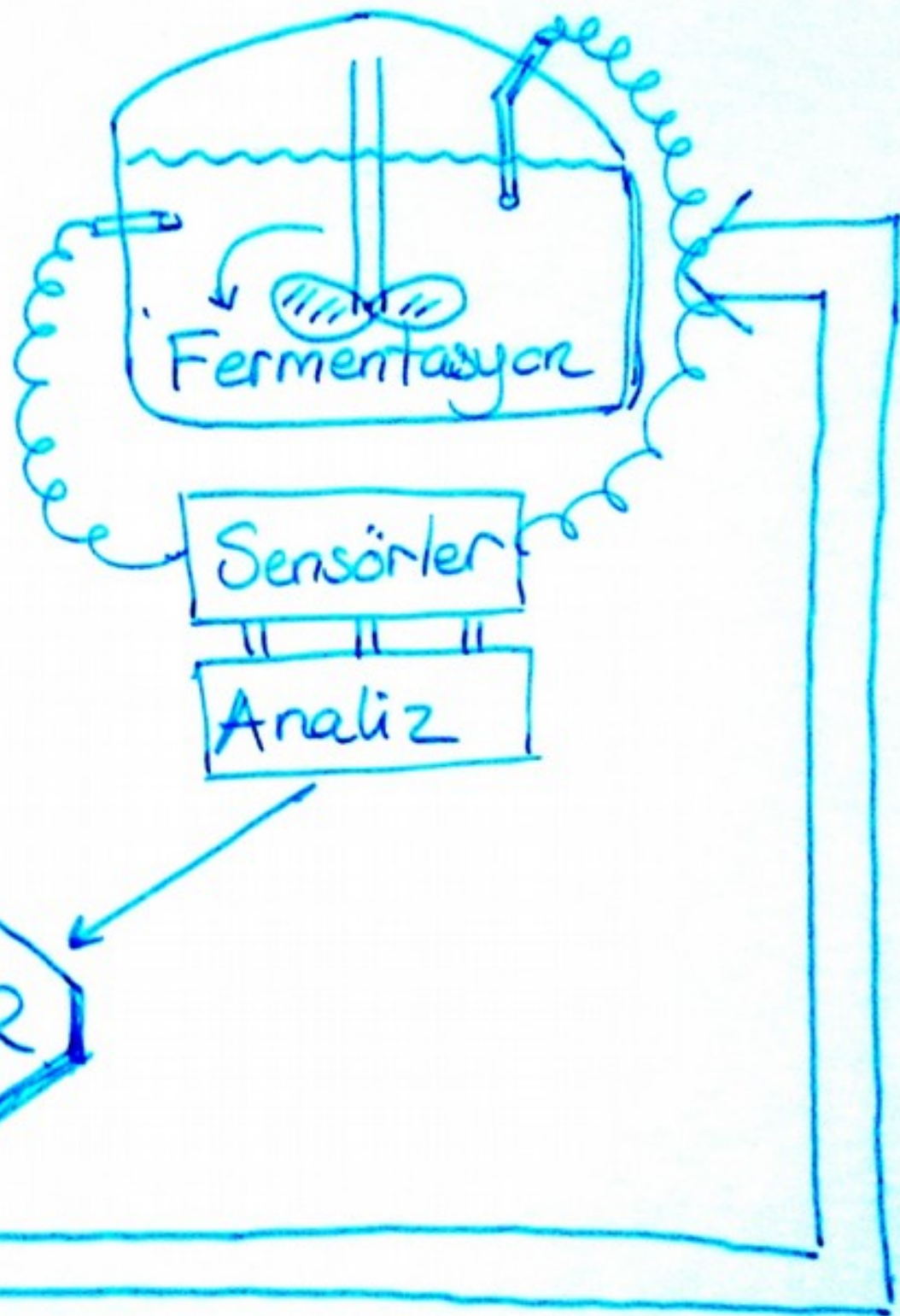


# **Mikrobiyal fabrika hücreler ve sistem biyolojisi**

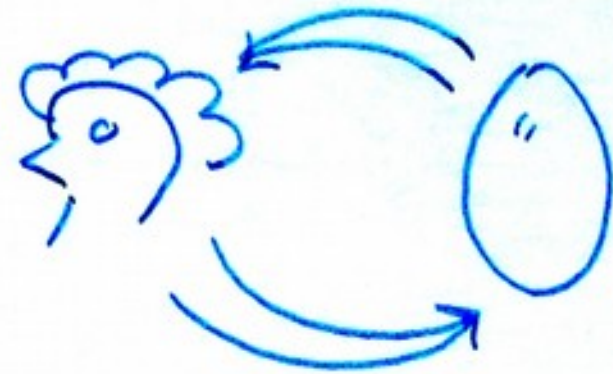
Matematik Model

Parametreler

KONTROLÖR



Lavoisier    Prensibi

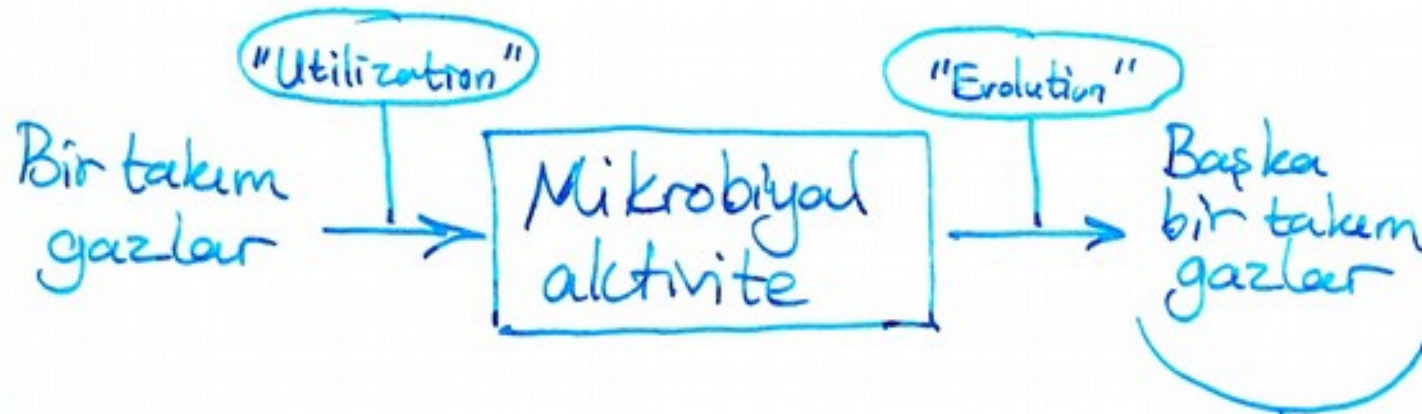


$$\frac{d(\text{element})}{dt} = E_{(\text{element})} - S_{(\text{element})}$$

S<sup>C</sup> H  
N O

Günkü,  
(Mikrobiyoloji kokulu bir iştir!)

Fermentör vent gazı analizi



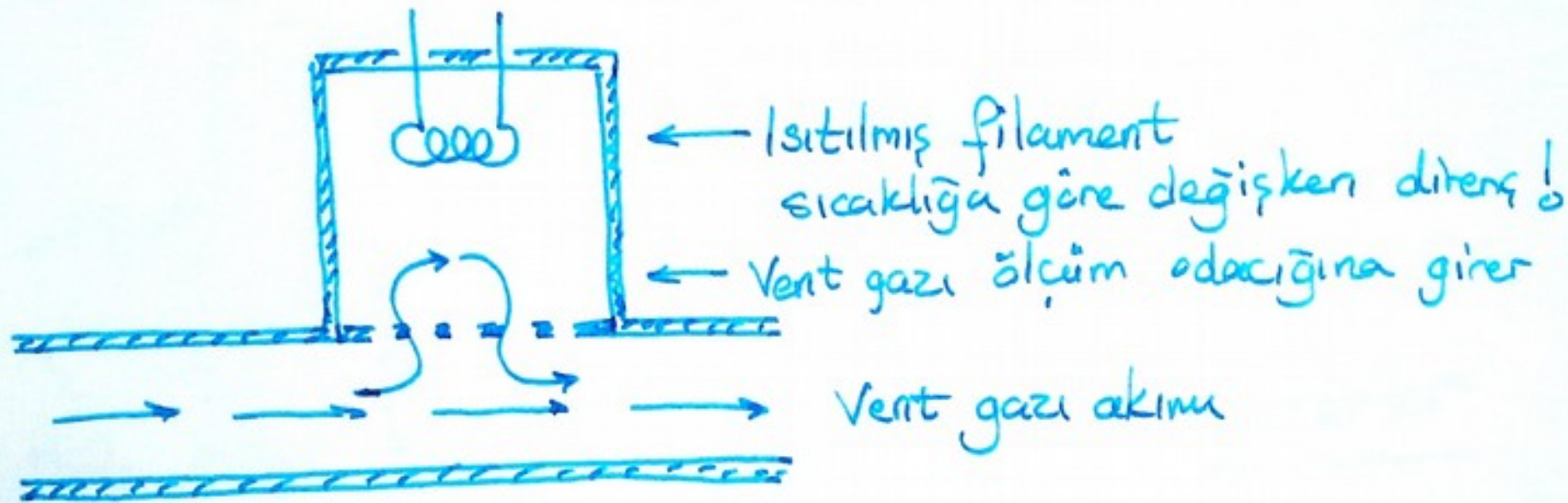
\* İyi bir modelleme ile bu gazların besiyerinde çözülmüş haldeki konsantrasyonları öngörülebilir

Ayrıca, koklamak steril operasyonu riske sokmaz :)

