УДК 631.861.871

АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО СИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ В ХОДЕ БИОКОНВЕРСИИ ОРГАНИЧЕСКОГО СЫРЬЯ

В.П. Молчанов, Ю.Ю. Косивцов, М.Г. Сульман, К.М. Хуснутдинова

Тверской государственный технический университет, г. Тверь

В статье рассмотрены вопросы кинетического моделирования и оптимизации ферментативных процессов биокаталитического синтеза свободных аминокислот в ходе биоконверсии органического сырья.

Ключевые слова: *кинетическое моделирование, оптимизация биокаталитического синтеза, синтез свободных аминокислот, биоконверсия.*

Одними из важнейших задач, при решении которых применяется кинетическое моделирование ферментативных процессов, являются исследование и разработка новых технологий и проектирование новых производств, оптимизация отдельных аппаратов и технологических схем, разработка методов управления процессами биоконверсии и их автоматизация [1]. Существует два основных подхода к моделированию процессов биоконверсии: физико-химический и математический.

Физико-химическое моделирование позволяет исследовать процессы, сущность которых мало изучена, проводить на моделях большое количество измерений, которые невозможно осуществить в обычных условиях, оно требует меньших затрат и менее опасно для окружающей среды, чем промышленные эксперименты.

Для оптимизации и управления современными процессами биоконверсии, разработки новых процессов недостаточно физико-химического моделирования, необходимо создание математических моделей, в основу которых положены знания о взаимосвязи большого числа физико-химических, биохимических и микробиологических факторов. Математическая модель этой сложной системы должна включать описание разных по природе объектов и явлений: клеток и их популяций, их взаимодействие с параметрами культивирования, химических превращений, массообмена, гидродинамики, теплообмена и др. Модель также должна учитывать возможность управления процессом биоконверсии.

При моделировании биоконверсии процесс рассматривают как сложную систему, анализируя ее методом декомпозиции, т. е. выделяя ряд подсистем меньшей сложности. Методами биокинетики строятся

модели различных явлений, присущих данным процессам: тепло- и массообмена, кинетики биохимических превращений, роста популяции, причем другие параметры процесса рассматриваются как внешние. Биокинетика как отрасль современной физической химии и молекулярной биологии ставит своей задачей исследование молекулярных механизмов, определяющих динамику биологических процессов [2]. В первую очередь для определения механизмов биопревращений проводят кинетический эксперимент по измерению концентрации одного из веществ с течением времени и в зависимости от ряда наиболее информативных параметров (температуры, влажности, порозности, pH и др.). Результатом кинетического эксперимента являются кинетические кривые (обычно графики зависимости концентрации веществ от времени процесса), которые отражают качественные изменения концентраций веществ, происходящих в ходе биопревращений. Количественное описание изменений становится возможным при помощи дифференциальных и интегральных кривых.

В основу большинства кинетических моделей ферментативных процессов положено допущение о периодическом росте клеточной популяции, при котором в биореактор в ходе всего процесса ничего не добавляется и из него ничего не выделяется (за исключением газов). Для типичного периодического процесса (*in vitro*) число живых клеток изменяется во времени. При этом на кривой роста можно выделить ряд основных переходных состояний, именуемых фазами:

1. Лаг-фаза (фаза задержки, латентная фаза), в течение которой численность популяции практически не меняется. В этот период не наблюдают сколько-нибудь заметного увеличения концентрации продуктов ферментативных превращений.
2. Фаза экспоненциального роста, для которой характерен быстрый рост популяции клеток и продуктов клеточного метаболизма.
3. Стационарная фаза. Наблюдается вслед за фазой замедления роста, при этом число клеток, достигнув максимума, практически не меняется.
4. Фаза отмирания культуры, в которой преобладают процессы гибели клеток. Зачастую для фазы отмирания характерно экспоненциальное снижение численности микроорганизмов.

В ферментативных процессах важную роль может играть любая из фаз. Так, при разработке процесса одной из задач может быть сокращение до минимума продолжительности лаг-фазы и достижение максимальной длительности фазы экспоненциального роста (и скорости роста клеток в этой фазе); вторая цель, в свою очередь, достигается путем искусственного торможения перехода к стационарной фазе.

Экспоненциальный рост заканчивается, когда одна из важных переменных процесса (например, концентрация питательного вещества

– лимитирующего субстрата или токсина) достигает уровня, не обеспечивающего дальнейший рост клеток.

