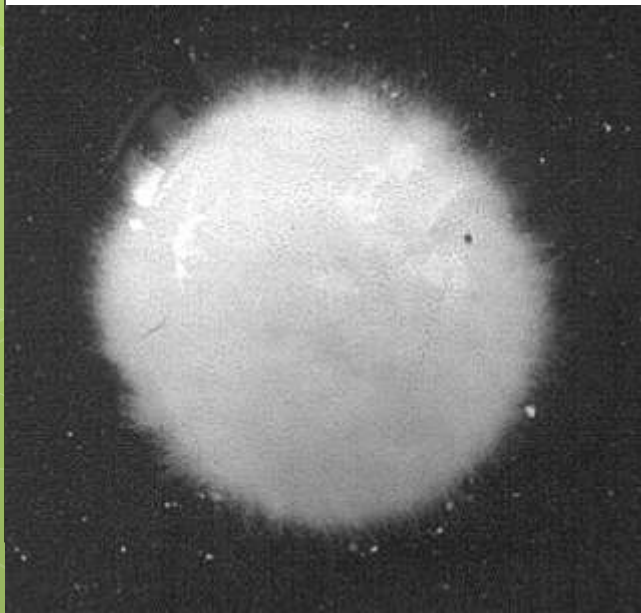
$$G = \frac{L_t}{(n + 2)} = \frac{\textit{celotna dolžina hif}}{\textit{število apeksov}}$$

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)



Morfologija in metabolizem gliv

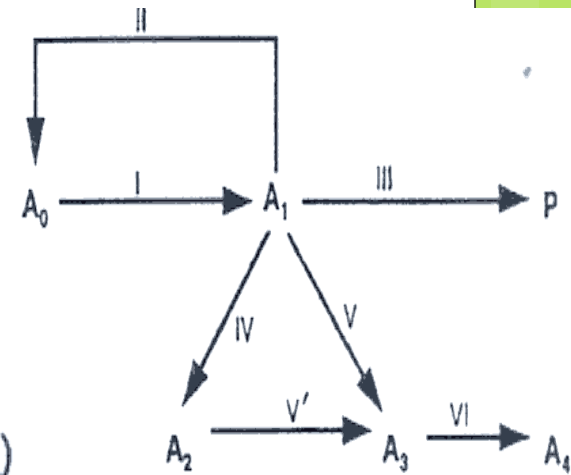
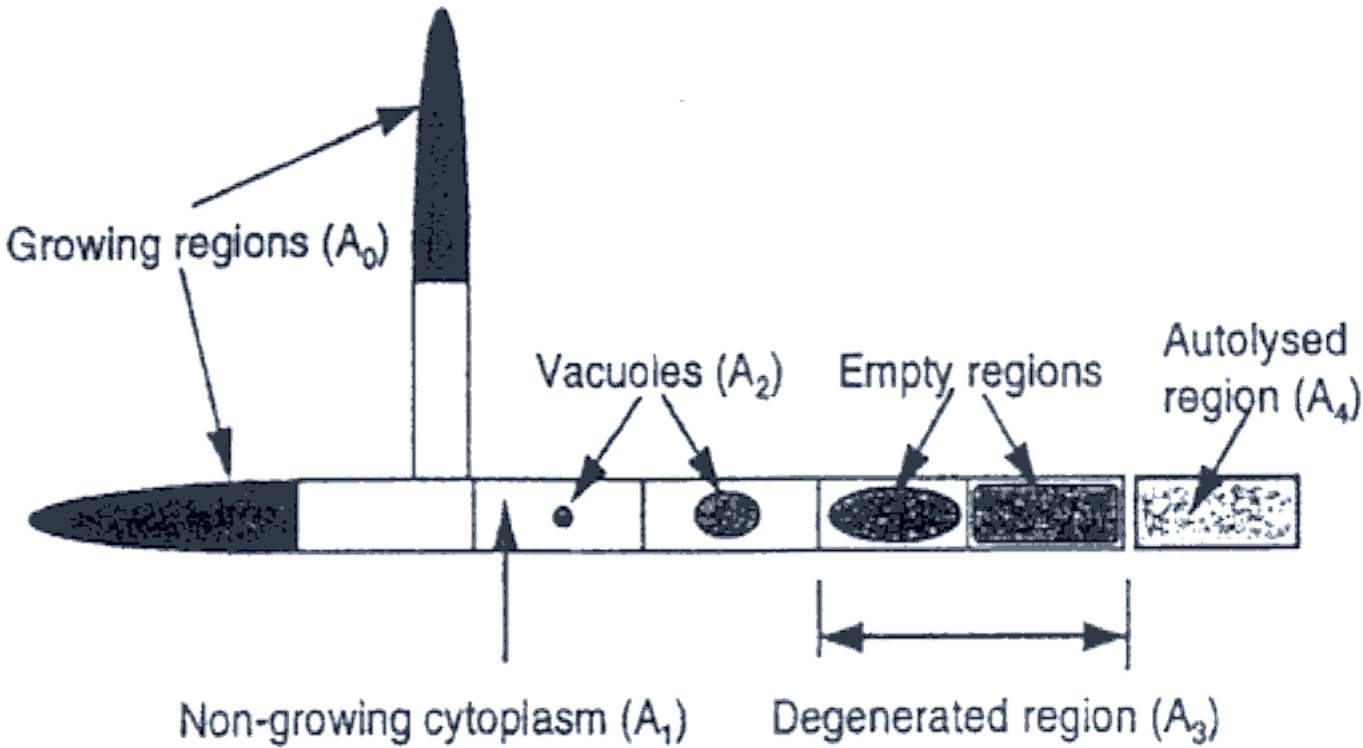
- Primarni metabolizem (neobhodno potreben za življenje)
- Sekundarni metabolizem (posledica diferenciacije celic, vključuje več vrst in bolj raznolike metabolne poti)