$O^{18}$   
 $C^{13}$   
izotoplar

$O_2$   $CO_2^{**}$   
 $H_2$   $CH_4$   
Volatil hidrokarbonlar  
(etanol, butanol, ...)

# Termal iletkenlik sensörü

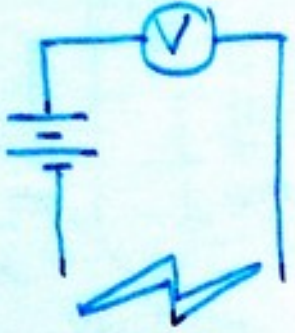


Filament ve örneklenen gaz arasında  
ISI TRANSFERİ gerçekleşir

Özgül bir yöntem değil!

CO<sub>2</sub> ölçümü için  
ÖNERİNİZ?

## Alev iyonizasyonu



$O_2$   $N_2$   $CO_2$  ?  
 $Ar$   $H_2O_2$   $NH_3$  ?  
vs  
Etanol, organik  
bileşikler ?

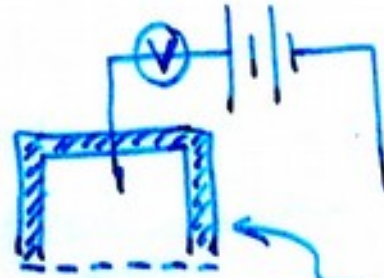
✓ Hassas, ✓ lineer yanıt  
özgülük YOK!

## Gaz kromatografisi

Ayrıştırma :)

Bir sensor ile  
taçlandırılmalı!

