

Jacques Monod (1910-1976) og "Monod kinetik"

Det er i år 100 år siden Jacques Monod blev født i Paris, og det er i høj grad på sin plads, at man i år ved møder rundt om i verden mindes denne fremragende videnskabsmand. I 1965 delte han Nobelprisen i fysiologi og medicin med André Lwoff og Francois Jacob

Af John Villadsen, Institut for Kemiteknik, DTU

I mit lille mindeskrift til Monod vil jeg mest beskæftige mig med hans opdagelse af Monod-kinetikken. Denne kinetik benyttes overalt - somme tider forkert - til at beskrive vækst af mikroorganismer, og den optræder allerede i indledende kurser i mikrobiel fysiologi. En gennemgang, af hvordan Monod kom frem til sin beskrivelse af væksthastigheden for mikroorganismer, kan samtidig give studerende et indblik i, hvordan fysiologiske studier blev grebet an for over 70 år siden. Man kan måske fornemme, at vor tids kostbare laboratorieudstyr ikke nødvendigvis er påkrævet for at få nøjagtige videnskabelige resultater.

Faktisk er det skriftet Monod i 1942 udgav (på basis af sin doktorafhandling fra 1941) om *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes* (figur 1) et mønster for, hvordan dygtigt udførte eksperimenter, kombineret med videnskabelig nysgerrighed for at tolke disse, kan frembringe resultater af helt overraskende almen betydning.

Således kan skriftet tjene som model for, hvad man kan håbe, at også nutidens ph.d.-studerende kan nå frem til i løbet af deres arbejde. Den originale publikation kommer dog næppe i hænderne på mange studerende. De få eksemplarer, der antikvarisk er i handlen, sælges for mange hundrede euro, og kun få biblioteker har et eksemplar.

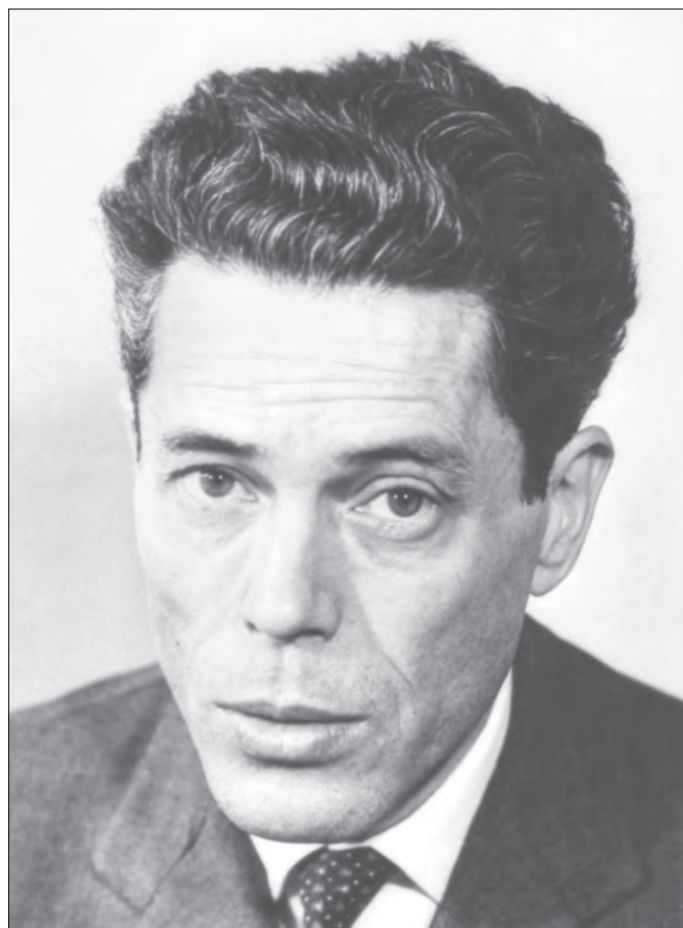
Monod havde god grund til ikke i for høj grad at publicere sin tilstedeværelse på udgivelsestidspunktet 1942. Som stabschef for Forces Francaises de l'Interieur var han jaget af Gestapo. Lykkeligvis undgik han sine forfølgere, også efter at han i sommeren 1944 var ansvarlig for den franske sabotagevirksomhed op til invasionen.

