

Μάθημα Βιοχημικές Διεργασίες (ΕΝΕ.2070)

Κινητική Ανάπτυξης Μικροοργανισμών

Δρ. ΑΝΕΣΤΗΣ ΒΛΥΣΙΔΗΣ

Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος

Πανεπιστήμιο Πατρών



Τι μάθαμε στην προηγούμενη διάλεξη (Διάλεξη 3β)

- Πως επηρεάζουν διάφοροι αναστολείς την κινητική μίας ενζυμικής αντίδρασης
 - Α) Συναγωνιστικούς αναστολείς (competitive inhibitors)
 - Β) Μη-συναγωνιστικούς αναστολείς (non-competitive inhibitors)
 - Γ) Ασυναγώνιστους αναστολείς (uncompetitive inhibitors)
- Είδαμε τον μηχανισμό της ενζυμικής αντίδρασης όταν υπάρχει αναστολή υποστρώματος
- Παραδείγματα πάνω στην κινητική των ενζύμων με τη χρήση διαγραμμάτων
- Τι συστήματα υπάρχουν για την ακινητοποίηση Ενζύμων
 - Παγιδευμένα σε μήτρα ή μεμβράνη
 - Προσδεμένα

Κινητική Μικροβιακής Ανάπτυξης



- Η κινητική της ανάπτυξης των κυττάρων εκφράζεται χρησιμοποιώντας εξισώσεις παρόμοιες με αυτές που αναφέραμε στην κινητική ενζύμων.
- Ο μεταβολισμός των κυττάρων εξαρτάται από την ολοκληρωμένη δράση ενός πλήθους ενζύμων.

Κινητική Μικροβιακής Ανάπτυξης

- Η ανάπτυξη είναι το αποτέλεσμα τόσο της αναπαραγωγής όσο και της μεταβολής του μεγέθους των κυττάρων.
- Εισάγοντας κατάλληλο θρεπτικό υλικό, οι μικροοργανισμοί αποσπούν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και τα μετατρέπουν σε βιολογικές ενώσεις.
 - Ένα μέρος για παραγωγή ενέργειας
 - Ένα άλλο μέρος χρησιμοποιείται για βιοσύνθεση και παραγωγή προϊόντων
- Παρατηρείται αύξηση της μικροβιακής μάζας με το χρόνο.
- Η μικροβιακή ανάπτυξη είναι ένα καλό παράδειγμα αυτοκαταλυόμενης αντίδρασης.
- Υποστρώματα + κύτταρα $\rightarrow$ εξωκυτταρικά προϊόντα + περισσότερα κύτταρα
 - $\Sigma S + X \rightarrow \Sigma P + nX$

Μικροβιακή Ανάπτυξη σε Διαδικασίες Διαλείποντος έργου (Batch Growth)

Οι διάφορες φάσεις ανάπτυξης διακρίνονται πιο εύκολα όταν ο λογάριθμος της συγκέντρωσης των ζωντανών κυττάρων συσχετίζεται με το χρόνο.

- 1) Φάση καθυστέρησης
- 2) Φάση επιτάχυνσης
- 3) Φάση εκθετικής ανάπτυξης
- 4) Φάση επιβράδυνσης
- 5) Στάσιμη φάση
- 6) Φάση θανάτου ή αποδόμησης

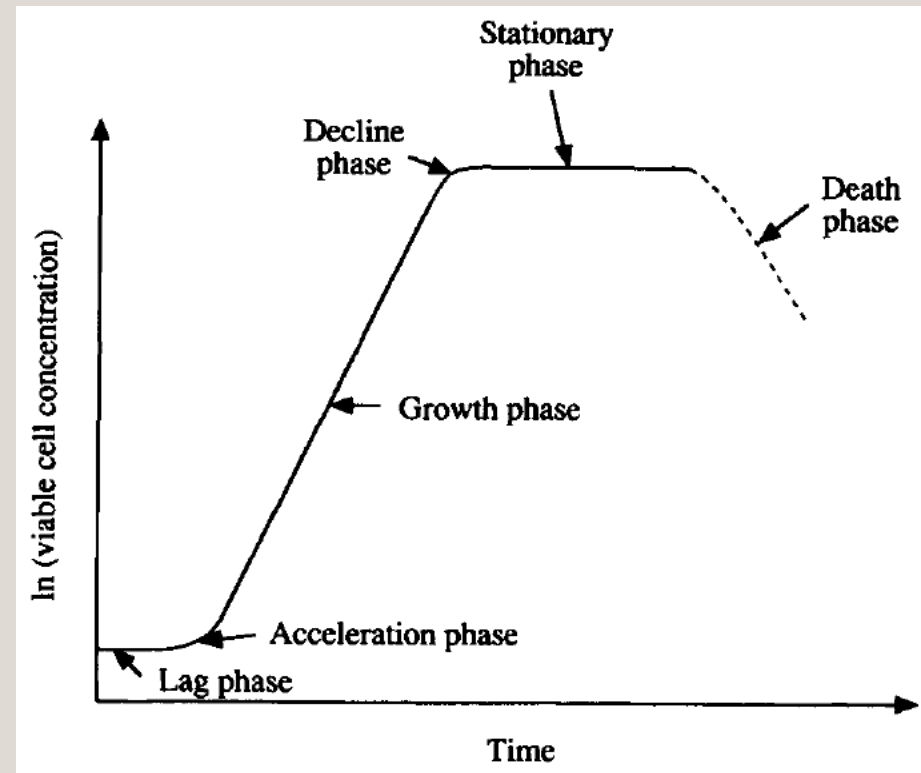


Table 11.6 Summary of batch cell growth

Phase	Description	Specific growth rate
Lag	Cells adapt to the new environment; no or very little growth	$\mu \approx 0$
Acceleration	Growth starts	$\mu < \mu_{\max}$
Growth	Growth achieves its maximum rate	$\mu \approx \mu_{\max}$
Decline	Growth slows due to nutrient exhaustion or build-up of inhibitory products	$\mu < \mu_{\max}$
Stationary	Growth ceases	$\mu = 0$
Death	Cells lose viability and lyse	$\mu < 0$

