

В.А. Єрохін¹, О.В. Карпенко¹, Т.Я. Покинсьброда¹, В.І. Лубенець²¹Відділення фізико-хімії горючих копалин
Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка
НАН України²Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармацевції та біотехнології

ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ МАТЕМАТИЧНОГО МОДЕЛЮВАННЯ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНИХ УМОВ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН

© Єрохін В.А., Карпенко О.В., Покинсьброда Т.Я., Лубенець В.І. 2008

Вивчено можливість застосування методів математичного моделювання для оптимізації параметрів культивування мікроорганізмів. Підтверджено ефективність використання методу адитивно-решітчастих рівнянь для підбору складу поживного середовища. Застосування цього методу дає змогу розробити інокуляційне та ферментаційне поживні середовища, а також дослідити вплив їхніх компонентів на біосинтез продуктів.

Possibility of application of mathematical modeling for optimization of parameters of microorganisms cultivation was studied. Effectiveness of method of additive-grating equations using for selection of nutrient medium composition was confirmed. The possibility to elaborate inoculative as well as fermentative nutrient medium, and to investigate influence of their components for microbial products biosynthesis have been shown.

Постановка проблеми. Визначення оптимальних умов культивування мікроорганізмів є одним із найважливіших завдань у мікробіологічній та біотехнологічній практиці. Від вирішення цієї проблеми залежить ефективність усього процесу ферментації, як у лабораторних умовах, так і у промисловому виробництві. Насамперед це стосується вибору оптимального складу поживного середовища. Тут завдання ускладнюється тим, що поживне середовище являє собою складну за вмістом суміш речовин, що взаємопов'язані між собою. Окрім того, точні шляхи метаболізму конкретних компонентів середовища у мікробній клітині не завжди визначені. Тому вибрати оптимальне середовище для конкретного штаму мікроорганізму надзвичайно важко і у багатьох випадках можливо лише емпірично. Це вимагає здійснення великої кількості експериментів та затрат часу.

У зв'язку з цим доцільне застосування методів оптимізації поживного середовища, які дають змогу зменшити обсяги та час експериментальних досліджень. Зокрема, у біотехнології використовують методи математичного моделювання, які дають можливість визначити умови для досягнення максимального ефекту. Завдяки цим методам уможлиблюється ефективна оптимізація складу поживного середовища.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Основні принципи визначення складу поживного середовища подані в більшості довідників з фізіології мікроорганізмів та біотехнології [1, 2]. При застосуванні методів математичного моделювання методика постановки експерименту та оцінювання результатів залишаються без змін. Але експеримент планують з метою одержання найпростіших математичних моделей. Вони, як правило, виражаються у вигляді математичних функцій, що пов'язують початкові концентрації субстратів з концентрацією цільового продукту в кінці культивування і мають доволі наближений характер. Дійсна ж залежність визначається великою кількістю чинників і є відмінною для кожного конкретного біологічного процесу. Отже, жодна математична модель не є універсальною і по-різному ефективна у кожному окремому випадку.

Серед математичних методів оптимізації складу поживного середовища особливий інтерес викликає метод адитивно-решітчастих рівнянь завдяки своїй простоті та достатньо високій точності [3]. Суть методу полягає в тому, що залежність вихідних параметрів, за якими здійснюється

оптимізація, від вхідних величин, що оптимізуються, описується адитивною функцією (1), де кожна складова має вигляд решітчастого рівняння (2). Значення величин b_0 і b_{ik} розраховуються згідно з математичними формулами (3), (4).

$$y = b_0 + f_1[X_1] + f_2[X_2] + \dots + f_n[X_n]. \quad (1)$$

$$f_i[X_i] = \begin{cases} b_{i1} & \text{при } X_i = X_{i1} \\ b_{i2} & \text{при } X_i = X_{i2} \\ \vdots & \\ b_{ik} & \text{при } X_i = X_{ik} \end{cases} \quad (2)$$

$$b_0 = \frac{\sum_{j=1}^N y_j}{N}; \quad (3)$$

$$b_{ik} = \frac{\sum_{j=1}^N y_{ij}^k}{N/m} - b_0, \quad (4)$$

де y – вихідна величина, що піддається оптимізації; X – вхідні величини, фактори оптимізації; N – загальна кількість варіантів; m – кількість варіантів кожного фактора.

Для одержання адитивно-решітчастого опису необхідно мати певний набір експериментальних даних, у якому вхідні параметри $X_1 \dots X_n$ містяться у різних варіаціях згідно із заданою кількістю варіантів параметра X_i , причому дає змогу змінювати варіанти одночасно по всіх параметрах у випадковому порядку. Це істотно зменшує кількість необхідних експериментів.

