

С.Д. Варфоломеев, С.В. Калюжный

# БИО- ТЕХНОЛОГИЯ



## Кинетические ОСНОВЫ микробиологических процессов

Допущено  
Государственным комитетом СССР по народному образованию  
в качестве учебного пособия для студентов биологических  
и химических специальностей высших учебных заведений



Москва  
«Высшая школа» 1990

ББК 30.16  
В18  
УДК 574.6

Рецензенты:

кафедра микробиологии (зав. кафедрой — проф. А. Лещнер) и лаборатория биоорганической химии (зав. лабораторией доц. Я. Яров) Гартуского государственного университета; акад. АН ЧСФР, проф. К. Мартинек

**В18** Варфоломеев С. Д., Калужный С. В.  
Биотехнология: Кинетические основы микробиологических процессов: Учеб. пособие для биол. и хим. спец. вузов. — М.: Высш. шк., 1990. — 296 с.: ил.  
ISBN 5-06-000645-X

Изложены основы и методы анализа кинетики микробиологических процессов. Детально рассмотрены аналитические модели клеточного роста, кинетические закономерности роста микробных популяций в различных режимах, методы определения кинетических параметров процессов. Дан количественный анализ факторов, осложняющих рост микроорганизмов, и проиллюстрированы возможности применения компьютерного анализа для исследования закономерностей микробной кинетики.

В  $\frac{1903010000 (4309000000) - 462}{001 (01) - 90}$  129 — 90

ББК 30.16  
605

ISBN 5-06-000645-X

© С. Д. Варфоломеев, С. В. Калужный, 1990

## ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние десятилетия непрерывно возрастает интерес к изучению и практическому использованию микроорганизмов, мир которых чрезвычайно многообразен и динамичен. Микроорганизмы играют большую роль в природных процессах и в течение многих лет являются «полигоном», где современная наука исследует фундаментальные основы живой материи. Достаточно сказать, что нынешнее здание науки о молекулярных механизмах наследственности в значительной степени создано в результате изучения микробиологических объектов. Микробиология — это и фундамент современной биотехнологии. Ряд микробиологических систем в настоящее время уже весьма продуктивно используется в крупномасштабных производственных процессах. Еще более привлекательны возможности, открываемые при использовании в микробиологической практике генетической инженерии, а также весьма перспективно создание принципиально новых процессов на основе ферментных систем микроорганизмов. Все это служит мощным стимулом для дальнейшего совершенствования работ по количественному описанию роста и развития микробных популяций.

В настоящее время количественная микробиология, основанная на химико-кинетическом моделировании процессов микробного роста, является активно развивающейся областью биокинетики, имеющей много интересных фундаментальных и практических приложений.

Изучение кинетических основ микробиологических процессов широко представлено в учебных планах химико-биологических факультетов университетов и ряда технологических вузов. Однако до настоящего времени в учебной литературе отсутствует сколько-нибудь полное и последовательное изложение количественных основ роста и развития микробных популяций. Данное учебное пособие призвано восполнить этот пробел. Основой для написания этой книги послужили исследования, проводимые в Московском университете, а также курсы лекций, читаемых на химическом и биологическом факультетах.

Курс рассчитан на читателей, владеющих основами дифференциального и интегрального исчисления в объеме общих курсов математического анализа вузов. Основная задача книги — изложение кинетических закономерностей, наблюдаемых при росте микробных популяций, с целью дать экспериментатору достаточно простые и надежные методы, позволяющие выявить наиболее характерные особенности исследуемого процесса (например, истощение субстрата, ингибирование роста культур избытком субстрата или продуктом, лизис и др.).

В первую очередь внимание было обращено на анализ кинетических закономерностей автокаталитического роста микробных популяций в закрытых системах при периодическом культивировании. Дано кинетическое обоснование зависимости роста микроорганизмов от концентрации лимитирующего субстрата, рассмотрен ряд механистических моделей, позволяющих получить уравнение роста популяции на основе использования современных представлений о механизмах

конверсии генетической информации при биосинтезе белка и нуклеиновых кислот (синтез ключевых метаболитов, репликация, транскрипция, трансляция). Сделан анализ абсолютных скоростей роста популяций с выявлением предельных и наиболее типичных, «средних», скоростей роста микроорганизмов. Была предпринята попытка связать изучаемые кинетические параметры с конкретными молекулярно-биологическими процессами, протекающими в живой микробной клетке.

Значительное внимание в книге уделено анализу интегральных кинетических кривых роста микробных популяций с учетом различных осложняющих факторов. Рассмотрены проблемы кинетической дискриминации механизмов ингибирования, обсуждены механизмы процессов, приводящих к появлению на кинетической кривой роста периодов индукции.

Изложена кинетическая теория роста популяций микроорганизмов при непрерывном культивировании в проточных системах. Как и для периодического культивирования, основное внимание обращено на кинетическое описание процессов с осложняющими факторами.

Использование методов кинетического моделирования с помощью ЭВМ позволяет на качественно новом уровне решать ряд вопросов кинетической микробиологии. В данной книге обсуждаются принципы кинетического моделирования роста микроорганизмов, на основе использования методов численного интегрирования дан ряд качественных подходов, позволяющих идентифицировать особенности роста популяции; рассмотрены кинетические модели роста с учетом лизиса клеток, проблемы моделирования развития смешанных и симбиотрофных культур; анализируются закономерности роста фотосинтезирующих микробных популяций.

Методы анализа по мере возможности иллюстрируются литературными данными или данными, полученными авторами книги.

Весьма полезным представляется наличие в учебном пособии задач, что поможет читателю лучше понять теоретические и практические аспекты кинетики роста микробных популяций.

Авторы выражают благодарность чл.-кор. АН СССР Е. Н. Кондратьевой, а также рецензентам — академику АН ЧСФР К. Мартинеку и коллективам кафедры микробиологии (зав. кафедрой — проф. А. Ленцнер) и лаборатории биоорганической химии (зав. лабораторией — доц. Я. Ярв) Тартуского государственного университета за помощь и ценные замечания при написании учебного пособия.

Поскольку настоящее издание является первой попыткой создания учебного пособия такого рода, оно не свободно от недостатков. Авторы будут признательны читателям, которые сообщат свои пожелания, направленные на улучшение книги, по адресу: 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул., д. 29/14, Издательство «Высшая школа».

*Авторы*

## ВВЕДЕНИЕ

Каковы основные закономерности протекания во времени биологического процесса на молекулярном или клеточном уровне? Каковы пути и возможности ускорения процесса? Какая стадия определяет скорость того или иного биологического явления? Постановка такого рода интересных, хотя и сложных, вопросов связана с развитием области количественных биологических исследований, получившей название *биокинетики*.

В задачи биокинетики входят выяснение механизмов, определяющих скорости биологических процессов, и выявление их лимитирующих стадий. Составной частью биокинетики является математическое описание протекания биопроцесса во времени при использовании молекулярных представлений и законов физической и химической кинетики. В настоящее время биокинетика является основой управляемого количественного биосинтеза.

Данная книга посвящена изложению одной из важных частей биокинетики — анализу кинетических закономерностей роста и развития микробных популяций. По своей природе микробиологические процессы представляют собой ферментативные реакции, протекающие в полиферментных системах при переменной концентрации катализаторов (ферментов). Специфической особенностью роста микроорганизмов является автокаталитический характер процесса, определяемый увеличением общей концентрации ферментов в системе по мере развития популяции. В силу этого оказывается целесообразным применение в микробиологии ряда формальных методов и приемов, развитых при анализе кинетических закономерностей ферментативного катализа.

Культивирование (рост) микроорганизмов может осуществляться в двух основных режимах: периодическом и непрерывном. Первый тип культивирования относится к процессам в закрытых системах, второй — к открытым.

Вопросы кинетического описания роста микробных популяций давно привлекают внимание ученых. В конце 40-х годов нашего столетия Моно обнаружил и обосновал связь между скоростью роста культур микроорганизмов и концентрацией в среде лимитирующего субстрата. После этого работы по кинетическому моделированию роста культур микроорганизмов получили достаточно большое распространение. Широкое применение нашли методы непрерывного культивирования микроорганизмов, и, как следствие, возникла кинетическая теория, адекватно и плодотворно описывающая процессы роста микроорганизмов в открытых системах при непрерывном культивировании (Н. С. Печуркин, 1978; Дж. Перт, 1978; Н. С. Печуркин, И. А. Терсков, 1979). Важно отметить, что в развитие кинетической микробиологии большой и во многом определяющий вклад внесли советские исследователи Н. Д. Иерусалимский, Н. С. Печуркин, И. А. Терсков.

Современный этап исследований в области кинетического описания микробиологических процессов характеризуется рядом особенностей. Во-первых, дальнейшее развитие получают экспериментальные методы

исследования процессов, протекающих в микробной системе, в результате чего становятся доступными многопараметрические измерения, анализ многокомпонентных систем, детальный биохимический анализ микромолекулярных биосистем. Все это приводит к росту количественной точности, полноты, информативности микробиологического эксперимента. Во-вторых, заметное развитие получили методы аналитического рассмотрения кинетики роста микробных популяций, что позволяет иметь богатую информацию о природе процессов на основе первичных данных роста микробной культуры. В-третьих, кардинальные изменения произошли в связи с использованием электронно-вычислительных машин для анализа и кинетического моделирования микробиологических процессов.

Обсуждаемые в книге методы и подходы, с одной стороны, направлены на то, чтобы выработать у читателя навыки анализа особенностей протекания процесса микробного роста, создания представлений о механизмах явления, с другой стороны, дают возможности поиска оптимизации микробного процесса. Таким образом, рассматриваемые в данной книге кинетические основы микробиологических процессов важны при решении вопросов как фундаментальной, так и прикладной микробиологии. Последнее следует подчеркнуть особо. Биотехнология в разных ее аспектах начинает играть все большую роль в технологическом обеспечении современного общества, и при этом возрастает роль новых, перспективных и экологически безопасных процессов, основанных на использовании микроорганизмов.

По своей природе предмет обсуждения данной книги является междисциплинарным. Методологической основой книги служат законы химической кинетики. Решение многих вопросов, связанных с ростом микробных популяций, как уже отмечалось выше, основано на использовании методов, подходов и решений, найденных при изучении кинетических закономерностей ферментативного катализа. Природа изучаемых явлений имеет молекулярно-биологический, а также надмолекулярный, клеточный, уровень. Раскрытие механизмов микробного роста часто делается с помощью математического аппарата дифференциального и интегрального исчисления, теории систем дифференциальных уравнений с элементами использования электронно-вычислительных машин.

Все выше упомянутое говорит о том, что кинетическая микробиология — довольно сложная область, имеющая комплексный характер. Однако читателя не должны пугать эти сложности. Проникновение различных разделов друг в друга является отличительной чертой современной науки и техники. Следует пожелать читателю успехов в изучении и использовании кинетических основ клеточного роста, изложенных в этой книге.

# ГЛАВА 1

## КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РОСТА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Кинетические кривые роста микроорганизмов в закрытых системах (периодическое культивирование) имеют сложный характер (рис. 1.1). Выделяют несколько фаз в развитии культуры.

1. После введения инокулята обычно наблюдают *индукционный период (лаг-фазу) (1)*, в течение которого не происходит сколько-нибудь заметного увеличения числа клеток или образования каких-либо продуктов. В этот период перестраивается метаболизм клетки, синтезируются ферменты, специфичные к использованию новых субстратов, активируется биосинтез белка.

2. Индукционный период сменяется *фазой экспоненциального роста (2)*, в течение которой быстро накапливаются биомасса и продукты разных реакций. Эта фаза достаточно строго описывается экспоненциальной кривой.

3. В замкнутой системе экспоненциальная фаза роста не может развиваться неограниченно. Как правило, она переходит в *фазу линейного роста (3)*, характеризующуюся равномерным во времени линейным ростом культуры. В этой фазе уже не наблюдается линеаризации кинетических кривых роста в полулогарифмических координатах, т. е. имеет место отклонение точек в сторону меньших значений количества клеток или продуктов, что служит экспериментальным критерием перехода культуры в линейную фазу роста.

4. Фаза линейного роста может смениться весьма непродолжительным периодом, в течение которого скорость роста культуры снижается до нуля. Это *фаза замедления роста (4)*.

5. В некоторых случаях рост культуры может переходить в достаточно

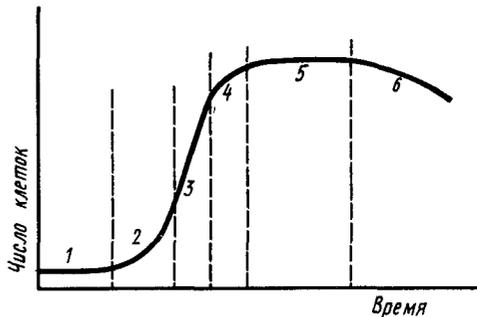


Рис. 1.1. Типичная кинетическая кривая роста популяции микроорганизмов:

1 — индукционный период; 2 — фаза экспоненциального роста; 3 — фаза линейного роста; 4 — фаза замедления роста; 5 — стационарная фаза; 6 — фаза отмирания культуры

устойчивую и продолжительную *стационарную фазу*. В этих условиях культура развивается в режиме постоянства общего числа клеток. Режим характеризуется достаточно высокими скоростями отмирания клеток. При этом скорость прироста биомассы полностью компенсируется скоростью гибели и лизиса клеток.

6. Если система полностью истощается по субстрату или накопление ингибирующих рост продуктов является значительным, то скорость прироста биомассы становится равной нулю, происходят существенные физиологические изменения клеток и, как правило, наблюдается *фаза отмирания культуры (б)*, сопровождаемая часто полным лизисом клеток.

▲ Принципиальной особенностью кинетики микробных популяций является зависимость скорости роста культуры от концентрации одного или нескольких наиболее важных компонентов среды, обеспечивающих биосинтетическую основу метаболизма. Эти компоненты, получившие название *лимитирующих субстратов*, в определенной степени регулируют скорость роста популяции.

В результате экспериментальных исследований зависимости скорости роста культур микроорганизмов были обнаружены две особенности:

1. Скорость изменения числа микроорганизмов в режиме его роста (в экспоненциальной фазе) линейно связана с концентрацией клеток в системе:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N, \quad (1.1)$$

где  $N$  — число клеток;  $\mu$  — коэффициент пропорциональности, получивший название *удельной скорости роста*  $\left(\mu = \frac{1}{N} \frac{dN}{dt}\right)$ ; имеет размерность обратного времени. Предполагается, что  $\mu$  не зависит от времени в исследуемом интервале. Собственно это уравнение в интегральной форме и представляет собой уравнение экспоненциального роста. Его интегрирование при начальном условии  $t=0$ ,  $N=N_0$  приводит к функции

$$N = N_0 e^{\mu t}. \quad (1.2)$$

2. Было найдено, что в большинстве случаев значение удельной скорости роста зависит от концентрации лимитирующего субстрата  $S$  и эта зависимость может быть представлена в форме

$$\mu(S) = \frac{\mu_m S}{K_s + S}, \quad (1.3)$$

где  $\mu_m$  — предельная максимальная удельная скорость роста;  $K_s$  — параметр, получивший название *константы средства субстрата к микроорганизму*.

Впервые на зависимость скорости роста культуры от концентрации субстрата обратил внимание Моно, поэтому уравнение (1.3) получило название *уравнения Моно*. По своей форме это уравнение соответствует зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата (уравнение Михаэлиса—Ментен\*). Ниже обсуждается уравнение Моно и даются подходы к его кинетическому обоснованию.

### 1.1. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РОСТА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИМИТИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА. «МАКРОСКОПИЧЕСКИЙ» ПОДХОД

Уравнение, связывающее скорость роста культур микроорганизмов с концентрацией субстрата (уравнение Моно), имеет эмпирический характер. Теоретическое рассмотрение вопроса на качественном уровне с привлечением представления о лимитирующей стадии в сложной последовательности ферментативных превращений субстрата в клетке также указывает на то, что зависимость скорости роста микроорганизмов должна быть аналогична зависимости, выражаемой уравнением Михаэлиса—Ментен (Д. С. Чернавский, Н. Д. Иерусалимский, 1968).

Проведем количественный анализ закономерностей роста микробной популяции с целью физико-химического обоснования уравнения Моно. Воспользуемся кинетическим подходом и проанализируем ряд различных кинетических схем процесса, исходя из предположения, что развитие популяции микроорганизмов представляет собой автокаталитический процесс.

#### 1.1.1. Простейшая схема взаимодействия клетки с субстратом

Представим себе простейшую кинетическую схему автокаталитической реакции с разложением каталитических центров



где  $N$ —число центров, претерпевающих удвоение при взаимодействии с субстратом;  $P$ —продукт.

Число центров, с которыми взаимодействует субстрат, и число клеток микроорганизмов связаны между собой прямо пропорциональной связью, поскольку предполагается, что клетки в среднем содержат одинаковое число центров, на которых

---

\* Обоснование уравнения Михаэлиса—Ментен, его свойства и методы анализа рассмотрены в ряде монографий (см., например, И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, 1979; С. Д. Варфоломеев, С. В. Зайцев, 1983).

осуществляется трансформация субстрата. В рамках кинетического приближения частоту актов деления клеток можно обозначить константой  $k$ . Субстрат  $S$  в результате взаимодействия с компонентами клетки трансформируется с образованием продукта  $P$ .