Μικροβιακή Ανάπτυξη σε Διαδικασίες Διαλείποντος έργου (Batch Growth): Φάση καθυστέρησης

- Προσαρμογή των κυττάρων στο θρεπτικό μέσο και στις συνθήκες ανάπτυξης

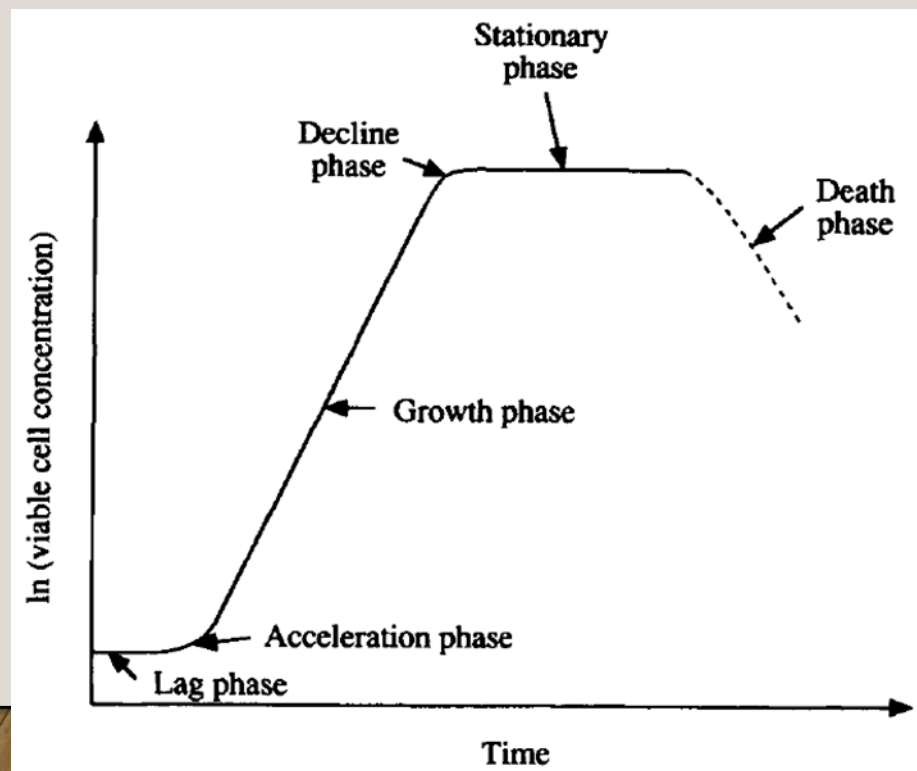
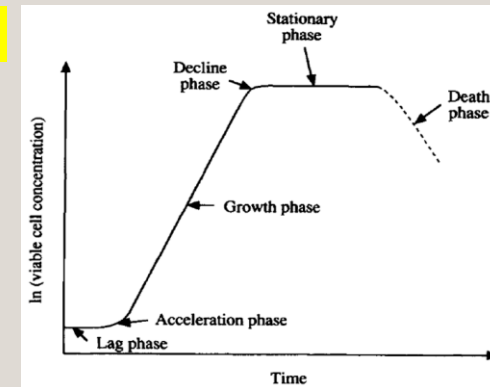


Table 11.6 Summary of batch cell growth

Phase	Description	Specific growth rate
Lag	Cells adapt to the new environment; no or very little growth	$\mu \approx 0$
Acceleration	Growth starts	$\mu < \mu_{\max}$
Growth	Growth achieves its maximum rate	$\mu \approx \mu_{\max}$
Decline	Growth slows due to nutrient exhaustion or build-up of inhibitory products	$\mu < \mu_{\max}$
Stationary	Growth ceases	$\mu = 0$
Death	Cells lose viability and lyse	$\mu < 0$

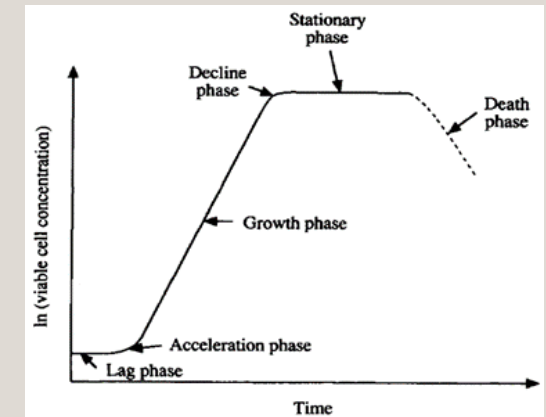
Μικροβιακή Ανάπτυξη σε Διαδικασίες Διαλείποντος έργου (Batch Growth): εκθετική φάση