## Elektrokimyasal sensörler

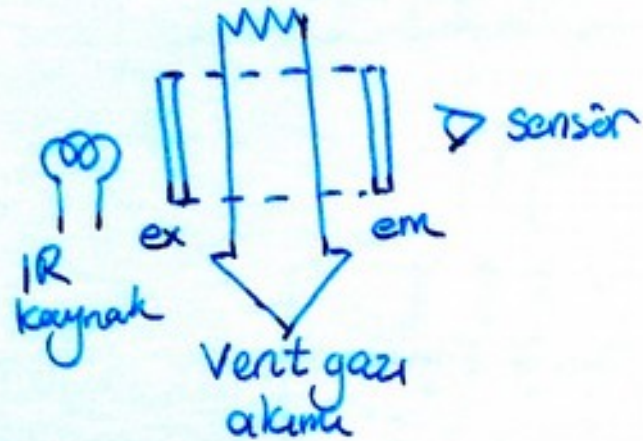


Gaza özgül  
seçici geçirgen  
membran

Belaciğa giren gaz  
redüklenir  
AKIM

"Solid state" sensörler

## IR sensör



eksitasyon ve emisyon  
dalga boyları  
nasıl ayarlanabilir?

Monokromatör nasıl?  
Ara  
(kendimi sansli hiss...)

## Paramagnetik sensörler

$O_2$  paramagnetik  
bir gaz b

$80^\circ C$  da (Curie sıcaklığı)  
paramagnetik  
özellik hemen hemen  
ortadan kalkar

Vent gazı soğuk!

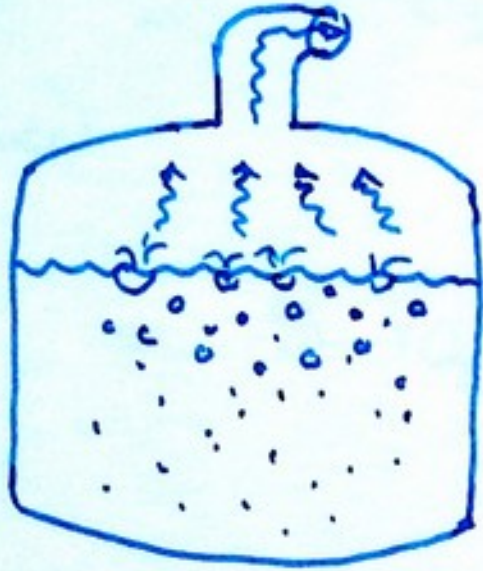
Sensöre girildiğinde  
akım yanadır...

\*\*\*

## Kütle spektrometrisi

(Gözler kalbin, ...)

Vent gazı fermentasyon buyyonunun aynasıdır!



Sıvı & gaz fazlarının iyi karıştığı modeller ( $< 100 L$ )

Alternatif modeller ( $> 100 L$ )

---

Volatil organik maddelerin sıvı fazdaki konsantrasyonlarının ön görülmesi ...



## "Respiratory Quotient" RQ

$$\text{CER} = \% V_{\text{CO}_2\text{out}} \times \text{flow out} - \% V_{\text{CO}_2\text{in}} \times \text{flow in}$$

(CO<sub>2</sub> Evolution Rate)

$$\text{OUR} = \% V_{\text{O}_2\text{in}} \times \text{flow in} - \% V_{\text{O}_2\text{out}} \times \text{flow out}$$