Динамику изменения в системе концентрации компонентов будут описывать уравнения

$$\frac{dN}{dt} = kSN; \quad (1.5)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{kSN}{Y_p}, \quad (1.6)$$

где  $Y_p$  — коэффициент пропорциональности, связывающий количество образовавшейся биомассы и продукта ферментационного превращения:

$$N - N_0 = Y_p(P - P_0). \quad (1.7)$$

Если концентрация вещества  $S$  в системе достаточно велика и за время процесса меняется незначительно, то можно ее считать величиной постоянной ( $S = S_0$ ). В этом случае уравнение (1.5) может быть проинтегрировано относительно числа клеток  $N$ . Если использовать начальное условие ( $t=0, N = N_0$ ), интегрирование уравнения (1.5) дает экспоненциальную функцию

$$N(t) = N_0 e^{kS_0 t}. \quad (1.8)$$

Подстановка уравнения (1.8) в дифференциальное уравнение (1.6) и последующее его интегрирование (при допущении, что  $P_0 = 0$ ) приводит к следующей зависимости от времени концентрации продукта:

$$P(t) = \int_0^t \frac{kS_0 N_0}{Y_p} e^{kS_0 t} dt = \frac{N_0}{Y_p} (e^{kS_0 t} - 1). \quad (1.9)$$

При временах реакции, близких к нулю ( $t \ll \frac{1}{kS_0}$ ), концентрация продукта близка к нулю, при больших временах реакции должен наблюдаться экспоненциальный рост концентрации продукта:

$$P(t) = \frac{N_0}{Y_p} e^{kS_0 t}. \quad (1.10)$$

Уравнения (1.8), (1.10) и соответственно кинетическая схема (1.4) описывают важную особенность кинетики роста микробной популяции — количество клеток в системе экспоненциально растет во времени. Удельная скорость роста  $\mu(S)$ , представляю-

щая собой показатель экспоненты в уравнениях (1.8) и (1.10), является линейной функцией концентрации субстрата:

$$\mu(S) = kS_0. \quad (1.11)$$

Уравнение (1.11) в отличие от уравнения Моно дает линейное неограниченное увеличение удельной скорости роста микроорганизмов с увеличением концентрации субстрата. Это противоречит экспериментальным данным и требует дополнительного усложнения простейшей кинетической схемы (1.4).

### 1.1.2. Схема с равновесным «насыщением» клеток микроорганизма субстратом

Кинетическая схема процесса роста культуры микроорганизма выглядит следующим образом:



Субстрат обратимо и равновесно взаимодействует с микроорганизмами, давая «насыщенную» форму клеток  $X$ , которая способна к делению с возникновением двух «ненасыщенных» состояний  $N$ . На схеме процесс равновесного «насыщения» клеток охарактеризован константой равновесия  $K$ , процесс деления — константой скорости первого порядка  $k$ .

Кинетика накопления компонентов реакции при постоянной концентрации субстрата ( $S = S_0$ ) может быть описана системой уравнений

$$\frac{dN}{dt} = 2kX; \quad (1.13)$$

$$\frac{dX}{dt} = -kX; \quad (1.14)$$

$$X = \frac{S_0}{K} N. \quad (1.15)$$

Измеряемая на опыте величина — общая концентрация клеток, или концентрация биомассы, — представляет собой суммарную величину  $M$ , в которую входит как концентрация «насыщенных» клеток  $X$ , так и концентрация «ненасыщенных» клеток  $N$ :

$$M(t) = X(t) + N(t). \quad (1.16)$$

Из этого уравнения следует

$$\frac{dM(t)}{dt} = \frac{dX(t)}{dt} + \frac{dN(t)}{dt} \quad (1.17)$$

или

$$\frac{dM(t)}{dt} = kX(t). \quad (1.18)$$

Концентрации клеток в состояниях N и X связаны соотношением (1.17). Соответственно исходя из уравнений (1.15) и (1.16) можно записать:

$$M(t) = X(t) \left( 1 + \frac{K}{S_0} \right). \quad (1.19)$$

Таким образом,  $X(t)$  можно выразить через общую биомассу в соответствии с уравнением

$$X(t) = \frac{M(t)}{1 + K/S_0}. \quad (1.20)$$

Если подставить найденную функцию  $X(t)$  в уравнение (1.18), получим

$$\frac{dM(t)}{dt} = \frac{k}{1 + K/S_0} M(t). \quad (1.21)$$

Уравнение (1.21) представляет собой дифференциальное уравнение первого порядка с разделяющимися переменными. Решение этого уравнения имеет вид

$$M(t) = N_0 \exp \left[ \frac{k S_0}{K + S_0} t \right], \quad (1.22)$$

где  $N_0$  — количество биомассы в системе после введения инокулята;

$$k S_0 / (K + S_0) = \mu(S). \quad (1.23)$$

Кинетическая схема (1.12) описывает экспоненциальный рост биомассы в системе. Сравнение теоретически полученной функции удельной скорости роста микроорганизма от концентрации субстрата [уравнение (1.23)] с уравнением Моно (1.3) показывает, что это функции одного и того же вида. При этом максимальная удельная скорость роста  $\mu_m$  имеет смысл константы скорости деления клеток микроорганизма  $k$ , величина  $K_s$  — константа равновесия «насыщения» клеток субстратом  $K$ .

● Таким образом, эмпирическое уравнение Моно получено из теоретического анализа кинетики роста микробной популяции в рамках достаточно простой кинетической схемы (1.12) и предположения о равновесном «насыщении» микроорганизма субстратом. Равновесие, характеризуемое константой  $K$ , может отражать, например, фермент-субстратное равновесие при образовании комплекса Михаэлиса с каким-либо лимитирующим процесс ферментом.

Очевидно, что механизм автокаталитического роста биомассы, представленный схемой (1.12), не является единственно возможным механизмом, описывающим экспериментально наблюдаемые зависимости. Против кинетической схемы (1.12)

имеется возражение качественного характера. Как правило, субстрат, попадая в клетку и взаимодействуя с каким-либо ферментом, претерпевает существенную трансформацию, и выход его из клетки в неизменном состоянии, как это следует из схемы (1.12), весьма маловероятен. Поэтому можно думать, что механизм (1.12) существенно упрощает ситуацию. Анализ показывает, что кинетические схемы с необратимой трансформацией субстрата внутри клетки при определенных условиях также описывают экспериментальные данные и приводят к зависимостям удельной скорости роста микроорганизмов, близким к уравнению Моно.

### 1.1.3. Схема с необратимой трансформацией субстрата в клетке

Рассмотрим кинетическую схему роста популяции с учетом двух необратимых стадий процесса:



Субстрат, взаимодействуя с каталитическими центрами внутри клетки (число центров  $N$  пропорционально числу клеток в популяции), приводит к образованию метаболитов, обеспечивающих возможность деления клетки и удвоения центров, с которыми взаимодействует субстрат.

Кинетику процесса описывает система уравнений ( $S$  постоянно,  $S = S_0$ )

$$\frac{dN}{dt} = 2k_2X - k_1S_0N; \quad (1.25)$$

$$\frac{dX}{dt} = k_1S_0N - k_2X; \quad (1.26)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_1S_0N}{Y_p}. \quad (1.27)$$

Измеряемая на опыте биомасса (или общее число клеток микроорганизмов) представляет собой сумму двух переменных величин:

$$M(t) = N(t) + X(t).$$

Система уравнений (1.25), (1.26) может быть решена относительно переменных  $N(t)$  и  $X(t)$ . Из уравнения (1.25) следует:

$$X = \frac{1}{2k_2} \left\{ \frac{dN}{dt} + k_1S_0N \right\}; \quad (1.28)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{1}{2k_2} \left\{ \frac{d^2N}{dt^2} + k_1S_0 \frac{dN}{dt} \right\}. \quad (1.29)$$

Подстановка  $dX/dt$  и  $X$  в уравнение (1.26) приводит к дифференциальному уравнению второго порядка с постоянными коэффициентами:

$$\frac{d^2N}{dt^2} + \frac{dN}{dt}(k_1S_0 + k_2) - k_2k_1S_0N = 0. \quad (1.30)$$

Решив это уравнение относительно  $N(t)$ , можно, используя уравнение (1.28), найти  $X(t)$  и соответственно функцию от времени общего количества биомассы  $M(t)$ .

Методы решения дифференциальных уравнения типа (1.30) детально рассмотрены в математической общеобразовательной литературе. Общее решение уравнения (1.30) имеет вид

$$N(t) = C_1 e^{\lambda_1 t} + C_2 e^{\lambda_2 t}, \quad (1.31)$$

где  $\lambda_1, \lambda_2$  — корни соответствующего характеристического уравнения;  $C_1, C_2$  — константы, которые могут быть найдены из начальных условий.

Характеристическое уравнение имеет вид

$$\lambda^2 + (k_1S_0 + k_2)\lambda - k_2k_1S_0 = 0. \quad (1.32)$$

Решение характеристического уравнения представлено двумя корнями:

1) положительный корень

$$\lambda_1 = \sqrt{\left(\frac{k_1S_0 + k_2}{2}\right)^2 - k_2k_1S_0} - \frac{k_1S_0 + k_2}{2}, \quad (1.33)$$

2) отрицательный корень

$$\lambda_2 = -\frac{k_1S_0 + k_2}{2} - \sqrt{\left(\frac{k_1S_0 + k_2}{2}\right)^2 + k_2k_1S_0}. \quad (1.34)$$

Из уравнения (1.31) следует

$$\frac{dN}{dt} = \lambda_1 C_1 e^{\lambda_1 t} + \lambda_2 C_2 e^{\lambda_2 t}. \quad (1.35)$$

С учетом этого соотношения из уравнения (1.28) можно получить

$$X(t) = C_1 e^{\lambda_1 t} \frac{\lambda_1 + k_1S_0}{2k_2} + C_2 e^{\lambda_2 t} \frac{\lambda_2 + k_1S_0}{2k_2}. \quad (1.36)$$

Для нахождения констант  $C_1$  и  $C_2$  воспользуемся начальными условиями:  $t=0, N=N_0, X=0$ . Использование этих условий для уравнения (1.31) и (1.36) приводит к системе алгебраических уравнений

$$\begin{cases} C_1 + C_2 = N_0; \\ C_1 \frac{\lambda_1 + k_1 S_0}{2k_2} + C_2 \frac{\lambda_2 + k_1 S_0}{2k_2} = 0, \end{cases} \quad (1.37)$$

из которых следуют значения  $C_1$  и  $C_2$ :

$$C_1 = N_0 \frac{\lambda_2 + k_1 S_0}{\lambda_2 - \lambda_1}, \quad (1.38)$$

$$C_2 = N_0 \frac{\lambda_1 + k_1 S_0}{\lambda_1 - \lambda_2}. \quad (1.39)$$

Таким образом, для изменения во времени числа клеток  $N$  можно записать:

$$N(t) = \frac{N_0(\lambda_2 + k_1 S_0)}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{\lambda_1 t} + \frac{N_0(\lambda_1 + k_1 S_0)}{\lambda_1 - \lambda_2} e^{\lambda_2 t}, \quad (1.40)$$

для состояния  $X$

$$X(t) = \frac{\lambda_1 + k_1 S_0}{2k_2} e^{\lambda_1 t} \frac{N_0(\lambda_2 + k_1 S_0)}{\lambda_2 - \lambda_1} + \frac{\lambda_2 + k_1 S_0}{2k_2} e^{\lambda_2 t} \frac{N_0(\lambda_1 + k_1 S_0)}{\lambda_1 - \lambda_2}. \quad (1.41)$$

В уравнения (1.40) и (1.41) входят два экспоненциальных члена, при этом один из них имеет положительный показатель экспоненты, а другой — отрицательный. Соответственно одна экспоненциальная функция увеличивается от единицы до бесконечности, вторая уменьшается от единицы до нуля. При соизмеримых по абсолютным значениям предэкспоненциальных членов и показателей  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  в суммарных функциях (1.40) и (1.41) через очень ограниченное время развития процесса можно с высокой степенью точности пренебречь членом, содержащим экспоненту с отрицательным показателем. Поскольку было принято, что  $\lambda_1$  имеет положительный характер, через очень небольшое время протекания процесса после определенной лаг-фазы имеет место экспоненциальный рост микроорганизма:

$$N(t) = \frac{N_0(\lambda_2 + k_1 S_0)}{\lambda_2 - \lambda_1} e^{\lambda_1 t}, \quad (1.42)$$

$$X(t) = \frac{N_0(\lambda_2 + k_1 S)}{\lambda_2 - \lambda_1} \frac{\lambda_1 + k_1 S_0}{2k_2} e^{\lambda_1 t}. \quad (1.43)$$

Измеряемую на опыте общую биомассу можно выразить уравнением

$$M(t) = N_0 \frac{\lambda_2 + k_1 S_0}{\lambda_2 - \lambda_1} \left( 1 + \frac{\lambda_1 + k_1 S_0}{2k_2} \right) e^{\lambda_1 t}. \quad (1.44)$$

Следует отметить, что в кинетике роста микроорганизмов очень часто, почти всегда, наблюдаются периоды индукции после введения в систему инокулята. Микроорганизмы адаптируются к новым условиям. В рамках обсуждаемой модели этот процесс может представлять собой первую стадию процесса (1.24), при этом наличие в уравнениях накопления биомассы экспоненты с отрицательным знаком, возможно, количественно объясняет длительность и природу лаг-фазы (другие механизмы, приводящие к появлению индукционного периода на кинетических кривых роста культуры, обсуждаются в гл. 6). Рассмотрим зависимость от концентрации субстрата параметра  $\lambda_1$  и предэкспоненциального множителя  $A$  уравнения (1.44):

$$A = \frac{\lambda_2 + k_1 S_0}{\lambda_2 - \lambda_1} \left( 1 + \frac{k_1 S_0 + \lambda_1}{2k_2} \right). \quad (1.45)$$

Уравнение (1.33) можно преобразовать к виду

$$\lambda_1 = \frac{k_1 S_0 + k_2}{2} \left( \sqrt{1 + \frac{4k_2 k_1 S_0}{(k_1 S_0 + k_2)^2}} - 1 \right). \quad (1.46)$$

Если один из кинетических параметров существенно превышает другой ( $k_2 \gg k_1 S_0$  или  $k_1 S_0 \gg k_2$ ), справедливо соотношение

$$\frac{4k_2 k_1 S_0}{(k_1 S_0 + k_2)^2} \ll 1. \quad (1.47)$$

Это позволяет функцию, входящую в подрадикальное выражение уравнения (1.46), разложить в быстросходящийся ряд относительно слагаемого  $4k_1 S_0 k_2 / (k_1 S_0 + k_2)^2$  и ограничиться первым членом разложения. В этих условиях из уравнения (1.46) следует

$$\lambda_1 = \frac{k_1 S_0 k_2}{k_2 + k_1 S_0} = \frac{k_2 S_0}{k_2 / (k_1 + S_0)}. \quad (1.48)$$

Таким образом, показатель экспоненты в рамках используемых приближений является гиперболической функцией концентрации субстрата, что соответствует уравнению Моно

$$\mu(S) = \frac{k_2 S_0}{k_2 / (k_1 + S_0)}. \quad (1.49)$$

Значение  $\mu_m$  имеет смысл константы скорости процесса удвоения числа центров  $k_2$ , с которыми взаимодействует субстрат.  $K_s$  в уравнении Моно представляет собой отношение констант скорости двух стадий процесса  $k_2/k_1$ .

Уравнение (1.49) получено как результат асимптотического разложения функции (1.46) в определенных условиях. Анализ

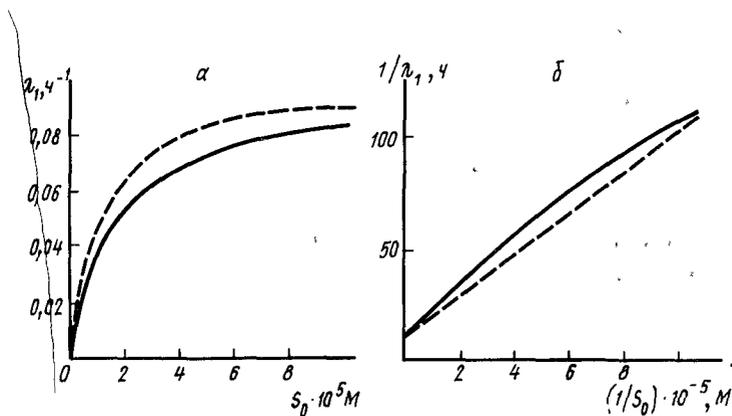


Рис. 1.2. Зависимость удельной скорости роста популяции микроорганизмов в экспоненциальной фазе от концентрации лимитирующего субстрата (а); те же данные в двойных обратных координатах (б): сравнение значений точного [пунктирная линия, уравнение (1.46)] и асимметрического [непрерывная линия, уравнение (1.48)] решения. При расчете принято  $k_1 = 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,1 \text{ ч}^{-1}$

показывает, что точное значение  $\lambda_1$  при любом соотношении параметров  $k_1 S_0$  и  $k_2$  весьма близко к асимптотической гиперболической зависимости (1.47) (рис. 1.2). Из рисунка видно, что асимптотическое приближение описывает точное решение. Наибольшее различие двух решений имеет место при  $S_0$ , соизмеримых с  $K_s = k_2/k_1$ . Это отклонение может достигать 20%. Как следует из рис. 1.2, а, при  $S_0 < K_s$  и  $S_0 > K_s$  величина отклонения уменьшается и в пределе при  $S_0 \gg K_s$  и  $S_0 \ll K_s$  уменьшается до нуля.