Peletna oblika: izrazite spremembe v pogojih in s tem večja diferenciacija celic

Morfologija in sestava celic

- spremembe v sestavi celične stene
- v peletih visoka stopnja signaliziranja in interakcij med celicami
 - bolj kompleksna diferenciacija celic
 - tvorba nespolnih spor, piknidijev (nespolna, votla hranilna telesa, ki ležijo v nespolnih piknidioforah) ali artrosporam podobnih celic
- hife na površini peletov imajo več RNA kot celice v notranjosti ⇒ omejena sposobnost sinteze proteinov v sredini aglomeratov

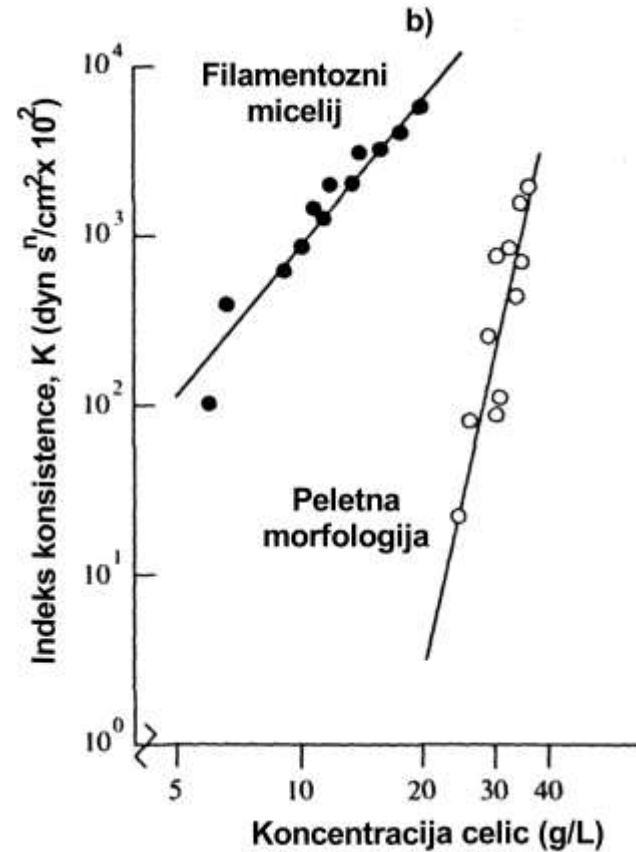
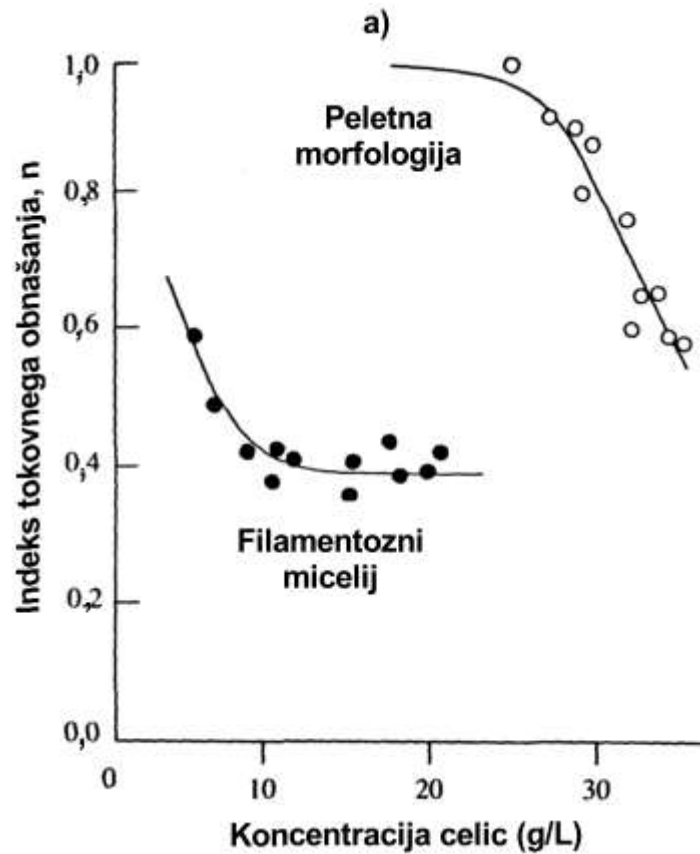
Diferenciacija celic v hifi



- I - hyphal extension
- II - branching
- III - penicillin production
- IV - vacuolation
- V', V - degeneration
- VI - autolysis

