

О МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ КИНЕТИКИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

© 2018 г. В.Б. Тишин, Ю.Н. Исмаилова

Санкт–Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 191002, Санкт–Петербург, ул. Ломоносова, 9

E-mail: tishinvb@mail.ru

Поступила в редакцию 10.08.17 г.

После доработки 16.10.17 г.

На основе обобщенного дифференциального уравнения прироста биомассы получены различные уравнения математических моделей кинетики развития различных биологических процессов. На примере аэробного периодического культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дается сравнительная оценка достоинств и недостатков четырех вариантов математических моделей. Показано, что экспоненциальная модель является частным решением обобщенного дифференциального уравнения. Полученные математические модели позволяют прогнозировать течение биологических процессов во времени, а также могут служить инструментом для проведения вычислительного эксперимента с целью выяснения зависимости скорости биологического процесса от изменения тех или иных параметров, влияющих на развитие клеток.

Ключевые слова: кинетика, математическая модель, культивирование, концентрация, биомасса, скорость.

Наиболее известной молекулярной динамикой кинетики развития микроорганизмов является экспоненциальная зависимость изменения концентрации клеток в культуральной жидкости во времени, основанной на гипотезе о прямой пропорциональности прироста биомассы Δx за период времени Δt ее концентрации x в культуральной среде. Однако прямая пропорциональность соблюдается не всегда. Вероятнее более общая гипотеза – $\Delta x \sim x^m \tau^n$, которая в дифференциальной форме имеет вид равенства

$$dx = kx^m \tau^n d\tau. \quad (1)$$

В равенстве (1) коэффициент пропорциональности k и показатели степени m и n определяются экспериментально.

В зависимости от сочетания значений показателей степени m и n можно получить уравнения различных молекулярных динамик кинетики развития тех или иных биологических процессов. Рассмотрим некоторые из них на примере процесса прироста биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В дальнейшем, чтобы при обработке опытных данных не быть зависимыми от размерностей, концентрации компонентов культуральной жидкости будем выражать в безразмерном виде как отношение текущих значений к начальным. В частности,

безразмерное значение концентрации биомассы (клеток) $\bar{x} = x/x_0$.

ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ

При $m = 1$, $n = 0$ из равенства (1) следует известное уравнение

$$\bar{x} = \exp(\mu\tau), \quad (2)$$

где коэффициент пропорциональности μ принято называть удельной скоростью развития микроорганизмов.

Дальнейшая задача заключается в установлении зависимости удельной скорости μ от тех или иных факторов (температуры, начальной концентрации микроорганизмов и углеводов; гидродинамических условий в культиваторе и т.п.). Удельную скорость при том или ином лимитирующем факторе выражают в виде различных зависимостей. В данной статье не ставится задача их анализа, а желающим познаться с ними рекомендуем обратиться к литературе [1–4]. Уравнение (2) совместно с уравнениями для расчета удельной скорости составят математическую модель, отражающую закон экспоненциального развития биологического процесса.

МОДЕЛИ СТЕПЕННОГО ВИДА

$$\bar{S} = \frac{1}{1 + (\gamma\tau)^{n_1}}. \quad (9)$$

Проинтегрировав уравнение (1) в пределах от $x = x_0$ до x и $\tau = 0$ до τ , получим математическую модель степенного типа в общем виде:

$$\bar{x} = \left[1 + \frac{k(1-m)}{x_0^{(1-m)(n+1)}} \tau^{n+1} \right]^{m_1}, \quad (3)$$

где показатель степени m_1 представляет собой равенство

$$m_1 = \frac{1}{1-m}. \quad (4)$$

Ранее уже было сказано, что при $m = 1$ получается экспоненциальная зависимость (2). Но при подстановке в уравнение (4) $m = 1$ функция $m_1(m)$ претерпевает разрыв и $m_1 = \pm \infty$. Именно в зоне разрыва имеет место экспоненциальная закономерность развития клеток. Таким образом, значение m_1 может находиться как в области положительных значений функции $m_1(m)$, так и отрицательных. При положительных значениях m_1 уравнение (3) будет отражать увеличение концентраций компонентов культуральной жидкости, при отрицательных – их снижение. Рассмотрим несколько частных вариантов уравнения (3), интересных для рассматриваемого нами случая.

Модель 1. $n = 0$. При $m < 1$ из (4) следует: $m_1 > 0$, и уравнение (3) примет вид

$$\bar{x} = (1 + \delta\tau)^{m_1}, \quad (5)$$

где $\delta = k_1(1-m)/x_0^{(1-m)}$.