Метою цієї роботи було визначення ефективності методу математичного моделювання з використанням адитивно-решітчастих рівнянь для оптимізації параметрів культивування мікроорганізмів. А також визначення оптимального складу двох поживних середовищ: інокуляційного – з високим виходом біомаси для посівного матеріалу та основного ферментаційного – з високим виходом цільового поверхнево-активного продукту.

Експериментальна частина. Об'єктом досліджень був бактеріальний штам *Pseudomonas species* PS-17 з колекції мікроорганізмів Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії ім. Л. М. Литвиненка НАН України.

Культивування виконували у лабораторних умовах в колбах Ерленмейера (750 мл), з робочим об'ємом 150 мл на ротаційній качалці (220 об/хв.) при температурі 30°C на рідкому поживному середовищі (1) такого складу (г/л): гліцерин – 45 г/л; NaNO_3 – 3,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 2,0; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; цитрат Na – 5,0 [4].

Як інокулянт використовували культуру, що вирощувалася протягом 24 год при 30 °C на рідкому поживному середовищі вказаного складу.

Поверхнево-активний біокомплекс виділяли з супернатанту культуральної рідини при підкисленні (10 % розчин HCl) до pH 2,5. Отриманий осад відділяли центрифугуванням при 8000 об/хв протягом 20 хв., висушували при 70°C до постійної маси.

Ліпіди виділяли з супернатанту культуральної рідини методом екстракції з подальшим упарюванням екстракту під вакуумом. Як екстрагент використовували розчин Фолча (хлороформ/метанол 2:1). Концентрацію рамноліпідних ПАР в екстракті визначали спектрофотометричним методом за концентрацією рамнози з використанням орцинового реактиву [5].

Концентрацію полісахариду визначали після його осадження ізопропанолом з супернатанту культуральної рідини за методом [6].

Емульгвальну активність визначали за індексом емульгування (E_{24}) методом [7].

Дані, одержані у результаті експерименту

№	Склад поживного середовища, г/л				Біомаса, г/л				Комплекс, г/л	Ліпіди, г/л	Рамноліїди, г/л	Полісахарид, г/л	Емульгування E ₂₄ , %	CMD	σ, мН/м
	глицерин	NaNO ₃	цитрат Na		24 год.	48 год.	72 год.	120 год.							
1	15	1	0		1,80	2,31	2,75	2,90	1,56	1,77	2,60	0,42	47	32	32,17
2	20	2	1		1,46	1,93	2,18	2,26	1,86	2,77	5,53	0,55	43	32	30,99
3	25	3	2		2,10	2,88	3,34	3,34	3,58	1,71	3,25	1,39	41	64	30,04
4	30	4	3		2,26	2,98	3,55	3,34	5,16	1,89	6,50	2,08	41	128	29,34
5	35	5	4		2,31	3,13	3,59	3,85	4,32	2,00	3,25	2,33	41	128	26,50
6	40	6	5		2,00	2,62	3,08	3,44	4,12	2,19	2,75	1,81	45	64	27,45
7	15	2	2		2,08	2,87	2,77	1,75	1,69	1,13	3,58	0,90	44	16	29,33
8	20	3	3		1,59	2,08	2,49	1,88	1,74	1,18	4,88	0,67	49	16	32,17
9	25	4	4		2,16	2,92	3,39	3,08	4,49	1,53	3,25	1,65	44	64	28,16
10	30	5	5		2,46	2,67	3,54	3,34	4,56	1,22	4,55	1,58	49	64	26,74
11	35	6	0		1,54	2,13	2,67	3,42	4,44	2,29	1,63	2,85	49	128	31,69
12	40	1	1		1,74	2,21	2,28	2,52	2,20	1,30	2,45	0,72	29	32	30,04
13	15	3	4		2,26	2,80	2,57	2,06	2,09	1,14	2,28	1,18	42	16	29,10
14	20	4	5		1,44	2,08	2,28	1,67	2,45	1,62	3,25	1,00	31	16	35,24
15	25	5	0		1,80	2,29	2,72	3,21	4,26	1,81	2,93	1,78	51	64	32,40
16	30	6	1		2,11	2,47	2,93	3,80	5,20	2,36	4,55	2,18	49	128	30,52
17	35	1	2		1,82	2,21	2,52	2,83	1,48	0,85	0,75	0,55	50	32	30,04
18	40	2	3		2,16	2,67	3,13	3,54	2,90	2,03	2,00	1,28	46	128	28,86
19	15	5	2		2,42	3,24	2,72	1,67	3,00	0,62	2,00	1,05	51	32	30,52
20	20	6	4		1,90	2,08	2,31	1,72	2,78	1,23	1,80	0,75	31	8	34,52
21	25	1	3		1,95	2,38	2,59	2,62	2,06	1,06	1,15	0,62	26	32	28,86
22	30	2	5		2,62	3,03	3,29	3,47	2,74	1,35	1,15	1,36	44	64	27,21
23	35	3	0		1,88	2,41	2,87	3,44	4,31	2,73	4,55	2,00	50	128	28,86
24	40	4	1		1,70	2,39	2,78	3,39	5,02	3,25	5,85	2,80	23	128	31,70