Monod kinetik

Den specifikke væksthastighed μ (eller r_x) af biomasse kan i en ustruktureret model for en mikroorganismes vækst beskrives med:

$$\mu = r_x = \frac{\mu_{\max} s}{s + K_m} \quad (\text{g celler X dannet}) (\text{g celler h})^{-1} \quad (1)$$

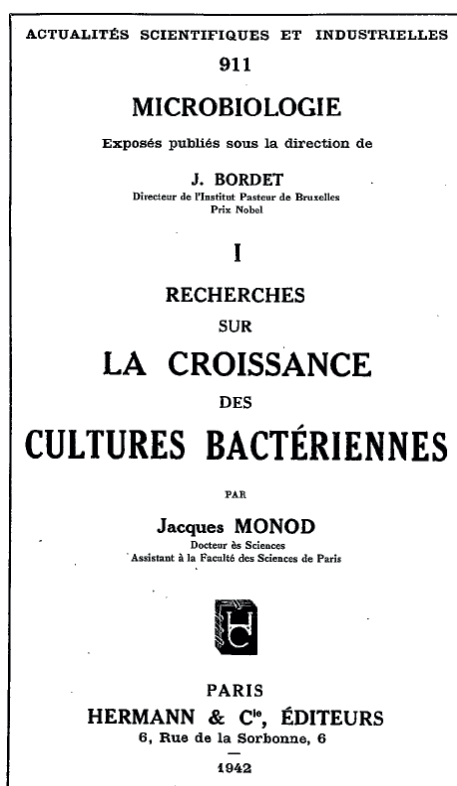
Det er denne formel, der har fået navnet "Monod kinetik". s er koncentrationen af det substrat, der er begrænsende for væksten. Konstanterne $\mu_{\max}$ og K_m er hhv. "den maksimale specifikke væksthastighed" og "Monod-konstanten". μ kan også betegnes som "aktiviteten" af biomassen, altså, hvor meget en vis mængde biomasse kan producere af ny biomasse pr. tidsenhed. I en bioreaktor finder man den volumetriske produktionshastighed, produktionen af ny biomasse pr. volumen reaktor, som produktet af μ og biomassekoncentrationen x (g (L reaktor)⁻¹). Det er (1), der



Jacques Monod (1910 - 1976): Fremragende naturvidenskabsmand - samt sabotør og naturfilosof. Foto: Scanpix.

beskriver den egentlige kinetik for bioprocessen - reaktoren er blot det kar, hvori organismene lever.

I dag fortæller lærebøgerne, at afhængigheden mellem μ og s bør findes ved stationære forsøg i en kontinuert omrørt tankreaktor (hvor μ =fortyndingshastigheden, D =forholdet mellem fødestrømmen v og reaktorvoluminet V , når føden til reaktoren ikke indeholder biomasse). Batchforsøg frarådes normalt, fordi K_m for de fleste industrielle mikroorganismer er meget lille, imellem 1 og 200 mg L⁻¹, og man derfor ikke får nok målinger til at bestemme både $\mu_{\max}$ og K_m , før alt substrat er brugt op og $\mu=0$.



Figur 1.
En helt
usædvanlig
doktor-
afhandling
(Monod
(1942)).

Med de bioreaktorer man havde i 1930'erne, kunne man, f.eks. pga. frygt for infektion, slet ikke lave kontinuerle fermenteringer. Derfor brugte Monod batchforsøg: Medium med en given koncentration s_0 af det begrænsende substrat blev podet med en smule biomasse til koncentrationen x_0 , og man målte, hvordan s aftog og x voksede som funktion af tiden.