Penicillium chrysogenum

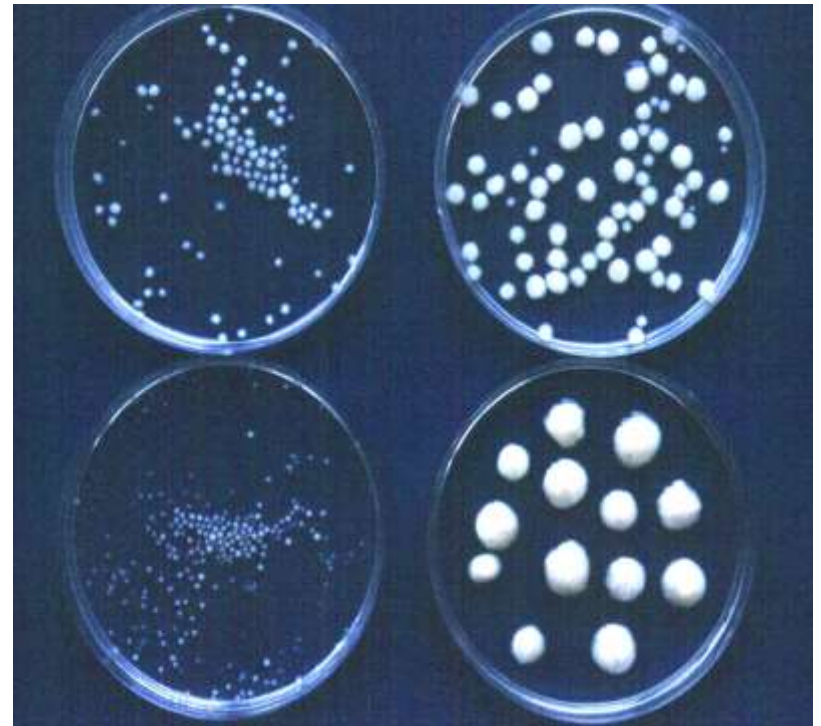
Morfologija in reološke lastnosti fermentacijskih brozg



Potenčni model: $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$

Peletna oblika rasti gliv

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

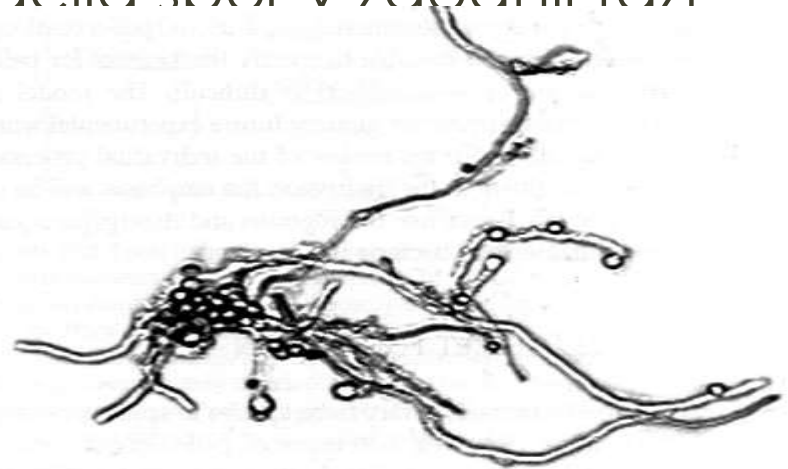


Tvorba peletov

Tradicionalna delitev:

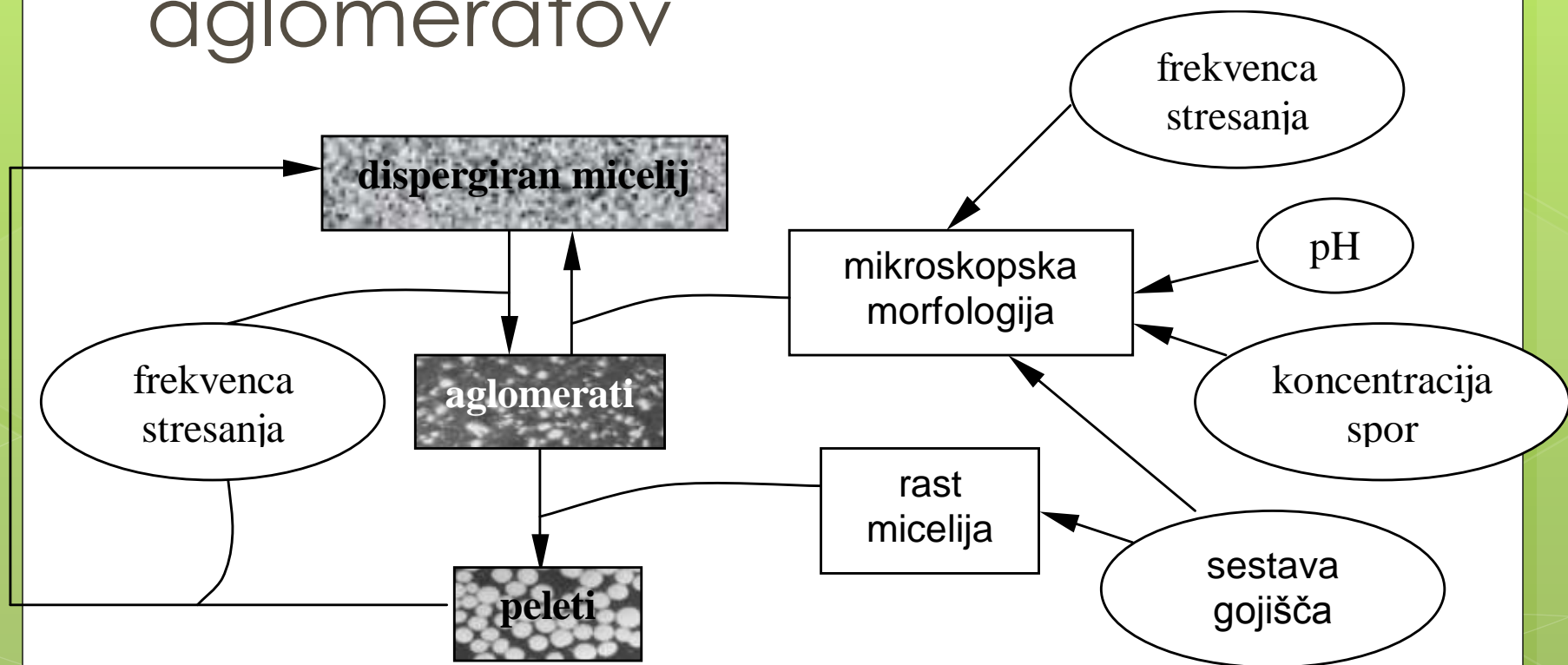
- koagulativni tip: aglomeracija spor v zadnji fazi razvoja