$$\text{RQ} = \text{CER} / \text{OUR}$$

# Verim & Verim katsayıları

$Y_{x/s}$  : kg hücre kütlesi / kg substrat  
output ↗ ↖ input

$Y_{p/s}$  : kg ürün kütlesi / kg substrat

$Y$   
↓  
Teorik

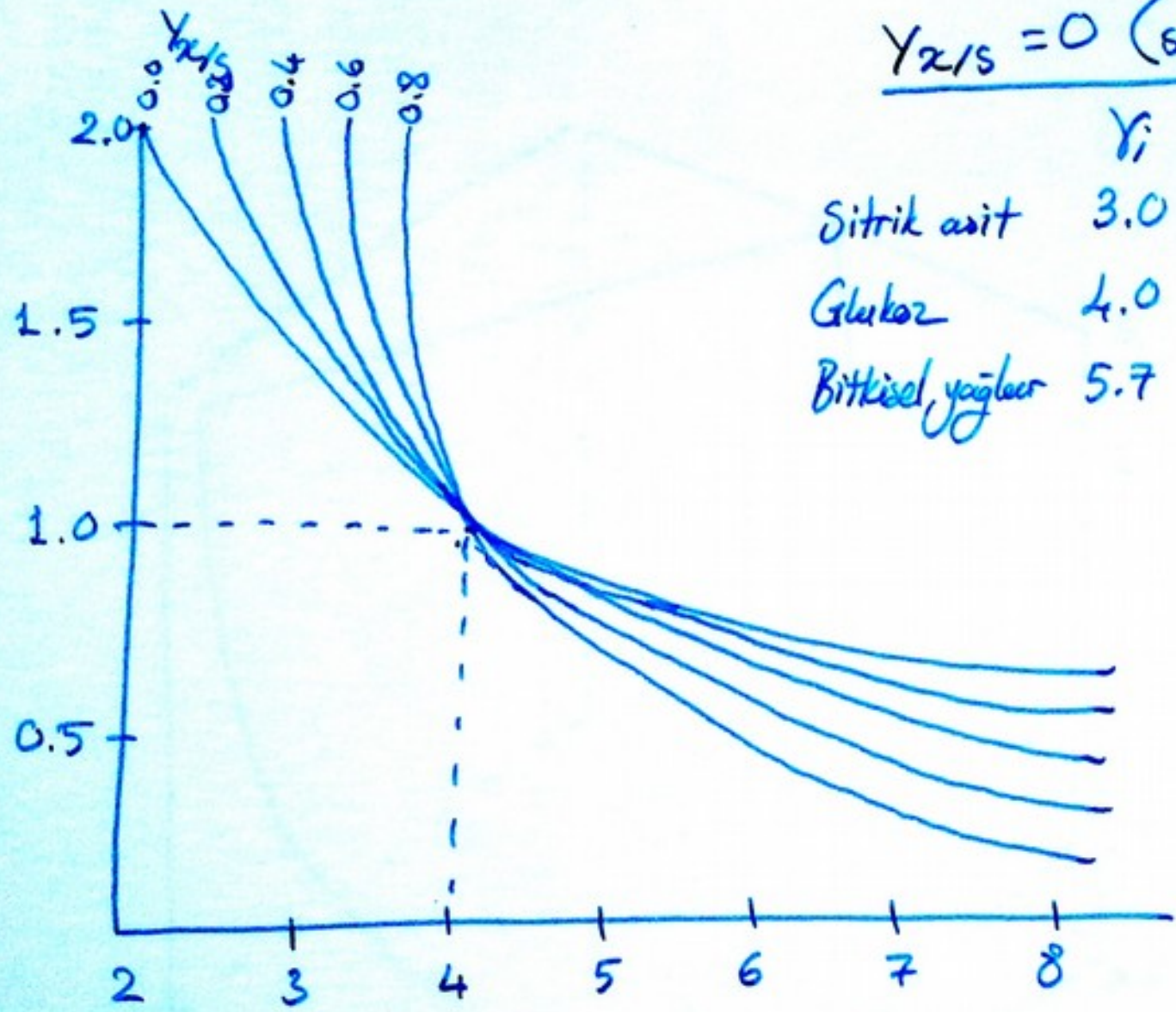
$Y'$   
↓  
Gözlenen

$RQ = Y_{CO_2/O_2}$

$Y_{x/s} = 0$  (sadece biyokütledüşürken)

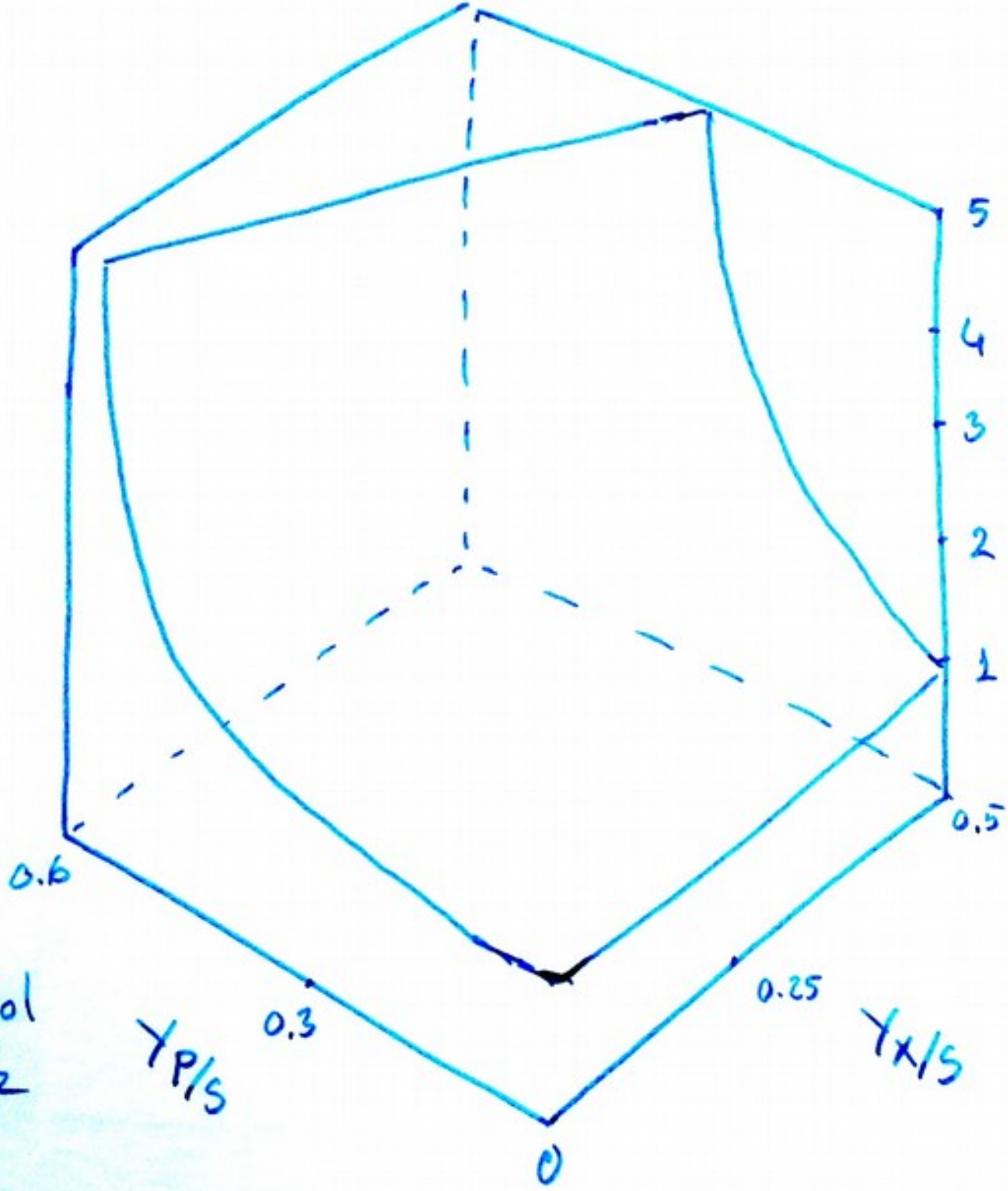
	$Y_i$	RQ
Sitrik asit	3.0	1.3
Glukoz	4.0	1.0
Bitkisel yağlar	5.7	0.7