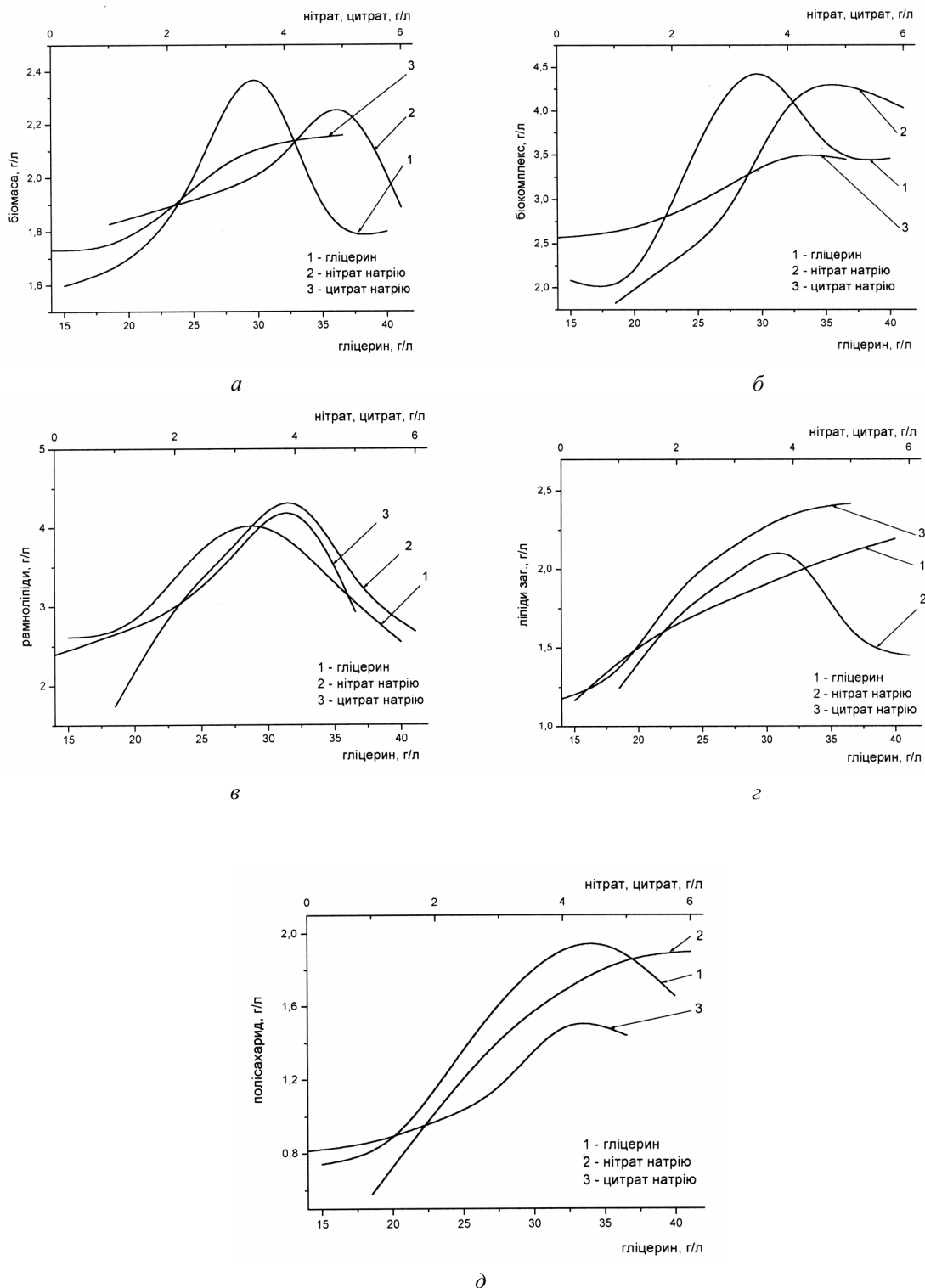


Рис. 1. Адитивно-решітчасті функції для компонентів поживного середовища відповідно до цільового продукту: а – біомаси; б – біокомплексу; в – рамноліпідів; г – загальних ліпідів; д – полісахариду

Поверхневий натяг визначали за методом [8] з платиновою пластинкою Вільгельмі.