Согласно этим допущениям строятся модели биосинтеза или биодеградации тех или иных органических соединений в ходе ферментации. Многие из существующих моделей поддерживаются системами уравнений на основе модификаций уравнения Моно [3].

К числу наиболее ценных компонентов, образующихся в ходе биоконверсии органического сырья, по праву относят свободные аминокислоты. В связи с этим выявление в продуктах ферментации микроорганизмов, синтезирующих аминокислоты (аминокислотсинтетиков), можно рассматривать в качестве опосредованного способа определения потенциальной ценности конечного продукта, рекомендуемого к использованию в качестве удобрения или кормовой добавки. В проведенных экспериментах относительное содержание аминокислотсинтетиков достигало высоких значений в ходе всего процесса, что дало основания предполагать накопление в конечном продукте мономеров белковой субстанции (аминокислот) и сделать вывод о перспективности исследуемого процесса. В свою очередь, кинетическое моделирование роста группы аминокислотсинтезирующих микроорганизмов приобретает особую ценность для изучения и оптимизации процесса биоконверсии органического сырья с целью получения конечного продукта, максимально обогащенного свободными аминокислотами. Ввиду того что в процессе инкубации популяция аминокислотсинтетиков большую часть времени находится в стадии экспоненциального роста, для получения математического описания может быть использовано классическое уравнение Моно:

$$\mu = \frac{\mu_m \times S}{K_S + S} \quad , \qquad (1)$$

где μ – удельная скорость роста, 1/час; μ_m – максимальная скорость роста, 1/час; S – концентрация лимитирующего субстрата в массовых процентах; K_S – постоянная сродства субстрата к микроорганизму.

В качестве лимитирующего субстрата обычно выступает наиболее важный компонент среды, обеспечивающий биосинтетические основы метаболизма и регулирующий в той или иной степени скорость роста микробной культуры [4]. Обнаруженная зависимость скорости развития популяции аминокислотсинтетиков от концентрации в смеси биостимуляторов (солей аскорбиновой кислоты) позволяет сделать предположение о том, что именно эти вещества играют роль лимитирующего субстрата.

Определение кинетических параметров уравнения Моно (максимальной скорости роста и константы сродства субстрата к

микроорганизму) может быть произведено путем линеаризации опытных данных в двойных обратных координатах в соответствии со следующим соотношением:

$$1/\mu = \left(K_S/\mu_m\right)\left(1/S\right) + \left(1/\mu_m\right) \qquad (2)$$

Исходные данные для построения графиков в координатах уравнения (2) содержатся в табл. 1. Следует отметить, что для решения поставленной задачи могут быть использованы только те значения удельной скорости роста, которые достигаются при внесении в исходную смесь биостимуляторов в концентрациях, не превышающих оптимальные, поскольку дальнейшее повышение содержания аскорбинатов приводит к описанному ранее эффекту ингибирования популяции.

Таблица 1

Удельная скорость роста аминокислотсинтезирующих микроорганизмов при внесении различных биостимуляторов

Вносимый аскорбинат	Удельная скорость роста при добавлении аскорбината в концентрации, 1/час				
	0.025 %	0.030 %	0.045 %	0.070 %	0.090 %
Аскорбинат Ca	0.0100	0.0130	0.0151	0.0114	0.0112
Аскорбинат K	0.0051	0.0054	0.0072	0.0049	0.0041
Аскорбинат Co	0.0058	0.0062	0.0069	0.0059	0.0046
Аскорбинат Zn	0.0166	0.0168	0.0175	0.0170	0.0166
Аскорбинат Fe	0.0100	0.0115	0.0164	0.0097	0.0081

