

ПРИНЦИПЫ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В БИОСИНТЕЗЕ АМИНОКИСЛОТ

А.С. ЗУРАБЯН*, Г.Г. МАРДЖАНИЯН**, Б.П. КАРАБЕКОВ*,
М.М. СИМОНЯН**

*ИИИ "Биотехнология", 375056, Ереван

**Республиканский Центр депонирования микрочов НАН и Министерства
образования и науки Армении, 378510, г. Абовян

Предложен принцип разработки математических моделей в биотехнологии с целью масштабирования и оптимизации биотехнологических процессов. Предлагается модифицированный критерий адекватности модели. Правомочность предложенного подхода подтверждена экспериментальными данными.

Կենսատեխնոլոգիական պրոցեսների ընդլայնման և օպտիմիզացիայի համար առաջարկված է մաթեմատիկական մոդելների մշակման սկզբունքը կենսատեխնոլոգիայում: Ստրեյի համապատասխանությանը առաջարկված է մոդիֆիկացված չափանիշ: Իտաջարկված մոտեցման իրավասությունը ասացուցված է փորձնական տվյալներով:

For large scale production and optimization of biotechnological processes the principle of the mathematical models development in biotechnology is proposed. The modified criterion for adequacy of model is suggested. The competency of suggested approach is proved by experimental data.

Бiosинтез аминокислот - математическое моделирование - масштабирование биотехнологических процессов

При исследовании процессов биосинтеза аминокислот особое место занимает проблема масштабирования, то есть нахождения условий, при которых возможен непосредственный перенос опытных данных, полученных для данной системы, с одного масштаба аппарата на другой.

Процессы, протекающие при биосинтезе аминокислот, отличаются исключительной сложностью, так как на явления микробиологического синтеза накладываются физико-химические явления, связанные с переносом вещества и энергии. Сложность усугубляется тем, что одновременно протекают процессы как на микроуровне - явления в клетках, так и на макроуровне - процессы массо- и теплопередачи, которые в свою очередь зависят от гидродинамической обстановки и аппарате.

Невозможность четкого разделения явлений, одновременно происходящих на микро- и макроуровнях, приводит к необходимости приближенной оценки влияния различных уровней взаимодействия и обуславливает необходимость математического моделирования как наиболее действенного метода исследования.

В литературе известно достаточно много моделей, описывающих накопление биомассы [1,2]. Значительно меньше работ, в которых дана модель получения продуктов микробиологического синтеза [3]. Основой этих моделей, как правило, служит предположение о связи между скоростью роста, возрастом культуры и скоростью накопления продукта. Эти модели являются по существу формальными, но достаточно приемлемы для проектно-конструкторских расчетов и имитационных исследований.

Однако формальные уравнения могут сильно различаться по своей структуре при примерно одинаковой точности описания ими экспериментальных данных. Это приводит к тому, что при определении оптимальных режимов масштабного перехода при реализации процесса в других гидродинамических условиях и решении других задач моделирования, где требуется знание производных от скорости процесса, оптимальные режимы могут сильно отличаться в зависимости от структуры (вида) модели, хотя исходные уравнения могут приблизительно одинаково описывать экспериментальные данные.

Вышеотмеченное определяет главный принцип разработки формальной математической модели в биосинтезе аминокислот, заключающийся в том, что основу его составляет задача выявления корректной структуры (вида) формального описания, позволяющей имитировать как качественные, так и количественные закономерности процесса.

Таким образом, при разработке математических моделей биосинтеза аминокислот с целью оптимизации процесса и его масштабирования предпочтение следует отдавать моделям, структура (вид) которых близка к кинетическим особенностям процесса и ущерб точности описания ими экспериментальных данных. Критерий же адекватности описания, в отличие от известной зависимости, характеризующей точность описания моделью эксперимента

$$\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Y_i^2 - Y_i^p|, \quad (1)$$

где Y_i^2 и Y_i^p - соответственно экспериментальное и расчетное значения искомой функции в i -ой точке сравнения, N - количество точек сравнения.

При разработке таких моделей критерий адекватности представляется в виде:

$$\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left| \frac{\partial Y^2}{\partial X_i} - \frac{\partial Y^p}{\partial X_i} \right|, \quad (2)$$

где $\left(\frac{\partial Y^2}{\partial X_i} \right)$ и $\left(\frac{\partial Y^p}{\partial X_i} \right)$ - соответственно экспериментальное и расчетное значения производной функции в i -ой точке сравнения.

Учитывая, как было отмечено выше, невозможность четкого разделения явлений, одновременно протекающих в процессах биосинтеза аминокислот, и, как следствие, невозможность априорного постулирования структуры модели, представляется целесообразной оценка структуры гипотетической модели в рассматриваемой области протекания процесса на основе статистической оценки характера связи между входными параметрами, что особенно важно при данном подходе, возможными сочетаниями функциональных блоков входных параметров (ФБВП) и выходными параметрами процесса.