- Ο ρυθμός ανάπτυξης είναι ευθέως ανάλογος της κυτταρικής συγκέντρωσης και η αναπαραγωγή των κυττάρων είναι το φυσικό προϊόν αυτής της αντίδρασης.
- Εάν η ανάπτυξη είναι εκθετική, η φάση ανάπτυξης εμφανίζεται ως ευθεία γραμμή σε ημι-λογαριθμικό διάγραμμα.
- Κατά τη φάση ανάπτυξης και αποδόμησης, ο ρυθμός ανάπτυξης κυττάρων περιγράφεται από την εξίσωση:
 - $r_X = \mu X$
 - $\mu =$ ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης με μονάδες π.χ. h^{-1}
- Ο εκθετικός ρυθμός ανάπτυξης είναι **πρώτης τάξης** και το μ είναι η **κλίση** της ευθείας του $\ln(X/X_0)$ ως προς το χρόνο.
- Σε κλειστό σύστημα όπου η ανάπτυξη είναι η μόνη διαδικασία που επηρεάζει τη συγκέντρωση των κυττάρων έχουμε:
 - $r_X = dX/dt = \mu X$



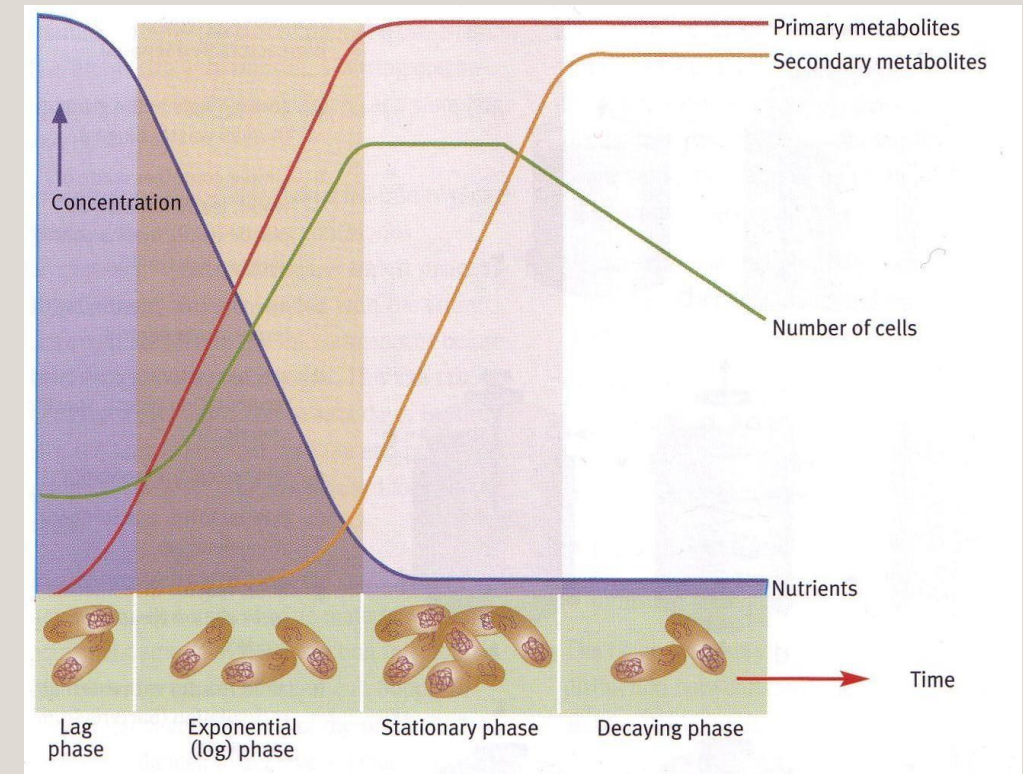
Μικροβιακή Ανάπτυξη σε Διαδικασίες Διαλείποντος έργου (Batch Growth): φάση επιβράδυνσης

- Μετά την εκθετική φάση έχουμε επιβράδυνση της αύξησης
- Είτε λόγω της εξάντλησης ενός ή περισσότερων σημαντικών θρεπτικών υλικών
- Είτε από την συσσώρευση τοξικών προϊόντων της ανάπτυξης
- Το κύτταρο αναδιοργανώνεται με στόχο να αυξήσει τις πιθανότητες επιβίωσής του σε ένα εχθρικό περιβάλλον.



Μικροβιακή Ανάπτυξη σε Διαδικασίες Διαλείποντος έργου (Batch Growth): φάση στασιμότητας

- Εδώ ο ρυθμός ανάπτυξης μηδενίζεται ή ο ρυθμός ανάπτυξης ισούται με τον ρυθμό θανάτου των κυττάρων.
- Τα κύτταρα είναι μεταβολικά ενεργά και παράγουν δευτερογενή μεταβολικά προϊόντα.
- Οι δευτερογενείς μεταβολίτες παράγονται ως αποτέλεσμα μεταβολικής απορρύθμισης.
- Τα κύτταρα καταβολίζουν τα αποθέματά τους για το σχηματισμό νέων δομικών συστατικών και μονομερών ουσιών που χρησιμοποιούνται για παραγωγή ενέργειας. (ενδογενής μεταβολισμός).



Μικροβιακή Ανάπτυξη σε Διαδικασίες Διαλείποντος έργου (Batch Growth): φάση θανάτου

- Ο ρυθμός θανάτου των κυττάρων ακολουθεί συνήθως κινητική πρώτης τάξης:
 - $\frac{dN}{dt} = -k'_d N$ ή
 - Μετά την ολοκλήρωση $\rightarrow N = N_S e^{-k'_d t}$
 - Όπου: N_S η συγκέντρωση των κυττάρων στο τέλος της φάσης στασιμότητας
 - k'_d η σταθερά για ρυθμού θανάτου πρώτης τάξης
 - Από το διάγραμμα του $\ln N$ ως προς t προκύπτει ευθεία γραμμή με κλίση $-k'_d$.