▲ На рис. 1.2, б приведены кривые для точного и асимптотического решения в обратных координатах, наиболее часто используемых при определении параметров  $\mu_m$  и  $K_s$  из экспериментальных данных. Видно, что эти функции достаточно близки. Если учесть, что удельные скорости при данной концентрации субстрата определяются с достаточно большой ошибкой (10—20%), то становится ясно, что экспериментатор весьма обоснованно будет использовать линейную асимптотическую зависимость. Ошибки в определении  $\mu_m$  и  $K_s$  будут возрастать, если используются данные эксперимента, выполняемого только в одной из областей:  $S_0 > K_s$  или  $S_0 < K_s$ . Для того чтобы быть уверенным в правильности определения  $\mu_m$  и  $K_s$  при использовании линейного асимптотического решения, необходимо эксперимент проводить в области обеих ветвей зависимости, как при  $S_0 > K_s$ , так и при  $S_0 < K_s$ .

Рассмотрим зависимость предэкспоненциального множителя от концентрации субстрата. Если использовать асимптотическое

приближение, обеспечивающее разложение в ряд радикальной функции, входящей в выражение для  $\lambda_1$  и  $\lambda_2$ , то можно найти

$$\lambda_2 = - \left( k_1 S_0 + k_2 + \frac{k_1 S_0 k_2}{k_1 S_0 + k_2} \right). \quad (1.50)$$

Соответственно на основе уравнения (1.45) значение  $A$  будет представлено функцией

$$A = \frac{k_2 + \frac{k_1 S_0 k_2}{k_1 S_0 + k_2}}{k_2 + k_1 S_0 + 2 \frac{k_1 S_0 k_2}{k_1 S_0 + k_2}} \left( 1 + \frac{k_1 S_0 + \frac{k_1 S_0 k_2}{k_1 S_0 + k_2}}{2k_2} \right). \quad (1.51)$$

С учетом того, что  $K_s = k_2/k_1$ , уравнение (1.51) можно преобразовать к виду

$$A = \frac{\left( 1 + \frac{1}{1 + K_s/S_0} \right) \left( 2 + \frac{S_0}{K_s} + \frac{1}{1 + K_s/S_0} \right)}{2 \left( 1 + \frac{S_0}{K_s} + \frac{2}{1 + K_s/S_0} \right)}. \quad (1.52)$$

▲ Из уравнения следует, что при  $S_0 \gg K_s$   $A \approx 1$ , а также при  $S_0 \ll K_s$   $A \approx 1$ . Наибольшее отклонение значения  $A$  от 1 наблюдается при  $S_0$ , соизмеримых с  $K_s$ . При  $S_0 = K_s$   $A = 0,875$ , т. е. отклонение  $A$  от единицы составляет 12,5%. Видно, что значение  $A$  весьма близко к единице при самой широкой вариации отношения  $S_0/K_s$ . Экспериментально значение предэкспоненциального множителя определяется в полулогарифмических координатах из отрезка, отсекаемого прямой роста на оси ординат. Очевидно, что в условиях эксперимента с учетом известной статистической ошибки отклонение  $A$  от единицы практически обнаружено быть не может, получаемое значение предэкспоненциального множителя достаточно строго соответствует значению  $N_0$ .

Таким образом, кинетическая схема (1.24) с учетом обычно наблюдаемых статистических ошибок хорошо соответствует имеющемуся обширному экспериментальному материалу и приводит к уравнению Моно (1.3), связывающему удельную скорость роста микроорганизмов с концентрацией субстрата. Проведенное рассмотрение дает кинетическое обоснование уравнению Моно.

● Принципиально важным выводом является утверждение, что уравнение Моно отражает многостадийный характер процессов при росте культур. Одна из стадий процесса зависит от концентрации субстрата, и скорость этой стадии может быть регулирована концентрацией субстрата. Вторая стадия не зависит от концентрации субстрата и представляет

собой некоторую лимитирующую стадию в процессе клеточного деления. Если кинетическую схему процесса не разделить, по крайней мере на две стадии, то удельная скорость роста популяции не будет представлена уравнением с «насыщением» субстратом, а будет дана линейной ненасыщаемой зависимостью от концентрации субстрата. При низких концентрациях субстрата процесс роста культур микроорганизмов лимитирован процессом накопления клеток в форме X, процессом накопления необходимых метаболитов. При высоких насыщающих концентрациях субстрата лимитирующим становится субстрат-независимый процесс удвоения центров. Максимальная удельная скорость роста характеризует именно этот процесс.

#### 1.1.4. Упрощенные методы анализа кинетики и механизмов автокаталитического роста микроорганизмов. Метод малого параметра

Выше приведен анализ кинетики автокаталитического роста культур микроорганизмов с точным решением систем уравнений, описывающих динамику процесса. Из анализа видно, что даже в случае простейшего двухстадийного механизма, представленного схемой (1.24), для получения точного решения требуется достаточно большая аналитическая работа. Сложности анализа кинетики процесса существенно увеличиваются с усложнением кинетической схемы процесса. Так, для того чтобы найти характеристические времена для кинетической схемы с участием двух промежуточных состояний (трехстадийная схема), необходимо аналитически решить кубическое уравнение и детально проанализировать свойства корней этого уравнения. Сложности становятся практически непреодолимыми, если анализ кинетики сопряжен с исследованием четырехстадийных или пятистадийных процессов. Это требует поиска методов анализа кинетики на принципах существенного упрощения с сохранением адекватности кинетического описания.

Рассмотрим принцип и возможности такого подхода на примере проанализированного двухстадийного процесса (1.24). Уравнение (1.28) можно представить в виде

$$\frac{1}{k_2} \frac{dX}{dt} + X = \frac{k_1 S_0}{k_2} N. \quad (1.53)$$

При определенных условиях в левой части уравнения можно пренебречь членом  $(1/k_2) dX/dt$  по сравнению с X. Найдем условия, при которых выполняется неравенство

$$\frac{1}{k_2} \frac{dX}{dt} \ll X. \quad (1.54)$$

Подстановка значений  $X$  и  $\frac{dX}{dt}$  из уравнения (1.36) в неравенство (1.54) приводит к выражению

$$\lambda_1 C_1 e^{\lambda_1 t} \frac{\lambda_1 + k_1 S_0}{2k_2^2} + \lambda_2 C_2 e^{\lambda_2 t} \frac{\lambda_2 + k_1 S_0}{2k_2^2} \ll C_1 e^{\lambda_1 t} \frac{\lambda_1 + k_1 S_0}{2k_2} + C_2 e^{\lambda_2 t} \frac{\lambda_2 + k_1 S_0}{2k_2}. \quad (1.55)$$

Если в этом выражении пренебречь членами, содержащими отрицательное значение корня  $\lambda_2$ , поскольку в очень ограниченном интервале времени они будут равны нулю, в то время как члены, содержащие положительную экспоненту  $\lambda_1$ , будут неограниченно расти, то можно получить неравенство

$$\lambda_1 C_1 e^{\lambda_1 t} \frac{\lambda_1 + k_1 S_0}{2k_2^2} \ll C_1 e^{\lambda_1 t} \frac{k_1 S_0 + \lambda_1}{2k_2} \quad (1.56)$$

или  $\lambda_1 \ll k_2$ .

При выполнении этого неравенства в дифференциальном уравнении (1.53) можно пренебречь первым слагаемым и существенно образом упростить решение.

Можно показать, что всегда строго выполняется неравенство  $\lambda_1 < k_2$ . Если подставить в неравенство (1.56) значение  $\lambda_1$ , выраженное из уравнения (1.46), то будем иметь

$$\sqrt{\left(\frac{k_1 S_0 + k_2}{2}\right)^2 - k_2 k_1 S_0} - \frac{k_1 S_0 + k_2}{2} < k_2, \quad (1.57)$$

которое эквивалентно неравенству  $k_2 > 0$ .

Таким образом, для кинетической схемы (1.24) и системы уравнений (1.25) — (1.27) весьма вероятно выполнение неравенства (1.57). Это позволяет в дифференциальном уравнении (1.53) в силу малости параметра  $1/k_2$  с высокой степенью точности пренебречь членом  $(1/k_2) dX/dt$  по сравнению с  $X$ . В этом приближении дифференциальное уравнение (1.53) трансформируется в алгебраическое:

$$X(t) = \frac{k_1 S_0}{k_2} N(t). \quad (1.58)$$

С учетом уравнения материального баланса можно записать

$$X(t) = \frac{M(t)}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0}}. \quad (1.59)$$

Учитывая, что

$$\frac{dM(t)}{dt} = k_2 X(t), \quad (1.60)$$

получаем

$$\frac{dM(t)}{dt} = \frac{k_2 M(t)}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0}} \quad (1.61)$$

Это уравнение представляет собой дифференциальное уравнение первого порядка с разделяющимися переменными, решение которого имеет вид

$$M(t) = N_0 \exp\left(\frac{k_2 k_1 S_0}{k_1 S_0 + k_2} t\right), \quad (1.62)$$

т. е. решение системы представляет собой уравнение экспоненциального роста культуры. При этом показатель экспоненты включает субстрат-зависимый параметр — удельную скорость роста:

$$\mu(S) = \frac{k_1 S_0 k_2}{k_1 S_0 + k_2}.$$

Это соответствует уравнению, полученному при полном решении системы дифференциальных уравнений, а также согласуется с эмпирическим уравнением Моно.

Обсуждаемый упрощенный подход к анализу автокаталитической кинетики роста микроорганизмов позволяет анализировать субстрат-зависимую кинетику роста культур для кинетических схем практически любой степени сложности. Рассмотрим использование этого подхода для анализа кинетики трехстадийного процесса и процесса с участием произвольного числа  $n$  различных состояний.

Представим, что кинетика процесса включает несколько соизмеримых по параметрам последовательных стадий:



Кинетику изменения во времени всех компонентов (при условии постоянства  $S=S_0$ ) описывает система уравнений

$$\frac{dN}{dt} = 2k_3 X_2 - k_1 S_0 N; \quad (1.64)$$

$$\frac{dX_1}{dt} = k_1 S_0 N - k_2 X_1; \quad (1.65)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_2 X_1 - k_3 X_2. \quad (1.66)$$

Выражение для общего количества биомассы, включающее суммарное количество клеток во всех состояниях, имеет вид

$$M = N + X_1 + X_2 \quad (1.67)$$

или

$$\frac{dM}{dt} = \frac{dN}{dt} + \frac{dX_1}{dt} + \frac{X_2}{dt}. \quad (1.68)$$

Сложение дифференциальных уравнений (1.64) — (1.66) приводит к уравнению

$$\frac{dM}{dt} = k_3 X_2. \quad (1.69)$$

Из уравнений (1.65) и (1.66) следует:

$$\frac{1}{k_2} \frac{dX_1}{dt} + X_1 = \frac{k_1 S_0}{k_2} N; \quad (1.70)$$

$$\frac{1}{k_3} \frac{dX_2}{dt} + X_2 = \frac{k_2 X_1}{k_3}. \quad (1.71)$$

Вспользуемся изложенным выше подходом, согласно которому в силу малости параметров  $1/k_2$  и  $1/k_3$  можно пренебречь в левой части уравнений (1.70) и (1.71) членами, содержащими производные  $dX_1/dt$  и  $dX_2/dt$ . Это приводит к уравнениям

$$X_1 = \frac{k_1 S_0}{k_2} N; \quad (1.72)$$

$$X_2 = \frac{k_2}{k_3} X_1. \quad (1.73)$$

С учетом этих соотношений уравнение для общего количества биомассы можно записать в виде

$$M(t) = X_2(t) \left( 1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0} \right) \quad (1.74)$$

или

$$X_2(t) = \frac{M(t)}{1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}}. \quad (1.75)$$

Если подставить это уравнение в (1.69), будем иметь

$$\frac{dM(t)}{dt} = \frac{k_3 M(t)}{1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}}. \quad (1.76)$$

Решение этого дифференциального уравнения с разделяющимися переменными при использовании начального условия  $t=0$ ,  $M=N_0$  имеет вид

$$M(t) = N_0 \exp \left[ \frac{k_3}{1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}} t \right]. \quad (1.77)$$

Соответственно уравнение удельной скорости роста культуры микроорганизма можно записать в виде

$$\mu(S) = \frac{1}{\frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_2} + \frac{1}{k_1 S_0}}. \quad (1.78)$$

Подставим это уравнение в «классической» гиперболической форме:

$$\mu(S) = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}; \quad (1.79)$$

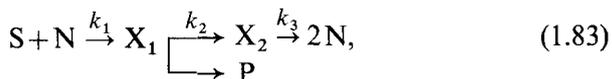
при этом значения параметров  $\mu_m$  и  $K_s$  как функции констант скорости элементарных стадий даны уравнениями

$$\mu_m = \frac{1}{1/k_3 + 1/k_2} = \frac{k_3 k_2}{k_3 + k_2}; \quad (1.80)$$

$$K_s = \frac{1}{k_1 (1/k_3 + 1/k_2)} = \frac{k_3 k_2}{k_1 (k_3 + k_2)}; \quad (1.81)$$

$$\mu_m / K_s = k_1. \quad (1.82)$$

Если на какой-либо стадии реакции образуется продукт, т. е.



то зависимость его концентрации от времени можно найти из уравнения

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_2 X_1}{Y_p}, \quad (1.84)$$

где  $Y_p$  — экономический коэффициент по продукту.

Из (1.84)

$$P(t) = \frac{N_0}{Y_p} (e^{\mu t} - 1). \quad (1.85)$$

При временах, превышающих  $1/\mu$ , в (1.85) можно пренебречь единицей по сравнению с экспоненциальным членом. При этом справедливо уравнение

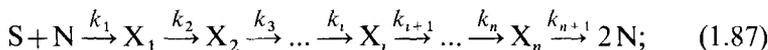
$$P(t) \cong \frac{N_0}{Y_p} e^{\mu t}. \quad (1.86)$$

Это уравнение экспоненциального роста культуры в условиях детекции продукта ферментативного процесса. Линеаризация данных по продукту реакции в полулогарифмических

координатах позволяет, так же как и при определении биомассы, определить удельную скорость роста культуры.

▲ Из уравнения (1.80) следует важное свойство кинетики роста популяций микроорганизмов: максимальная удельная скорость роста определяется *наиболее медленной стадией*. Если  $k_3 \gg k_2$ , то  $\mu_m = k_2$ ; если  $k_2 \gg k_3$ , то  $\mu_m = k_3$ .

Этот важный вывод имеет общий характер. Для его подтверждения рассмотрим кинетику процессов с учетом  $n$  возможных состояний:



$$\frac{dM(t)}{dt} = k_{n+1} X_n; \quad (1.88)$$

$$M(t) = N + \sum_{i=1}^n X_i; \quad (1.89)$$

$$\left. \begin{aligned} k_2 X_1 &= k_1 S_0 N; \\ k_3 X_2 &= k_2 X_1; \\ \dots &\dots \\ k_n N_{n-1} &= k_{n+1} X_n \end{aligned} \right\} \quad (1.90)$$

С учетом соотношений (1.90) уравнение (1.89) будет иметь вид

$$M(t) = X_n \left( 1 + \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{k_i} \right). \quad (1.91)$$

Это уравнение позволяет выразить переменную  $X_n$  через переменную  $M(t)$ , входящую в (1.88):

$$\frac{dM(t)}{dt} = \frac{k_{n+1} M(t)}{1 + \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{k_i}}. \quad (1.92)$$

Из этого уравнения следует

$$\mu = \frac{1}{\frac{1}{k_1 S_0} + \sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}} \quad (1.93)$$

или

$$\mu_m = \frac{1}{\sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}}; \quad (1.94)$$

$$K_s = \frac{1}{k_1 \sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}}; \quad (1.95)$$

$$\mu_m / K_s = k_1. \quad (1.96)$$

В максимальной удельной скорости роста микроорганизмов появляется лимитирующая стадия ферментативного процесса. Если в сложной последовательности трансформации вещества в клетке имеется какая-либо стадия, характеризующаяся наименьшим значением  $k_j$ ,  $k_j \ll k_i$ ,  $i=2, \dots, n+1$ ,  $i \neq j$ , то значение максимальной удельной скорости роста будет равно константе скорости этой стадии:

$$\mu_m = k_j. \tag{1.97}$$

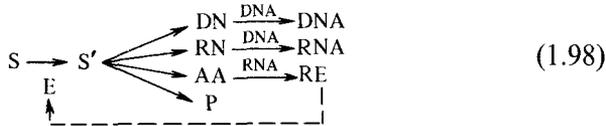
В этом случае  $j$ -я стадия является лимитирующей.

**1.1.5. Репликация, транскрипция, трансляция в кинетике роста микробной культуры**

Рассмотренный подход к описанию кинетики роста микробных популяций объясняет зависимость удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата.

Кинетическое описание роста клеточной популяции может быть основано и на применении подхода с использованием представлений о молекулярных механизмах трансформации генетической информации. Рассмотрим сущность этого подхода на примере анализа наиболее «грубой» схемы процесса. Цель этого анализа состоит в демонстрации того факта, что подход, основанный на известных представлениях о механизмах биосинтетических процессов, дает возможность объяснить две принципиально важные феноменологические закономерности: 1) экспоненциальный рост биомассы во времени; 2) зависимость удельной скорости роста популяции от концентрации лимитирующего субстрата.