Aspergillus oryzae



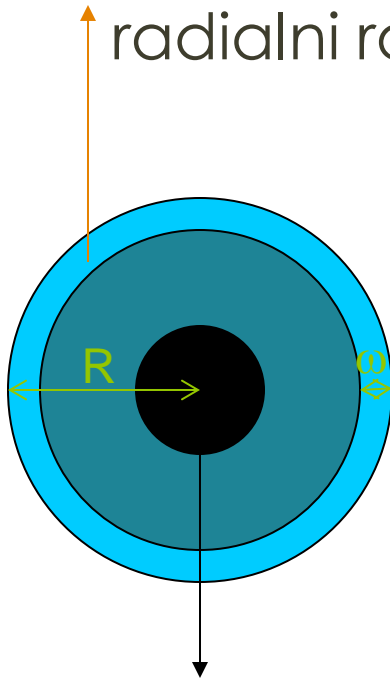
- nekoagulativni tip: 1 spora → 1 pelet

Nastanek peletov preko aglomeratov



Rast peletov

periferna cona, ki prispeva k
radialni rasti (ω)



nerastna cona, ki
počasi avtolizira

specifična hitrost rasti hif

$$\frac{dm_p}{dt} = \mu_h \cdot m_\omega$$

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

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

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

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

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

r.p.: $R = R$, $t = t$ in $R = R_0$, $t = t_0$

Nestrukturni modeli rasti gliv

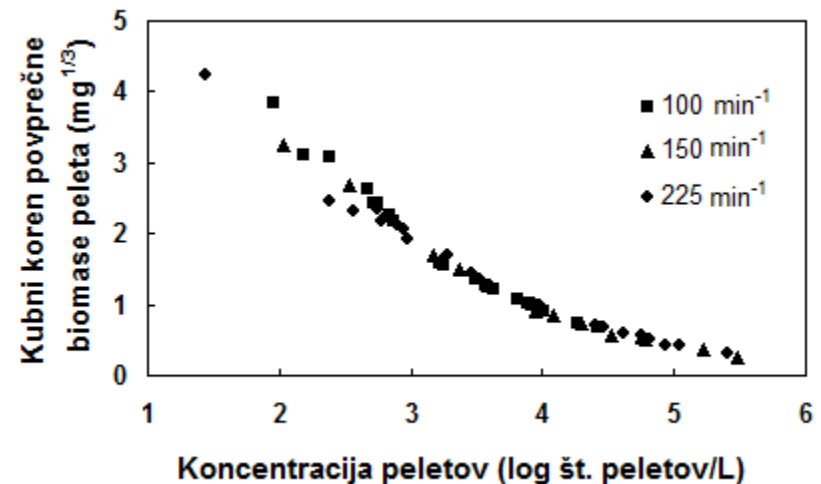
- model kubnega korena: peletna rast

$$R = R_0 + k_p \cdot (t - t_0)$$

$$X^{1/3} = X_0^{1/3} + k_c (t - t_0)$$

- model eksponentne rasti:
dispergirana rast

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$



Faze rasti peleta

- Lag faza:
tvorba aglomeratov spor in elementov hif (vcepek, fiziološko stanje)
- Eksponentna faza (kratka): majhni peleti, ni omejitev glede difuzije hranil
- Faza konstantne hitrosti rasti premera peleta: rast le na zunanji površini peleta, diferenciacija celic v notranjosti

Vpliv na velikost in obliko peletov

- prenos snovi v pelet
- koncentracija limitnih substratov v gojišču (kisik, glukoza)
- strižne sile: fragmentacija in razpad peletov



Predpostavke modela difuzije

- Delec je izotermen, homogen in v stacionarnem stanju
- Prenos snovi se odvija samo z difuzijo
- Velja Fickov zakon s konst. $D_{ef,i}$, kjer je:

$$D_{ef,i} = D_i \cdot \frac{\varepsilon}{\tau}$$

ε = poroznost peleta

τ = faktor zavitosti por

- C_i se spreminja samo radialno, S se prenašajo v notranjost in P v zunanost

Molekularna difuzija v pelet

Snovna bilanca za i-to komponento v stacionarnem stanju:

$$D_{ef,i} \cdot \left(\frac{d^2 c_i(y)}{dy^2} \cdot y^2 + 2 \cdot y \cdot \frac{dc_i(y)}{dy} \right) - r_i(c_i(y)) \cdot y^2 = 0$$

$$\eta_{ef} = \frac{r_{i,o}}{r_i(c_i(y=R))}$$

$$D_{ef,i} = D_i \cdot \frac{\varepsilon}{\tau}$$

$$\Phi_{gen} = \frac{R \cdot r_i(c_i(y=R))}{3 \cdot \sqrt{2 \cdot D_{i,e} \cdot \int_0^{c_i(y=R)} r_i(c_i) dc_i}}$$

