

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

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КИНЕТИКИ НАКОПЛЕНИЯ О-АНТИГЕНА В ХОДЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAЕ* М-41 ОГАВА С ЛИМИТАЦИЕЙ ПО УГЛЕРОДНОМУ СУБСТРАТУ

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

Разработана система дифференциальных уравнений, характеризующих кинетику роста биомассы, утилизацию источника углеродного питания (глюкозы) и накопления О-антигена в ходе глубинного культивирования *Vibrio cholerae* М-41 Огава. Произведена идентификация параметров математической модели. С использованием разработанного программного обеспечения в среде Mathcad 15.0 найдены значения кинетических констант и коэффициентов. Показано, что математическая модель адекватно описывает процесс биосинтеза О-антигена. Полученные данные могут применяться при масштабировании технологии глубинного культивирования *V. cholerae* М-41 Огава.

*Ключевые слова:* О-антиген холерного вибриона, 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 O-Antigen Accumulation in the Process of Periodic Submerged Cultivation of *Vibrio cholerae* M-41 Ogava with Limitation on Carbon Substrate

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Developed is the system of differential equations that characterize kinetics of biomass growth, glucose utilization and O-antigen accumulation in the process of submerged cultivation of *V. cholerae* strain M-41 Ogawa. The parameters of the mathematic model are identified. Using the developed software in Mathcad 15.0 determined are kinetic constants and coefficients. The mathematical model is demonstrated to describe adequately O-antigen biosynthesis process. The received data can be used in large-scale technology of *V. cholerae* strain M-41 submerged cultivation.

*Key words:* O-antigen of *V. cholerae*, mathematic model, kinetics.

Использование методов математического моделирования ускоряет решение задачи проектирования производства, позволяет оптимизировать работу действующих установок. Математическому описанию процессов выращивания микроорганизмов и биосинтеза продуктов посвящено достаточно большое количество исследований [1–5]. Между тем работ, посвященных математическому описанию процессов биосинтеза протективных антигенов холерных вибрионов, нам обнаружить не удалось. Поэтому исследования, направленные на разработку математических моделей накопления протективных антигенов холерных вибрионов, являются актуальными.

Целью работы являлась разработка математической модели кинетики накопления О-антигена в ходе периодического глубинного культивирования *V. cholerae* М-41 Огава.

### Материалы и методы

При выполнении работы использовали производственный штамм *V. cholerae* М-41 Огава – продуцент О-антигена (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), который выращивали при 37 °С в реакторе-ферментере на среде из ферментативного гидролизата казеина

в условиях глубинного культивирования. Через 10 ч выращивание прекращали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %.

### Результаты и обсуждение

При рассмотрении процессов аэробного биосинтеза на удельную скорость роста клеток влияет как количество растворенного кислорода, так и концентрация углеродного субстрата, что в общем случае может быть представлено как:

$$\mu = \psi(\mu_S; \mu_{O_2}), \quad (1)$$

где  $\mu$  – общая удельная скорость роста клеток;  $\mu_S$  – удельная скорость роста клеток, зависящая от углеродного субстрата;  $\mu_{O_2}$  – удельная скорость роста клеток, зависящая от содержания растворенного кислорода в питательной среде.

В данной работе рассмотрен вариант, когда скорость роста клеток не лимитируется концентрацией растворенного кислорода (он находится в избытке) и, следовательно, удельная скорость роста клеток будет определяться, в основном, содержанием в среде углеродного субстрата (глюкозы).

На первоначальном этапе исследований необходимо было обосновать выбор уравнения, описывающего скорость роста *V. cholerae* М-41 Огава. С этой целью были проанализированы данные по накопле-

Таблица 1

Данные по накоплению биомассы, О-антигена и утилизации глюкозы

Время от начала ферментации (t), ч	Концентрация в среде компонентов, г/л		
	Биомасса (X)	Глюкоза (S)	О-антиген (P)
t <sub>1</sub> = 0	0,13	0	0
t <sub>2</sub> = 1	0,13	22	0
t <sub>3</sub> = 2	0,9	21	0
t <sub>4</sub> = 3	1,1	20	0,038
t <sub>5</sub> = 4	2,0	18	0,05
t <sub>6</sub> = 5	4,65	16	0,1
t <sub>7</sub> = 6	10,0	14	0,2
t <sub>8</sub> = 7	13,33	12	0,4
t <sub>9</sub> = 8	18,33	8	0,6
t <sub>10</sub> = 9	20,0	4	0,8
t <sub>11</sub> = 10	20,0	0	0,8