Механизм конверсии исходного субстрата  $S$  в клеточную биомассу включает действие на субстрат лимитирующего фермента  $E$ :



Продуктом этой ферментативной реакции является промежуточный субстрат  $S'$ , дальнейшая конверсия которого обеспечивает синтез всех основных метаболитов. Превращение  $S$  в  $S'$  может осуществляться как отдельным ферментом, так и целой полиферментной системой, в которой фермент  $E$  является лимитирующим.

Под действием различных ферментных систем вещество  $S'$  трансформируется в метаболиты ( $DN$ ,  $RN$ ,  $AA$ ), обеспечивающие синтез основных полимерных компонентов клетки: дезоксирибонуклеиновой кислоты ( $DNA$ ), рибонуклеиновой

кислоты (RNA) и белка. Одним из компонентов синтезированного белка является лимитирующий фермент E. Помимо компонентов, непосредственно участвующих в биосинтезе белка и нуклеиновых кислот, в системе могут образовываться необходимые энергетические и структурно важные соединения, суммарно обозначенные на схеме веществом P.

Терминальными стадиями схемы (1.98) являются стадии репликации (синтез DNA на матрице DNA), транскрипции (синтез RNA на матрице DNA) и трансляции (синтез белка на матрице RNA, включая синтез белка E). Образовавшийся в результате трансляции белок E является катализатором первой стадии реакции, что обеспечивает автокаталитический характер процесса.

Предполагается, что первая стадия процесса (ферментативное превращение S в S') имеет обычный ферментативный характер и может быть описана уравнением типа Михаэлиса—Ментен

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_{\text{кат}}ES_0}{K_M + S_0}, \quad (1.99)$$

где  $k_{\text{кат}}$  — каталитическая константа скорости лимитирующего фермента;  $K_M$  — константа Михаэлиса фермента E. Также предполагается, что процесс исследуется на начальном этапе, так что расходом субстрата можно практически пренебречь ( $S \approx S_0$ ).

Стадии конверсии промежуточного соединения S' могут быть охарактеризованы кинетическими коэффициентами  $k_d$ ,  $k_r$ ,  $k_a$ ,  $k_p$  соответственно:



В условиях, когда конверсия S в S' является лимитирующей стадией, превращение S' будет протекать по второму порядку относительно концентрации S' и концентрации соответствующих ферментов  $E_d$ ,  $E_r$ ,  $E_a$  и  $E_p$ . Это следует из кинетической теории полиферментных реакций, один из выводов которой состоит в том, что для полиферментной системы со строго лимитирующей стадией последующие реакции протекают в режиме реакции второго порядка. Константы  $k_d$ ,  $k_r$ ,  $k_a$  и  $k_p$  имеют смысл констант скоростей второго порядка (отношение  $k_{\text{кат}}/K_M$  соответствующих ферментов). Предполагается, что состав клетки в процессе роста культуры не меняется, т. е. концентрации ферментов  $E_d$ ,  $E_r$ ,  $E_a$  и  $E_p$  связаны с концентрацией фермента E линейными соотношениями

$$E_d = \Phi_d E; \quad E_r = \Phi_r E; \quad E_a = \Phi_a E; \quad E_p = \Phi_p E, \quad (1.101)$$

где  $\Phi_d$ ,  $\Phi_r$ ,  $\Phi_a$ ,  $\Phi_p$  — соответствующие коэффициенты пропорциональности.

В соответствии с этим дифференциальное уравнение, описывающее изменение вещества  $S'$ , можно записать в виде

$$\frac{dS'}{dt} = \frac{k_{\text{кат}} ES_0}{K_M + S_0} - (\Phi_d k_d + \Phi_r k_r + \Phi_a k_a + \Phi_p k_p) ES'. \quad (1.102)$$

Конечными этапами биосинтетического процесса являются стадии образования DNA, RNA и E. Предполагается, что скорость репликации зависит как от концентрации DNA в системе, так и от концентрации суммарного и мономерного компонента DN. Соответственно скорость транскрипции определяется концентрацией DNA и RN, скорость трансляции зависит от суммарной концентрации аминокислот (AA) и RNA. Систему уравнений, описывающих накопление полимерных компонентов DNA, RNA и E, можно представить в виде

$$\begin{aligned} \frac{d\text{DNA}}{dt} &= \alpha_R \text{DNA DN}; \\ \frac{d\text{RNA}}{dt} &= \alpha_T \text{DNA RN}; \\ \frac{dE}{dt} &= \alpha_i \text{RNA AA}, \end{aligned} \quad (1.103)$$

где  $\alpha_R$ ,  $\alpha_T$ ,  $\alpha_i$  — коэффициенты пропорциональности, имеющие смысл констант скорости второго порядка.

Если считать, что основные «оттоки» веществ DN, RN и AA связаны с их включением в полимеры, то дифференциальные уравнения для этих компонентов системы могут быть записаны следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{d\text{DN}}{dt} &= \Phi_d k_d ES' - \alpha_R \text{DN DNA}; \\ \frac{d\text{RN}}{dt} &= \Phi_r k_r ES' - \alpha_T \text{RN DNA}; \\ \frac{d\text{AA}}{dt} &= \Phi_a k_a ES' - \alpha_i \text{AA RNA}. \end{aligned} \quad (1.104)$$

Система уравнений (1.102) — (1.104) описывает поведение обсуждаемой автокаталитической полиферментной реакции, и ее решение может дать уравнение изменения основных компонентов во времени.

В целях существенного упрощения анализа для решения разностных уравнений (1.102) и (1.104) можно использовать приближение, основанное на малости параметра перед производной:

$$\begin{aligned} \frac{1}{(\Phi_d k_d + \Phi_r k_r + \Phi_a k_a + \Phi_p k_p) E} \frac{dS'}{dt} + S' &= \\ &= \frac{k_{\text{кат}} S_0}{(K_s + S_0)(\Phi_d k_d + \Phi_r k_r + \Phi_a k_a + \Phi_p k_p)}; \end{aligned} \quad (1.105)$$

$$\frac{1}{\alpha_R \text{DNA}} \frac{d\text{DN}}{dt} + \text{DN} = \frac{\Phi_d k_d ES'}{\alpha_R \text{DNA}}; \quad (1.106)$$

$$\frac{1}{\alpha_T \text{DNA}} \frac{d\text{RN}}{dt} + \text{RN} = \frac{\Phi_r k_r \text{ES}'}{\alpha_r \text{DNA}}; \quad (1.107)$$

$$\frac{1}{\alpha_r \text{RNA}} \frac{d\text{AA}}{dt} + \text{AA} = \frac{\Phi_a k_a \text{ES}'}{\alpha_r \text{RNA}}; \quad (1.108)$$

В условиях малости параметра перед производной имеем

$$\begin{aligned} S' &\gg \frac{1}{\Phi_d k_d + \Phi_r k_r + \Phi_a k_a + \Phi_p k_p} \frac{dS'}{dt}; \\ \text{DN} &\gg \frac{1}{\alpha_R \text{DNA}} \frac{d\text{DN}}{dt}; \\ \text{RN} &\gg \frac{1}{\alpha_T \text{DNA}} \frac{d\text{RN}}{dt}; \\ \text{AA} &\gg \frac{1}{\alpha_r \text{RNA}} \frac{d\text{AA}}{dt}, \end{aligned} \quad (1.109)$$

поэтому уравнения (1.105) — (1.108) трансформируются к виду

$$S' = \frac{k_{\text{кат}} S_0}{K_M + S_0} \frac{1}{\Phi_d k_d + \Phi_r k_r + \Phi_a k_a + \Phi_p k_p}; \quad (1.110)$$

$$\text{DN} = \frac{\Phi_d k_d \text{ES}'}{\alpha_R \text{DNA}}; \quad (1.111)$$

$$\text{RN} = \frac{\Phi_r k_r \text{ES}'}{\alpha_T \text{DNA}}; \quad (1.112)$$

$$\text{AA} = \frac{\Phi_a k_a \text{ES}'}{\alpha_r \text{RNA}}. \quad (1.113)$$

Условия (1.109) соответствуют условиям стационарности по промежуточным соединениям, согласно которым  $dS'/dt=0$ ,  $d\text{DN}/dt=0$ ,  $d\text{RN}/dt=0$ ,  $d\text{AA}/dt=0$ . По физическому смыслу эти условия характеризуют режим, в котором синтез полимерных молекул DNA, RNA, E протекает относительно быстро, так что лимитирующими оказываются стадии накопления предшественников.

Из уравнений (1.104) следуют соотношения

$$\begin{aligned} \frac{d\text{DNA}}{d\text{RNA}} &= \frac{\alpha_R}{\alpha_T} \frac{\text{DN}}{\text{RN}}, \\ \frac{d\text{DNA}}{dE} &= \frac{\alpha_R}{\alpha_r} \frac{\text{DN}}{\text{AA}} \frac{\text{DNA}}{\text{RNA}}, \\ \frac{d\text{RNA}}{dE} &= \frac{\alpha_T}{\alpha_r} \frac{\text{RN}}{\text{AA}} \frac{\text{DNA}}{\text{RNA}}. \end{aligned} \quad (1.114)$$

Уравнения (1.114) могут быть проинтегрированы. В условиях развития процесса на достаточную глубину [ $E_0 \ll E$ ,  $(\text{DNA})_0 \ll \ll \text{DNA}$ ,  $(\text{RNA})_0 \ll \ll \text{RNA}$ , где  $E_0$ ,  $\text{DNA}_0$ ,  $\text{RNA}_0$  — начальные концентрации полимерных компонентов] будем иметь:

$$\frac{\text{DNA}}{\text{RNA}} = \frac{\alpha_R}{\alpha_T} \frac{\text{DN}}{\text{RN}}, \quad (1.115)$$

$$\frac{\text{DNA}}{\text{E}} = \frac{\alpha_R}{\alpha_T} \frac{\text{DN}}{\text{AA}} \frac{\text{DNA}}{\text{RNA}}, \quad (1.116)$$

$$\frac{\text{RNA}}{\text{E}} = \frac{\alpha_T}{\alpha_i} \frac{\text{RN}}{\text{AA}} \frac{\text{DNA}}{\text{RNA}}. \quad (1.117)$$

Для того чтобы найти решение системы, необходимо проинтегрировать только одно уравнение, например

$$d\text{DNA} = \alpha_R \text{DN} dt. \quad (1.118)$$

Значение DN может быть найдено по уравнению (1.111). Однако сначала необходимо определить отношение (E/DNA), входящее в это уравнение. Из уравнений (1.111) — (1.113) следует:

$$\frac{\text{DN}}{\text{RN}} = \frac{\alpha_T}{\alpha_R} \frac{\Phi_d k_d}{\Phi_r k_r}, \quad (1.119)$$

$$\frac{\text{DN}}{\text{AA}} = \frac{\alpha_i}{\alpha_R} \frac{\Phi_d k_d}{\Phi_a k_a} \frac{\text{RNA}}{\text{DNA}}, \quad (1.120)$$

$$\frac{\text{RN}}{\text{AA}} = \frac{\alpha_i}{\alpha_T} \frac{\Phi_r k_r}{\Phi_a k_a} \frac{\text{RNA}}{\text{DNA}}. \quad (1.121)$$

Подстановка (1.119) в (1.125) дает уравнение

$$\frac{\text{DNA}}{\text{RNA}} = \frac{\Phi_d k_d}{\Phi_r k_r}. \quad (1.122)$$

Соответственно получаем

$$\frac{\text{DNA}}{\text{E}} = \frac{\Phi_d k_d}{\Phi_a k_a}. \quad (1.123)$$

Подстановка этого соотношения в уравнение для DN и последующее использование полученного значения DN приводят к дифференциальному уравнению

$$\frac{d\text{DNA}}{dt} = \Phi_a k_a S' \text{DNA} \quad (1.124)$$

или

$$\frac{d\text{DNA}}{\text{DNA}} = \frac{k_{\text{кат}} S_0}{k_M + S_0} \frac{\Phi_a k_a}{\Phi_a k_a + \Phi_d k_d + \Phi_r k_r + \Phi_p k_p}. \quad (1.125)$$

Интегрирование (1.125) с использованием начального условия  $t=0$ ,  $\text{DNA} = \text{DNA}_0$  дает функцию

$$\text{DNA} = \text{DNA}_0 e^{\mu t}, \quad (1.126)$$

где

$$\mu = \frac{k_{\text{кат}} S_0}{(k_M + S_0)} \frac{\Phi_a k_a}{\Phi_a k_a + \Phi_d k_d + \Phi_r k_r + \Phi_p k_p}. \quad (1.127)$$

Соответственно на основе использования соотношений (1.115) — (1.117) могут быть найдены функции, описывающие накопление во времени других полимерных компонентов:

$$\text{RNA} = \frac{\Phi_r k_r}{\Phi_a k_a} (\text{DNA})_0 e^{\mu t}; \quad (1.128)$$

$$E = \frac{\Phi_a k_a}{\Phi_a k_a} (\text{DNA})_0 e^{\mu t}. \quad (1.129)$$

Таким образом, полученные решения описывают экспоненциальный рост биомассы в системе. При этом удельная скорость роста культуры является гиперболической функцией от концентрации субстрата. Зависимость от концентрации субстрата отражает михаэлисовскую функцию для лимитирующего фермента. Максимальная удельная скорость, реализуемая при высоких концентрациях субстрата, имеет вид

$$\mu_m = \frac{k_{\text{кат}}}{1 + \frac{\Phi_a k_a}{\Phi_a k_a} + \frac{\Phi_r k_r}{\Phi_a k_a} + \frac{\Phi_p k_p}{\Phi_a k_a}}. \quad (1.130)$$

● Проведенный анализ показывает, что кинетическое обоснование зависимости скорости роста популяции микроорганизмов от концентрации субстрата может быть получено и на основе подхода, использующего представления о механизме биосинтеза нуклеиновых кислот и белка. Входящий в уравнение параметр  $\mu_m$  является сложной функцией кинетических характеристик лимитирующих биохимических процессов, значение  $K_s$  в рамках данной модели характеризует константу Михаэлиса лимитирующего субстрата.

Зависимость скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата, данная уравнением Моно, весьма широко используется на практике и, как правило, в рамках точности микробиологического эксперимента находит экспериментальное подтверждение. В разное время были предложены и другие уравнения, в той или иной степени описывающие кинетику роста культур микроорганизмов. Например, удельная скорость их роста может быть представлена экспоненциальной функцией концентрации субстрата (уравнение Тейсера)

$$\mu = \mu_m (1 - e^{-kS}), \quad (1.131)$$

где  $k$  — константа, которая может быть найдена из экспериментальных данных.

Другая аппроксимация уравнения скорости роста популяции имеет вид (Ц. Оиву, Г. Лоусон и Г. Дин, 1984)

$$\frac{dM}{dt} = \mu M \frac{1 - M/M_m}{1 - M/M'_m}, \quad (1.132)$$

где  $M_m$  и  $M'_m$  — эмпирические константы.

Однако эти уравнения не имеют достаточно ясного молекулярного обоснования, громоздки и находят ограниченное применение на практике.

## 1.2. ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ РОСТА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИМИТИРУЮЩЕГО СУБСТРАТА. «МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ» ПОДХОД

Изложенный подход к описанию кинетики роста микробной популяции имеет «макроскопический» характер. Рост культуры микроорганизмов представлен как автокаталитический процесс, идущий с накоплением активных самовоспроизводящихся каталитических систем. Видно, что такой подход приводит к уравнениям, достаточно адекватно описывающим фундаментальные кинетические особенности микробного роста — экспоненциальный характер процесса и зависимость удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата. Методология построения кинетических уравнений микробного роста может быть основана и на другом подходе — на расчете из химико-кинетических представлений времени удвоения клеточного материала исходя из предположения, что это время определяется каким-то лимитирующим биохимическим процессом. При условии, что это время удастся рассчитать, рост популяции в экспоненциальной фазе будет описываться уравнением

$$M = M_0 \cdot 2^{t/\tau}, \quad (1.133)$$

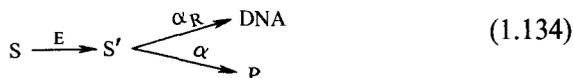
где  $\tau$  — характеристическое время биохимического цикла, лимитирующее деление (время удвоения);  $M_0$  — начальная концентрация клеток.

Это достаточно общий и широкий подход, позволяющий проанализировать кинетику роста любой клеточной популяции, если имеется возможность количественного определения  $\tau$ . Очевидно, что время удвоения будет зависеть от механизма процесса и скорости отдельных его стадий.

Рассмотрим механизм деления клетки, предполагая, что действие фермента (или ферментной системы), трансформирующего лимитирующий субстрат, и процесс репликации ДНК являются самыми медленными стадиями. Такая ситуация часто реализуется для активно растущих микроорганизмов, постоянно находящихся в процессе деления.