Κινητική Μικροβιακής Ανάπτυξης

- Οι ρυθμοί μετατροπής μεταβλητών που μας ενδιαφέρουν στις βιοχημικές αντιδράσεις είναι:
 - (α) ο ρυθμός ανάπτυξης βιομάζας $r_X = dX/dt$ με μονάδες π.χ. $\text{kg}/\text{m}^3/\text{h}$,
 - (β) ο ρυθμός κατανάλωσης υποστρώματος $r_S = -d[S]/dt$,
 - (γ) ο ρυθμός σχηματισμού προϊόντος $r_P = d[P]/dt$, και
 - (δ) ο ρυθμός παραγωγής θερμότητας $r_H = dH/dt$.

Και έχουμε και τους ειδικούς ρυθμούς (ανά g κυτταρικής μάζας) :

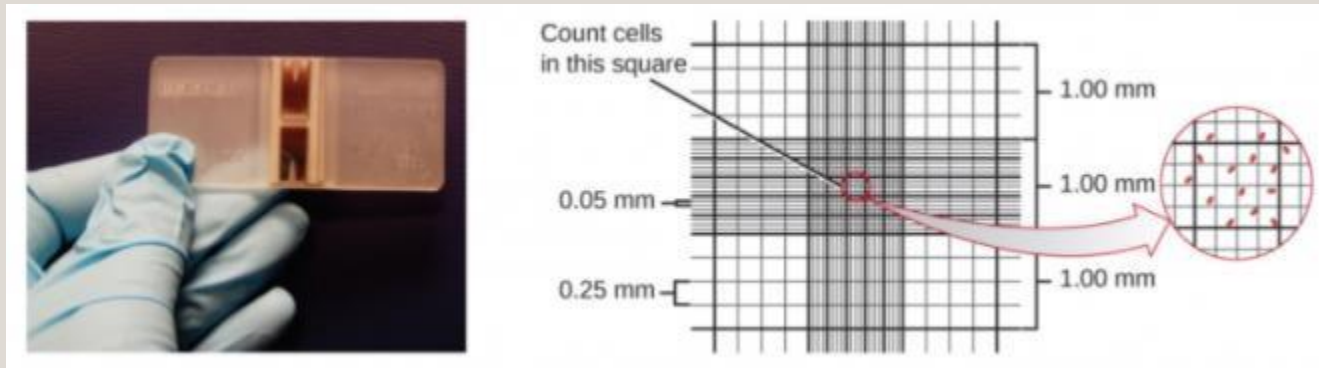
$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} \quad q_S = -\frac{1}{x} \frac{d[S]}{dt} \quad q_P = \frac{1}{x} \frac{d[P]}{dt} \quad q_H = \frac{1}{x} \frac{dH}{dt}$$

Πως μετράμε την συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας

- Υπολογισμός αριθμών κυττάρων
 - Με μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας ένα κυτταρόμετρο (βαθμονομημένη πλάκα)
 - Με αρίθμηση των μικροοργανισμών σε τρυβλία (Colony forming units)
- Υπολογισμός της μάζας των κυττάρων
 - Ξηρό βάρος
 - Θολερότητα ή οπτική πυκνότητα δειγμάτων (απορρόφηση φωτός από αιωρούμενα κύτταρα)
 - Έμμεσες μέθοδοι (εσωκυτταρικές ουσίες (DNA, RNA, ATP), υπόστρωμα για αύξηση βιομάζας ή προϊόντα του μεταβολισμού (π.χ. CO₂))

Πως μετράμε την συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας Με κυτταρόμετρο (βαθμονομημένη πλάκα)