$$\eta_{ef} = \frac{\tanh \Phi_{gen}}{\Phi_{gen}}$$

Kritični polmer peleta

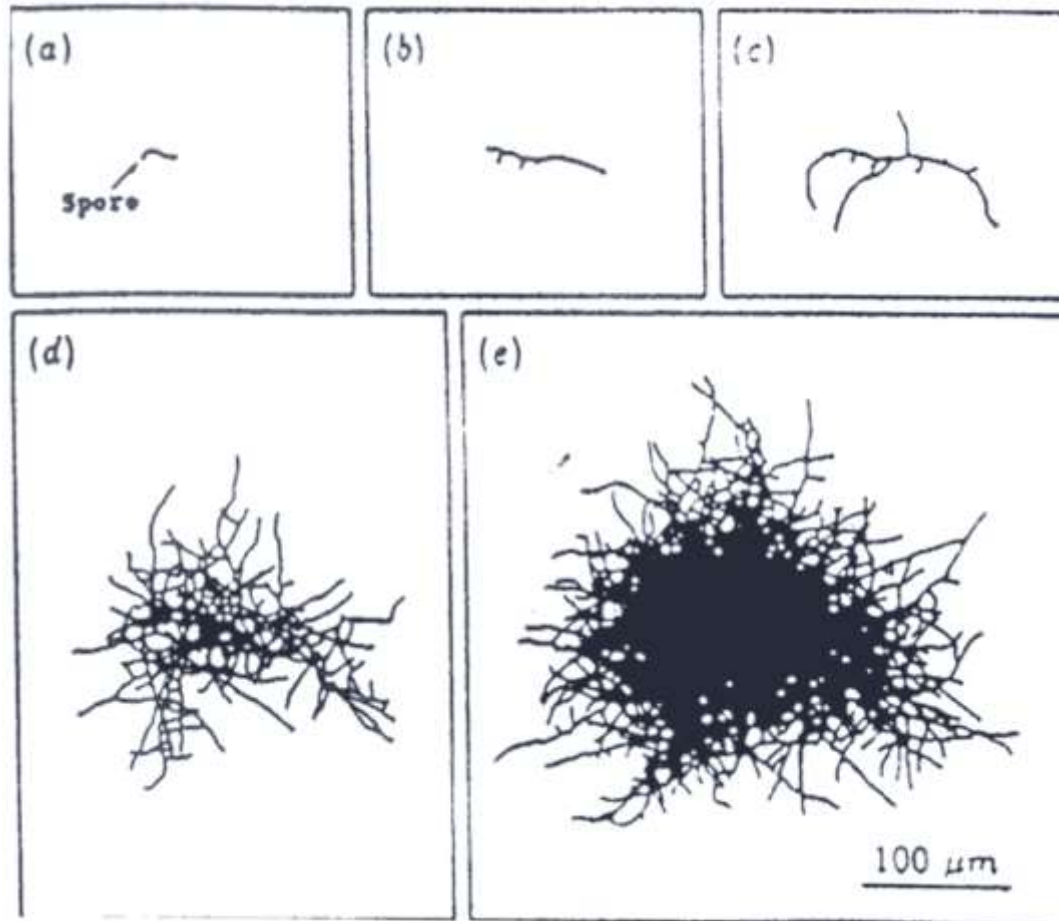
$$C_j = 0 \text{ pri } r = 0$$

$$R_{krit.} = \sqrt{\frac{6 D_{ef,i} Y_{x/i} C_{i,s}}{r_i(C_{i,s})}}$$



Limitni dejavnik za rast peletov: difuzija kisika v pelet

Simulacija peletne rasti



Rast peletov *Aspergillus niger*



(a)



(b)

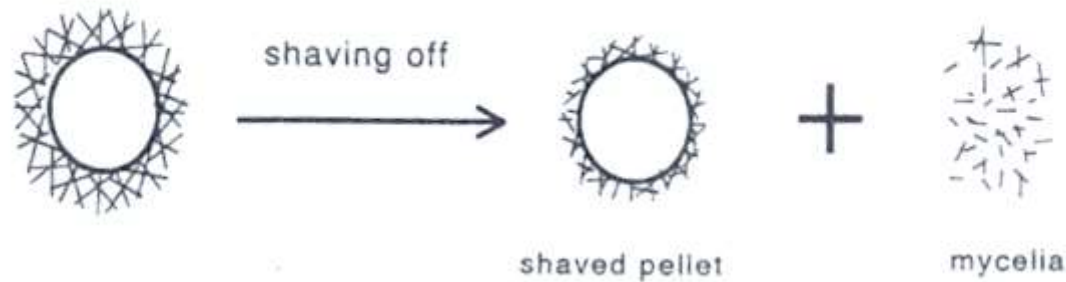
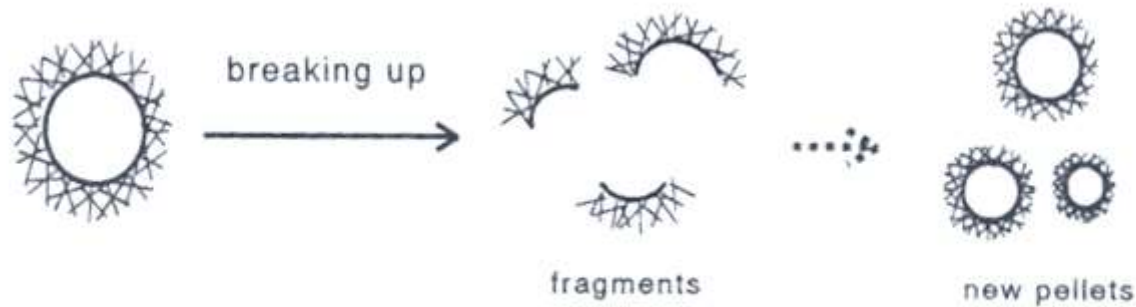