Мера линейной зависимости между случайными величинами оценивается значением парной корреляции, которая численно равна

ковариации двух нормированных переменных для стационарного ансамбля:

$$\rho_{xy} = \frac{E\{[\bar{X} - E(X)] \cdot [\bar{Y} - E(Y)]\}}{\sigma_x \cdot \sigma_y}, \quad (3)$$

где $\sigma_x^2 = E\{[\bar{X} - E(X)]^2\}$; $\sigma_y^2 = E\{[\bar{Y} - E(Y)]^2\}$; \bar{X}, \bar{Y} - векторы случайных величин X и Y , между которыми оценивается наличие связи; $E(X)$ - математическое ожидание вектора \bar{X} .

Для оценки структуры модели по выражению (3) необходимо прежде всего выделить векторы X (входные параметры и функциональные блоки входных параметров) и Y (выходные параметры) процесса. При этом представляется целесообразным из всех возможных ФБВП на основе экспертной оценки выбрать те из них, которые имеют определенное теоретическое обоснование.

Далее на основе полученной матрицы значений парных корреляций составляется знаковая модель процесса, представленная системой дифференциальных уравнений, правая часть которых дана в виде ряда Тейлора от входных параметров и ФБВП.

Приведенные выше положения были взяты за основу при разработке математической модели процесса биосинтеза L-пролина изолейцинозависимыми мутантами.

Поскольку полное описание процессов микробиологического синтеза, кроме раскрытия кинетики накопления биомассы, должно также включать описание закономерностей потребления компонентов питательной среды и выделения продуктов метаболизма, то в качестве базовой модели были выбраны уравнения Марра (5) для описания утилизации компонентов среды и Людеккига (4) для описания накопления продуктов метаболизма:

$$\begin{cases} \frac{dC_x}{dt} = -\gamma \frac{dC_i}{dt} + \eta C_x \\ \frac{dC_i}{dt} = \frac{1}{\gamma} \frac{dC_x}{dt} + \frac{\eta}{\gamma} C_x \\ \frac{dC_p}{dt} = \alpha \frac{dC_x}{dt} + \beta C_x \end{cases} \quad (4)$$

где C_x, C_i и C_p - соответственно концентрации биомассы i -ого компонента питательной среды и продукта метаболизма.

Проведенные ранее исследования показали, что определяющими входными параметрами процесса при заданном диапазоне изменения pH среды и температуре ферментации являются концентрации компонентов в исходной питательной среде.

Кроме того, для процессов аэробной ферментации одним из важнейших факторов, определяющих ход процесса, служит количество

растворенного кислорода. В соответствии с этим в качестве входных параметров модели рассматривались концентрации компонентов исходной питательной среды (изолейцина - C_{10} , г/л, сахара - C_{11} , г/л, азота - C_{12} , г/л), скорость растворения кислорода - (v , г/л час) и ФБВП, составленные на их основе. В качестве выходных параметров были выбраны скорость роста биомассы (dC_x/dt), скорость утилизации энергетического субстрата сахара - (dC_{11}/dt) и скорость накопления L -продина в культуральной жидкости (dC_p/dt).

Результаты корреляционного анализа позволили сделать следующие предложения о структуре модели.

$$\begin{aligned} \frac{dC_x}{dt} &= f\left(C_x, \frac{dC_x}{dt}, C_x\right) \\ \frac{dC_2^y}{dt} &= f\left(\frac{1}{\frac{C_1}{v} - m_1} \cdot C_2^y\right) \\ \frac{dC_p}{dt} &= f\left(\frac{1}{\sum_{i=1}^3 \left(\frac{C_i}{v} - m_i\right)} \cdot C_x\right) \end{aligned} \quad (5)$$

где формальный параметр m_i рассматривается как оценочное значение величины (C_i/v) в оптимальной области. Выражение

$$\frac{C_1}{v} - m_1 = 0, \quad (6)$$

преобразованное к виду

$$\frac{C_x}{v + m_1} - 1 = 0, \quad (7)$$

показывает, что размерность формального параметра m_1 выражается в единицах времени (час). Это позволяет, имея в виду известную зависимость скорости растворения кислорода

$$v = \frac{dC_{O_2}}{dt} = K_L \cdot a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}), \quad (8)$$

где K_L и a - массообменные характеристики, предположить наличие связи

$$m_1 = \frac{a_1}{K_L \cdot a}. \quad (9)$$

С учетом этого выражения и добавлением некоторых констант, обеспечивающих математическую корректность кинетики, математическая

модель для i -го рассматриваемого штамма-продуцента L-валина постулируется в виде:

$$\left\{ \begin{aligned} \frac{dC_x}{dt} &= -\gamma \frac{dC_2}{dt} + \eta C_3; \\ \frac{dC_2^y}{dt} &= b_2 \left(\frac{K_{1,2} a}{1 + R_2} \right)^{n_2} \cdot C_2^{n_2} \cdot C_3^{n_3}; \\ \frac{dC_p}{dt} &= b_p \left(\frac{K_{1,p} a}{1 + \sum_{i=1}^n R_i} \right)^{n_p} \cdot C_2^{n_2}; \end{aligned} \right. \quad (10)$$

$$C_x(0) = C_x^0; \quad C_2(0) = C_2^0; \quad C_p(0) = 0; \quad (11)$$

$$R_i = \beta_i \left| \frac{C_x}{C_2^* - C_{0,2}} - \alpha_i \right|; \quad (12)$$

где $\gamma, \eta, \beta_i, b_k, n_k$ ($k=1-5$) - параметры модели, подлежащие оцениванию.