Monod antog, at kulturen voksede eksponentielt med tiden, og han indførte betegnelsen μ_D for fordoblingsfrekvensen (h^{-1}) for biomassekoncentrationen:

$$\begin{aligned} \frac{dx}{dt} &= \mu x \text{ og } x = x_0 2^n = x_0 2^{\mu_D t} \rightarrow \frac{dx}{dt} = x \mu_D \ln 2 \\ &= \mu x, \text{ altså } \frac{d \ln x}{dt} = \mu = \mu_D \ln 2 \end{aligned} \quad (2)$$

Nu kunne μ_D bestemmes ved forsøg, hvor man på en række tidspunkter t_i beregnede:

$$\mu_D = \frac{\ln x_i - \ln x_{i-1}}{(t_i - t_{i-1}) \ln 2} = \mu / \ln 2 \quad (3)$$

Mellem t_i og t_{i-1} antoges s at være $\frac{s_i + s_{i-1}}{2}$

Figur 2, side 20 viser et ud af mange forsøg, som Monod udførte med forskellige sukre som substrat for tarmbakterien *E. coli*. Figuren er direkte reproduceret fra Monod (1942) for at vise, hvor nøjagtige forsøgene var, også for helt små s , i området $1\text{--}2 \text{ mg L}^{-1}$. Ordinataksen angiver fordoblingsfrekvensen for kulturen i enheden h^{-1} , og kurven er fremkommet ved statistisk behandling af data for 5 forsøg.

Man kan kun beundre, hvor nøjagtigt $K_M (= C_i \text{ på figuren})$ og μ_D kan bestemmes: $K_M = 4 \text{ mg L}^{-1}$ og $\mu_{\max} = 1,35 \ln 2 = 0,94 \text{ h}^{-1}$.

I referencen er figurene ledsaget af tabeller over rådata, der viser, at $\mu_{\max}$ er bestemt med en usikkerhed på højst $0,01 \text{ h}^{-1}$ i det enkelte forsøg og at afvigelsen mellem $\mu_{\max}$ (eller K_M) bestemt i forskellige forsøg højst er et par procent.

Samtidig er der tabeller, der viser, at biomasseudbyttet Y_{sx} (g biomasse/g substrat) er konstant gennem et helt forsøg, f.eks. $Y_{sx} = 0,233$ for glukose med en usikkerhed på under 2%, helt ned til $s \approx 25 \text{ mg L}^{-1}$, hvor $\ln x$ næsten er holdt op med at vokse.

Laver vi de tilsvarende forsøg i en helt moderne bioreaktor vil vi måle s som funktion af $\mu = D$ i en række stationære forsøg i en kontinuert reaktor (en "kemostat"). For at være sikker på at forholdene er stationære i hvert forsøg, må vi vente omtrent tiden $\Delta t = 5 D^{-1}$ mellem hvert forsøgspunkt. Når μ er faldet til $0,05 \text{ h}^{-1}$, skal der helst gå 100 h mellem hver aflæsning, en for studerende (og andre) nærmest uudholdelig lang tid.

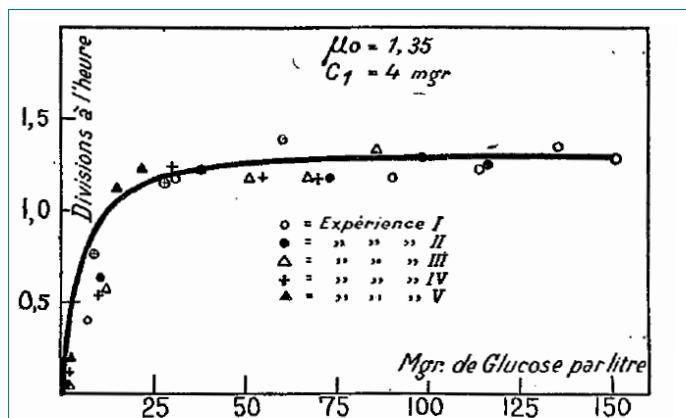
Monod kunne udføre en hel forsøgsrække som figur 2 på 3-4 timer. Ved $t=0$, hvor $s=150 \text{ mg L}^{-1}$ og $x=x_0$, er man længst til højre på figuren, og efterhånden bevæger man sig ned mod $s=0$ og $x=x_{\max} = x_0 + Y_{sx} s_0 \approx 0,233 \cdot 150 = 35 \text{ mg L}^{-1}$.

