

РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССА НАКОПЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ В ХОДЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAЕ* M-41 ОГАВА И *VIBRIO CHOLERAЕ* 569В ИНАБА С ЛИМИТАЦИЕЙ ПО УГЛЕРОДНОМУ СУБСТРАТУ

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Никифоров А.К.

ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия (410005, Саратов, ул. Университетская, 46), e-mail: rusrapi@microbe.ru

Сформулированы математические модели кинетики накопления О-антигена штамма *Vibrio cholerae cholerae* M-41 серовара Огава, а также О-антигена и токсина штамма *V. cholerae cholerae* 569 В серовара Инаба с лимитацией по углеродному субстрату. При решении систем дифференциальных уравнений получены зависимости, характеризующие рост холерного вибриона, накопление О-антигена штамма *Vibrio cholerae cholerae* M-41 серовара Огава, а также О-антигена и токсина штамма *V. cholerae cholerae* 569 В серовара Инаба и потребления источника углеводного питания (глюкозы). На основании кривой, характеризующей потребление глюкозы, разработан и реализован алгоритм ее автоматического введения в культуральную среду при культивировании *V. cholerae cholerae* M-41 серовара Огава и *V. cholerae cholerae* 569 В серовара Инаба.

Ключевые слова: О-антиген и токсин холерного вибриона, периодическое глубинное культивирование *Vibrio cholerae* M-41 серовара Огава и *V. cholerae* 569 серовара Инаба, математическая модель.

MODELING OUTCOMES AS REGARDS PROCESS OF ANTIGEN ACCUMULATION IN CASE OF DISCONTINUOUS SUBMERGED CULTIVATION OF *VIBRIO CHOLERAЕ* M-41 OGAWA AND *VIBRIO CHOLERAЕ* 569B INABA WITH CARBON SUBSTRATE LIMITATION

Komissarov A.V., Eremin S.A., Zadokhin S.N., Nikiforov A.K.

Rospotrebnadzor Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia (410005, Saratov, Universitetskaya St., 46), e-mail: rusrapi@microbe.ru

Designed are the mathematical models for kinetics of O-antigen accumulation, obtained from *Vibrio cholerae cholerae* M-41 Ogawa; as well as of O-antigen and toxin from *V. cholerae cholerae* 569B Inaba, with carbon substrate limitation. In the process of solving differential equations identified are the dependencies characterizing *Cholerae vibrio* growth; O-antigen accumulation, obtained from *Vibrio cholerae cholerae* M-41 Ogawa, as well as of O-antigen and toxin from *V. cholerae cholerae* 569B Inaba; and source carbohydrate nutrition (glucose) intake. Using glucose intake curve developed and implemented is the algorithm of glucose automatic introduction into the culture medium when cultivating *V. cholerae cholerae* M-41 Ogawa and *V. cholerae cholerae* 569 B Inaba.

Keywords: *Vibrio cholerae* O-antigen & toxin, discontinuous submerged cultivation of *Vibrio cholerae* M-41 Ogawa and *V. cholerae* 569B Inaba, mathematical model.

Российская холерная химическая вакцина производства института «Микроб» не менее эффективна, чем ее зарубежные аналоги [4]. Производство данной вакцины состоит из ряда биотехнологических этапов, определяющим из которых является культивирование производственных штаммов холерных вибрионов с целью получения их антигенов. Общеизвестно, что использование методов математического моделирования позволяет оптимизировать работу действующих ферментационных установок. Математическому описанию процессов выращивания микроорганизмов и биосинтеза продуктов посвящено достаточно большое количество исследований, изложенных в работах Моно Ж., Бирюкова В.В., Кантере В.М., Уэбба Ф.Ч., Винарова А.Ю., Перта С.Дж., Васильева Н.Н., Амбросова В.А., Складнева А.А. и ряда

других. 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, являлись актуальными.

Материалы и методы

При выполнении работы использовали производственные штаммы *V. cholerae* 569В Инаба – продуцент токсина и О-антигена и *V. cholerae* М-41 Огава – продуцент О-антигена (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), которые выращивали при 37 °С в биореакторе на среде из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования. Культивирование прекращали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Расчеты коэффициентов дифференциальных уравнений осуществляли с использованием программы Mathcad 15.0.

Результаты и обсуждение

Нами сформулированы математические модели кинетики накопления О-антигена штамма *V. cholerae* М-41 серовара Огава, а также О-антигена и токсина штамма *V. cholerae* 569В серовара Инаба с лимитацией по углеродному субстрату. При разработке моделей были сделаны следующие основные допущения: биореактор является реактором идеального смешения; реологические свойства культуральной среды в реакторе остаются постоянными в течение всего процесса; неисследуемые параметры (температура, рН, концентрация растворенного кислорода) не являются лимитирующими в ходе всего процесса [2, 3].