### 1.2.1. Простейшая схема

Проанализируем простейшую кинетическую схему:



На первой стадии процесса происходит трансформация исходного лимитирующего субстрата под действием фермента (или ферментной системы)  $E$  с образованием ключевого метаболита  $S'$ . Этот процесс представляет собой обычную ферментативную реакцию, и кинетика его описывается «классическим» уравнением Михаэлиса — Ментен. Ключевой метаболит  $S'$  участвует в процессе репликации и в других параллельных процессах, приводящих к накоплению клеточного материала  $P$ . Предполагается, что скорость синтеза ДНК на матрице ДНК пропорциональна концентрации промежуточного метаболита  $S'$  и может быть охарактеризована константой скорости  $\alpha_R$ . По физическому смыслу это может быть константа скорости удлинения полимерной цепи на одно основание. Важным также представляется предположение о том, что скорость биосинтеза фермента  $E$  и белков репликационного комплекса — относительно быстрые процессы, концентрации этих компонентов постоянны и не входят в уравнения скорости процесса. Любое из этих предположений может быть неоправданно, что существенно изменит кинетическое описание, однако это не затрагивает принципы излагаемого метода.

Кинетику процесса в рамках кинетической схемы (1.134) описывает система уравнений

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \alpha_R S'; \quad (1.135)$$

$$\frac{dS'}{dt} = \frac{k_{кат} ES}{K_s + S} - (\alpha_R + \alpha) S', \quad (1.136)$$

где  $\Delta DNA$  — прирост ДНК на исходной матрице.

В условиях стационара по промежуточному метаболиту ( $dS'/dt=0$ ) имеем

$$S' = \frac{1}{\alpha_R + \alpha} \frac{k_{кат} ES}{K_s + S}. \quad (1.137)$$

Соответственно

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{\alpha_R}{\alpha_R + \alpha} \cdot \frac{k_{кат} ES}{K_s + S}. \quad (1.138)$$

На начальном этапе процесса в режиме  $S=S_0$  уравнение может быть проинтегрировано:

$$\Delta DNA(t) = \frac{\alpha_R}{\alpha_R + \alpha} \cdot \frac{k_{кат} ES_0}{K_s + S_0} t \quad (1.139)$$

(при этом использовано начальное условие  $t=0, \Delta DNA=0$ ).

Репликационный процесс заканчивается, когда количество синтезированной DNA соответствует количеству базовой, т. е.  $\Delta DNA = B$ , где  $B$  — количество базовой ДНК. Величина  $B$  мо-

жет быть охарактеризована различным образом. Например, если скорость процессов в клетке выражается в единицах моль в секунду на клетку, то  $B$  может быть выражено в единицах моль оснований ДНК на клетку.

При  $t = \tau_R$ ,  $\Delta DNA = B$  имеем

$$B = \frac{\alpha_R}{\alpha_R + \alpha} \cdot \frac{k_{кат} ES_0}{K_s + S_0} \tau_R \quad (1.140)$$

или

$$\tau_R = \frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \frac{B(K_s + S_0)}{k_{кат} ES_0} \quad (1.141)$$

Таким образом, найдено время, необходимое для удвоения ДНК. Видно, что оно зависит от концентрации субстрата обратно пропорционально активности лимитирующего фермента.

Динамика изменения числа клеток в популяции с учетом уравнения (1.141) определяется соотношением

$$M(t) = M_0 2^{\left[ \frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \frac{K_s + S_0}{k_{кат} ES_0} B \right] t}, \quad (1.142)$$

т. е. удельная скорость роста культуры будет иметь вид

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau_R} = \frac{\alpha_R \ln 2}{\alpha_R + \alpha} \frac{k_{кат} S_0}{K_s + S_0} \frac{E}{B} \quad (1.143)$$

▲ Уравнение (1.143) отражает принципиальную особенность кинетики микробного роста — зависимость удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата. При «насыщающих» концентрациях субстрата имеем максимальную удельную скорость

$$\mu_m = \frac{\alpha_R}{\alpha_R + \alpha} \ln 2 \frac{k_{кат} E}{B} \quad (1.144)$$

Из уравнения (1.144) видно, что основными факторами, приводящими к существенному уменьшению  $\mu_m$  по сравнению с  $k_{кат}$ , являются распределение потоков ключевого метаболита  $[\alpha_R / (\alpha_R + \alpha)]$  может быть существенно меньше единицы, если  $\alpha / \alpha_R \gg 1$ , т. е. если на репликационный процесс идет небольшая доля вещества] и малое количество в клетке лимитирующего фермента по сравнению с ДНК.

Величины  $K_s$  должны соответствовать константе Михаэлиса лимитирующего фермента.

● Рассмотренный подход и полученное уравнение (1.143) соответствуют самому простому случаю — линейному развитию во времени репликационного процесса. В реальной практике



стадийность трансформации субстрата в условиях, когда лимитирует одна из стадий, не отражается на уравнении скорости репликации.

### 1.2.3. Многостадийность клеточного развития

Наиболее общий случай развития клетки включает ряд фаз, в которых не происходит репликационного процесса и клеточного деления. В кинетике роста каждой индивидуальной клетки могут иметь место периоды индукции, предшествующие репликации или следующие за ней. Это вносит определенные изменения в кинетику процесса.

Время удвоения клетки в этом случае определяется уравнением

$$\tau = \tau_R + \tau_a, \quad (1.150)$$

где  $\tau_R$  — время репликации, представленное уравнением (1.141);  $\tau_a$  — время нахождения клетки в других фазах клеточного цикла.

Учитывая уравнение (1.141), найдем

$$\tau = \frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} - \frac{K_s + S_0}{k_{\text{кат}} S_0} \frac{B}{E} + \tau_a \quad (1.151)$$

или

$$\mu = \frac{\ln 2}{\left(\frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R}\right) \frac{K_s + S_0}{k_{\text{кат}} S_0} \frac{B}{E} + \tau_a} \quad (1.152)$$

Уравнение (1.152) можно преобразовать к виду

$$\mu = \frac{\frac{k_{\text{кат}} E \ln 2}{\left(\frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R}\right) B + \tau_a k_{\text{кат}} E} S_0}{\frac{K_s}{1 + \frac{\tau_a k_{\text{кат}} E \alpha_R}{(\alpha_R + \alpha) B}} + S_0}, \quad (1.153)$$

из которого следуют выражения для кинетических параметров уравнения Моно

$$\mu_m = \frac{k_{\text{кат}} E \ln 2}{\left(1 + \frac{\alpha}{\alpha_R}\right) B + \tau_a k_{\text{кат}} E}; \quad (1.154)$$

$$K_{s1 \text{ набл}} = \frac{K_s}{1 + \frac{\tau_a k_{\text{кат}} E \alpha_R}{(\alpha_R + \alpha) B}}, \quad (1.155)$$

где  $K_s$  — константа сродства субстрата к микроорганизму. Уравнения (1.152) и (1.153) «вырождаются» в более простую зависимость вида (1.143) при условии

$$\tau_a k_{\text{кат}} E \ll B \left( \frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \right) \quad (1.156)$$

или

$$\tau_a \ll \frac{(\alpha_R + \alpha) B}{\alpha_R k_{\text{кат}} E} \quad (1.157)$$

Это неравенство справедливо при относительно небольших периодах  $\tau_a$ , т. е. если периоды времени, предшествующие репликационному процессу или следующие за ним, относительно малы. Видно, что неравенство (1.157) выполняется более отчетливо при больших содержаниях ДНК ( $B$ ) и малых значениях активности лимитирующего фермента ( $k_{\text{кат}} E$ ). При этих условиях деление клетки лимитируется репликационным процессом.

Можно представить и обратную ситуацию, когда  $\tau_a k_{\text{кат}} E \gg \gg \left( \frac{\alpha_R + \alpha}{\alpha_R} \right) B$ . Как видно из уравнений (1.154) и (1.155), в этом режиме

$$\mu_m = \frac{\ln 2}{\tau_a}; \quad (1.158)$$

$$K_{s_1 \text{набл}} = \frac{K_s B (\alpha_R + \alpha)}{\alpha_R \tau_a k_{\text{кат}} E}. \quad (1.159)$$

▲ Максимальная удельная скорость роста гиперболически зависит от концентрации лимитирующего фермента, и в пределе лимитирующей сгадий становится процесс, характеризуемый переменным параметром  $\tau_a$ . При этом режиме клетка большую часть времени находится в состоянии покоя, а процесс деления протекает относительно быстро.

Известно, что процесс развития клеток как микробного, так и животного происхождения включает несколько дискриминируемых стадий. В этой последовательности трансформаций клетки лишь одна стадия представляет собой истинную репликационную стадию. Остальные стадии, связанные с изменением метаболизма, с включением или выключением определенных генов, составляют совокупность процессов, определяющих характеристическое время  $\tau_a$ . Бактериальные клетки имеют высокие скорости роста и, вероятно, в активной фазе развития популяции постоянно находятся в состоянии митоза. Для описания кинетики их роста, по-видимому, наиболее оправдано использование уравнения (1.149). Для животных клеток в культуре ткани митоз составляет небольшой отрезок времени их развития. В этом случае оправдано описание кинетики процесса с помощью (1.158), (1.159). При этом дополнительной кинетической дешифровке должен быть под-

вергнут параметр  $\tau_a$ , характеризующий некую наиболее медленную молекулярную трансформацию в процессе развития клетки.

### 1.2.4. Влияние транспортных процессов на кинетику роста популяции

Рассмотрим закономерности процесса для случая, когда транспорт вещества в клетку может вносить свой вклад в лимитирование процесса роста клетки. Известно, что транспорт лимитирующего субстрата, определяемый действием пермеаз, может быть относительно медленной стадией. Формально эквивалентным является случай, когда транспорт лимитирован внешнедиффузионным переносом субстрата. Простейшая кинетическая схема имеет вид



где  $v_T$  — скорость транспортных процессов.

Кинетику процесса описывает система дифференциальных уравнений

$$\frac{dS_1}{dt} = v_T - \frac{k_{\text{кат}} ES_1}{k_1 + S_1}; \quad (1.161)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{k_{\text{кат}} ES_1}{K_1 + S_1} - \frac{\alpha_R S_2}{K_2 + S_2}; \quad (1.162)$$

$$\frac{d\Delta \text{DNA}}{dt} = \frac{\alpha_R S_2}{K_2 + S_2}. \quad (1.163)$$

Предполагается, что скорость транспортных процессов может линейно зависеть от концентрации субстрата. Это в достаточной степени справедливо для лимитирования процесса внешнедиффузионным переносом субстрата (С. Д. Варфоломеев, Г. Ф. Судьина, 1980):

$$v_T = k S_0. \quad (1.164)$$

Если транспорт вещества определяется действием белков-переносчиков (пермеаз), то скорость процесса может иметь вид уравнения Михаэлиса — Ментен

$$v_T = \frac{V S_0}{K + S_0}, \quad (1.165)$$

где  $V$  — максимальная скорость транспорта;  $K$  — эффективная субстратная константа.  $v_T$  может быть выражена в молях субстрата на клетку в единицу времени.

Если в клетке имеет место стационарное состояние по промежуточным субстратам  $S_1$  и  $S_2$ , т. е. если  $\frac{dS_1}{dt} = 0$ ,  $\frac{dS_2}{dt} = 0$ , то

$$\frac{d\Delta\text{DNA}}{dt} = v_r; \quad (1.166)$$

следовательно, скорость роста полимерной цепи ДНК лимитирована скоростью транспорта субстрата. В этом случае удельная скорость роста популяции должна быть представлена уравнением

$$\mu = \frac{v_r}{B} \ln 2, \quad (1.167)$$

где  $B$  — количество ДНК, выраженное числом молей оснований на клетку.

Таким образом, удельная скорость роста клеточной культуры может иметь вид

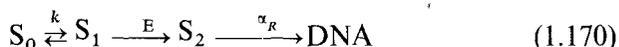
$$\mu = \frac{kS_0}{B} \ln 2 \quad (1.168)$$

[следствие уравнения (1.164)] или

$$\mu = \frac{V S_0 \ln 2}{(K + S_0) B} \quad (1.169)$$

[следствие уравнения (1.165)].

Транспорт вещества в клетку может быть быстрым и носить равновесный характер. Этому соответствуют кинетическая схема



и система уравнений

$$K_s = S_1 / S_0; \quad (1.171)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{k_{\text{кат}} E S_1}{K_s + S_1} - \alpha_R S_2; \quad (1.172)$$

$$\frac{d\Delta\text{DNA}}{dt} = \alpha_R S_2.$$

В режиме быстрого использования  $S_2$  ( $\alpha$  велико) ( $1/\alpha$ )  $dS_2/dt \ll S_2$  имеет место стационарное состояние по  $S_2$ . Соответственно

$$\frac{d\Delta\text{DNA}}{dt} = \frac{k_0 E S_1}{K_s + S_1} = \frac{k_{\text{кат}} E K S_0}{K_s + K S_0}. \quad (1.173)$$

Удельная скорость роста популяции в этом случае дается уравнением

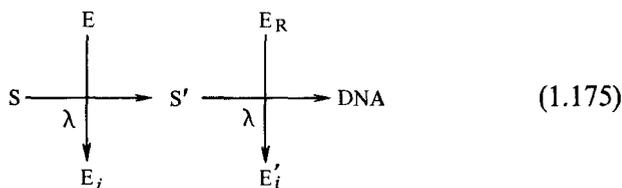
$$\mu = \frac{k_{\text{кат}} S_0}{K_s / K + S_0} \frac{E}{B} \ln 2. \quad (1.174)$$

● Видно, что наличие быстрого равновесного транспортно-го процесса оказывает влияние на наблюдаемую константу сродства микроорганизма к субстрату и не сказывается на максимальной удельной скорости роста популяции.

### 1.2.5. Старение клетки в процессе роста

Весьма важные явления, которые наблюдаются в процессе роста индивидуальной клетки, связаны с процессами старения или инактивации ключевых ферментных систем. Инактивации может подвергаться как репликативный комплекс, так и лимитирующий фермент. Как тот, так и другой процесс должны найти отражение в кинетике роста микробной популяции. Рассмотрим общий случай старения клетки, когда на динамику процесса накладывается кинетика неспецифических инактивационных процессов, вызывающих потерю репликационного потенциала и инактивацию лимитирующего фермента. Такого рода явления могут иметь место, например, при «старении» мембран клетки, инактивации энергетических процессов.

Простейшую кинетическую схему, описывающую сущность таких процессов, можно представить в виде



где  $S$ —исходный лимитирующий субстрат;  $S'$ —промежуточный метаболит, лимитирующий репликацию;  $E$ —лимитирующий фермент;  $E_R$ —ферменты репликативного комплекса;  $E_i$ ,  $E'_i$ —инактивированные формы фермента и репликативного комплекса. Предполагается, что инактивационные процессы имеют экспоненциальную природу и характеризуются общим кинетическим параметром  $\lambda$ .

Кинетику процессов будет описывать система уравнений

$$\frac{d\Delta\text{DNA}}{dt} = \alpha_R(t)S'; \quad (1.176)$$

$$\frac{dS'}{dt} = \frac{k_{\text{вар}}E(t)S}{K_s + S} - \alpha_R(t)S'; \quad (1.177)$$

$$\alpha_R(t) = \alpha_{R_0}e^{-\lambda t}; \quad (1.178)$$

$$E(t) = E_0e^{-\lambda t}. \quad (1.179)$$

На начальном этапе развития процесса в режиме постоянства концентрации исходного субстрата ( $S=S_0$ ) и стационарности по  $S'$  имеет место соотношение

$$S' = \frac{1}{\alpha_{R_0}} \frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_s + S_0}. \quad (1.180)$$

Соответственно кинетику роста цепи ДНК будет описывать уравнение

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_s + S_0} e^{-\alpha t}. \quad (1.181)$$

Обозначим

$$\frac{k_{кат} E_0 S_0}{K_s + S_0} = v_0. \quad (1.182)$$

Интегрирование (1.181) при условии  $t=0, \Delta DNA=0$  приводит к функции

$$\Delta DNA(t) = \frac{v_0}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t}). \quad (1.183)$$

Формально схеме (1.175) эквивалентна схема с инактивацией только лишь репликативного комплекса  $E_R$ , если «отток» промежуточного субстрата  $S'$  на репликационный процесс относительно мал:



При  $\alpha_{R_0} \ll \alpha$  уравнения, описывающие кинетику, фактически эквивалентны уравнениям (1.176)—(1.179), однако вместо множителя  $1/\alpha_{R_0}$  в уравнении (1.180) появляется множитель  $1/\alpha$ , т. е.

$$S' = \frac{1}{\alpha} \frac{k_{кат} E S_0}{K_s + S_0}, \quad (1.185)$$

и соответственно в уравнении (1.181)—множитель  $\alpha_R/\alpha$ :

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \left( \frac{\alpha_R}{\alpha} \right) v_0 e^{-\lambda t}.$$

При конечном росте полимерной цепи, соответствующей ДНК клетки, уравнение (1.183) позволяет определить время репликационного процесса  $\tau_R$ . Если принять, что при  $t=\tau_R$   $\Delta DNA=B$ , то имеем

$$B = \frac{v_0}{\lambda} (1 - e^{-\lambda \tau_R}). \quad (1.186)$$

Из этого уравнения следует

$$\tau_R = -\frac{1}{\lambda} \ln \left( 1 - \frac{\lambda B}{v_0} \right). \quad (1.187)$$

Соответственно

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau_R} = - \frac{\lambda \ln 2}{\ln \left( 1 - \frac{\lambda B}{v_0} \right)}. \quad (1.188)$$

Как функция начальной концентрации субстрата уравнение удельной скорости роста будет иметь вид

$$\mu = - \frac{\lambda \ln 2}{\ln \left[ 1 - \frac{\lambda B}{k_{\text{кат}} E} (1 + K_s/S_0) \right]}. \quad (1.189)$$

При малых значениях  $\lambda$ , когда  $\frac{\lambda B}{k_{\text{кат}} E} \left( 1 + \frac{K_s}{S_0} \right) \ll 1$ , логарифмический знаменатель уравнения (1.189) разлагается в быстро сходящийся ряд, что приводит к функции

$$\mu_{\lambda \rightarrow 0} = k_{\text{кат}} \left( \frac{S_0}{K_s + S_0} \right) \ln 2 \frac{E}{B}. \quad (1.190)$$

Эта функция соответствует уравнению удельной скорости роста типа Моно (см. (1.143)).