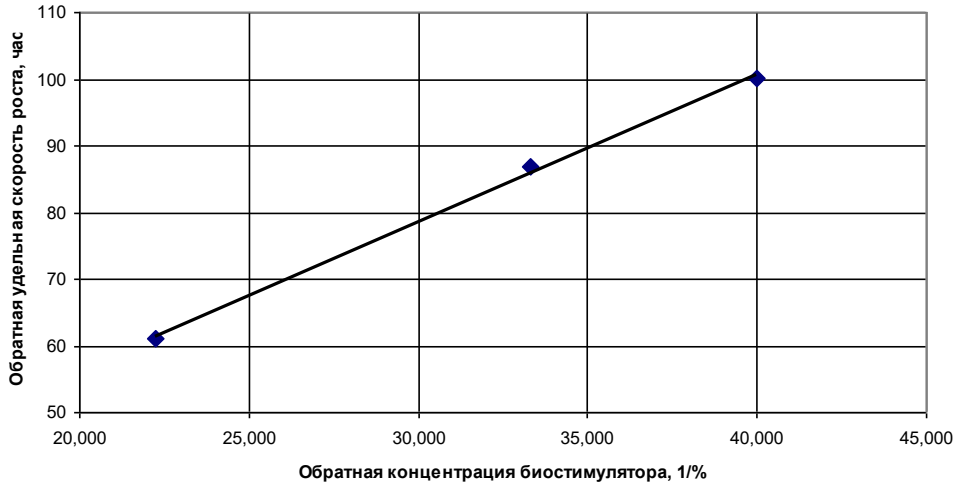


Рис. 1. Определение параметров уравнения Моно в опытах с аскорбинатом железа

Для примера на рис. 1 приведен график зависимости удельной скорости роста аминокислотсинтетиков от концентрации

биостимулятора в двойных обратных координатах уравнения Моно для экспериментов с использованием аскорбината железа. Видно, что в указанном случае имеет место высокая степень линеаризации данных. Аналогичная картина наблюдается и при внесении других биостимуляторов, что подтверждает правильность гипотезы о возможности использования содержания аскорбинатов в качестве концентрации лимитирующего развитие культуры субстрата.

При помощи соотношения (2) были определены кинетические параметры роста аминокислотсинтезирующих микроорганизмов при добавлении к исходной смеси различных солей аскорбиновой кислоты. Результаты расчетов приведены в табл. 2.

Таблица 2

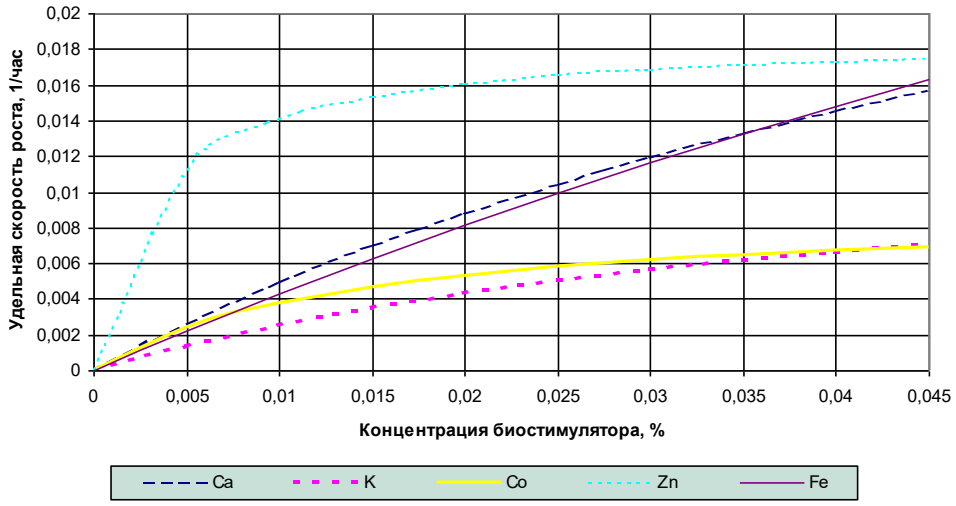
Кинетические параметры роста аминокислотсинтетиков при добавлении различных биостимуляторов

Вносимый аскорбинат	Максимальная скорость роста, 1/час	Константа сродства субстрата к микроорганизму, %
Аскорбинат Co	0.009	0.014
Аскорбинат K	0.015	0.049
Аскорбинат Ca	0.042	0.077
Аскорбинат Zn	0.019	0.003
Аскорбинат Fe	0.082	0.180

Представленные данные показывают, что, например, при внесении аскорбината железа максимальная скорость роста культуры имеет наибольшее значение, тем не менее высокое значение константы сродства субстрата к микроорганизму в этом случае в соответствии с уравнением (1) снижает реально достигаемые в ходе инкубации скорости развития популяции аминокислотсинтетиков. Для более наглядного анализа полученных значений кинетических параметров на рис. 2 приведены графики в координатах уравнения Моно, характеризующие процесс микробного развития при добавлении солей аскорбиновой кислоты различных металлов.