Модель 2. $n = 0$. При $m > 1$ из (4) следует: $m_1 < 0$, и уравнение (3) примет вид

$$\bar{S} = \frac{1}{(1 + \delta\tau)^{m_1}}, \quad (6)$$

где \bar{S} означает безразмерную концентрацию, которая снижается в процессе культивирования.

Модель 3. При $n > (-1)$ из (4) следует $n_1 > 0$ и $m = 0$, $m_1 = 0$ из уравнения (3) следует:

$$\bar{x} = 1 + (\gamma\tau)^{n_1}, \quad (7)$$

где $n_1 = n + 1$,

$$\gamma = (k_2/x_0 n_1)^{1/n_1}. \quad (8)$$

Модель 4. При $n > (-1)$, $n_1 > 0$ и $m = 2$, $m_1 = -1$ из уравнения (3) следует:

Таким образом, получено четыре уравнения, два из которых (уравнения (5) и (7)) соответствуют положительным значениям m_1 , и два (уравнения (6) и (9)) – отрицательным. Поскольку в статье рассматриваются вопросы прироста биомассы, то нас будут интересовать в первую очередь уравнения (5) и (7). Об уравнениях (6) и (9) скажем лишь, что они достаточно точно аппроксимируют опытные данные по изменению концентрации углеводов в процессе культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [5] и при брожении пивного сусла [6].

Входящим в уравнения (5)–(9) коэффициентам и показателям степеней можно придать определенный физико-биологический смысл. Коэффициенты γ и δ по сути имеют тот же смысл, что μ в уравнении (2). Кроме того, легко доказывается, что в уравнении (7) отношение $1/\gamma$ есть время удвоения функции $\bar{x}(\tau)$, а в уравнении (9) – время снижения функции $\bar{S}(\tau)$ в два раза. Эти величины важны в технологических расчетах.

По виду равенства (2) μ называют еще логарифмической удельной скоростью. По аналогии с μ , согласно уравнению (7), γ можно назвать степенной удельной скоростью.

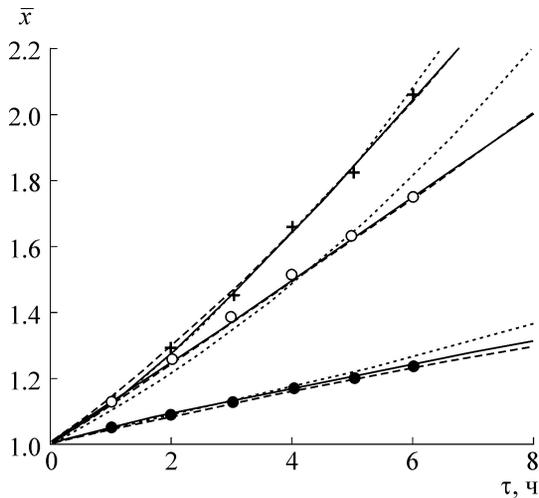
Показатели степени m_1 и n_1 определяют темп изменения функций $\bar{x}(\tau)$ и $\bar{S}(\tau)$, т.е. характеризуют изменение скоростей протекания биологических процессов во времени и представляют собой производные функций по времени. Применительно к приросту биомассы производные имеют следующий вид:

$$\bar{x}' = (1 + \delta\tau)^{m_1-1} m_1 \delta, \quad (5a)$$

$$\bar{x}' = \gamma^{n_1} n_1 \tau^{n_1-1}. \quad (7a)$$

Интерес представляет анализ равенства (8), согласно которому γ снижается с увеличением x_0 и n_1 .

Снижение удельной скорости при увеличении концентрации клеток в культуральной среде не является чем-то неожиданным. Вопросы взаимоотношения клеток внутри популяции давно привлекают внимание микробиологов. В работе [7] отмечается, что первым, кто попытался объяснить природу и механизм взаимовлияния особей, был П.Ф. Ферхюльст. По мнению ученого, с увеличением численности клеток возрастает конкуренция между ними за субстрат, возрастает число погибших клеток из-за



Изменение прироста биомассы во времени при начальном содержании сахаров $S_0 = 0,108$. Экспериментальные данные: \bullet — $q = 11$; \circ — $q = 32$; $+$ — $q = 92$; $\bullet\bullet\bullet$ — расчет по уравнению (2), $- - -$ — расчет по уравнению (5), $- \cdot - \cdot -$ — расчет по уравнению (7).

недостатка питания, вследствие чего снижается скорость прироста биомассы. Согласно Ферхюльсту рост популяции должен подчиняться экспоненциальному закону (2), но удельная логарифмическая скорость μ должна быть функцией концентрации клеток.