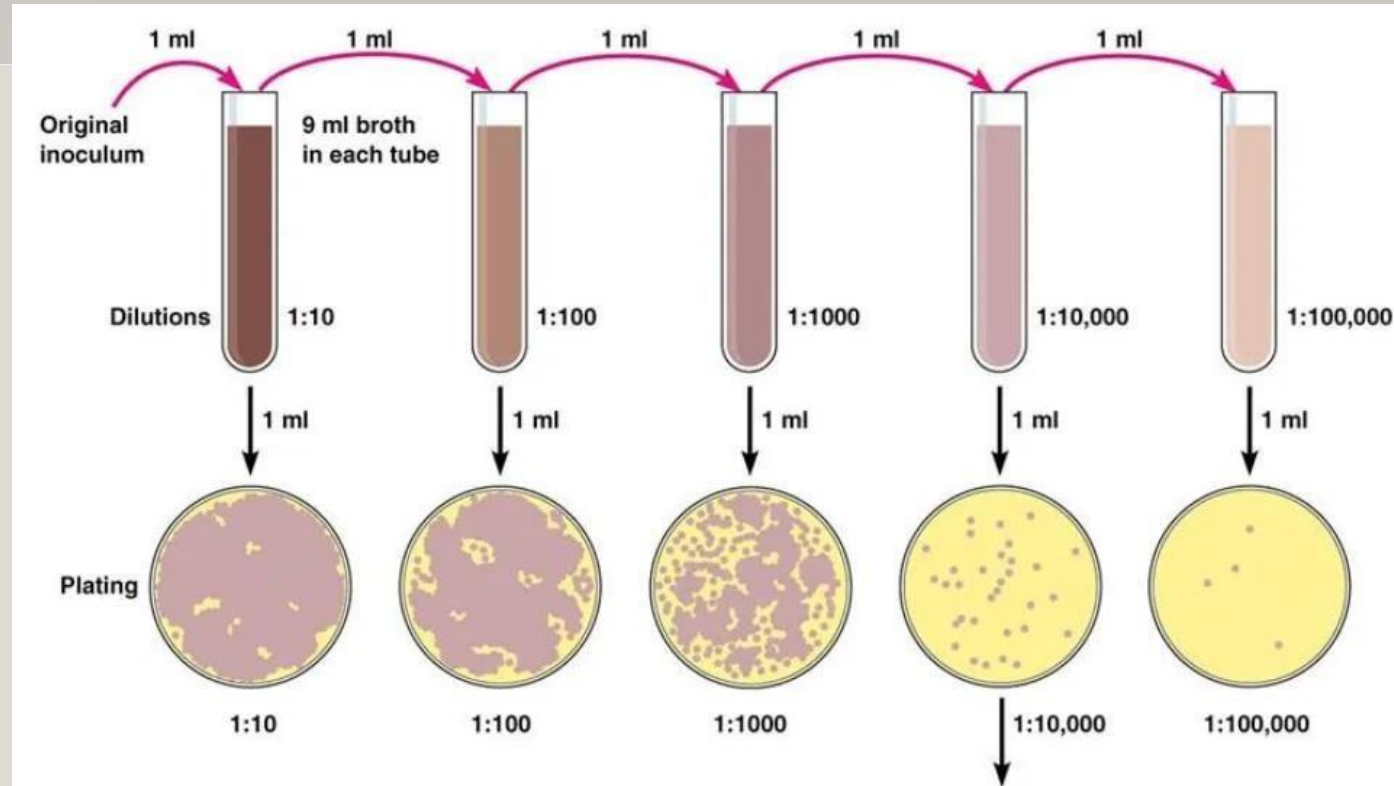
- Ένας θάλαμος Petroff-Hausser είναι μια ειδική διαφάνεια που έχει σχεδιαστεί για τη μέτρηση των βακτηριακών κυττάρων σε γνωστό όγκο δείγματος.
- Ένα πλέγμα χαράσσεται στη διαφάνεια για να διευκολύνει την ακρίβεια στην μέτρηση.
- Η εικόνα που παίρνουμε στο μικροσκόπιο αποτελείται από τετράγωνα γνωστών περιοχών.
- Η μεγεθυμένη προβολή δείχνει το τετράγωνο στο οποίο μετριοούνται τα βακτήρια (ερυθρά κύτταρα).



Η μέθοδος αυτή είναι κατάλληλη για καλλιέργειες στις οποίες τα κύτταρα δε συσσωματώνονται.

Πως μετράμε την συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας

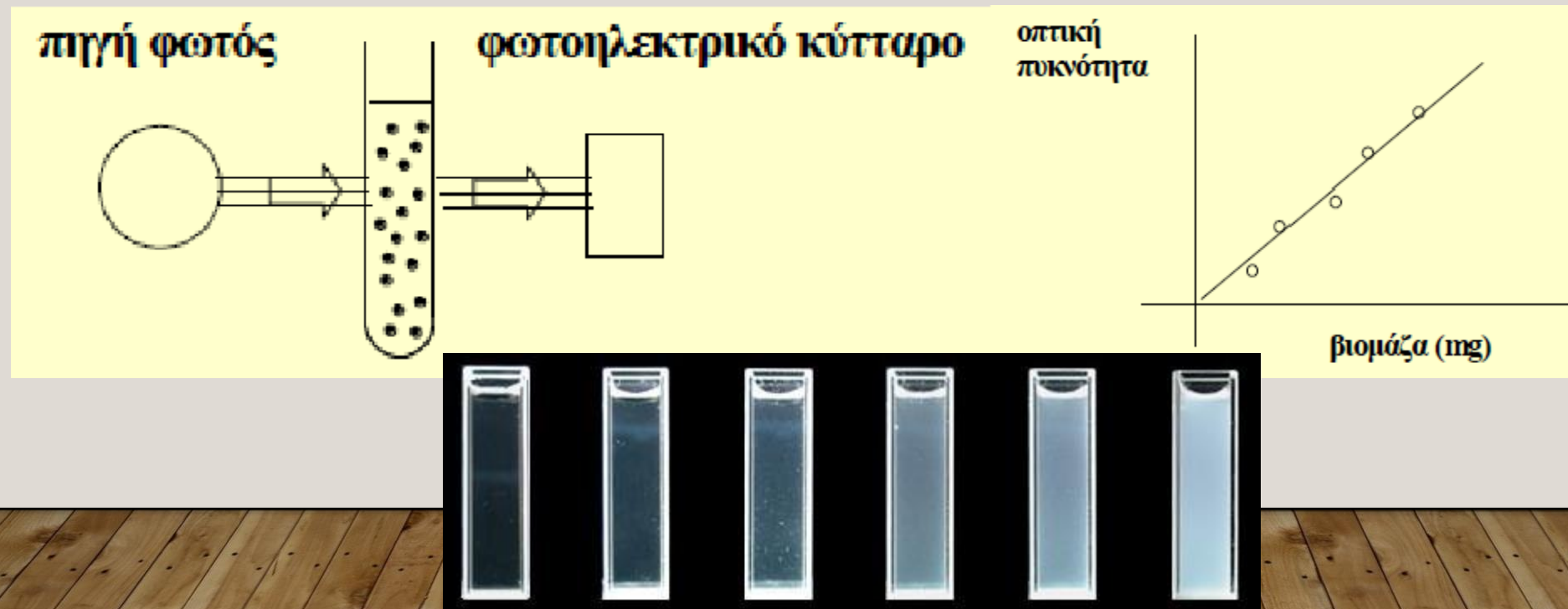
Με αρίθμηση των μικροοργανισμών σε τρυβλία Colony forming units