Оптимальная температура проведения процесса культивирования поддерживалась системой автоматического регулирования. рН культуральной среды при снижении до 7,6 восстанавливали до 8,0 введением 10 % раствора аммиака. Содержание растворенного кислорода до минимального критического уровня 30 % поддерживалось при ранее экспериментально обоснованных режимах аэрации-перемешивания культуральной среды, позволяющих обеспечить массопередачу кислорода на уровне от 2,2 до 3,1 гО₂/(дм³/ч) [5]. При обильном пенообразовании данные режимы сохранялись за счет введения пеногасителя «Антиспумин ТЗ» в количестве (4,5±1,5) мл на 150 дм³ культуральной среды [1].

Система дифференциальных уравнений, характеризующая кинетику накопления О-антигена штамма *V. cholerae* М-41 серовара Огава, выглядела следующим образом (1):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times X, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{\left(1 + P/K_{iS}\right)} \times X, \text{ если } t \geq 3 \end{array} \right. \\ \frac{dS}{dt} = \left\{ \begin{array}{l} \frac{dS}{dt} = -\mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{X}{Y_{XS}}, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \end{array} \right. \end{array} \right. \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{\left(1 + \frac{P}{K_{IS}}\right)} \times \frac{X}{Y_{XS}}, \text{ если } t \geq 3$$

$$\frac{dP}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P\max} \frac{X^2}{(K_{pS} + X)} - K_{ip} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3 \end{cases}$$

где X – концентрация клеток *V. cholerae* М-41 серовара Огава, г/л; P – концентрация О-антигена, г/л; μ_{\max} – удельная максимальная скорость роста микроорганизмов, ч⁻¹; $q_{P\max}$ – удельная максимальная скорость образования О-антигена, ч⁻¹; S_L – текущая концентрация растворенной глюкозы, г/л; K_S , K_{IS} , K_p , K_{ip} – кинетические константы, г/л; Y_{XS} – расходный коэффициент, г/г.

Система дифференциальных уравнений, характеризующая кинетику накопления О-антигена и токсина штамма *V. cholerae* 569В серовара Инаба, выглядела следующим образом

(2):

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{dX}{dt} = \begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times X, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{\left(1 + \frac{P_1 + P_2}{K_{IS}}\right)} \times X, \text{ если } t \geq 3 \end{cases} \\ \frac{dS}{dt} = \begin{cases} \frac{dS}{dt} = -\mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{X}{Y_{XS}}, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ \frac{dS}{dt} = -\mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{\left(1 + \frac{P_1 + P_2}{K_{IS}}\right)} \times \frac{X}{Y_{XS}}, \text{ если } t \geq 3 \end{cases} \\ \frac{dP_1}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P\max1} \frac{X^2}{(K_{p1S} + X)} - K_{ip1} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3 \end{cases} \\ \frac{dP_2}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P\max2} \frac{X^2}{(K_{p2S} + X)} - K_{ip2} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3 \end{cases} \end{array} \right. \quad (2)$$

где X – концентрация клеток *V. cholerae* М-41 серовара Огава, г/л; P_1 – концентрация О-антигена, г/л; P_2 – концентрация токсина, г/л; μ_{\max} – удельная максимальная скорость роста микроорганизмов, ч⁻¹; $q_{P\max1}$ – удельная максимальная скорость образования О-антигена, ч⁻¹; $q_{P\max2}$ – удельная максимальная скорость образования О-антигена, ч⁻¹; S_L – текущая концентрация растворенной глюкозы, г/л; K_S , K_{IS} , K_{p1} , K_{ip1} , K_{p2} , K_{ip2} – кинетические константы; Y_{XS} – расходный коэффициент, г/г.

С использованием разработанной программы для ЭВМ в среде Mathcad при решении систем дифференциальных уравнений были определены значения кинетических коэффициентов и получены зависимости, характеризующие рост холерного вибриона, накопление антигенов и потребления глюкозы (рис.1 и рис. 2).