RQ



$Y_i$

RQ



Etanol  
Glukoz

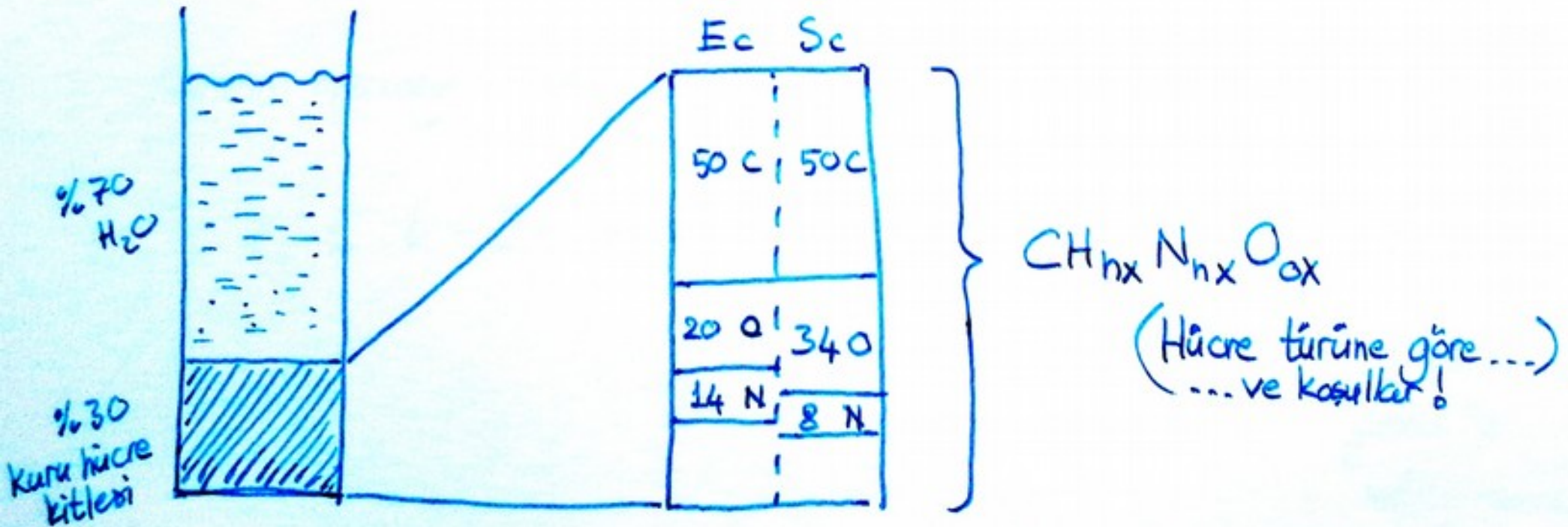
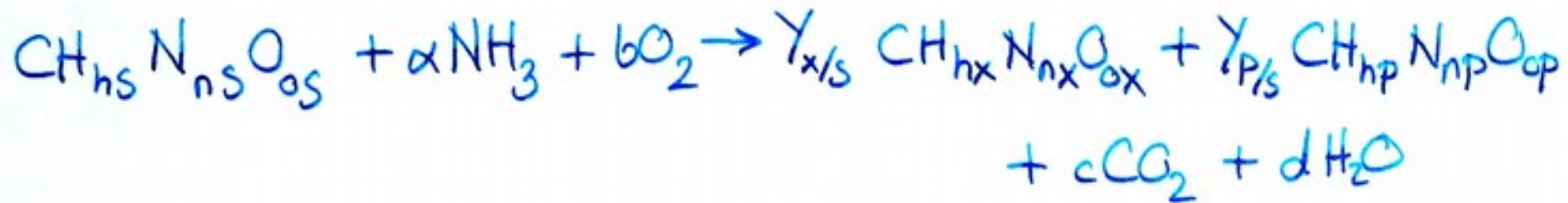
$\gamma_{P/S}$

$\gamma_{X/S}$

Biyokütle  
Glukoz

# ÜREME

Biraz Hücre + Besiyeri +  $O_2$   $\Rightarrow$  Daha çok Hücre + ÜRÜN +  $CO_2 + H_2O$



# of available  $e^-$  / # of C

## İndirgenme derecesi

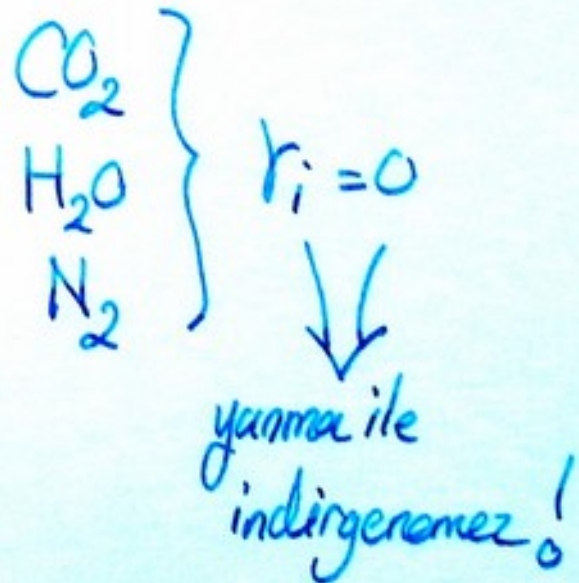
C +4	N 0
H +1	S +6
O -2	P +5



$$r_i = \frac{4a + b - 2c + 6e + 5f}{a}$$

Karbon içermeyen bileşikler için ( $a=0$ ):

$$r_i = b - 2c + 6e + 5f$$




$\gamma_i$ 

Formik asit	$\text{CH}_2\text{O}_2$	2.0
Sitrik asit	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	3.0
Pirivik asit	$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$	3.3
Asetik asit	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	4.0
Glukoz	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	4.0
Biyokütle (ort)	$\text{CH}_{1.8}\text{O}_{0.5}\text{N}_{0.2}$	4.8
Gliserol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	4.7
Bütirik asit	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	5.0
Metanol	$\text{CH}_4\text{O}$	6.0
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	6.0

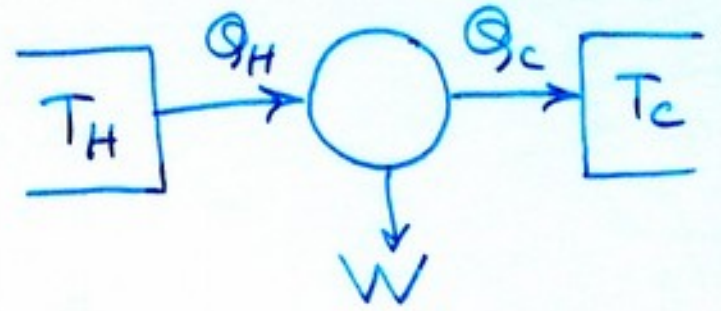
Bazı metabolitlerin indirgenme dereceleri . . .