Для оцінки відносної концентрації сумарних ПАР у культуральній рідині визначали параметр CMD (critical micelle dilution – критичне міцелярне розведення) [9] у нашій модифікації. Для визначення CMD вимірювали поверхневий натяг для ряду послідовних розведень і за отриманими даними будували графік залежності поверхневого натягу від кратності розведення культуральної рідини. Абсциса точки перетину дотичних до гілок кривої відповідає точці CMD.

Результати досліджень. Методом математичного моделювання визначено оптимальний склад поживного середовища для культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17. Раніше встановлено, що цей штам здатний утилізувати широкий спектр органічних субстратів і синтезувати позаклітинні поверхнево-активні речовини [10–13]. Ці ПАР являють собою речовини гліколіпідної природи, а саме гомологічні рамноліпіди. У культуральній рідині рамноліпіди утворюють поверхнево-активний комплекс з біополімером – полісахаридом. Цей комплекс має високу поверхневу активність, легко виділяється і може використовуватися як цільовий промисловий продукт [14].

Дослідження довели високу ефективність отриманих біоПАР, перспективи їхнього промислового виробництва та застосування.

Вхідними параметрами, що оптимізувалися, були вибрані початкові концентрації джерела вуглецю (гліцерину), азоту (NaNO_3) та цитрату натрію у шести варіантах. Решта компонентів середовища І вносилися без змін для зменшення обсягу експериментальних досліджень, оскільки їхній вплив на біосинтез незначний.

Як вихідні величини у ході культивування контролювалися концентрації біомаси і поверхнево-активних продуктів.

Таблиця 2

Оптимальні співвідношення компонентів поживного середовища

Продукт	Склад поживного середовища, г/л						Співвідношення C:N
	гліцерин	NaNO_3	цитрат натрію	KH_2PO_4	K_2HPO_4	$\text{MgSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	
– біомаса	30	5	5	2	1,2	0,5	14:1
– біокомплекс	30	5	4	2	1,2	0,5	14:1
– ліпіди загальні	40	4	5	2	1,2	0,5	16:1
– рамноліпіди	30	4	4	2	1,2	0,5	18:1
– полісахарид	35	6	4	2	1,2	0,5	12:1

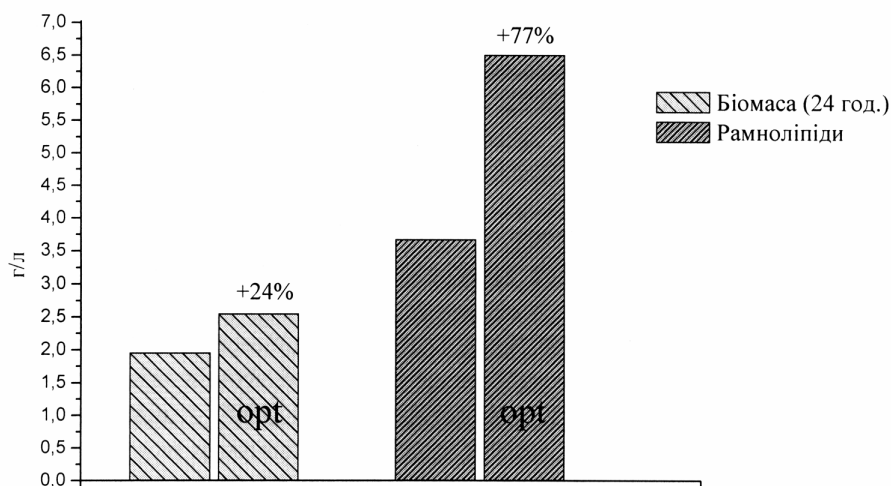


Рис. 2. Вихід основних цільових продуктів культивування штаму *Pseudomonas* sp. PS-17 до та після оптимізації відповідно

Згідно з методикою із 216 (6^3) можливих співвідношень компонентів середовища для експериментів було вибрано 24 варіанти. Одержані дані наведено у табл.1. Для математичного моделювання було вибрано ключові продукти, які визначають ефективність біосинтезу. Для кожного з цих продуктів були розраховані адитивно-решітчасті функції, зображені на рис. 1.

З наведених графіків видно, що всі компоненти поживного середовища, що підлягали оптимізації (гліцерин, нітрат, цитрат), мають певні концентрації, за яких досягається максимальний

вихід відповідного продукту. Отже, математична обробка результатів дала змогу отримати оптимальні співвідношення компонентів поживного середовища із заданими вихідними параметрами (табл. 2).