- Οπότε άμα έχουμε 36 αποικίες (colonies) σε 1:10000 αραιώση τότε ο αριθμός βακτηριδίων είναι $36 * 10000 = 360000$ βακτήρια / ml δείγματος

Πως μετράμε την συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας Με φασματοφωτομετρία

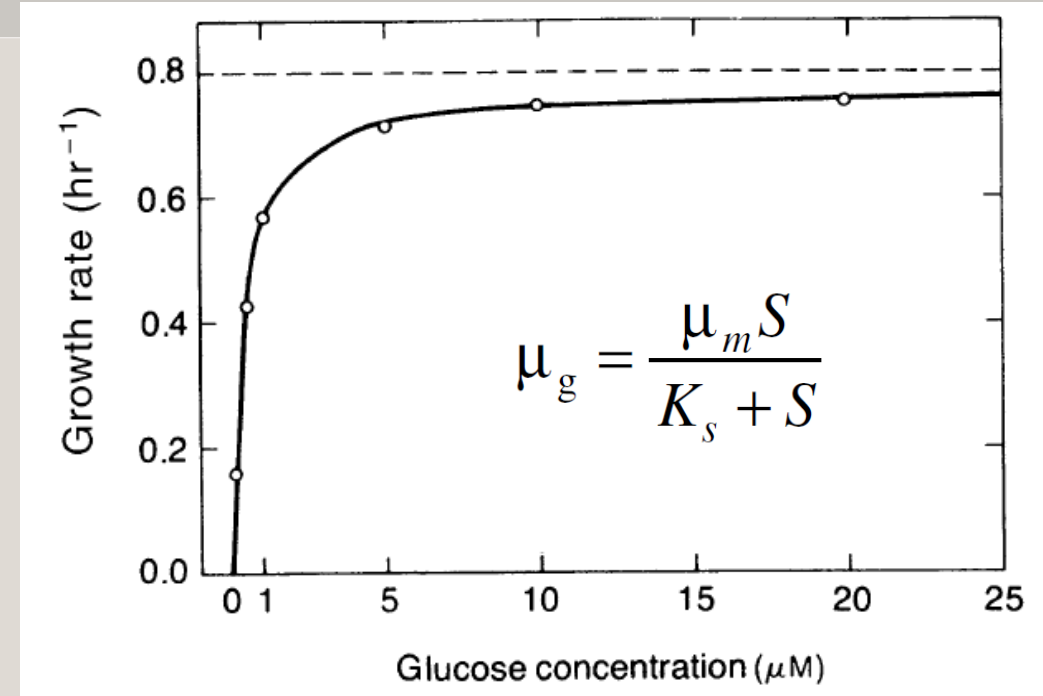
- Βασίζεται στην απορρόφηση του φωτός από τα αιωρούμενα κύτταρα που περιέχονται στο δείγμα μας.
- Η ένταση του απορροφώμενου φωτός μετριέται με τη βοήθεια φωτομέτρου



Ανάπτυξη που περιορίζεται από το υπόστρωμα

Η εξίσωση κορεσμού του Monod

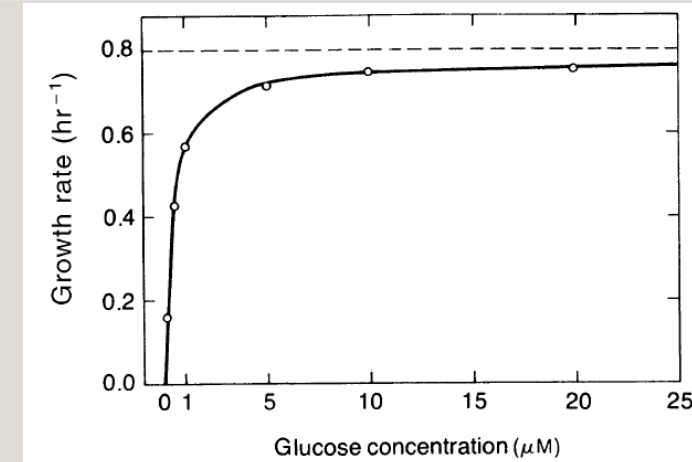
- Εξάρτηση του μ από τη συγκέντρωση του υποστρώματος
- Κινητική κορεσμού
- Παρόμοια με την κινητική Michaelis-Menten στην κινητική των ενζύμων
- Όταν έχουμε κυτταρικά συστήματα η εξίσωση που περιγράφει την κινητική κορεσμού είναι η **εξίσωση Monod**.



Ανάπτυξη που περιορίζεται από το υπόστρωμα

Η εξίσωση κορεσμού του Monod

- $\mu_{\max}$ είναι ο μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης και επιτυγχάνεται όταν $[S] \gg K_S$.
- Η σταθερά K_S είναι γνωστή ως σταθερά κορεσμού ή σταθερά ημίσειας ταχύτητας και ισούται με τη $[S]$ όταν το μ είναι ίσος με το μισό της μέγιστης τιμής του
- Δηλαδή, $K_S = [S]$ όταν $\mu = \frac{1}{2} \mu_{\max}$
- Για πολύ μικρά $[S]$ δλδ $[S] \ll K_S$, $\mu = (\mu_{\max} S / K_S)$.
- Η εξίσωση Monod είναι ημι-εμπειρική: προκύπτει από την προϋπόθεση ότι ένα ενζυμικό σύστημα που ακολουθεί κινητική Michaelis - Menten είναι υπεύθυνο για την πρόσληψη του S και ότι η ποσότητα αυτού του ενζύμου είναι αρκετά χαμηλή ώστε να καθίσταται ο ρυθμιστικός παράγοντας της ανάπτυξης.
- Δεν μπορεί να περιγράψει την κινητική όταν έχουμε παρουσία ή συσσώρευση παρεμποδιστικών παραγόντων