		$Y_i$
<i>E. coli</i>	$CH_{1.83}O_{0.5}N_{0.22}P_{0.01}$	4.91
<i>A. niger</i>	$CH_{1.72}O_{0.55}N_{0.17}$	4.62
<i>S. cerevisiae</i>	$CH_{1.82}O_{0.58}N_{0.16}$	4.66
<i>P. doysogenum</i>	$CH_{1.64}O_{0.52}N_{0.16}$	4.60
<i>C. utilis</i>	$CH_{1.87}O_{0.56}N_{0.20}$	4.75

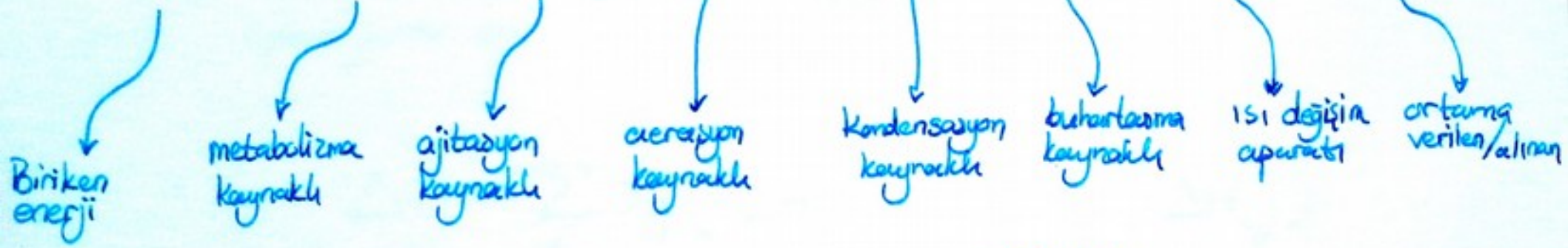

 Bu oranlar nasıl ölçülüyor?



# Kalorimetrik denge



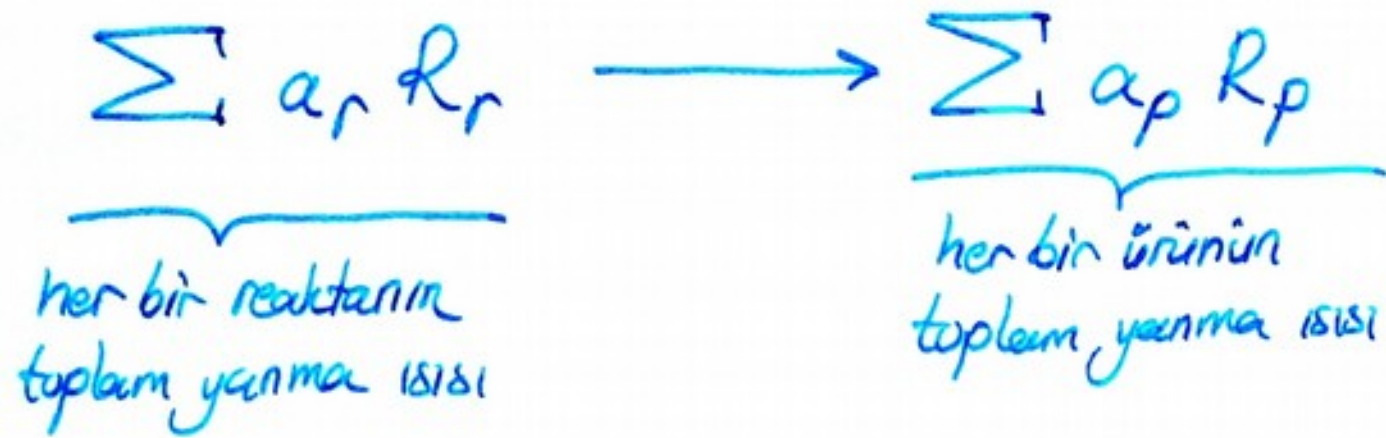
$$Q_{acc} = Q_{met} + Q_{ag} + Q_{cer} + Q_{sen} + Q_{evap} + Q_{hizer} + Q_{surr}$$



Isı oluşumunu etkileyen temel faktörler:

- 1 - Kullanılan mikroorganizma
- 2 - Karbon kaynağı
- 3 - Fermentasyon koşulları

# Isı üretimi ve stokiometri



$$\Delta H = \sum_i \gamma_{P_i} (-\Delta H_{c_i}) - \sum_j \gamma_{S_j} (-\Delta H_{c_j})$$

Bir bileşiğin aerobik koşullarda yanma ısı:

$$-\Delta H_{c_i} \approx 115 \gamma_i$$

(kJ/C-mol)

## Kültürlerin kimyasal analizi

Keskinlik - accuracy : Ölçüm sonuçlarının gerçek değere ne kadar yakın olduğunun göstergesi

Tekrarlanabilirlik - precision :  $CV_{(\%)} = \frac{\sigma}{\mu} \times 100$

→ SD

→ ortalama

Hassasiyet - Sensitivity : Saptanabilen en düşük değer

## Karbonhidratlar

\* "anthrone reagent" - trisiklik aromatik keton  
total CHO ölçümü. Mekanizma?  
620nm'de kromofor oluşumunun ölçümü

\* indolasetik asit yöntemi  
fruktosil grupları  
530nm ölçüm

\* HPLC ile refraktif indeks saptanmayan  
aminopropil kolon, 70:30 AcN:H<sub>2</sub>O

\* Test kitleleri: Glukoz, Sukroz, Gliserol, Üre, Ürik asit, Sitrat,  
 $\alpha$ -amilaz, lipaz, trigliseridler, . . . .