Оценка параметров модели проводилась минимизацией квадратичной формы, характеризующей степень совпадения результатов модельных расчетов и экспериментальных данных.

Средняя относительная ошибка описания моделью экспериментальных данных составляет 8%, что соизмеримо с уровнем экспериментальных ошибок.

Кроме того, интегрирование уравнения роста биомассы показывает, что продолжительность экспоненциальной фазы роста составляет приблизительно 6 часов, что соответствует опыту, а время генерации клеток в этой фазе (начальная концентрация биомассы равна 0,15 г/л) составляет 60 - 70 мин, что также экспериментально подтверждается.

Математическая модель процесса была получена на основании колбочочных ферментаций. Поэтому для подтверждения правомочности выводов, вытекающих из анализа модели, была проверена ее "работоспособность" и другом гидродинамическом режиме на лабораторном ферментаторе (емкость-10л, объем накопления-7л, скорость оборотов мешалки-1000 1/мин, подача воздуха-1.1). Сравнение рассчитанных по модели кривых и соответствующих им экспериментальных точек показало достаточную точность описания моделью процесса биосинтеза L-валина.

Полученная знаковая модель была апробирована для описания процесса биосинтеза L-валина и доказала свою "работоспособность", что

подтверждает объективный характер полученной модели и правомочность предложенного подхода к математическому моделированию в биосинтезе аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбросов В.А., Васильев Н.Н., Складнев А.А. Прикл. биохим. и микробиол., 6, 4, 363-372, 1970.
2. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. 290, М., 1976.
3. Кафаров В.В., Винаров А.Ю., Гордеев Л.С. Моделирование биохимических реакторов. 341, М., 1979.
4. Luedeking R., Piret E.L. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 1, 4, 393-412, 1959.
5. Marr A.G., Nilson E.H., Clark D.J. The maintenance requirement of *Escherichia coli*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 102, 3, 536-548, 1963.

Поступила 14.IV.1997

Биолог. журн. Армении, 3-4 (50), 1997

УДК 579.846

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Fe^{2+} И Fe^{3+} НА РОСТ И ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ *SULFOBACILLUS THERMOSULFIDOOXIDANS*

Н.С. ВАРТАНЯН

Институт микробиологии НАН и Республиканский центр депонирования микробов НАН и Министерства образования и науки Армении, 378510, г. Абовян

Показано, что оптимальными для роста *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* шт. 41 и окисления Fe^{2+} являются исходные его концентрации от 105,3 до 205,3 мМ. При более высоких концентрациях Fe^{2+} наблюдалась задержка роста и окисления Fe^{2+} . Ионы трехвалентного железа ингибируют рост бактерии и окисление Fe^{2+} . При этом увеличивается константа насыщения (K_s). Следовательно, ингибирование носит конкурентный характер. Константа ингибирования (K_i) составляет 12,2 - 14,7 мМ Fe^{3+} .

Ցույց է տրված, որ *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* 41 շտամի աճի և երկաթի օքսիդացման համար օպտիմալ են համոխանում Fe^{2+} -ի 105,3 - 205,3 մՄ սկզբնական կոնցենտրացիաները: Fe^{3+} իոնների ազելի մեծ քանակության դեպքում նկատվել է բակտերիաների աճի և Fe^{2+} օքսիդացման դանդաղեցում: Ետադեք երկաթի իոնները արգելակում են բակտերիաների աճը և Fe^{2+} օքսիդացումը, ընդ որում այդ դեպքում մեծանում է հազեցման հաստատունը (K_s): Դետևարար, արգելակումը կրում է մրցակցային բնույթ: Արգելակման հաստատունը (K_i) կազմել է 12,2 - 14,7 մՄ Fe^{3+} :

The optimal concentrations for growth of *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*-41 and iron oxidation with initial concentrations of Fe^{2+} in limits 105,3 - 205,3 mM have been revealed. Decrease of growth and iron oxidation of bacteria at high concentrations of Fe^{2+} was observed. The Fe^{3+} ions inhibited the growth and Fe^{2+} oxidation of bacteria, so in that case the constant of saturation (K_s) increased. Consequently, the inhibition was competitive. The constant of inhibition (K_i) was 12,2 - 14,7 mM Fe^{3+} .