Отже, в результаті одного експерименту було отримано одразу цілий набір поживних середовищ, оптимальних для накопичення відповідного продукту. Аналіз результатів культивування штаму-продуценту на одержаних оптимізованих поживних середовищах порівняно із початковим середовищем 1 показав можливість збільшення виходу біомаси на 24 %, а поверхнево-активних рамноліпідів на 77 % відповідно (рис. 2).

Як правило, процеси мікробного синтезу у біотехнологічній промисловості відбуваються у дві стадії. Перша – стадія інокуляції, що має за мету максимальне накопичення активної біомаси штаму-продуценту. Друга – стадія товарної ферментації, яка спрямована на максимальний вихід цільового продукту. Такий двостадійний процес дає змогу істотно збільшити ефективність виробництва. Тому в промисловості використовуються два поживні середовища: інокуляційне – для накопичення біомаси та ферментаційне – для накопичення продукту. З огляду на це, цей метод оптимізації доцільно застосовувати для одночасного визначення оптимального складу обидвох поживних середовищ двостадійного біотехнологічного виробництва.

Висновки

1. Підтверджено ефективність використання методу математичного моделювання з використанням адитивно-решітчастих рівнянь для оптимізації параметрів культивування мікроорганізмів.
2. Цей метод дає змогу одержати цілий набір поживних середовищ, оптимальних для біосинтезу відповідних продуктів.
3. Використання зазначеного методу дає змогу одночасно з оптимізацією поживного середовища досліджувати вплив його компонентів на біосинтез окремих продуктів.
4. Виконані дослідження мають практичне значення, оскільки розроблені оптимальні за складом інокуляційне та ферментаційне середовища, що важливо для ефективного промислового біотехнологічного виробництва.

1. *Определитель бактерий Берджи* // Под ред. Дж.Хоулта, Н. Крига, П. Снита. – М.: Мир, 1997. – 368 с. 2. Дж. Мейнелл, Э.Мейнелл. *Экспериментальная микробиология* // М.: Мир, 1967. – 348 с. 3. Бирюков В.В., Кентере В.М. *Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза* // М.: Наука, 1985. 4. Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В., Новіков В.П. *Дослідження росту та синтезу цільового продукту штамом Pseudomonas species PS-17 – продуцентом позаклітинних біосурфактантів* // Вісник Національного університету „Львівська політехніка”. Львів: НУ “ЛП”, 2006. 5. Ando S., Saito M. *Chromatography lipid, biomedical research and chemical diagnostic* // Elsevier.: Amsterdames. – 1987. – P.266–310. 6. *Методы общей бактериологии* // Под. ред. Ф. Герхарда. – М.: Мир, 1983. – Т.1 – 535 с. 7. Кучер Р.В., Лесик О.Ю., Карпенко О.В. *Емульгування вуглеводнів – нова властивість культури дріжджів Phaffia rhodozyma* // Доп. АН УРСР. Сер.Б. Геол., хім. та біол. науки. – 1990 – № 8 – С.49–53. 8. *Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсии* // Под ред. К. Муттела. – М.: Мир, 1980. – 597 с. 9. Desai J., Vanat I. *Microbial production of surfactants and their commercial potential* // *Microbiology and molecular biology reviews*. – Mar. 1997 – p. 47–64. 10. Карпенко Е.В., Шульга А.Н., Туровский А.А. *Поверхностно-активные соединения культуры Pseudomonas sp. PS-17* // *Мікробіол. журн.* – 1996. – Т.58 – № 5. – С.18–24. 11. Карпенко Е.В., Щеглова Н.С., Вильданова Р.И. *Поверхностно-активный биопрепарат. 2004, Патент України, N 71222, Бюл. N 12.* 12. Vasileva-Tankova E., Galabova D., Karpenko E., Shulga A. *Biosurfactants-rhamnolipid effects on yeast cells* // *Letters in Applied Microbiology*, 2001, V.33, P.280-284. 13. Sotirova A., Galabova D., Shulga A., Karpenko E. *Effects of biosurfactant-rhamnolipid on bacterial growth and protein release.* – *Ecological Engineering and Environmental Protection.* – 2003, V.1. 14. Єрохін В.А., Покинсьброда Т.Я., Карпенко О.В. *Поверхнево-активні препарати на основі продуктів біосинтезу штаму Pseudomonas sp. PS-17* // *Збірник наук. праць ДонНТУ, серія “Хімія і хімічна технологія”, 2007.*