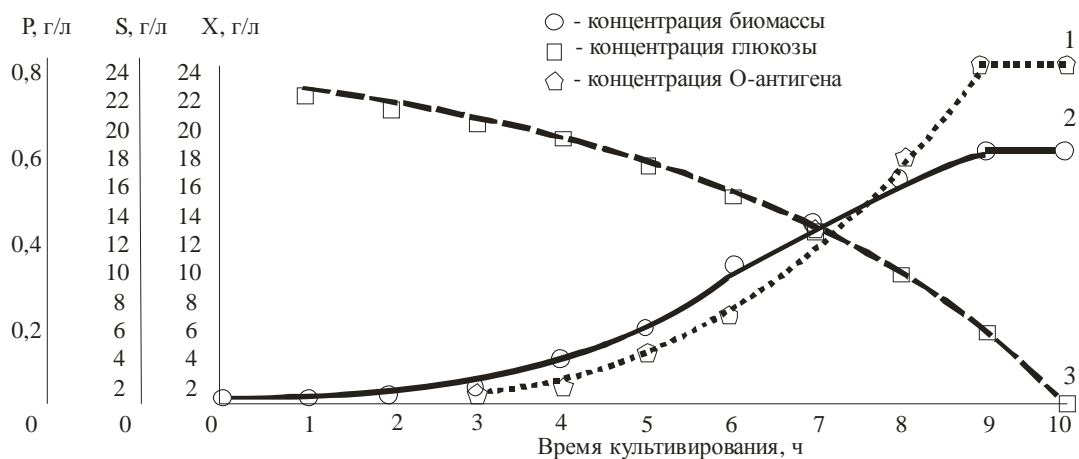


Рис. 1. Результаты моделирования процесса культивирования *V. cholerae* М-41 серовара
Огава

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

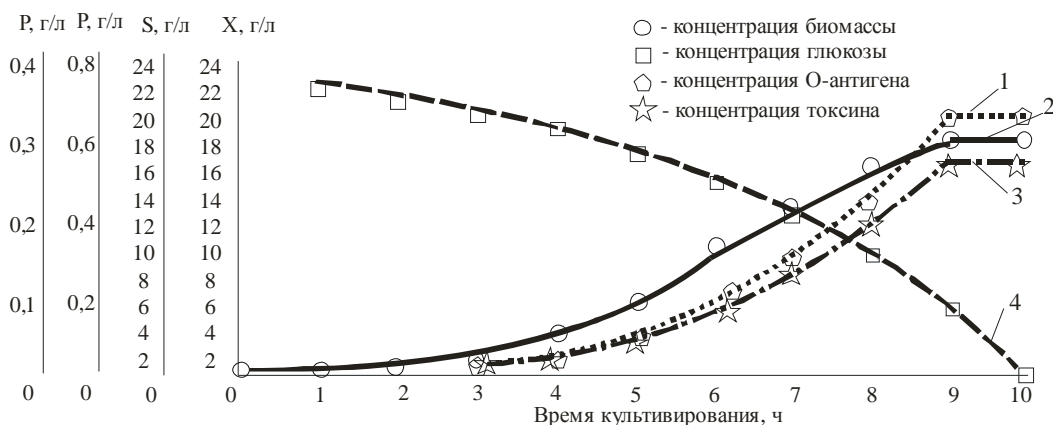


Рис. 2. Результаты моделирования процесса культивирования *V. cholerae* 569В серовара
Инаба

1 – динамика накопления О-антигена; 2 – кривая роста холерного вибриона;
3 – динамика накопления токсина; 4 – динамика потребления глюкозы

На основании кривой, характеризующей потребление глюкозы, был разработан и реализован алгоритм ее автоматического введения в культуральную среду при культивировании *V. cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба. Реализация данного алгоритма в условиях эксперимента показала удовлетворительную сходимость результатов моделирования.

Список литературы

1. Еремин С.А., Комиссаров А.В., Л.Ф. Ливанова, Беякова Н.И., Волох О.А., Васин Ю.Г., Никифоров А.К. Повышение эффективности процесса культивирования производственных штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов протективных антигенов в производстве вакцины

холерной химической таблетированной // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора (5-6 июня 2013 г.) / Ростов-на-Дону: Дониздат, 2013. – Вып. 26. – С. 226-228.

2. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.Н., 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 // Проблемы особо опасных инф. – 2013. – Вып. 1. – С. 91-93.

3. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.Н., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А. Математическая модель кинетики накопления антигенов в ходе периодического глубинного культивирования *Vibrio cholerae* 569В Инаба с лимитацией по углеродному субстрату // Проблемы особо опасных инф. – 2014. – Вып. 3. – С. 96-99.

4. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области профилактики особо опасных инфекционных бактериальных инфекций // Проблемы особо опасных инфекций. – 2006. – Вып. 2 (92). – С. 18-24.

5. Ульянов А.Ю., Никифоров А.К., Еремин С.А., Щербаков Д.А., Васин Ю.Г., Комиссаров А.В. Разработка биореактора и оценка возможности его использования в производстве холерной вакцины // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. – 2011. – № 1. – С. 39-44.

Рецензенты:

Похиленко В.Д., д.т.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Московская область, п. Оболенск;

Лещенко А.А., д.т.н., профессор, профессор кафедры микробиологии ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», г. Киров.