Внешне функция (1.189) мало похожа на «классическое» уравнение Моно, однако графически эти функции весьма близки. Это создает определенные трудности для дискриминации двух механизмов на основе конкретных экспериментальных данных. На рис. 1.3, а приведены рассчитанные

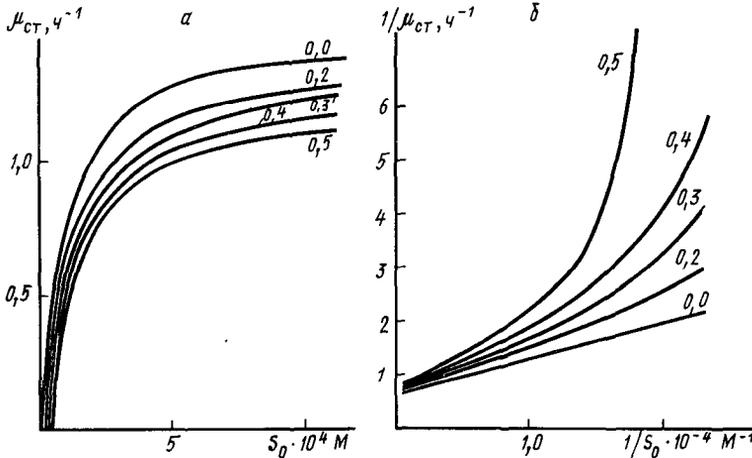


Рис. 1.3. Зависимость удельной скорости роста клеточной популяции от концентрации субстрата в условиях проявления клеточного старения (а); те же данные в цветных обратных координатах (б):

функции рассчитаны по уравнению (1.189) при использовании следующих параметров:  $K_s = 1 \cdot 10^{-4}$  М;  $B/k_{\text{кат}}$ ,  $E = 0,66$  ч<sup>-1</sup>. Значения  $\lambda$  даны цифрами на кривых (ч<sup>-1</sup>)

значения  $\mu$  как функции концентрации субстрата при различных значениях константы скорости инактивации  $\lambda$ . Для сравнения на этом же рисунке приведена кривая для случая неосложненного «старением» роста (кривая с  $\lambda=0$ ). Видно, что удельная скорость роста культуры для случая «старения» клетки в процессе роста также «насыщается» субстратом:

$$\mu_{s_0 \rightarrow \infty} = \mu_m = - \frac{\lambda \ln 2}{\ln \left[ 1 - \frac{\lambda B}{k_{кат} E} \right]}. \quad (1.191)$$

▲ Принципиальное отличие этих двух функций выявляется при анализе их поведения в условиях малых концентраций субстрата. При старении клеток в процессе роста должна существовать *пороговая минимальная концентрация субстрата*, ниже которой микробный рост невозможен. Из уравнения (1.195) следует условие

$$1 - \frac{\lambda B}{k_{кат} E} \left( 1 + \frac{K_s}{S_0} \right) > 0. \quad (1.192)$$

из которого получаем

$$S_{кр} = \frac{K_s}{\frac{k_{кат} E}{\lambda B} - 1}. \quad (1.193)$$

Видно, что чем больше константа скорости инактивации  $\lambda$ , тем выше значение  $S_{кр}$ .

В микробиологии часты случаи, когда рост клеток весьма чувствителен к концентрации лимитирующего субстрата; рост культуры полностью прекращается при переходе к низким его концентрациям. Развитая кинетическая модель, базирующаяся на представлении о «старении» клеточных механизмов в процессе роста популяции, может служить основой для объяснения феноменов этой группы. Физический смысл критических эффектов заключается в том, что при малых концентрациях субстрата репликационный процесс идет настолько медленно, что инактивационные процессы успевают заблокировать рост клетки.

Отличить рост культуры со старением от неосложненного роста можно на основе изучения зависимости удельной скорости роста от концентрации исходного субстрата. В случае заметных эффектов инактивации ключевых элементов клеточного деления кинетические данные не должны линеаризоваться в обратных координатах (рис. 1.3, б). Возможность дискриминации механизмов в значительной степени зависит от точности эксперимента, в первую очередь от точности определения удельных скоростей роста популяции.

Для определения кинетических параметров роста культуры из экспериментальных данных можно воспользоваться прибли-

женными уравнениями, основанными на разложении в ряд логарифмического члена уравнения (1.189). При концентрациях субстрата выше критической разложение в ряд логарифмического члена уравнения (1.189) и использование первых двух членов приводят к уравнению

$$\mu = \frac{\ln 2}{\frac{B}{k_{\text{кат}} E} \left(1 + \frac{K_s}{S_0}\right) \left[1 + \frac{\lambda B}{2k_{\text{кат}} E} \left(1 + \frac{K_s}{S_0}\right)\right]}. \quad (1.194)$$

Это уравнение справедливо при невысокой степени нелинейности экспериментальных данных в координатах  $1/\mu$  от  $1/S_0$ .

Уравнение (1.194) может быть записано в форме

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1 + \frac{K_s}{S_0}}{\mu_m} \left[1 + \frac{\lambda \ln 2}{2\mu_m} \left(1 + \frac{K_s}{S_0}\right)\right], \quad (1.195)$$

где  $\mu_m = \frac{k_{\text{кат}} E \ln 2}{B}$ .

При малых значениях  $1/S_0$  (большие концентрации субстрата) может быть сделана оценка  $K_s$  и  $\mu_m$  на основе использования асимптотической прямой, описываемой уравнением

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m S_0}. \quad (1.196)$$

Это прямая в координатах  $1/\mu$  от  $1/S_0$ , имеющая вид касательной к точке  $1/\mu_m$ . Оценка  $K_s$  на основе этой прямой позволяет рассчитать функцию  $\Phi$  при любой концентрации субстрата:

$$\Phi = 1 + \frac{K_s}{S_0}. \quad (1.197)$$

С учетом этого уравнение (1.195) может быть трансформировано к виду

$$\frac{1}{\mu\Phi} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{\lambda \ln 2}{2\mu_m^2}. \quad (1.198)$$

▲ В координатах  $1/\mu$   $\Phi$  от  $\Phi$  экспериментальные данные должны быть представлены прямой линией, параметры которой дают значения  $\mu_m$  и  $\lambda$ .

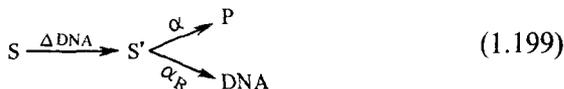
### 1.2.6. Кинетика роста микробной клетки с ускорением

При создании выше рассмотренных моделей клеточного роста исходили из представления о линейном характере репликационного процесса во времени или о его замедлении,

связанном со «старением» клеточных структур и с потерей их функциональной активности. Однако в литературе обсуждаются возможности нелинейного роста клетки и нелинейного процесса репликации. Рассматриваются закономерности экспоненциального или квадратичного роста (Л. Н. Дроздов-Тихомиров, А. В. Дороднов, 1984). Представляет интерес изучение кинетических моделей такого рода процессов.

Увеличение скорости репликационного процесса возможно, если скорость последующей репликации зависит от белка, «записанного» ранее, т. е. для последующей репликации необходим предварительный биосинтез белкового компонента. Рассмотрим несколько моделей такого рода.

**ДНК-зависимая стадия конверсии лимитирующего субстрата.** Кинетическая схема процесса может быть представлена в виде



Ферментативная стадия образования промежуточного метаболита может быть резко ускорена за счет дополнительного биосинтеза фермента, а этот биосинтетический процесс, в свою очередь, определяется приростом ДНК. Систему уравнений, описывающих кинетику процесса, можно представить в виде

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \alpha_R S'; \quad (1.200)$$

$$\frac{dS'}{dt} = \frac{k\Delta DNA S_0}{K_s + S_0} - (\alpha_R + \alpha) S', \quad (1.201)$$

где константа скорости  $k$  имеет эффективный характер и включает некую постоянную начальную концентрацию лимитирующего фермента. В стационарном состоянии по промежуточному метаболиту ( $dS'/dt=0$ ) имеем

$$S' = \frac{k\Delta DNA S_0}{(K_s + S_0)(\alpha_R + \alpha)}; \quad (1.202)$$

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{\alpha_R}{\alpha_R + \alpha} \frac{kS_0}{K_s + S_0} \Delta DNA. \quad (1.203)$$

Видно, что скорость прироста DNA линейно зависит от количества реплицированной нуклеиновой кислоты.

**ДНК-зависимый репликационный процесс.** Если скорость репликации зависит от белкового компонента, синтез которого закодирован в ДНК, и для нормального развития процесса необходим предварительный синтез одного из компонентов репликационного комплекса, то кинетические закономерности

процесса будут аналогичны рассмотренным выше. Действительно,

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \alpha'_R S' \Delta DNA; \quad (1.204)$$

$$\frac{dS'}{dt} = \frac{k_{\text{кат}} ES_0}{K_s + S_0} - (\alpha + \alpha'_R \Delta DNA) S', \quad (1.205)$$

или (при  $dS'/dt = 0$ )

$$S' = \frac{k_{\text{кат}} ES_0}{(K_s + S_0)(\alpha + \alpha'_R \Delta DNA)}; \quad (1.206)$$

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{\alpha'_R \Delta DNA k_{\text{кат}} ES_0}{(K_s + S_0)(\alpha + \alpha'_R \Delta DNA)}. \quad (1.207)$$

При  $\alpha'_R \Delta DNA \gg \alpha$  уравнение скорости репликации принимает вид

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{k_{\text{кат}} ES_0}{K_s + S_0}, \quad (1.208)$$

т. е. будет соответствовать известному случаю линейного роста. Однако если  $\alpha \gg \alpha'_R \Delta DNA$ , то

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = \frac{\alpha'_R k_{\text{кат}} ES_0}{\alpha K_s + S_0} \Delta DNA, \quad (1.209)$$

т. е. имеет место зависимость скорости прироста DNA от количества  $\Delta DNA$ .

Уравнения типа (1.203) и (1.209) представляют собой уравнения с разделяющимися переменными и могут быть легко проинтегрированы. Эти уравнения можно записать в форме

$$\frac{d\Delta DNA}{dt} = A(S_0) \Delta DNA, \quad (1.210)$$

где  $A(S_0) = \frac{\alpha'_R k_{\text{кат}} ES_0}{\alpha K_s + S_0}$  [в случае уравнения (1.209)]

и  $A(S_0) = \frac{\alpha'_R k_{\text{кат}} ES_0}{\alpha + \alpha'_R \frac{k S_0}{K_s + S_0}}$  [в случае уравнения (1.203)]

Интегрирование (1.210) в предположении, что при  $t=0$   $\Delta DNA = \Delta DNA_0$ , т. е. в начальный момент времени в системе имеется часть реплицированной DNA, приводит к уравнению

$$\ln \frac{\Delta DNA}{\Delta DNA_0} = A(S_0) t. \quad (1.211)$$

Если это условие не выполняется, то уравнение (1.211) теряет смысл и процесс репликации не может идти. Уравнение (1.211) показывает, что репликационный процесс протекает экспоненциально во времени:

$$\Delta \text{DNA}(t) = \Delta \text{DNA}_0 e^{A(S_0)t}. \quad (1.212)$$

На основе этого уравнения можно рассчитать время репликации  $\tau$  при условии, что при  $t = \tau$  прирост вновь синтезированной ДНК  $\Delta \text{DNA}$  достигает определенного значения, равного  $\text{DNA}_n$ , т. е.

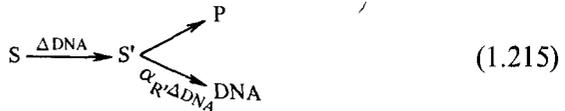
$$\tau = \frac{1}{A(S_0)} \ln \frac{\text{DNA}_n}{\Delta \text{DNA}_0}, \quad (1.213)$$

и соответственно при использовании связи между временем репликации и удельной скоростью роста популяции можно рассчитать удельную скорость роста:

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau} = \frac{\ln 2 A(S_0)}{\ln \frac{\text{DNA}_n}{\Delta \text{DNA}_0}}. \quad (1.214)$$

Видно, что уравнение удельной скорости роста как функция концентрации субстрата имеет «классический» гиперболический вид, а максимальная удельная скорость роста включает в себя зависимость от количества «затравки», реплицированной в начальный момент времени DNA.

**ДНК-зависимая как ферментативная, так и репликационная стадии.** В случае зависимости от  $\Delta \text{DNA}$  скорости как ферментативной, так и репликационной стадии система характеризуется квадратичным характером уравнения скорости:



Для данной кинетической схемы система уравнений имеет вид

$$\frac{d\Delta \text{DNA}}{dt} = \alpha'_R S' \Delta \text{DNA}; \quad (1.216)$$

$$\frac{dS'}{dt} = \frac{k S_0 \Delta \text{DNA}}{K_s + S_0} - (\alpha'_R \Delta \text{DNA} + \alpha) S', \quad (1.217)$$

где  $k$  имеет тот же смысл, что и в уравнении (1.201). Соответственно (при  $dS'/dt = 0$ )

$$S' = \frac{k S_0 \Delta \text{DNA}}{(K_s + S_0)(\alpha + \alpha'_R \Delta \text{DNA})} \quad (1.218)$$

или при  $\alpha \gg \alpha'_R \Delta \text{DNA}$

$$S' = \frac{k S_0 \Delta \text{DNA}}{(K_s + S_0) \alpha}; \quad (1.219)$$

$$\frac{d\Delta \text{DNA}}{dt} = \frac{\alpha'_R}{\alpha} \frac{k S_0}{K_s + S_0} (\Delta \text{DNA})^2. \quad (1.220)$$

Уравнение (1.220) представляет собой дифференциальное уравнение с разделяющимися переменными и может быть проинтегрировано. Если обозначить

$$\frac{\alpha'_R k S_0}{\alpha K_s + S_0} = A(S_0), \quad (1.221)$$

то имеем

$$\frac{d\Delta DNA}{(\Delta DNA)^2} = A(S_0) dt. \quad (1.222)$$

Интегрирование при использовании начального условия  $t=0$ ,  $\Delta DNA = \Delta DNA_0$  дает уравнение

$$\frac{1}{\Delta DNA_0} - \frac{1}{\Delta DNA_t} = A(S_0)t, \quad (1.223)$$

где  $\Delta DNA_t$  — текущее значение  $\Delta DNA$  при времени  $t$ .

Количество реплицированной ДНК резко увеличивается во времени:

$$\Delta DNA_t = \frac{\Delta DNA_0}{1 - A(S_0)\Delta DNA_0 t}. \quad (1.224)$$

Как следует из этого уравнения, с ростом  $t$  существенно увеличивается скорость репликации.

Если принять, что репликация завершается за время, соответствующее полному синтезу DNA клетки, т. е. при  $t = \tau$ ,  $\Delta DNA = DNA_n$ , с учетом уравнения (1.223) находим

$$\tau = \left( \frac{1}{\Delta DNA_0} - \frac{1}{DNA_n} \right) \frac{1}{A(S_0)} \quad (1.225)$$

или

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau} = \frac{\ln 2 A(S_0)}{\frac{1}{\Delta DNA_0} - \frac{1}{DNA_n}}. \quad (1.226)$$

Если количество «затравки» существенно меньше общего количества, т. е.  $DNA$ , и  $\frac{1}{\Delta DNA_0} \gg \frac{1}{DNA_n}$ , то

$$\mu = A(S_0) \ln 2 \Delta DNA_0. \quad (1.227)$$

Удельная скорость роста зависит по Моно от концентрации лимитирующего субстрата, а максимальная удельная скорость линейно связана с количеством «затравки»:

$$\mu_m = \frac{k\alpha'_R}{\alpha} \Delta DNA_0. \quad (1.228)$$

● Рассмотренные кинетические модели описывают феномен нелинейного роста клетки или феномен нелинейной репликации. Уравнения удельной скорости роста популяции, вытекающие

из этих моделей, дают зависимости скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата. Принципиально важной особенностью уравнений нелинейного роста является включение в качестве параметра количества «считанной» ДНК в начальный момент времени  $\Delta DNA_0$ . Процесс репликации начинает идти с ускорением, если в клетке имеется определенное количество реплицированного наследственного материала.

Таким образом, в данном разделе рассмотрены подходы к построению кинетических уравнений роста популяции при различных предположениях о молекулярных механизмах клеточных процессов. Развитые подходы позволяют осуществить переход от «микроскопических» представлений о механизмах процессов к «макроскопическим» явлениям роста клеточных популяций, исследуемым экспериментально.