(c)



(d)

Fragmentacija in razpad peletov



- Popolno razbitje peletov
- Fragmentacija hif na površini peletov



dispergirani elementi hif

Fragmentacija in razpad peletov

Vpliv na:

- porazdelitev velikosti peletov
- število peletov
- strukturo peletov



Struktura peleta

Fragmentacija vpliva na strukturo peletov:

- puhasti, rahli (imajo kompaktno sredino in razvejano, puhasto zunanost)
- kompaktni, gladki (so celi kompaktni, zunanost pa je gladka)
- votli gladki (sredina peletov je prazna, zunanost pa gladka)

Prednosti uporabe peletov

- pridobivanje metabolitov, ki se ne tvorijo pri dispergirani rasti
- zmanjšanje porabe energije za mešanje
- boljši prenos toplote in snovi v mediju
- enostavnejše ločevanje micelija od medija
- možnost ponovne uporabe biomase

Industrijska uporaba peletne oblike nitastih gliv

- Citronska kislina: *Aspergillus niger*
- Penicilin: *Penicillium chrysogenum* in *Penicillium notatum* (obe obliki)
- Celulolitični encimi: *Trichoderma reesei*
- Ligninolitični encimi in razbarvanje odpadnih tokov pri beljenju papirja : *Phanerochaete chrysosporium*
- Submerzno pridobivanje višjih gob

Potencialna uporaba peletov

- Adsorpcijski procesi v okoljevarstvu (odstranjevanje težkih kovin iz odpadnih vod)
- Mikrobne biotransformacije
- Proizvodnja proteinov iz organskih odpadkov
- Proizvodnja številnih sekundarnih metabolitov gliv

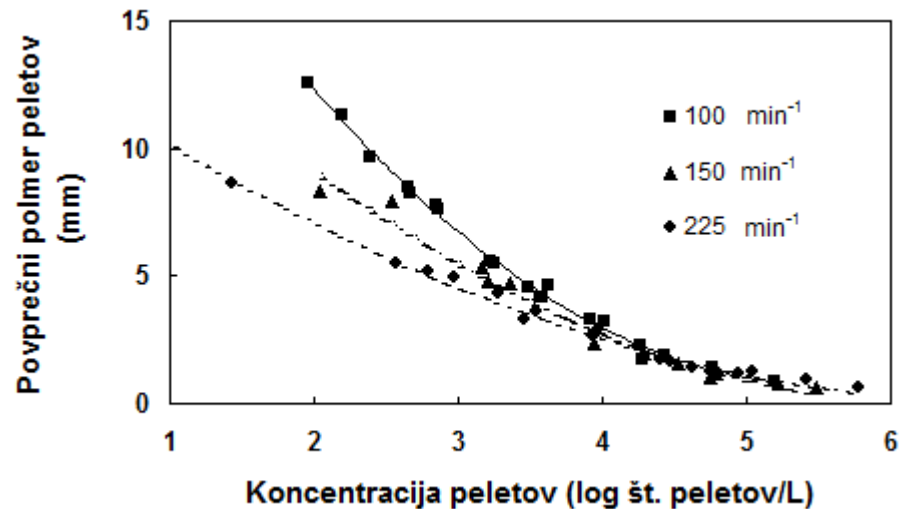
Vpliv procesnih parametrov na submerzno rast gliv

- Vcepek
- Sestava gojišča
 - Vrsta in konc. vira ogljika
 - Dušik in fosfat
 - Kovinski in drugi ioni
- Raztopljeni kisik
- Raztopljeni CO₂
- pH
- Temperatura
- Mehanske sile

Vpliv vcepka

- Glavni vpliv na tvorbo peletov
- Pomembna tudi priprava vcepka

Splošno: Visoke koncentracije spor \Rightarrow
disperzna rast micelija



Vpliv sestave gojišča

- Visoke koncentracije hranil \Rightarrow hitra rast
 \Rightarrow običajno dispergirana rast
- Pomanjkanje enega od substratov (N , O_2)
 \Rightarrow indukcija peletne rasti
- Pomembna prisotnost površinsko aktivnih snovi

Vpliv CO₂

- Tvorba pri aerobnih fermentacijah
- Močan vpliv na morfologijo:
 - Bolj razvejane, zadebeljene hife
 - Zadebeljene celične stene (sinteza hitina)
- Nižja navidezna viskoznost brozg in s tem boljši vnos kisika
- Sprememba metabolizma

Vpliv mešanja

- Zelo velike strižne sile vodijo v fragmentacijo hif \Rightarrow vpliv na metabolizem in reologijo brozg
- Nehomogenost brozg v reaktorjih, celo v laboratorijskem merilu \Rightarrow mirujoči predeli, pomanjkanje hranil \Rightarrow diferenciacija celic