Таблица 2

Данные по скорости роста биомассы и выделения О-антигена

Интервалы времени, ч	Удельные скорости, ч <sup>-1</sup>	
	μ = ΔX/Δt	q <sub>p</sub> = ΔP/Δt
t <sub>2</sub> -t <sub>1</sub>	0	0
t <sub>3</sub> -t <sub>2</sub>	0	0
t <sub>4</sub> -t <sub>3</sub>	0,2	0,013
t <sub>5</sub> -t <sub>4</sub>	0,30	0,017
t <sub>6</sub> -t <sub>5</sub>	0,28	0,015
t <sub>7</sub> -t <sub>6</sub>	0,36	0,014
t <sub>8</sub> -t <sub>7</sub>	0,46	0,017
t <sub>9</sub> -t <sub>8</sub>	0,21	0,013
t <sub>10</sub> -t <sub>9</sub>	0,09	0,01
t <sub>11</sub> -t <sub>10</sub>	0	0

нию биомассы и О-антигена, скорости их роста и выделения, утилизации глюкозы, которые представлены в табл. 1 и 2.

Анализ данных, представленных в табл. 1 и 2, показывает, что накопление биомассы и выделение продукта метаболизма (О-антигена) осуществляется пропорционально потребленному субстрату. Скорость роста биомассы и выделения О-антигена достигает максимума к 8 ч культивирования, 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 продукта на скорость роста биомассы, является уравнение Моно-Иерусалимского [2]:

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

где μ<sub>max</sub> – удельная максимальная скорость роста микроорганизмов, ч<sup>-1</sup>; S<sub>L</sub> – текущая концентрация растворенной глюкозы, г/л; K<sub>S</sub> и K<sub>IS</sub> – кинетические константы, г/л; P – концентрация О-антигена, г/л.

Согласно экспериментальным данным, производство продукта начинается примерно в 3 ч, скорость его накопления ингибируется избытком биомассы и зависит от концентрации глюкозы в процессе производства. Тогда удельная скорость производства О-антигена запишется в следующем виде:

$$\frac{dP}{dt} = \begin{cases} 0, & \text{если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{Pmax} \frac{X^2}{(K_p S + X)} - K_{ip} \cdot X^2, & \text{если } t \geq 3 \end{cases} \quad (3)$$

При этом в уравнении изменения концентрации продукта во времени первый член отвечает за зависимость кинетики накопления О-антигена от концентрации холерного вибриона и глюкозы, а второй – за

ингибирование производства избытком биомассы.

Скорость потребления глюкозы клетками представлена зависимостью:

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

где Y<sub>XS</sub> – расходный коэффициент, г/г.

Таким образом, модель кинетики процесса была сформирована, исходя из условий идеального смешения в реакторе, и состоит из дифференциальных уравнений, учитывающих изменение концентрации биомассы, концентрации глюкозы в питательной среде и продукта синтеза (О-антигена) во времени. Система уравнений представлена следующим образом:

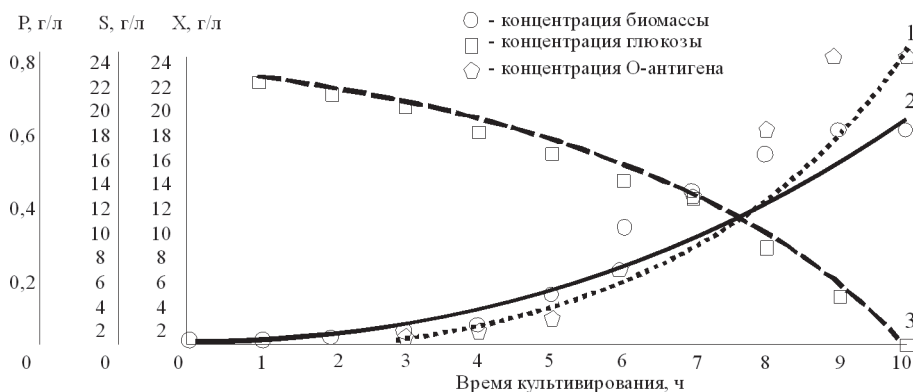
$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \\ \frac{dS}{dt} = -q_S \cdot X \\ \frac{dP}{dt} = \begin{cases} 0, & \text{если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{Pmax} \frac{X^2}{(K_p S + X)} - K_{ip} \cdot X^2, & \text{если } t \geq 3, \end{cases} \end{cases} \quad (5)$$