At Monod, med datidens måleudstyr, kunne måle så nøjagtigt er beundringsværdigt, men det skulle ikke være nogen kunst at efterprøve hans forsøg med nutidens online eller at-line måleudstyr (FIA for glukose, og OD (lys-absorptionsmåling) af biomassen). Man kan faktisk anbefale den ikke-stationære metode. Blot skal s_0 vælges tilstrækkelig lille. Samtidig undgår man enhver interferens forårsaget af en evt. produkt- eller substratinhibition ved bestemmelsen af de to parametre $\mu_{\max}$ og K_M .

Til slut skal det bemærkes, at Monod ikke et øjeblik var i tvivl om, at "hans" kinetik alene var en empirisk (om end oftest god) beskrivelse af biomassevækst *under betingelser, hvor kulturen er i metabolisk ligevægt*. Enhver tolkning af (1) som en mekanistisk funderet kinetik i lighed med Michaelis-Menten kinetik for enzyreaktioner savner enhver berettigelse. De tusinder af reaktio-



Biolab A/S · Sindalsvej 29
DK-8240 Risskov
Telefon 8621 2866
Telefax 8621 2301
E-mail: sales@biolab.dk
Kalibrering af pipetter.
DANAK akkreditering nr. 482.
Specialister i:
SPE * HPLC * GPC * LC * FLASH
* Spektrofotometre * TLC * CE *
Pipetter * SPR * mikrobiologisk
analyse * syntese



Figur 2. Bestemmelse af mætningskonstant (K_M) og maksimal specifik væksthastighed ($\mu_{\max}$) ved et batchforsøg. Fra Monod (1942) med original-figurateksten bibeholdt.

ner, der tilsammen giver vækst af biomassen, kan kun beskrives empirisk.

Dog udtrykker (1) en fundamental egenskab ved vækst af mikroorganismer: Ved for lav koncentration af substratet vil *enhver* kemisk reaktion forløbe med en hastighed proportional med s . Her bliver hastighedskonstanten $\mu_{\max}/K_M$ (h^{-1}), når $s \ll K_M$. Når s bliver stor, nytter en yderligere forøgelse af s ikke på μ , for cellens aktivitet er opadtil begrænset af det antal proteiner + ribosomer, der kan "stoppes ind" i cellen.

Desværre er mange nutidige forskere ikke så bevidste, som Monod var, om at (1) *kun* gælder, når cellen er i metabolisk ligevægt. Det er den både i kemostatforsøg (CSTR), i fed-batchforsøg, i hvert fald så længe μ er konstant (altså i perioden, hvor der fødes eksponentielt), samt i batchforsøg indtil s dykker væsentligt under K_M , og her vokser Δt mellem målingerne, så metabolisk ligevægt nok kan nå at indstille sig.

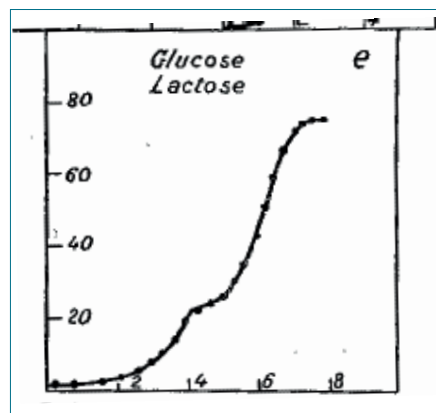
Det er helt galt at anvende (1) ved ægte transiente forsøg, f.eks. hvor en puls af glukose tilsættes en stationær kemostat, eller D pludselig ændres. Her afdækkes dybere lag i cellens reguleringssystem, og en helt anden kinetik skal benyttes til at beskrive pludselige "hændelser" til brug ved design af proceskontrol i bioreaktorer.