### 1.3. ПРЕДЕЛЫ СКОРОСТИ РОСТА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

Представляет интерес анализ числовых значений параметров  $\mu_m$  и  $K_s$ , входящих в уравнение скорости роста микроорганизмов. Значение  $\mu_m$  характеризует время увеличения популяции микроорганизмов в  $e$  раз и может быть сопоставлено со временем удвоения каждой клетки:

$$\tau_{1/2} = 0,69/\mu_m. \quad (1.229)$$

В рамках всех рассмотренных моделей параметр  $K_s$  связан с константой Михаэлиса наиболее медленно работающего фермента, осуществляющего конверсию лимитирующего субстрата.

Авторами по литературным данным был составлен пул значений  $\mu_m$  и  $K_s$  для различных популяций микроорганизмов. Всего было использовано около 50 значений для каждого из параметров, характеризующих рост культур на лимитирующем субстрате. Значения  $\mu_m$  найденных величин варьировали в диапазоне  $10^{-2} - 10^{-5} \text{ с}^{-1}$ , значения  $K_s$  — в диапазоне  $10^{-2} - 10^{-8} \text{ М}$ .

Значения параметров процесса удобно характеризовать функцией плотности распределения. Для получения представлений о распределении величины весь пул найденных значений был разбит на группы с приблизительно одинаковыми значениями  $K_s$  в пределах одного порядка. Далее было подсчитано число значений в каждой группе и полученная величина разделена на общее число значений в пуле. Тем самым найдена вероятность обнаружения величин с заданным значением константы  $K_s$ .

На рис. 1.4 приведены полученные значения плотности распределения как функции логарифма значений  $K_s$ . Кривая

распределения близка к нормальному логарифмическому распределению. Эта функция дает представление о вероятностных значениях  $K_s$  для любого микроорганизма и субстрата, а также позволяет подсчитать вероятность нахождения величины в заданном интервале значений. Из рисунка видно, что с вероятностью около 0,5 наугад взятый организм будет характеризоваться константой сродства с лимитирующим субстратом, равной  $10^{-5}$  М.

▲ Для сравнения на этом же рисунке приведены плотности распределения констант Михаэлиса для ферментативных реакций (С. Д. Варфоломеев, С. В. Зайцев, 1982). Видно, что плотности распределения констант Михаэлиса ферментативных процессов и констант сродства субстратов к микроорганизмам в значительной степени перекрываются.

▲ Особый интерес представляет анализ численных значений максимальных удельных скоростей роста микроорганизмов. Из рис. 1.4 видно, что значения  $\mu_m$  лежат вокруг среднего значения  $\mu_{m, \text{ср}} = 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ . Таким образом, среднее значение времени удвоения микробных клеток составляет около 2 ч. Это наиболее вероятное значение для наугад взятой популяции микроорганизмов. В выборке практически отсутствуют микроорганизмы, характеризующиеся  $\mu_m$  выше  $10^{-2}$  и ниже  $10^{-6} \text{ с}^{-1}$ .

Нижний предел скорости роста культур микроорганизмов определяется, по-видимому, малой жизнеспособностью популяции клеток, имеющих относительно низкие скорости роста.

Возникает вопрос: каковы физические механизмы, ограничивающие верхний предел скорости роста микроорганизмов? Абсолютный предел в скоростях удвоения клеток определяется скоростями синтеза полимерных молекул. Например, синтез молекулы ДНК занимает отрезок времени, превышающий 15 мин. Проиллюстрируем это простым расчетом. Молекула ДНК с  $M_r \sim 10^7$  содержит  $\sim 10^5$  связей, ферментативно образуемых в процессе ее синтеза. Как известно, наиболее характерные числа оборотов ферментов равны около  $10^2 \text{ с}^{-1}$  (рис. 1.4), т. е. одна связь образуется за  $10^{-2}$  с. Если для синтеза полимера необходимым является последовательный рост полимерной цепи, то этот процесс может завершиться лишь за  $10^5$  с.

Таким образом, значения максимальных удельных скоростей роста микроорганизмов, соответствующие значениям 2,0—

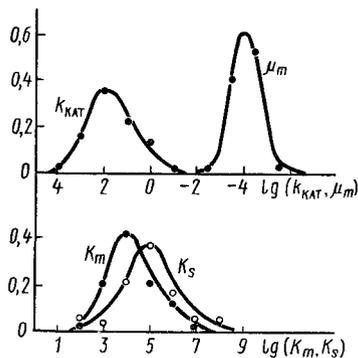


Рис. 1.4. Плотность распределения кинетических характеристик ферментативных реакций ( $K_{MAT}$ ,  $K_M$  — в М) и кинетических параметров роста микробных популяций ( $\mu_m$ ,  $K_s$  — в  $\text{с}^{-1}$ )

$2,5 \text{ ч}^{-1}$ , являются, по-видимому, абсолютными предельными значениями скорости роста клеток микроорганизмов.

! В этой главе были рассмотрены кинетические модели роста популяции микроорганизмов для выявления связи между удельной скоростью роста популяции и концентрацией лимитирующего субстрата. Для этих целей может быть использовано два подхода. Первый подход основан на представлении о росте микробной популяции как автокаталитическом процессе, идущем с накоплением каталитических центров, на которых протекают биохимические процессы. Во втором подходе рассчитывается время удвоения клеточного материала с учетом того, что это время определяется каким-либо биохимическим процессом, в частности временем биосинтеза ДНК. Оба подхода приводят к функциональной зависимости удельной скорости роста от концентрации лимитирующего субстрата.

Кинетическое моделирование, как всякий модельный подход, позволяет проанализировать различные возможные механизмы процесса при последовательном усложнении схемы процесса. Так, были рассмотрены простейшая схема, схема с равновесным «насыщением» клетки субстратом, схема с субстратом, необратимо трансформирующимся в клетке. Последние две схемы дают зависимость удельной скорости роста от концентрации субстрата типа уравнения Моно. Вообще можно записать бесчисленное число кинетических схем, решения которых приводят к зависимости удельной скорости роста от концентрации субстрата типа уравнения Моно или Михаэлиса—Ментен. Необходимым общим элементом всех этих схем является по крайней мере двухстадийность процесса. Таким образом, уравнение Моно—отражение многостадийности трансформации субстрата, при этом первая стадия процесса является субстрат-зависимой, скорость второй стадии не зависит от концентрации субстрата.

При анализе кинетических схем весьма полезны упрощенные методы анализа, прежде всего метод малого параметра перед производной. Этот подход позволяет получать приближенные решения для кинетических схем любой степени сложности. В частности, в этой главе рассмотрена кинетическая схема с участием  $n+1$  различных стадий процесса роста, проанализирована схема процесса, основанная на введении в механизм роста степени репликации, трансформации и трансляции.

Весьма продуктивным для построения кинетических моделей и для их анализа является подход, основанный на расчете времени биохимического цикла, лимитирующего клеточное деление. Рассмотрены кинетические модели, базирующиеся на предположении, что синтез ДНК может представлять лимити-

рующую стадию клеточного деления. Выведенное уравнение для удельной скорости роста показывает, что эта величина определяется концентрацией субстрата, каталитической константой скорости действия лимитирующего фермента и отношением количеств лимитирующего фермента и ДНК.

Получены уравнения, учитывающие многостадийность трансформации субстрата и многостадийность клеточного развития.

Принципиально важным и полезным при анализе конкретных экспериментальных данных является использование кинетической модели, учитывающей «старение» клетки в процессе роста. Предполагается, что «старение» клеточного аппарата выражается в инактивации клеточных ферментных систем. Уравнение для удельной скорости роста функционально мало похоже на «классическое» уравнение Моно, однако графически весьма к нему близко. Важный вывод состоит в том, что в системах со «старением» должны иметь место критические явления при низких концентрациях субстрата. Рост культуры может проходить только при концентрации субстрата выше критического порога. Указанием на то, что рост исследуемой культуры клеток протекает в рамках механизма, отражающего «старение» клеток в процессе роста, может служить нелинейность зависимости скорости роста от концентрации субстрата в обратных координатах. Скорость роста резко падает при низких концентрациях субстрата, соответственно в обратных координатах  $1/\mu$  резко возрастает.

Исследованы также модели роста, в которых скорость деления клеток зависит и от фактора роста, предварительный синтез последнего необходим для роста клеточной популяции. Это так называемые модели роста микробной клетки с ускорением. Особенностью роста в этих условиях является включение в качестве параметра в уравнение роста количества предварительно «считанной» ДНК. В отсутствие такого предварительного процесса, т. е. внеклеточного или внутриклеточного фактора роста, рост популяции вообще протекать не может.

Важными представляются оценки «типичных» значений кинетических параметров микробиологического роста — значений максимальной удельной скорости роста и константы сродства к субстратам. Значения  $K_s$  для микробного роста по своему распределению весьма близки к константам Михаэлиса ферментативных реакций. Типичное значение  $\mu_m = 10^{-4} \text{ с}^{-1}$ , т. е. среднее значение времени удвоения микробных клеток составляет около 2 ч.

## ГЛАВА 2

### ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНАЯ ФАЗА РОСТА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ

В условиях постоянства концентраций субстратов и других компонентов, необходимых для роста микроорганизмов, процесс увеличения числа клеток имеет автокаталитический характер. Основные закономерности роста популяций в этом режиме рассмотрены в гл. 1. Автокаталитическая природа процесса означает, что скорость накопления микробной биомассы (скорость накопления клеток) прямо пропорциональна числу клеток в системе. Количество биомассы может выражаться в различных единицах (в г/л, в числе клеток в единице объема и др.). Рассмотрим закономерности развития микробных популяций в экспоненциальной фазе роста.

#### 2.1 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ РОСТА КУЛЬТУРЫ

Уравнение скорости роста при постоянстве концентрации субстрата представляет собой дифференциальное уравнение первого порядка с разделяющимися переменными и может быть легко проинтегрировано:

$$M(t) = N_0 e^{\mu t}, \quad (2.1)$$

где  $N_0$  — количество биомассы, число клеток в начальный момент времени. В полулогарифмических координатах это уравнение имеет вид

$$\ln M(t) = \ln N_0 + \mu t. \quad (2.2)$$

В качестве экспериментального примера можно рассмотреть данные, приведенные на рис. 2.1, а, на котором представлена динамика изменения числа клеток в процессе роста метанобразующей бактерии *Methanobolus tindaris*. Видно, что число клеток экспоненциально увеличивается во времени. Данные рис. 2.1, а достаточно хорошо линейризуются в координатах уравнения (2.2) в течение первых 20 ч процесса. Значение  $\mu$ , найденное из линейного участка кривой рис. 2.1, б, равно  $0,28 \text{ ч}^{-1}$ .

Можно предложить и другую процедуру определения  $\mu$ . Это так называемый *разностный метод анализа*. Исходя из уравнения (2.2) в данный, конкретный, момент времени  $t_i$  справедливо равенство

$$\ln M_i = \ln N_0 + \mu t_i, \quad (2.3)$$

во время, соответствующее периоду  $t_j$ ,

$$\ln M_j = \ln N_0 + \mu t_j. \quad (2.4)$$

Если вычесть уравнение (2.4) из (2.3), то получаем

$$\ln \frac{M_i}{M_j} = \mu(t_i - t_j). \quad (2.5)$$

Таким образом, если изобразить графически уравнение (2.5) в коэффициентах  $\ln(M_i/M_j)$ ;  $(t_i - t_j)$  при условии, что кинетика процесса описывается экспоненциальной функцией (2.1), то можно получить прямую, тангенс угла наклона которой дает значение удельной скорости роста  $\mu$ . Более подробно и в более общем виде разностный метод анализируется в гл. 3.

Важным экспериментальным фактом, обнаруженным и исследованным на большом числе примеров, является зависимость удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата, количество которого лимитирует скорость роста культур микроорганизма (1.3).

Уравнение (1.3) отражает участие лимитирующего фермента в росте микробной популяции. Поэтому при анализе развития микробных культур в условиях экспоненциальной фазы роста применим достаточно хорошо разработанный набор методов для описания стационарной кинетики ферментативных реакций (М. Диксон, Э. Уэбб, 1966; И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, 1979; С. Д. Варфоломеев, С. В. Зайцев, 1982).

Методы анализа зависимости удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата рассмотрим на примере роста метанообразующей бактерии *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Известно, что эта бактерия развивается на минеральной среде в атмосфере молекулярного водорода и диоксида углерода, причем последний является единственным источником углерода. Зависимость удельной скорости роста  $\mu$  от концентрации каждого из газов при фиксированной концентрации другого газа приведена на рис. 2.2 и 2.3. Как видно из рисунка,  $\mu$  по гиперболическому закону зависит от концентрации  $H_2$  и от концентрации  $CO_2$  во входящем газе. По аналогии с уравнением Михаэлиса—Ментен для кинетики ферментативных реакций  $\mu_m$  и  $K_s$  могут быть определены на основе линеаризации уравнения (1.3):

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m S}. \quad (2.6)$$

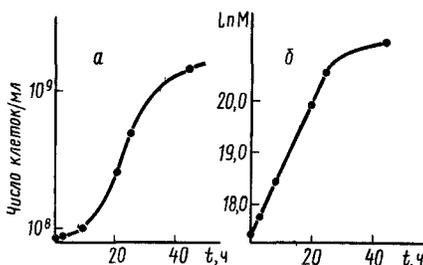


Рис. 2.1. Кривая роста культуры *M. tindaris* на среде с метанолом при 37° С, рН 7,0 (а); те же данные в полулогарифмических координатах (б) (К. О. Stetter, G. Caad, 1983)

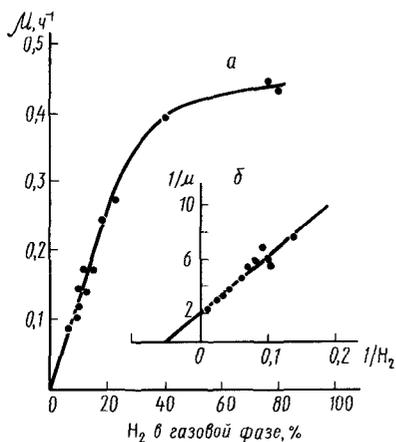


Рис. 2.2. Зависимость удельной скорости роста *M. thermoautotrophicum* от концентрации  $\text{H}_2$  во входящем газе (а); (рН 7,0,  $65^\circ\text{C}$ , 20%  $\text{CO}_2$ ), те же данные в двойных обратных координатах (б)

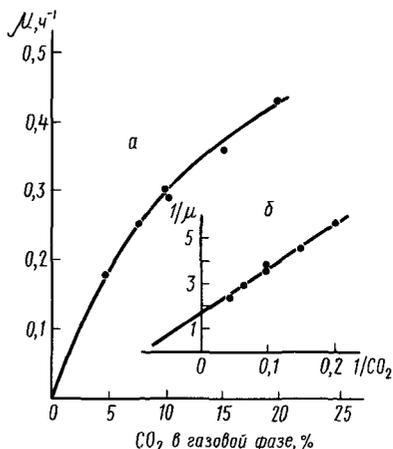


Рис. 2.3. Зависимость удельной скорости роста *M. thermoautotrophicum* от концентрации  $\text{CO}_2$  во входящем газе (рН 7,0,  $65^\circ\text{C}$ , 80%  $\text{H}_2$ ); те же данные в двойных обратных координатах (б) (P. Schönheit et. al., 1980)

Из данных рис. 2.2, б и 2.3, б были найдены следующие значения параметров:  $\mu_m^{\text{H}_2} = 0,49 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s^{\text{H}_2} = 20\%$  (значения максимальной удельной скорости роста и константы сродства, найденные при вариации концентрации водорода и при постоянной концентрации  $\text{CO}_2$ , равной 20%);  $\mu_m^{\text{CO}_2} = 0,61 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s^{\text{CO}_2} = 11\%$  (значения максимальной удельной скорости роста и константы сродства, найденные при вариации  $\text{CO}_2$  и постоянной концентрации водорода, равной 80%).

Кроме анаморфозы (2.6) линеаризацию можно проводить также и другими способами, например, используя уравнения:

$$\mu = \mu_m - K_s \frac{\mu}{S}; \quad (2.7)$$

$$\frac{S}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S}{\mu_m}; \quad (2.8)$$

$$\frac{\mu}{S} = \frac{\mu_m}{K_s} - \frac{\mu}{K_s}. \quad (2.9)$$

На рис. 2.4 приведены прямые, соответствующие линеаризации данных рис. 2.2, а в координатах уравнений (2.7) и (2.8).

Согласно анализу, проведенному Э. Корниш-Боуден (1979), наименее удовлетворительные результаты дает наиболее распространенная модификация уравнения (1.3) — метод двойных

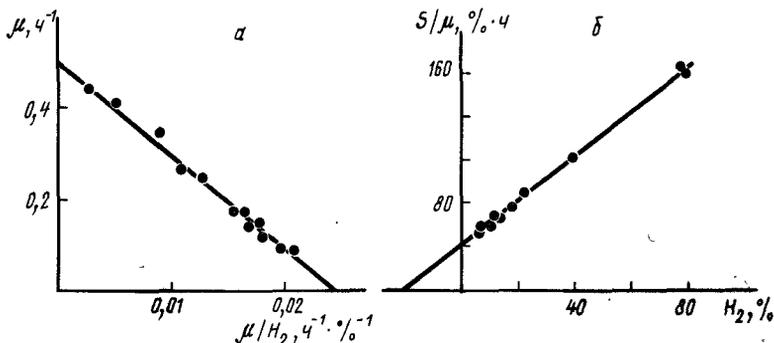


Рис. 2.4. Данные рис. 2.2, а в координатах уравнений (2.8) и (2.9)

обратных координат (2.6). Графическое представление результатов с использованием этого метода не дает почти никакой визуальной информации о статистической ошибке. Эта ошибка лучше всего визуализируется при использовании координат  $S/\mu$  от  $S$  [уравнение (2.8)].