где K<sub>p</sub>, K<sub>ip</sub> – кинетические константы, г/л; q<sub>S</sub> – скорость потребления глюкозы клетками, ч<sup>-1</sup>; q<sub>Pmax</sub> – удельная максимальная скорость образования О-антигена, ч<sup>-1</sup>; X – концентрация биомассы, г/л.

На первой стадии процесса (до 3 ч) можно пренебречь изменением концентрации продукта в связи с его отсутствием. В системе из 3 дифференциальных уравнений (5) для этой стадии можно исключить последнее уравнение, описывающее кинетику накопления О-антигена.

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

Кроме того, удельная скорость роста биомассы в



Сопоставление экспериментальных значений и данных, полученных в ходе моделирования:

- 1 – динамика накопления О-антигена;
- 2 – кривая роста холерного вибриона;
- 3 – динамика потребления глюкозы (рассчитанные значения)

данной зоне будет описываться 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  $\mu_{\max} = 0,95$  ч<sup>-1</sup>, параметра  $Y_{XS} = 0,927$  г/г и коэффициента  $K_S = 0,5$  г/л.

Переходя к моделированию второй стадии процесса (после 3 ч), стоит отметить, что значения параметров, найденных в первой стадии, были использованы при моделировании процесса во второй. Математическая модель для описания данной стадии будет содержать 3 дифференциальных уравнения (5), и скорость роста будет соответствовать уравнению (2).

В качестве начальных условий послужили конечные концентрации биомассы и глюкозы на первой стадии, а также  $P_0 = 0,0375$  г/л. Для определения значений коэффициентов  $K_{iS}$ ,  $q_{Pmax}$ ,  $K_p$ ,  $K_{ip}$ , с использованием разработанного программного обеспечения в среде Mathcad 15.0, был произведен расчет системы дифференциальных уравнений (5) и получены следующие значения:  $K = 2,1$  г/л,  $K_{ip} = 0,001$  г/л,  $K_{iS} = 0,103$  и  $q_{Pmax} = 0,005$  ч<sup>-1</sup>.

Результаты моделирования полного периодического процесса представлены на рисунке.

Был произведен анализ отклонений расчетных значений от экспериментальных. Относительная

ошибка для различных кривых составила от 5 до 15 %, что является удовлетворительной величиной для микробиологических процессов. Таким образом, показано, что разработанная математическая модель адекватно описывает процесс биосинтеза О-антигена.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС; 2004. 296 с.
2. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. М.: Наука; 1985. 292 с.
3. Винаров А.Ю., Смирнов В.А. Влияние уровня растворенного кислорода на стехиометрические коэффициенты процесса выращивания дрожжей. Прикладная биохимия и микробиология. 1983; XIX(1):244–8.
4. Bajpai R.K., Reuss M. A mechanistic model for penicillin production. J. Chem. Technol. Biotechnol. 1980; 30:332–44.
5. Ettler P., Votruba J. Determination of the optimal feeding regime during biosynthesis of erythromycin. Folia Microbiol. 1980; 25:424–9.

#### References

1. Biryukov V.V. [The Principals of Industrial Biotechnology]. M.; 2004; 296 p.
2. Biryukov V.V., Kantere V.M. [Optimization of Periodic Process of Microbiological Synthesis]. M.; 1985. 292 p.
3. Vinarov A.Yu., Smirnov V.A. [Influence of dissolved oxygen level on stekhiometric coefficients of the process of yeast growth]. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 1983; XIX(1):244–8.
4. Bajpai R.K., Reuss M. A mechanistic model for penicillin production. J. Chem. Technol. Biotechnol. 1980; 30:332–44.
5. Ettler P., Votruba J. Determination of the optimal feeding regime during biosynthesis of erythromycin. Folia Microbiol. 1980; 25:424–9.

#### Authors:

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

Поступила 25.01.12.