

А.В.Комиссаров, А.К.Никифоров, С.Н.Задохин, С.А.Еремин, О.А.Волох, Ю.А.Алешина

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КИНЕТИКИ НАКОПЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ В ХОДЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAЕ* 569В ИНАБА С ЛИМИТАЦИЕЙ ПО УГЛЕРОДНОМУ СУБСТРАТУ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

На основе анализа экспериментальных данных по накоплению биомассы *Vibrio cholerae* 569В Инаба и антигенов, скоростям их роста и выделения, утилизации глюкозы предложена математическая модель кинетики процесса микробиологического синтеза О-антигена и холерного токсина в ходе периодического глубинного культивирования *V. cholerae* 569В Инаба с лимитацией по углеродному субстрату. С помощью программы Mathcad 15.0 вычислены значения коэффициентов дифференциальных уравнений, входящих в математическую модель. В результате сопоставления расчетных и экспериментальных данных установлено, что относительная ошибка определения концентраций синтезируемых веществ, глюкозы и холерного вибриона составляет от 5 до 20 %. Предложенная модель позволяет определять максимальный выход целевых продуктов и уточнять параметры ведения процесса культивирования при различных начальных условиях.

Ключевые слова: О-антиген и токсин холерного вибриона, периодическое глубинное культивирование *Vibrio cholerae* 569 Инаба, математическая модель, кинетика.

A.V.Komissarov, A.K.Nikiforov, S.N.Zadokhin, S.A.Eremin, O.A.Volokh, Yu.A.Aleshina

Mathematical Model of Kinetics of Antigens Accumulation in the Process of Periodical Submerged Cultivation of *Vibrio cholerae* 569B Inaba with Limitation as Regards Carbonic Substrate

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Presented is mathematical model of kinetics of the process of O-antigen and cholera toxin synthesis during periodical submerged cultivation of *V. cholerae* 569B Inaba with limitation as regards carbonic substrate. The proposed model is based upon analysis of experimental data on *V. cholerae* 569B Inaba biomass and antigens accumulation, rate of growth and antigens release, and glucose utilization. Using Mathcad 15.0 software calculated are coefficients of differential equations entering into the mathematical model. Comparison of predicted and experimental data demonstrates that relative error of determination of concentrations of the synthesized substances, glucose and cholera vibrio is between 5 and 20 %. The proposed model permits to determine maximum output of final products and specify the parameters of cultivation process performance at different initial conditions.

Key words: O-antigen and cholera toxin, periodical submerged cultivation of *Vibrio cholerae* 569 Inaba, mathematical model, kinetics.

Нами, в ходе проведения предыдущих исследований [2], была разработана и проверена на адекватность математическая модель кинетики накопления О-антигена, роста холерного вибриона и потребления глюкозы в ходе периодического глубинного культивирования *V. cholerae* М-41 Огава и создана программа для ЭВМ, позволяющая рассчитывать кинетические параметры системы дифференциальных уравнений, описывающих данные процессы, и определять максимальный выход О-антигена при различных начальных условиях [3].

Одними из основных компонентов вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, наряду с О-антигеном *V. cholerae* М-41 Огава, являются холероген-анатоксин и О-антиген *V. cholerae* 569В Инаба. Поэтому исследования, направленные на разработку математической модели накопления токсина и О-антигена в ходе периодического глубинного культивирования *V. cholerae* 569 Инаба, имеют под собой определенную практическую базу и являются актуальными.

Материалы и методы

При выполнении работы использовали производственный штамм *V. cholerae* 569В Инаба – продуцент токсина и О-антигена (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), который выращивали при 37 °С в биореакторе на среде из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования. Через 10 ч выращивание прекращали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Расчеты коэффициентов дифференциальных уравнений осуществляли с использованием программы Mathcad 15.0.

Результаты и обсуждение

Математическая модель кинетики периодического процесса глубинного культивирования микроорганизмов формулируется, как правило, исходя из условий идеального смешения в биореакторе. Это означает отсутствие различий по рабочему объему

Таблица 1

Данные по накоплению биомассы, антигенов и утилизации глюкозы

Концентрация в среде, г/л	Время от начала ферментации, ч										
	$t_1=0$	$t_2=1$	$t_3=2$	$t_4=3$	$t_5=4$	$t_6=5$	$t_7=6$	$t_8=7$	$t_9=8$	$t_{10}=9$	$t_{11}=10$
Биомасса (X)	0,13	0,13	0,8	0,98	1,78	4,14	8,9	11,86	16,32	17,8	17,8
Глюкоза (S)	0	22	21	20	18	16	14	12	8	4	0
О-антиген (P_1)	0	0	0	0,032	0,042	0,084	0,168	0,336	0,504	0,672	0,672
Токсин (P_2)	0	0	0	0,014	0,02	0,04	0,081	0,162	0,283	0,324	0,324

аппарата в концентрациях субстратов, продуктов метаболизма, биомассы микроорганизмов, рН и температуры [1].