## Yağlar

- \* Sulfofosforanilin testi  
Pembe renkli kompleks 530 nm'de okunur.

## Azot kayrakları

- \* Kjeldahl sindirilmesi ile tüm N-kayrakları amonyaka indirgenir, Nessler reaktifi (iyodid içeren akasya şurubu) ile amonyum sülfat saptanır.
- \* Serbest ve peptidik aminasitlerin ninhidrin reaktifi ile saptanması
- \* o-phthalaldehyde ile türevlendirilen aminasitlerin HPLC ile ayrılıp 340 nm'de saptanması
- \* Coomassie mavisi, BCA, Bradford assay.

## Fosfatlar ve diğer inorganik iyonlar

- \* Malasit yeşili + amonyum molibdat yöntemi
- \* amidd + sodyum metabisülfid + amonyum molibdat yöntemi.
- \* iyon kromatografi yöntemi

## Fermentasyon metabolitlerinin birikiminin ölçülmesi

Şeker alkoller (polyol'ler)

Karboksilik asitler

Amino bileşikler

Ammonia

Peptid / Protein / Enzim

Tiyol bileşikler

Kısa zincirli yağ asitleri

Pigmentler

Logaritmik faz?  
yulan mı?

## Mikrobiyal üremenin analizi

$$\mu = \frac{dX}{X dt} = \frac{d \ln X}{dt}$$

$\mu$  : özgül üreme hızı

$X$  : populasyon  
yoğunluğuna ölçüsü

maksimum  
özgül üreme hızı

üremeyi sınırlayan  
besin maddesi konsantrasyonu

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

Satürasyon  
sabit

Buna göre



Monod:

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

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m S X}{K_s + S}$$

aynı zamanda:

$$\frac{dS}{dt} = - \frac{\mu_m S X}{Y(K_s + S)}$$

Verim sabiti  
 $Y_{X/S}$

Batch kültürde, S tükenene kadar gerçekleşen kütle dengesi

S harcandıkça X (biyokütle) artıyor



(Batch kültürde)

Biyokütlenin dengeye ulaştığı durumu:  $(X_e)$

$$\frac{dX}{dS} = -Y$$

$$X = -YS + c$$

↗ integrasyon sabiti

Herşey taptaze, yepisyeni yiken:

$$X = X_0 \quad S = S_0 \quad t = 0 \quad (\text{tabii ki...})$$

$$c = X_0 + YS_0$$

ve  $X = -YS + X_0 + YS_0$  olduğuna göre:

S tükendiğinde  
dengeye ulaşılır  $\Rightarrow$   
( $S_e = 0$ )

$$X_e = X_0 + YS_0$$

↓  
Denge durumundaki  
Biyokütle

Kemostatatta ise durum farklı :

⚠ Termodinamik olarak açık sistem\*\*

$$\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_m SX}{K_s + S}$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_r - S) - \frac{\mu_m SX}{Y(K_s + S)}$$

Eklenen Substrat konsant.

Toplam reaksiyon hacmi sabit kalacak şekilde besiyeri tahliyesi gerçekleşirken diğer yandan  $F$  hızı ile taze besiyeri ekleniyor

$D$

Dilüsyon hızı  $D = F/V$

Sistem "dinamik denge" durumuna ulaşıyor

STEADY STATE

"Steady State" durumuna ulaşmış kemostatatta,

$X_s =$  bir değer (sabit, değişmeyen),  $S_s =$  bir başka değer (değişmeyen)

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad , \quad \frac{dS}{dt} = 0$$

Ortak çözümlenince;

$$D = \frac{\mu_m S_s}{K_s + S_s}$$

$$S_s = \frac{DK_s}{\mu_m - D}$$

veee;

$$X_s = Y(S_r - S_s)$$

Dilüsyen hızı  $D$  ve dilüe edici besiyerindeki substrat konsantrasyonu  $S_r$  deneysel olarak belirlenmeli ...

## Monod dışında da kinetik fonksiyonlar önerilmiş :

- Lojistik denklem  $\mu = \mu_m - \frac{\mu_m}{K} x$  (mikrobiyal ekoloji)
- Tessier denklemi  $\mu = \mu_m (1 - e^{-S/K_s})$
- Moser denklemi  $\mu = \mu_m (1 + K_s S^{-\lambda})^{-1}$  ( $\lambda$  sabit)
- Contois denklemi  $\mu = \frac{\mu_m S}{Bx + S}$  (Bürün sabiti)
- Substrat inhibisyonu  $\mu = \frac{\mu_m S}{K_i + S + S^2/K_p}$
- Ürün inhibisyonu  $\mu = \frac{\mu_m S K_p}{K_i + K_p S + C}$

## Farklı kültür sistemleri için

$$\frac{dX}{dt} = \mu X - DX$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_r - S) - \frac{\mu X}{Y}$$

Batch

$$D=0$$

Chemostat

$$D = \text{sabit}$$

Fed-batch

$$D = \frac{F}{V_0} + F_t$$

Homojen sistemler

Non-homojen sistemler

Katı/yarı katı reaktör sistemlerinde dispersiyon hesaba katılmak!