Det kan man f.eks. læse om i Nielsen *et al* (2003).

Monods arbejde med repression og induktion af enzymsyntese

Ovenstående er således det væsentlige i min hyldest til Jacques Monod.

Men det var naturligvis ikke pga. Monod kinetik, at han i 1965 fik "Turen til Stockholm". Hans egentlige videnskabelige bedrift er hans opdagelse, sammen med eleven Francois Jacob, af den genetiske kontrol af enzymsyntesen.



Figur 3. Optagelse af laktose efter glukose ved batchforsøg. En ud af over 20 sukre og sukkeranaloger undersøgt i Monod (1942).

Allerede i Monod (1942) ser man hans ivrige søgen efter en forklaring på diauxie, det fænomen at en mikroorganisme, der tilbydes et andet substrat sammen med et "foretrukket" substrat (ofte glukose), ikke vokser hurtigere af den grund. Når laktose tilbydes *E. coli* sammen med glukose optages laktosen slet ikke, fordi hverken transportenzymer for import af laktose eller enzymet, der kan nedbryde laktose til glukose + galaktose (β -galaktosidase), er syntetiseret i målbar mængde. Først når glukose, en *repressor* for syntese af disse enzymer, er brugt op, *induceres* syntesen af enzymerne (og der er langt bedre inducere for β -galaktosidase end laktose). Erkendelsen kom i 1950'erne i banebrydende artikler, f.eks. Jacob og Monod (1961), men grundlaget for arbejdet var lagt i de mange diauxie-forsøg, der vises i Monod (1942), for eksempel figur 3.

Man kan ikke anbefale en bedre indgang til Monods livsværk end hans selvbiograf i Nobel-pristalen, Monod (1965). Her kan ung som ældre se, hvad der driver en ægte naturvidenskabsmand.

E-mail-adresse

John Villadsen: jv@kt.dtu.dk

Kilder

Jacob, F. and Monod J. (1961). Genetic regulatory processes in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, 3, 318-356

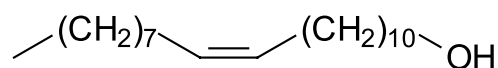
Monod, J. (1942). *Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes*, Hermann et Cie, Paris

Monod, J. (1965) From enzymatic adaption to allosteric transitions. Nobel lecture December 11, 1965 (i "Nobel lectures, Physiology and Medicine 1963-1970", Elsevier, 1972).

Nielsen, J., Villadsen J. og Lidén G. (2003). *Bioreaction Engineering Principles* 2. udgave, Kluwer Academic/Plenum Publishers. 3. udgave (2011), Springer Verlag.

Nyt om...

... Blomster narrer hvepse



(Z)-ICOS-11-EN-1-OL

Ca. en tredjedel af verdens orkideer belønner ikke deres bestøvere med nektar, de er derfor umiddelbart mindre

attraktive at besøge. En orkide *Dendrobium sinense* hjemmehørende på den kinesiske ø Hainan har fundet på noget andet. Den producerer (Z)-icos-11-en-1-ol, der er et advarselspheromon for den asiatiske bi *Apis cerana* mod hvepse, som fanger bierne og fodrer deres larver med dem. Når hvepsene lugter blomsterne, tror de, det er bier og farer på dem, hvorved de bestøver dem.

Carl Th.

Orchid Mimics Honey Bee Alarm Pheromone in Order to Attract Hornets for Pollination, *Current Biology*, 19, 2009 side 1368.