$$\mu_g = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$

Παραγωγή βιομάζας

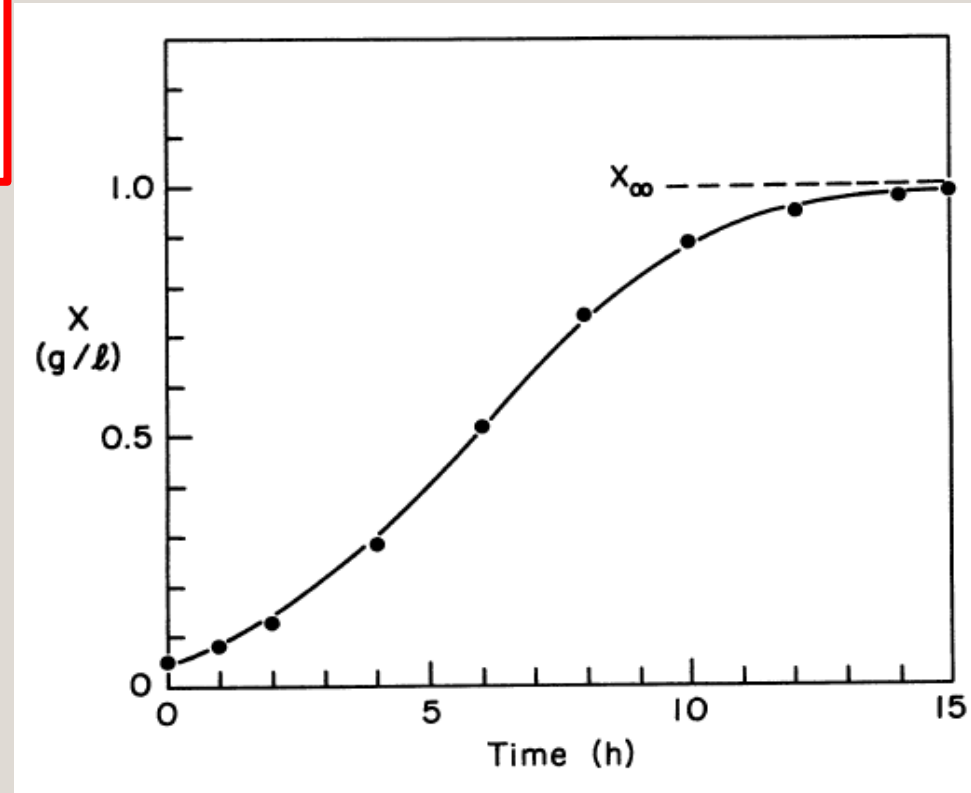
Το λογιστικό μοντέλο

$$\mu = k \left(1 - \frac{X}{X_{\infty}} \right)$$

$$\frac{dX}{dt} = kX \left(1 - \frac{X}{X_{\infty}} \right)$$

- Όπου X_{∞} η μέγιστη τιμή κυτταρικής μάζας
- k συντελεστής δυναμικού μεταφοράς
- Ολοκλήρωση της σχέσης με συνθήκες $X(0) = X_0$ μας δίνει τη λογιστική εξίσωση:

$$X = \frac{X_0 e^{kt}}{1 - \frac{X_0}{X_{\infty}} (1 - e^{kt})}$$



Παράδειγμα: Λογιστική Εξίσωση

- Παράγεται αιθανόλη από γλυκόζη με τη ζύμη *Saccharomyces cerevisiae* σε καλλιέργεια διαλείποντος έργου και λαμβάνονται τα ακόλουθα δεδομένα:

Time (h)	Glucose (S), g/L	Biomass (X), g/L	Ethanol (P), g/L
0	100	0.5	0.0
2	95	1.0	2.5
5	85	2.1	7.5
10	58	4.8	20.0
15	30	7.7	34.0
20	12	9.6	43.0
25	5	10.4	47.5
30	2	10.7	49.0

α) Να προσδιοριστούν οι συντελεστές απόδοσης $Y_{P/S}$ και $Y_{X/S}$

β) Να προσδιοριστεί ο συντελεστής δυναμικού μεταφοράς k , προσαρμόζοντας τα δεδομένα κυτταρικής μάζας στη λογιστική εξίσωση.

$$\frac{dX}{dt} = kX \left(1 - \frac{X}{X_{\infty}} \right)$$

Λύση Άσκησης

$$Y_{P/S} = \frac{-\Delta P}{\Delta S} = \frac{-(49 - 0)}{(2 - 100)} = 0.5 \frac{\text{gP}}{\text{gS}}$$

$$Y_{X/S} = \frac{-\Delta X}{\Delta S} = \frac{-(10.7 - 0.5)}{(2 - 100)} = 0.104 \frac{\text{gX}}{\text{gS}}$$

Time (h)	Glucose (S), g/L	Biomass (X), g/L	Ethanol (P), g/L
0	100	0.5	0.0
2	95	1.0	2.5
5	85	2.1	7.5
10	58	4.8	20.0
15	30	7.7	34.0
20	12	9.6	43.0
25	5	10.4	47.5
30	2	10.7	49.0

Λύση Άσκησης

- Για τον υπολογισμό του k λυνουμε την εξίσωση ως προς k χρησιμοποιώντας τα δεδομένα του πίνακα για κάθε μία χρονική στιγμή.