Основными лимитирующими факторами процесса аэробного культивирования микроорганизмов, к которым относится и выращивание *V. cholerae* 569В Инаба, являются количество растворенного кислорода и концентрация углеродного субстрата. Нами рассмотрен вариант, когда растворенный кислород находится в избытке, и удельная скорость роста холерного вибриона определяется содержанием в питательной среде глюкозы.

С целью выбора уравнения, описывающего скорость роста *V. cholerae* 569В Инаба при его периодическом глубинном культивировании, были рассмотрены данные по накоплению биомассы, токсина и О-антигена, скоростям их роста и выделения, утилизации глюкозы. Анализ данных, представленных в табл. 1, 2, показывает, что накопление биомассы и выделение продукта метаболизма осуществляется пропорционально потребленному субстрату. Скорость роста биомассы и выделения токсина достигает максимума к 9 ч культивирования, а О-антигена к 8 ч, в дальнейшем происходит их уменьшение. Таким образом, можно сделать вывод, что рост холерного вибриона зависит не только от концентрации субстрата, но и от концентрации продуктов метаболизма, причем их накопление снижает скорость роста микроорганизмов.

Наиболее распространенным уравнением, учитывающим влияние субстрата и продуктов на скорость роста биомассы, является уравнение Моно-Иерусалимского [1]:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{\left(1 + \frac{P}{K_{is}}\right)}. \quad (1)$$

Однако классическое уравнение Моно-Иерусалимского учитывает влияние только одного продукта

биосинтеза. Основываясь на том, что в рассматриваемом случае имеются два продукта, нами предложена следующая модификация уравнения:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{\left(1 + \frac{P_1 + P_2}{K_{is}}\right)}, \quad (2)$$

где μ_{\max} – удельная максимальная скорость роста микроорганизмов, $ч^{-1}$; S_L – текущая концентрация растворенной глюкозы, г/л; K_S и K_{is} – кинетические константы, г/л; P_1 – концентрация О-антигена, г/л; P_2 – концентрация токсина, г/л.

Согласно экспериментальным данным, синтез О-антигена и токсина начинается примерно через 3 ч, скорости их накопления ингибируются избытком биомассы и зависит от концентрации глюкозы в процессе производства. Таким образом, удельные скорости производства токсина и О-антигена можно выразить в виде двух систем дифференциальных уравнений:

$$\frac{dP_1}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P1\max} \frac{X^2}{(K_{P1}S + X)} - K_{ip1} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3 \end{cases} \quad (3)$$

$$\frac{dP_2}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P2\max} \frac{X^2}{(K_{P2}S + X)} - K_{ip2} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3. \end{cases}$$

При этом в уравнениях изменения концентраций продуктов во времени выражения

$$q_{P1\max} \frac{X^2}{(K_{P1}S + X)} \text{ и } q_{P2\max} \frac{X^2}{(K_{P2}S + X)}$$

отвечают за зависимость кинетики накопления антигенов от концентрации холерного вибриона и глюкозы, а $K_{ip1} \cdot X^2$ и $K_{ip2} \cdot X^2$ – за ингибирование производства

Таблица 2

Данные по скорости роста биомассы и выделения антигенов

Удельная скорость, $ч^{-1}$	Интервалы времени, ч									
	t_2-t_1	t_3-t_2	t_4-t_3	t_5-t_4	t_6-t_5	t_7-t_6	t_8-t_7	t_9-t_8	$t_{10}-t_9$	$t_{11}-t_{10}$
$\mu = \Delta X / X \Delta t$	0	0,8	0,202	0,58	0,807	0,73	0,285	0,316	0,09	0
$q_{P1} = \Delta P_1 / X \Delta t$	0	0	0,36	0,007	0,014	0,013	0,017	0,005	0,001	0
$q_{P2} = \Delta P_2 / X \Delta t$	0	0	0,016	0,004	0,007	0,006	0,008	0,009	0,002	0

избытком биомассы.

Скорость потребления глюкозы клетками представлена зависимостью:

$$q_s = \frac{\mu \cdot X}{Y_{XS}}, \quad (4)$$

где Y_{XS} – расходный коэффициент, г/г.

Следовательно, модель кинетики процесса состоит из дифференциальных уравнений, учитывающих изменение концентрации биомассы, концентрации глюкозы в питательной среде и продукта синтеза (антигенов) во времени. Система уравнений представлена следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \\ \frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X \\ \frac{dP_1}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P1max} \frac{X^2}{(K_{P1}S + X)} - K_{ip1} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3 \end{cases} \\ \frac{dP_2}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P2max} \frac{X^2}{(K_{P2}S + X)} - K_{ip2} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3, \end{cases} \end{cases} \quad (5)$$

где $K_{p1}, K_{ip1}, K_{p2}, K_{ip2}$ – кинетические константы, г/л; q_s – скорость потребления глюкозы клетками, $ч^{-1}$; q_{P1max}, q_{P2max} – удельная максимальная скорость образования О-антигена и токсина соответственно, $ч^{-1}$; X – концентрация биомассы, г/л.