Видно, что при использовании аскорбината цинка стабильно высокие значения удельных скоростей роста наблюдаются в широком диапазоне концентрации биостимулятора, но применение аскорбината железа потенциально более эффективно с точки зрения развития популяции аминокислотсинтетиков. Вместе с тем в последнем случае достижение высоких значений скорости роста резко ограничивается при повышении содержания стимулятора ввиду наличия ингибирующего эффекта. В этой связи не исключено, что в дальнейшем имеет смысл провести масштабные поисковые исследования для нахождения другого биологически активного вещества, содержащего катионы железа, которое при добавлении к исходной смеси не будет вызывать ингибирования и позволит тем самым более существенно

интенсифицировать развитие популяции аминокислотсинтезирующих микроорганизмов. Однако следует подчеркнуть, что указанные выше эксперименты могут привести к положительному результату только в том случае, если наблюдаемое угнетение микробного роста обусловлено действием кислотного остатка вносимых в смесь аскорбинатов, а не катионов металлов, входящих в состав этих биостимуляторов.



Р и с . 2 . Кинетика роста аминокислотсинтетиков в координатах уравнения Моно

В ходе проведенных исследований влияния различных аскорбинатов на процесс биоконверсии органического сырья был выявлен целый ряд закономерностей, в соответствии с которыми в ферментируемой смеси происходит образование и накопление свободных аминокислот, а также развитие популяции микроорганизмов, осуществляющих процесс биоферментации. Кроме того, были определены оптимальные условия проведения биоконверсии, поддержание которых приводит к наибольшему росту численности аминокислотсинтезирующих микроорганизмов и к достижению максимальной концентрации аминокислот по окончании инкубации, что обусловливает образование ценного продукта ферментации, приближенного по своим свойствам к высокоэффективным удобрениям и кормовым добавкам. Следует подчеркнуть, что найденные оптимальные условия не являются универсальными, т. е. для получения продуктов биоконверсии с другими заданными свойствами необходимо проведение исследований по определению таких условий, которые будут наиболее благоприятными для преимущественного развития в смеси целевых микробиологических процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-00256).

Список литературы

1. Осадочная А.И., Подгорский В.С., Семенов В.Ф. Биотехнологическое использование отходов растениеводства. Киев: Наукова думка, 1990. 183 с.
2. Березин И.В., Варфоломеев С.Д. Биокинетика. М.: Наука, 1979. 310 с.
3. Косивцов Ю.Ю. Математическое моделирование процессов гидрирования в синтезе витаминов: дис. ... канд. техн. наук. Тверь, 1996. 129 с.
4. Варфоломеев С.Д., Калюжный С.В. Биотехнология: кинетические основы микробиологических процессов. М.: Высш. Шк., 1990. 296 с.

KINETIC ANALYSIS OF THE ENZYMATIC BIOCATALYTIC PROCESSES FOR THE SYNTHESIS OF AMINO ACIDS IN THE COURSE OF BIOCONVERSION OF ORGANIC RAW MATERIALS

V.P. Molchanov, Yu.Yu. Kosivtsov, M.G. Sulman, K.M. Husnutdinova

Tver State Technical University, Tver

In the article the questions of kinetic modeling and optimization of enzymatic processes of biocatalytical synthesis of free amino acids in the course of bioconversion of organic raw materials.
Keywords: *kinetic modeling, optimization of biocatalytic synthesis, synthesis of free amino acids, bioconversion.*

Об авторах:

МОЛЧАНОВ Владимир Петрович – кандидат химических наук, доцент кафедры стандартизации, сертификации и управления качеством Тверского государственного технического университета (ТвГТУ), e-mail: science@science.tver.ru

КОСИВЦОВ Юрий Юрьевич – доктор технических наук, профессор кафедры стандартизации, сертификации и управления качеством ТвГТУ, e-mail: kosivtsov@science.tver.ru

СУЛЬМАН Михаил Геннадьевич – доктор химических наук, профессор, заместитель проректора по научной работе ТвГТУ, e-mail: sulman@online.tver.ru

ХУСНУТДИНОВА Кристина Маратовна – студентка химико-технологического факультета ТвГТУ, e-mail: huskris95@gmail.com

Поступила в редакцию 22 августа 2017 г.