$$\frac{dX}{dt} = kX \left(1 - \frac{X}{X_{\infty}} \right)$$

$$k = \frac{\frac{1}{\bar{X}} \frac{\Delta X}{\Delta t}}{\left(1 - \frac{\bar{X}}{X_{\infty}} \right)}$$

Όπου $\bar{X}$ η μέση συγκέντρωση κυτταρικής μάζας για το χρόνο Δt
Και X_{∞} η μέγιστη τιμή κυτταρικής μάζας ~ 10.7 g/L εφόσον η ανάπτυξη έχει ολοκληρωθεί σε περίπου 30 ώρες

Time (h)	Glucose (S), g/L	Biomass (X), g/L	Ethanol (P), g/L
0	100	0.5	0.0
2	95	1.0	2.5
5	85	2.1	7.5
10	58	4.8	20.0
15	30	7.7	34.0
20	12	9.6	43.0
25	5	10.4	47.5
30	2	10.7	49.0

Δt (h)	$\bar{X}$ (g/L)	$\frac{1}{\bar{X}} \Delta X / \Delta t$ (h ⁻¹)	$\left(1 - \frac{\bar{X}}{X_{\infty}} \right)$	k (h ⁻¹)
2	0.75	0.333	0.931	0.36
3	1.55	0.236	0.856	0.28
5	3.45	0.156	0.681	0.23
5	6.25	0.093	0.416	0.22
5	8.65	0.044	0.200	0.22
5	10.00	0.016	0.074	0.22
5	10.55	0.0057	0.023	0.25

Η τιμή $k=0.22 \text{ h}^{-1}$ μπορεί να περιγράψει την πλειονότητα των δεδομένων



Παράδειγμα

- Κατά την ανάπτυξη ενός μύκητα σε διεργασία διαλείποντος έργου με υπόστρωμα γλυκόζη παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα δεδομένα:

Time (h)	Cell concentration (g/l)	Glucose concentration (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

A) Υπολογίστε την απόδοση της κυτταρικής μάζας.

B) Ποια η μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων που αναμένει κανείς αν χρησιμοποιηθούν 150 g /L γλυκόζης με το ίδιο εμβόλιο;

ΛΥΣΗ

$$A) \quad Y = -\frac{\Delta X}{\Delta S} = -\frac{41 - 1.25}{0.625 - 100} \cong 0.4 \text{ g cells/g substrate}$$

$$B) \quad X_{\max} = X_0 + YS_0 = 1.25 + 0.4(150) = 61.25 \text{ g cells/l}$$

$$X_{\max} = X_0 + YS_0$$

Time (h)	Cell concentration (g/l)	Glucose concentration (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

Δομή Μαθήματος

Δρ. Ανέστης Βλυσίδης

Ισοζύγια μάζας
& Στοιχειομετρία

Κινητική Ενζυμικών
αντιδράσεων

Κινητική ανάπτυξης
μικροβίων & παραγωγή
Μεταβολικών προϊόντων

Εισαγωγικό
Μάθημα

Ανάντι και κατάντι
διεργασίες σε
συστήματα
βιοδιεργασιών

Κλιμάκωση βιοδιεργασιών,
μικτές καλλιέργειες,
αντιδραστήρες ετερογενούς
ανάπτυξης

Σχεδιασμός &
Μηχανική
Βιοαντιδραστήρων

Φαινόμενα μεταφοράς
μάζας και ενέργειας σε
έναν αντιδραστήρα

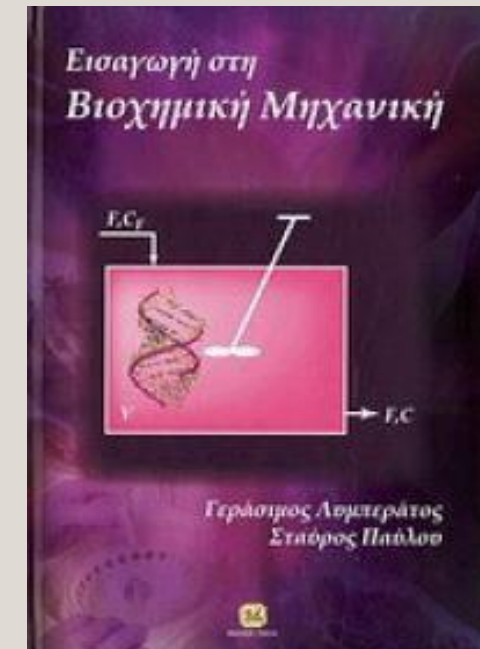


Βιβλιογραφία



Michael L. Shuler, Fikret Kargi, ΜΗΧΑΝΙΚΗ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ Βασικές Έννοιες, 2005, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις ΕΜΠ.

Λυμπεράτος Γ., Παύλου Στ., Εισαγωγή στη ΒΙΟΧΗΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ, Εκδόσεις Τζιόλα, 2011



Τι μάθαμε σήμερα

- Πως μπορούμε να εκφράσουμε το ρυθμό μιας αντίδρασης στις βιοδιεργασίες
- Υπολογισμός του ρυθμού της αντίδρασης από πειραματικά δεδομένων χρησιμοποιώντας την μέθοδο κλίσης μεσαίου σημείου
- Κινητική Μικροβιακής Ανάπτυξης σε Διαδικασίες Διαλείποντος έργου (Batch Growth)
- Πως μετράμε την συγκέντρωση της κυτταρικής μάζας
- Εξέταση Μη Δομημένων και Μη Κατανεμημένων μοντέλων
- Ανάπτυξη μοντέλων για την περιγραφή της βιομάζας
- Ανάπτυξη μοντέλων για την περιγραφή της κατανάλωσης του υποστρώματος και της παραγωγής Προϊόντος