В той же работе (7) приведены мнения других исследователей, которые причиной снижения μ с ростом численности клеток считают накопление в культуральной среде токсичных продуктов метаболизма. Скорее всего, обе точки зрения имеют право на существование. Все зависит от природы микроорганизмов, от соблюдения технологических режимов культивирования, качества сырья и т.п. Общим для обеих точек зрения является стремление μ к нулю при $x \rightarrow \infty$. Уравнение (8) тоже удовлетворяет этому условию.

Однако последнее заключение было поставлено под сомнение опытами авторов работ [8,9], проводившими исследования по культивированию *Saccharomyces cerevisiae* для хлебопечения при высоких концентрациях биомассы (до 120 кг абсолютно сухой биомассы на 1 м³). Ими было установлено, что с увеличением концентрации биомассы от 5 до 30 кг абсолютно сухой биомассы на 1 м³ удельная скорость роста μ снижается от 0,35 до 0,091 1/ч и остается на этом уровне до $x = 90$ кг абсолютно сухой биомассы на 1 м³, после чего вновь падает до $\mu = 0,04-0,05$ 1/ч и остается постоянной до $x = 120$ кг абсолютно сухой биомассы на 1 м³.

Таким образом, исследования авторов работ [8,9] показали, что с ростом концентрации биомассы $\mu \rightarrow \mu_{\min} = \text{const}$. Трудно представить, что степенная удельная скорость γ будет зависеть от концентрации клеток иначе, чем μ .

Безусловно, само понятие «бесконечно большая концентрация» лишено какого-либо реального смысла, однако возникает вопрос, до каких значений x может происходить размножение клеток? Невольно напрашивается ответ, что клетки будут делиться в любых условиях, если к ним будет обеспечен подвод питательных веществ и отвод продуктов метаболизма от них. Если такие условия соблюдения невозможно, то вопрос о культивировании теряет всякий смысл.

Можно предположить, не отрицая предыдущие точки зрения, что причина снижения скорости роста кроется еще и в изменении свойств культуральной жидкости. Увеличение концентрации клеток требует соответствующего увеличения субстрата, что приводит к изменению физических свойств среды. Снижается равновесная концентрация кислорода в культуральной среде, вследствие чего снижается движущая сила процесса переноса кислорода из газовой фазы в жидкую. Указанные обстоятельства особенно отрицательно сказываются на массообмене между фазами: клетка–жидкость и жидкость–воздух. Все эти причины приводят к тому, что, находясь в условиях стесненности, клетки плохо потребляют субстрат, несмотря на его избыток в растворе. Подобной точки зрения придерживается и автор работы [10].

Принятие условия $\gamma \rightarrow \text{const}$ при $x \rightarrow \infty$ требует корректировки уравнения (8) таким образом, чтобы γ была бы функцией не только от x_0 , но и x . В существующей записи использование уравнения (8) в построении молекулярной динамики возможно только при заданном x_0 без учета влияния на γ текущей концентрации биомассы.

Причина снижения удельной скорости γ с увеличением темпа прироста биомассы n_1 кроется, скорее всего, в наличии двух противоположно действующих факторов. С одной стороны увеличение n_1 по какой-либо причине (например, увеличение расхода воздуха) приводит к росту скорости размножения клеток (см. уравнение (7a)), но с другой — увеличение концентрации их приводит к снижению γ согласно тому же уравнению (8).

Анализ уравнений (2), (5) и (7) показал, что они с равной степенью точности соответствуют опытным результатам. В качестве примера на рисунке представлены результаты эксперимен-

тальных исследований по бесприточному аэробному культивированию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма Л-128, выполненных автором работы [5]. Исследования были проведены в культиваторе барботажного типа при температуре 30–32°C, начальном содержании сахаров $S_0 = 0,028\text{--}0,108$ массовых долей, начальный засев $x_0 = 5$ кг абсолютно сухой биомассы на 1 м³. Удельный расход воздуха q изменялся от 11 до 214,3 л/ч. Объем жидкости в аппарате был постоянен – 7 л.

Из рисунка видно, что с ростом расхода воздуха показатель степени n_1 увеличивается от значений, меньших единицы, до значений, больших единицы. Если сравнивать функции (5) и (7) с функцией (2), то можно заметить, что при $n_1 > 1$ и по характеру изменения, и численно они совпадают с опытными данными. При $n_1 < 1$ ($q = 11\text{--}32$ л/ч) численные значения их близки (в условиях эксперимента), однако характер изменения функций (5) и (7) отличается от функции (2). Поэтому уравнение (2) не может быть принято в качестве математической модели для моделирования исследуемого процесса в широких диапазонах изменения τ , x_0 , S_0 и q .