Velikost peleta

- Vpliv volumskega vnosa moči:

$$d_{p,r} = d_{frag} \cdot \left(\frac{P_g}{V} \right)^{-0,4}$$

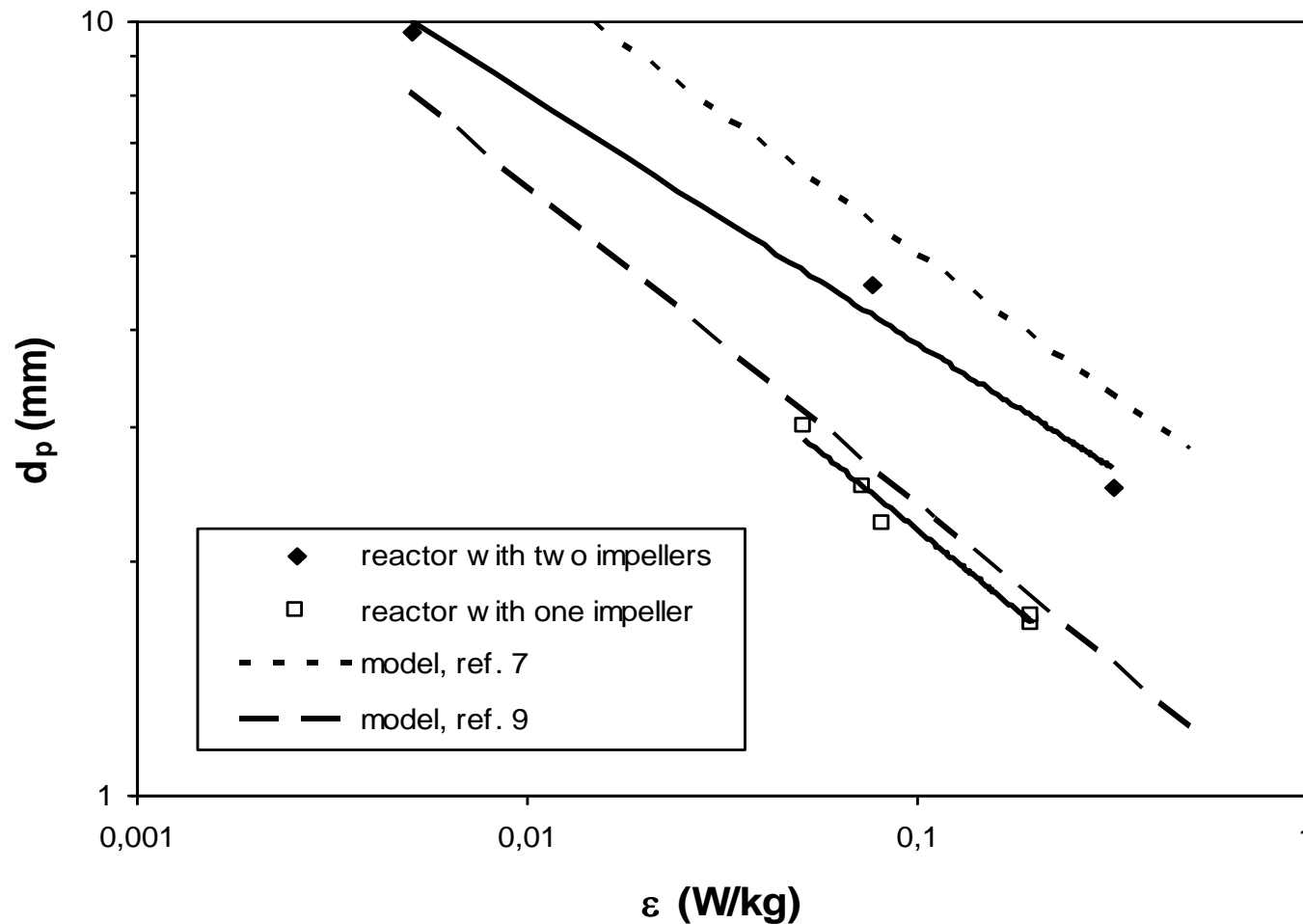
$d_p > d_{p,r} \longrightarrow$ peleti fragmentirajo

d_{frag} = parameter, odvisen od natezne trdnosti peleta

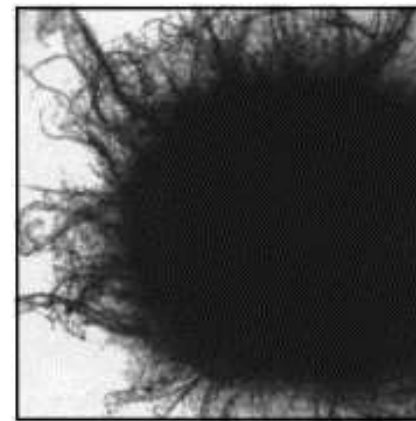
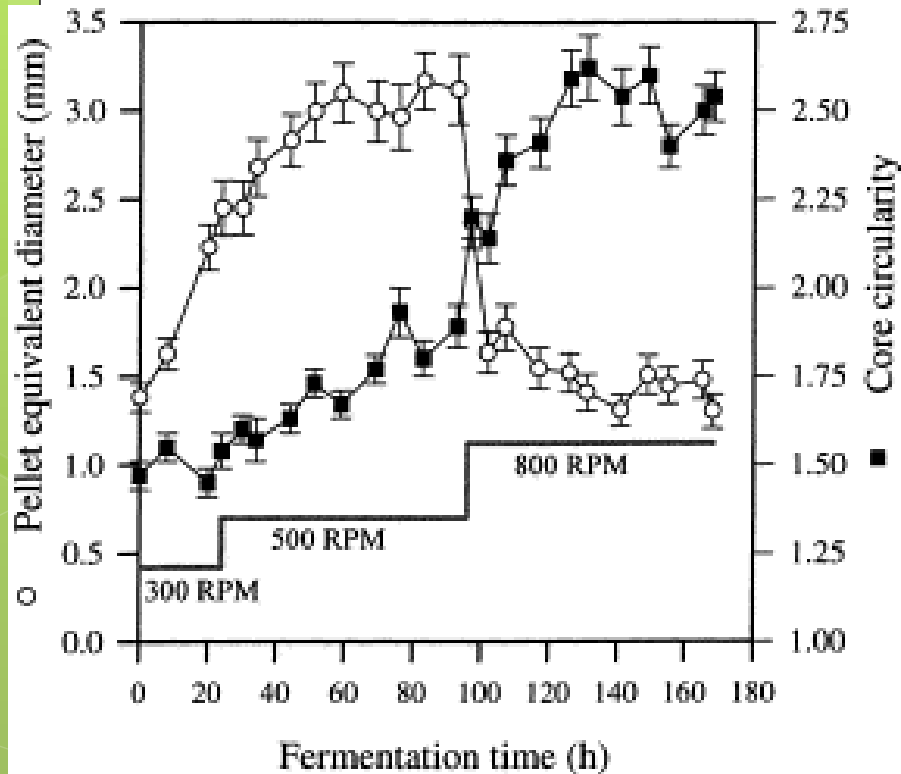
- Vpliv specifičnega vnosa moči (mešalni r.)