Parciyel diferensiyasyon

Parameter estimation

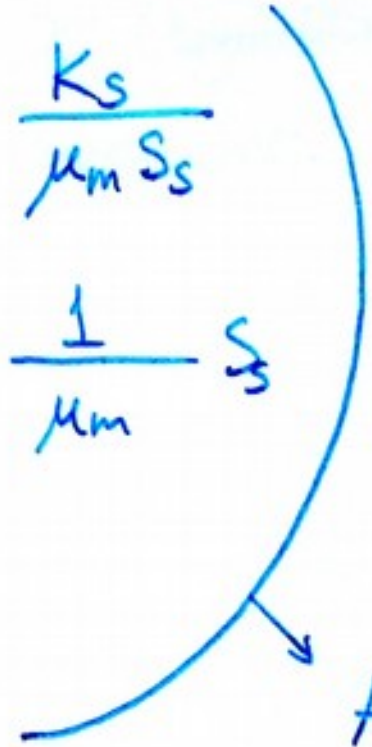
Monod üreme sabitlerinin tahmini

(steady-state kemostat koşullarında...)

$$D = \frac{\mu_m S_s}{K_s + S} \longrightarrow \frac{1}{D} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m S_s}$$

$$\frac{S_s}{D} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{1}{\mu_m} S_s$$

$$D = \mu_m - K_s \frac{D}{S_s}$$



Hepsi de  
 $y = ax + b$

$\mu_m$  ve  $K_s$ 'i tahmin etmek için



Regresyon analizi

## "Wash-out" yöntemi

Kemostat kültürde  $D$  (dilüsyon) hızı, kültürün yetişemeyeceği kadar yükseltilir. Zamana karşı  $X$  (biyokütle) ölçümleri yapılır  $\rightarrow \mu_m$  (özellik üreme hızı) hesaplanır.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X - DX$$

integre edildiğinde ( $t=0 \rightarrow t=t$  arası)

$$\ln X_t = (\mu_m - D)t + \ln X_0$$

$$\mu_m = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t} + D$$

## Simülasyon

Diferansiyel denklemlerin numerik çözümü

Dinamik parametre tahmini

## Analitik Yöntemler

Diferansiyel denklemler stabil çözümler vermediğinde . . .

Nonlinear bir denkleme yaklaşık linear bir denklem oluşturma



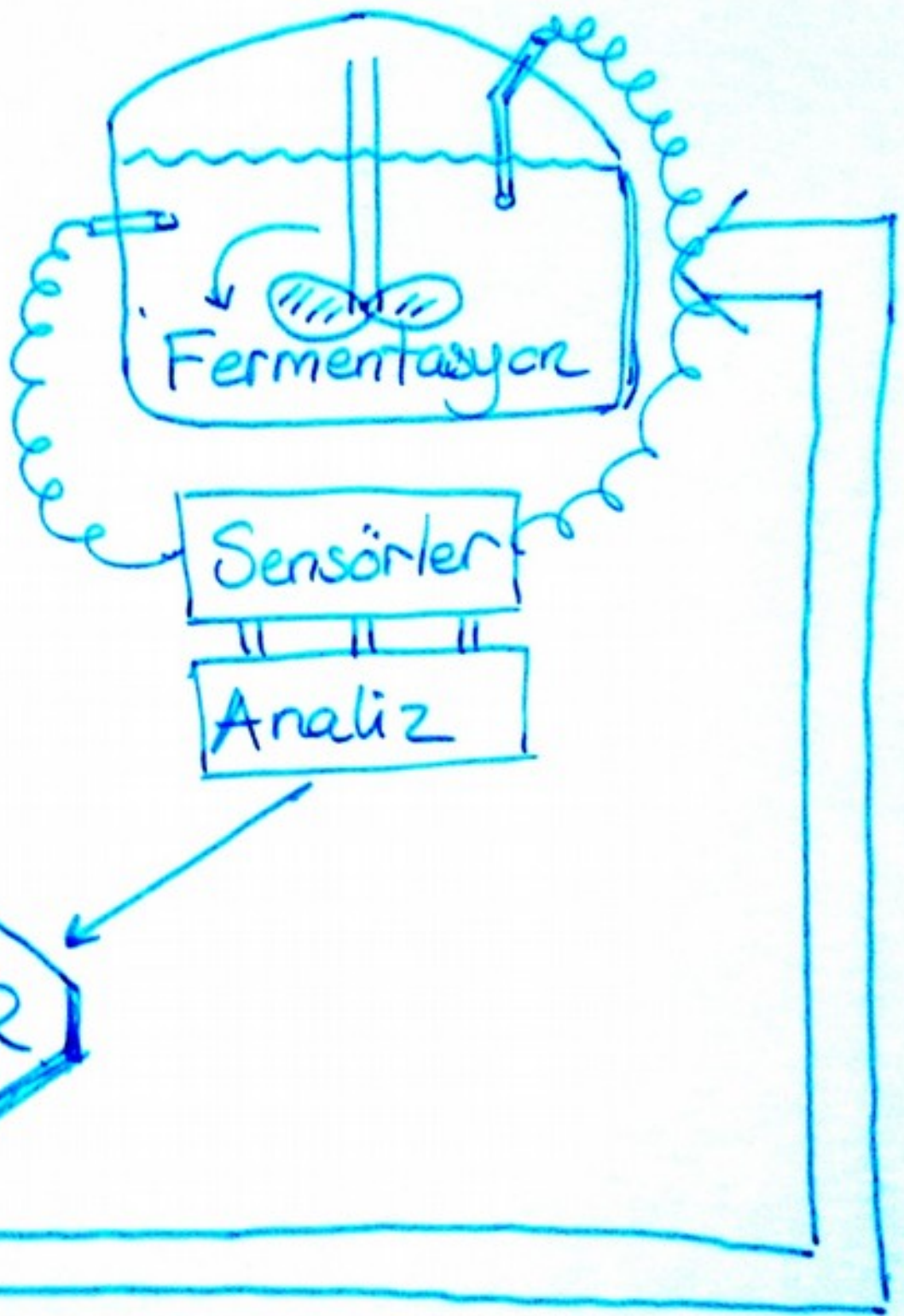
Matematik Model



Parametreler



KONTROLÖR



Fermentasyon

Sensörler

Analiz