В системе из 3 дифференциальных уравнений (5) для первой стадии процесса можно исключить уравнения, описывающие кинетику накопления токсина и О-антигена, так как отсутствует их синтез.

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \\ \frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X. \end{cases} \quad (6)$$

Также можно предположить, что удельная скорость роста биомассы будет выражаться уравнением Моно:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S_L}{K_S + S_L}. \quad (7)$$

Для определения значения коэффициента K_S был произведен расчет системы дифференциальных уравнений (6). В качестве начальных условий послужили концентрации биомассы и глюкозы: $X_0=0,13$ г/л, $S_0=22,0$ г/л.

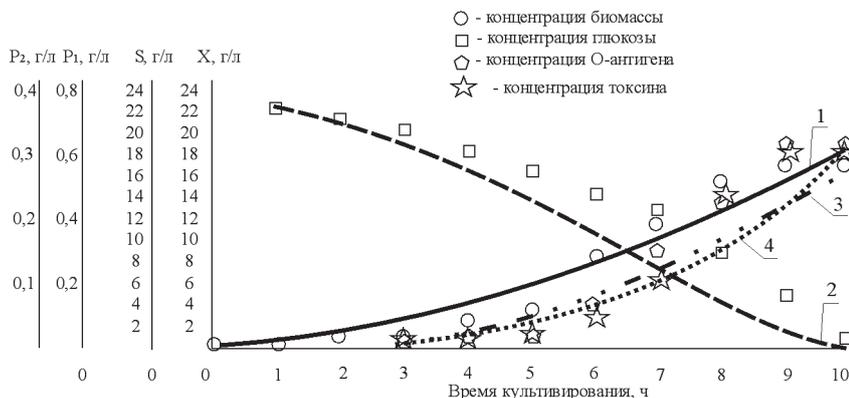
На основе анализа экспериментальных данных и с использованием разработанного программного обеспечения в среде Mathcad 15.0 были получены значения максимальной удельной скорости роста $\mu_{max}=0,99$ $ч^{-1}$, параметра $Y_{XS}=0,824$ г/г и коэффициента $K_S=0,5$ г/л.

Математическая модель для второй стадии процесса (после 3 ч) представлена тремя дифференциальными уравнениями (5), а скорость роста описывается выражением (2).

В качестве начальных условий послужили конечные концентрации биомассы и глюкозы на первой стадии, а также $P_{10}=0,032$ г/л, $P_{20}=0,014$ г/л. Для определения значений коэффициентов $K_{is}, q_{P1max}, q_{P2max}, K_{p1}, K_{ip1}, K_{p2}, K_{ip2}$ с использованием разработанного программного обеспечения в среде Mathcad 15.0 был произведен расчет системы дифференциальных уравнений (5) и были получены следующие значения: $K_{p1}=1,7$ г/л, $K_{p2}=2,2$ г/л, $K_{ip1}=0,001$ г/л, $K_{ip2}=0,001$ г/л, $K_{is}=0,122$, $q_{P1max}=0,007$ $ч^{-1}$ и $q_{P2max}=0,005$ $ч^{-1}$.

Результаты моделирования процесса представлены на рисунке.

Был произведен анализ отклонений расчетных значений от экспериментальных. Максимальная относительная ошибка концентраций составила: 5 % для биомассы, 20 % для глюкозы и 15 % для О-антигена и токсина, что является приемлемыми величинами для трудно прогнозируемых биотехнологических процессов. На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что предложенная математическая модель приемлема для описания процесса биосинтеза токсина и О-антигена в ходе периодического глутинного культивирования *V. cholerae* 569В Инаба.



Сопоставление экспериментальных значений и данных, полученных в ходе моделирования: 1 – кривая роста холерного вибриона; 2 – динамика потребления глюкозы; 3 – динамика накопления О-антигена; 4 – динамика накопления токсина (расчитанные значения)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС; 2004. 296 с.
2. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.П., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А. Математическая модель кинетики накопления О-антигена в ходе периодического глубинного культивирования *Vibrio cholerae* М-41 Огава с лимитацией по углеродному субстрату. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:91–3.
3. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.П., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А. Программа для расчета концентрации и скорости роста микроорганизмов и продуктов их биосинтеза в зависимости от концентрации субстрата. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ 2012614773 РФ, опубл. 20.09.12 г. Бюл. № 3(80).

References

1. Biryukov V.V. [The Bases of Industrial Biotechnology]. M.: KolosS; 2004. 296 p.
2. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Zadokhin S.N., Eremin S.A., Volokh O.A., Aleshina Yu.A. [Mathematical model of kinetics of O-antigen accumulation in the process of periodic submerged cultivation of *Vibrio chol-*

erae M-41 Ogawa with limitation on carbon substrate]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:91–3.

3. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Zadokhin S.N., Eremin S.A., Volokh O.A., Aleshina Yu.A. [Program for calculation of concentrations and growth speed of microorganisms and their biosynthesis products depending on substrate concentration]. RF State registration certificate 2012614773.

Authors:

Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Zadokhin S.N., Eremin S.A., Volokh O.A., Aleshina Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.Н., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 13.09.13.