$$d_p \propto \epsilon^{(-0,14 \pm 0,08)}$$

Vpliv vnosa moči na velikost peletov

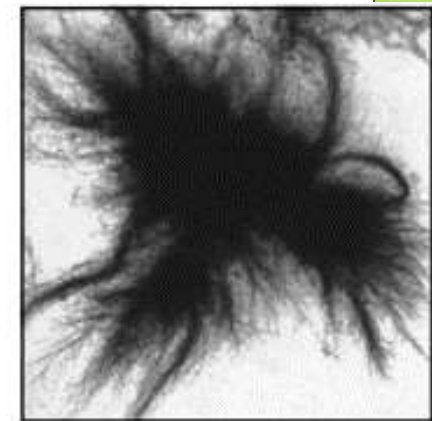


Vpliv mešanja na strukturo peletov



(a)

N=500rpm

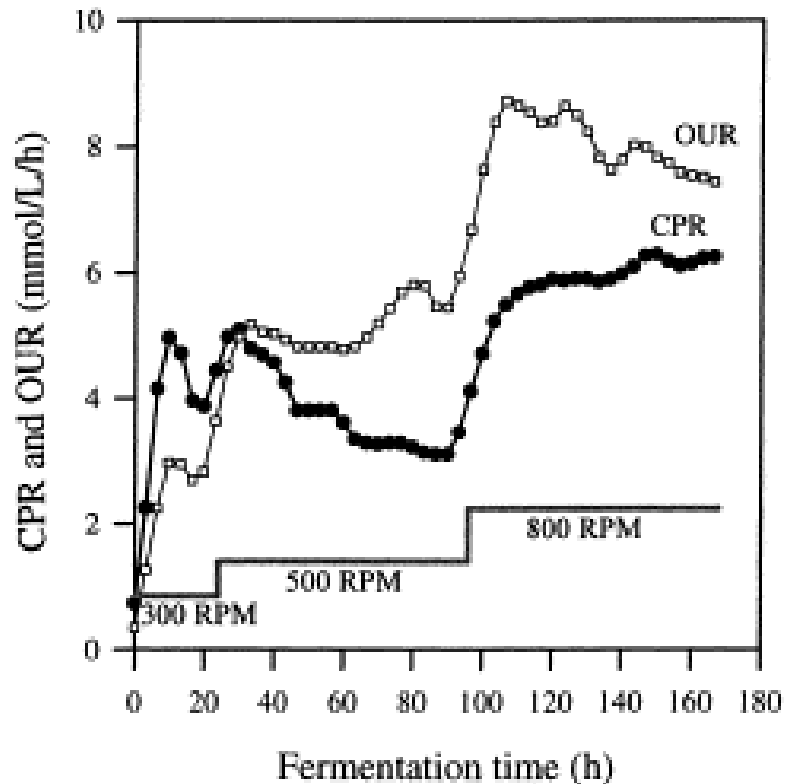


(b)

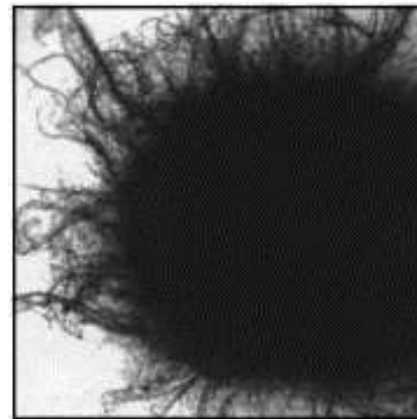
N=800rpm

Proizvodnja citronske kisline s peleti *Aspergillus niger*

Vpliv mešanja na porabo kisika in tvorbo CO₂



CPR = hitrost tvorbe CO₂,
OUR = hitrost porabe O₂



(a) N=500rpm



(b) N=800rpm

Proizvodnja citronske kisline s peleti *Aspergillus niger*

Načrtovanje bioprocessov z upoštevanjem morfoloških karakteristik

- Reološke lastnosti fermentacijskih brozg
- Mešanje in prezračevanje
 - Poraba moči
 - Vnos kisika
- Sproščanje CO₂
- Izbira bioreaktorja in načina vodenja procesa
- Prenos v večje merilo