Таким образом, сравнительная оценка возможностей использования рассмотренных математических моделей для аппроксимации опытных данных по культивированию дрожжей показала, что для этой цели вполне подходит как уравнение (5), так и уравнение (7). Оба они с одинаковой степенью точности описывают результаты экспериментов. Встает вопрос, какому же уравнению отдать предпочтение?

Согласно уравнению (7а) при $\tau \rightarrow 0$ $\bar{x}' \rightarrow \infty$, а согласно уравнению (5а) при $\tau \rightarrow 0$ \bar{x}' стремится к максимально возможной скорости $\bar{x}' = m_1 \delta$. Первый вариант в реальных условиях не возможен в принципе. Второй – требует придания ему определенного биологического смысла. Можно предположить, что это та максимальная скорость прироста биомассы, которая возможна для данного штамма дрожжей в начальный момент времени при отсутствии лаг-фазы. Но эта гипотеза требует экспериментального подтверждения.

Во-вторых, если не принимать во внимание первые минуты культивирования, то предпочтение следует отдать уравнению (7), как более простому, к тому же из него легко находится время удвоения биомассы. Поэтому уравнение (7) взято за основу дальнейшей обработки опытных данных.

Для расчета входящих в уравнение (7) значений γ и n_1 получены эмпирические уравнения (5), которые учитывают влияние на скорость прироста биомассы начальной концентрации углеводов и расхода воздуха и вместе с уравнением (7) составляют систему уравнений молекулярной динамики исследуемого процесса.

ВЫВОДЫ

Гипотезу (1) можно рекомендовать к использованию при поиске уравнений молекулярной динамики кинетики биологических процессов.

Системой уравнений степенного вида (7) можно рассчитать молекулярную динамику кинетики аэробного периодического культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, так как она позволяет прогнозировать изменение концентрации биомассы во времени и решать вполне конкретные технологические задачи при заданных значениях S_0 и q .

Систему уравнений вида (7) нельзя считать законченной молекулярной динамикой кинетики прироста биомассы, так как скорость прироста биомассы зависит не только от начальных значений S_0 и удельного расхода воздуха q , но и от текущих значений x и S . Поэтому для построения более полной математической модели нужны дополнительные уравнения, устанавливающие функциональную зависимость γ и n_1 от x и S .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. И. А. Басканьян, В. А. Бирюков и Ю. М. Крылов, *Микробиология* **5**, 5 (1976).
2. А. Б. Рубин, *Соросовский образоват. журн.*, № 10, 84 (1998).
3. А. А. Арзамасцев и А. Н. Андреев, *Биофизика* **46** (6), 1048 (2001).
4. Г. Ю. Ризниченко, *Лекции по математическим моделям в биологии* (Изд-во РХД, М. – Ижевск, 2002).
5. М. Аль Асаад Кусай, Дис. ... канд. техн. наук (ГУ-НиПТ, СПб., 2007).
6. Г. А. Тамазян, Автореф. ... дис. канд. техн. наук (СПб., 2010).
7. Н. Н. Васильев, В. А. Амбросов и А. А. Складнев, *Моделирование процессов микробиологического синтеза* (Лесн. пром., М., 1975).
8. И. Б. Тишин, А. Г. Новоселов и Т. В. Меледина, *Журн. прикл. химии*, № 7, 1620 (1990).
9. В. Б. Тишин, Т. В. Меледина и А. Г. Новоселов, *Микология и фитопатология* **28** (3), 35 (1994).
10. Н. П. Елинов, *Основы биотехнологии* (Наука, СПб., 1995).

On Mathematical Models for Kinetics of Cultivation of Microorganisms

V.B. Tishin and Y.N. Ismailova

*St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics,
ul. Lomonosova 9, St. Petersburg, 191002 Russia*

Based on the generalized differential equation of biomass growth, various equations of mathematical models for the kinetics of the development of various biological processes have been obtained. Aerobic periodic cultivation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* was carried out to provide a comparative evaluation of merits and demerits of four types of mathematical models. It was shown that the exponential model is a particular solution to the generalized differential equation. The developed mathematical models can be used to predict the course of biological processes in time, and can serve as a tool for a computational experiment in order to clarify the dependence of the rate of a biological process on changes in certain parameters that affect the development of cells.

Keywords: kinetics, mathematical model, cultivation, concentration, biomass, rate