В принципе для определения параметров  $\mu_m$  и  $S_s$  достаточно двух измерений удельной скорости роста  $\mu_i$  и  $\mu_j$  при двух различающихся концентрациях субстрата  $S_i$  и  $S_j$ :

$$K_s = \frac{\mu_i - \mu_j}{\mu_j/S_j - \mu_i/S_i}; \quad (2.10)$$

$$\mu_m = \frac{S_i - S_j}{S_i/\mu_i - S_j/\mu_j}. \quad (2.11)$$

В силу существующих реальных статистических ошибок в определении скоростей и концентраций компонентов обычно проводят 5—10 измерений скорости при концентрациях субстрата, соизмеримых с  $K_s$ . Для каждой пары измерений можно вычислить значения  $\mu_m$  и  $K_s$  и затем провести статистическую обработку результатов, определив среднее значение и среднеквадратичное отклонение параметра от среднего значения.

Для графического определения  $\mu_m$  и  $K_s$  и визуального нахождения ошибки удобно воспользоваться методом Корниш-Боуден. Из уравнения (1.3) следует уравнение связи между параметрами  $\mu_m$  и  $K_s$ :

$$\mu_m = \mu + \frac{\mu}{S} K_s. \quad (2.12)$$

В координатах  $\mu_m$  от  $K_s$  эта зависимость должна быть представлена прямой с тангенсом угла наклона  $\mu/S$  и отрезком  $\mu$ . Таким образом, для любой пары экспериментально измеряемых переменных  $\mu$  и  $S$  значения  $\mu_m$  и  $K_s$  лежат на этой

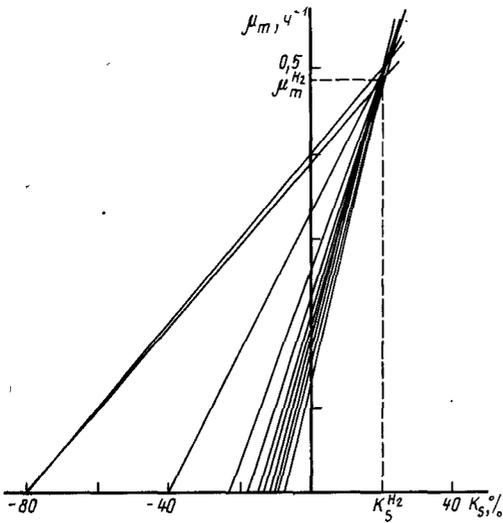


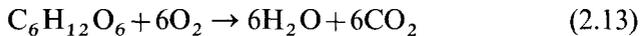
Рис. 2.5. Данные рис. 2.2, а в координатах Корниш—Боуден

в координатах  $\mu(-S)$ . Прямые пересекаются в одной точке, координаты точек пересечения дают значения  $\mu_m$  и  $K_s$ .

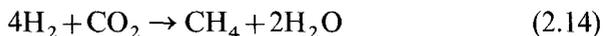
В настоящее время графические модификации уравнения Михаэлиса—Ментен, как и уравнения Моно, применяют для визуальной иллюстрации соответствия экспериментальных данных гиперболической зависимости (1.3). Для численного определения  $\mu_m$  и  $K_s$  чаще используют методы статистической обработки результатов и ЭВМ, дающие помимо числовых значений параметров достоверные сведения о статистических ошибках.

## 2.2. МНОГОСУБСТРАТНЫЕ МИКРОБНЫЕ ПРОЦЕССЫ

По своей природе микробный процесс обычно многосубстратен. Например, аэробный процесс дыхания идет с осуществлением следующего превращения углерода:



Анаэробные микроорганизмы, как правило, также используют в качестве субстратов слабые восстановитель и окислитель. Например, обсуждаемая выше суммарная реакция с участием *M. thermoautotrophicum* может быть записана в виде



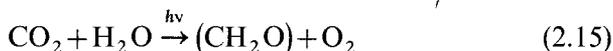
В данном случае водород и диоксид углерода выступают в качестве равноправных субстратов микроорганизма. Для

прямой, а точка пересечения прямых в координатах  $\mu$  от  $-S$ , если таковая существует, дает значения  $\mu_m$  и  $K_s$ .

Преимущество этого метода связано с тем, что при определении параметров нет необходимости в предварительной обработке и пересчете экспериментальных данных. Важным представляется хорошая визуализация статистической ошибки в определении  $\mu_m$  и  $K_s$ .

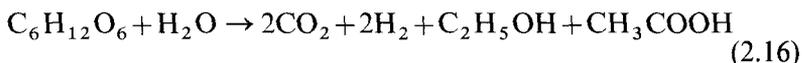
На рис. 2.5 приведены данные скорости роста *M. thermoauto-*

фототрофных микроорганизмов типа микроводорослей и цианобактерий суммарное уравнение ассимиляции  $\text{CO}_2$  имеет вид



где  $(\text{CH}_2\text{O})$ —условное обозначение образующихся веществ в клетке. В данном случае микробный процесс трехсубстратен, при этом в качестве одного из субстратов выступает свет.

Рост микроорганизма может представлять собой и псевдо-односубстратный процесс, если один из компонентов находится в большом избытке или поддерживается постоянным в процессе развития популяции. Например, большая группа анаэробных микроорганизмов для получения энергии использует конверсию углеводов по пути Эмблена—Мейергофа, химическое уравнение которого в одном из вариантов выглядит следующим образом:



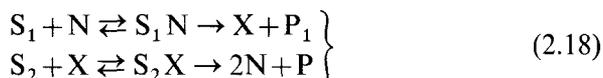
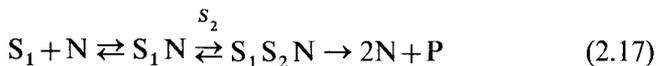
Здесь за счет большого избытка воды процесс имеет псевдо-односубстратный характер.

Реакции (2.13)—(2.16), протекающие с расходом основных субстратов и накоплением конечных продуктов ферментации, можно назвать *базовыми химическими реакциями* микробного процесса. Каждая группа микроорганизмов может быть охарактеризована своей собственной базовой химической реакцией.

Рассмотрим закономерности роста микроорганизмов в экспоненциальной фазе с учетом многосубстратности микробиологического роста.

### 2.3. ПРОСТЕЙШИЕ КИНЕТИЧЕСКИЕ СХЕМЫ

Из ферментативного катализа известны две принципиально различные простейшие кинетические схемы, проводящие к дискриминируемым зависимостям скорости процесса от концентраций двух субстратов. С учетом автокаталитического процесса микробного роста эти две схемы могут быть представлены в таком виде:



Механизм (2.17) включает две обратимые равновесные стадии присоединения субстратов (*механизм тройного комплек-*

са), в механизме (2.18) стадии присоединения субстратов разделены по крайней мере одной необратимой стадией. В терминах механизмов ферментативной кинетики группа механизмов типа (2.18) получила название *пинг-понг-механизмов*.

Две различные кинетические схемы приводят к двум различающимся зависимостям скорости роста от концентрации субстратов. Для механизмов группы (2.18) (пинг-понг-механизмы) характерна следующая зависимость от концентрации субстратов:

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_1/S_1 + K_2/S_2}, \quad (2.19)$$

где  $K_1$  и  $K_2$  — эффективные константы сродства микроорганизма к субстратам  $S_1$  и  $S_2$ .

Для механизмов группы (2.17) (в одном из вариантов) уравнение удельной скорости роста может быть записано в виде

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + K_2/S_2 + K_1 K_2/S_1 S_2}. \quad (2.20)$$

Принципиальное различие уравнений (2.19) и (2.20) в той форме, в которой они записаны, заключается в том, что уравнение (2.20) содержит член, представляющий собой произведение  $S_1 S_2$  (механизм с мультиплицирующими субстратами). Это позволяет из зависимости удельных скоростей роста от концентрации субстратов отличить механизм (2.17) от механизма (2.18). Для дискриминации механизмов необходимо исследовать зависимости удельной скорости роста от концентрации одного субстрата при постоянной концентрации другого субстрата, варьируя от серии к серии экспериментов концентрацию последнего.

▲ При анализе экспериментальных данных в соответствии с методами, развитыми для многосубстратных ферментативных реакций (С. Д. Варфоломеев, С. В. Зайцев, 1982), удобно использовать один из двух подходов.

1. В обратных координатах для механизмов групп пинг-понг-зависимости (*немultiплицирующие субстраты*) скорости от концентрации субстрата будут представлены серией параллельных, непересекающихся, прямых (рис. 2.6). Для механизмов с тройным комплексом (*мультиплицирующие субстраты*), уравнения скорости которых включают произведение переменных  $S_1 S_2$  в обратных координатах, экспериментальные данные должны линеаризоваться, что приводит к серии пересекающихся прямых (рис. 2.7).

2. В некоторых случаях возможно провести эксперимент с определением  $\mu_{m1}^{S_1}$ ,  $\mu_{m2}^{S_2}$ ,  $K_{s1}^{S_1}$ ,  $K_{s2}^{S_2}$ , где  $\mu_{m1}^{S_1}$ ,  $K_{s1}^{S_1}$  — максимальная

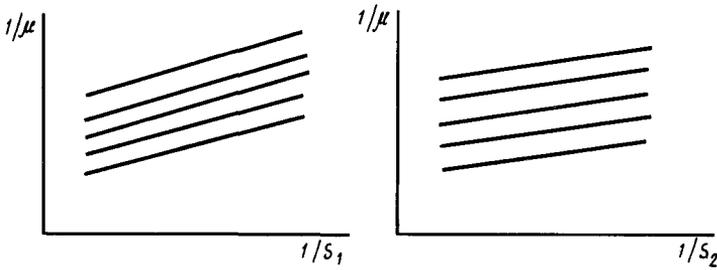


Рис 2.6. Зависимости удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстратов ( $S_1$  и  $S_2$ ) в обратных координатах для группы пинг-понг-механизмов

удельная скорость роста и константа сродства, найденные по субстрату  $S_1$  при каком-то фиксированном значении концентрации субстрата  $S_2$ ;  $\mu_{m2}^{S_2}$ ,  $K_{s2}^{S_2}$  — максимальная удельная скорость роста и константа сродства, найденные по субстрату  $S_2$  при фиксированном значении  $S_1$ . Механизмы (2.17) и (2.18) различаются по зависимости  $\mu_{m1}^{S_1}$ ,  $K_{s1}^{S_1}$  от  $S_2$ ;  $\mu_{m2}^{S_2}$ ,  $K_{s2}^{S_2}$  от  $S_1$ . Так, для группы механизмов с немультиплицирующими субстратами (группа пинг-понг-механизмов) из уравнения (2.19) следует:

$$\mu_{m1}^{S_1} = \frac{\mu_m}{1 + K_2/S_2}; \quad \mu_{m2}^{S_2} = \frac{\mu_m}{1 + K_1/S_1}; \quad (2.21)$$

$$K_{s1}^{S_1} = \frac{K_1}{1 + K_2/S_2}; \quad K_{s2}^{S_2} = \frac{K_2}{1 + K_1/S_1}. \quad (2.22)$$

Видно, что зависимости  $\mu_{m1}^{S_1}$  от  $S_2$ ,  $\mu_{m2}^{S_2}$  от  $S_1$ ,  $K_{s1}^{S_1}$  от  $S_2$ ,  $K_{s2}^{S_2}$  от  $S_1$  имеют гиперболический характер и должны линеаризоваться в обратных координатах, при этом значение  $\mu_{m1}^{S_1}/K_{s1}^{S_1}$  не должно зависеть от концентрации второго субстрата (рис. 2.8).

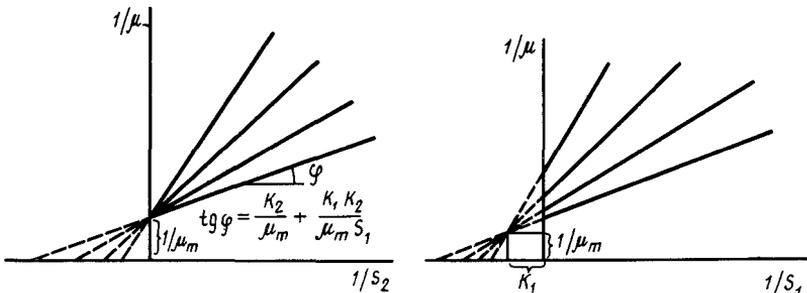


Рис 2.7. Зависимость удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстратов ( $S_1$  и  $S_2$ ) в обратных координатах для механизмов с мультиплицирующими субстратами

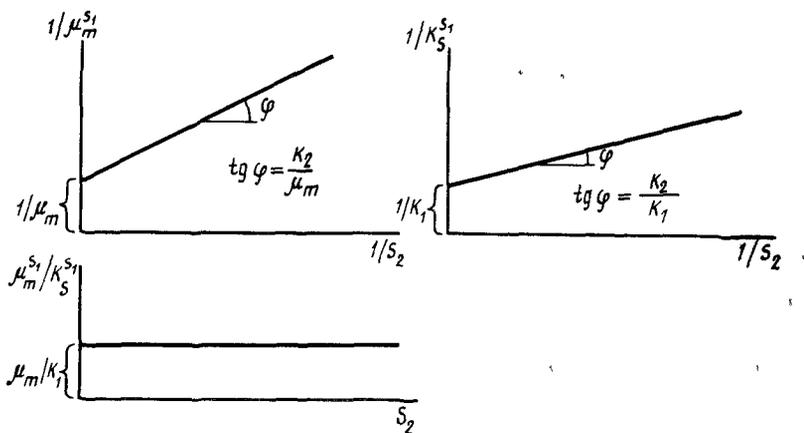


Рис. 2.8. Зависимости параметров  $\mu_m^{S_1}$  и  $K_s^{S_1}$ , найденные при вариации субстрата  $S_1$ , от концентрации второго субстрата  $S_2$  для групп пинг-понг механизмов

Для механизмов с равновесным тройным комплексом [схема (2.17), (2.20)] вид зависимостей  $\mu_m^{S_1}$  от  $S_2$ ,  $K_s^{S_1}$  от  $S_2$ ,  $\mu_m^{S_2}$  от  $S_1$  и  $K_s^{S_2}$  от  $S_1$  совершенно другой следующий:

$$\mu_m^{S_1} = \frac{\mu_m}{1 + K_2/S_2}; \quad K_s^{S_1} = \frac{K_1 K_2}{K_2 + S_2}; \quad (2.23)$$

$$\mu_m^{S_2} = \mu_m; \quad K_s^{S_2} = K_2 (1 + K_1/S_1). \quad (2.24)$$

● На рис. 2.9 и 2.10 приведены зависимости  $\mu_m^{S_1}(S_2)$ ;  $K_s^{S_1}(S_2)$ ,  $\mu_m^{S_2}/K_s^{S_1}$ ;  $\mu_m^{S_2}(S_1)$ ;  $K_s^{S_2}(S_1)$ ;  $\mu_m^{S_2}/K_s^{S_2}$ . Сопоставление эксперимен-

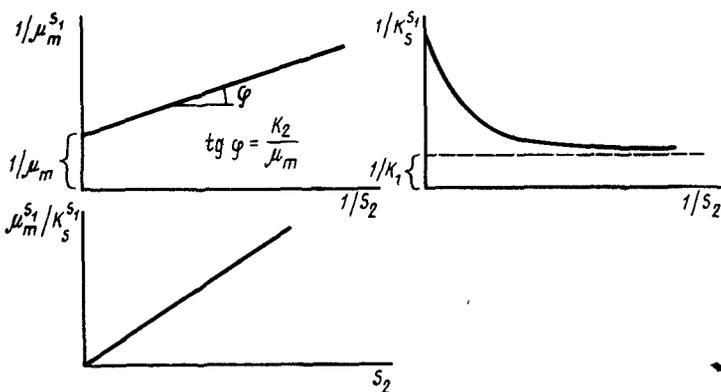


Рис. 2.9. Зависимость кинетических параметров  $\mu_m^{S_1}$  и  $K_s^{S_1}$ , найденных при вариации субстрата  $S_1$ , от концентрации второго субстрата  $S_2$  для механизма с мультиплицирующими субстратами

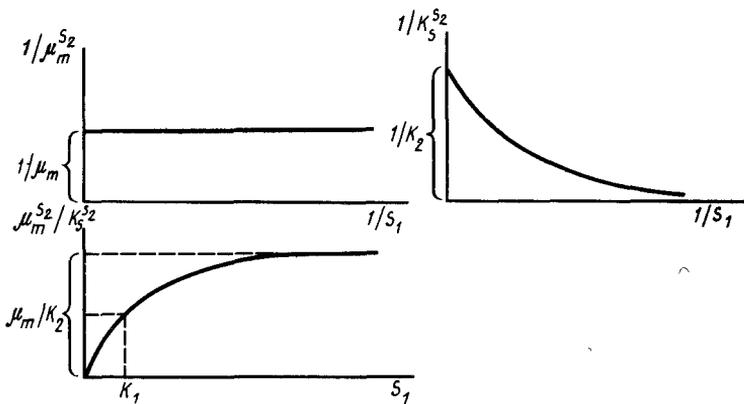


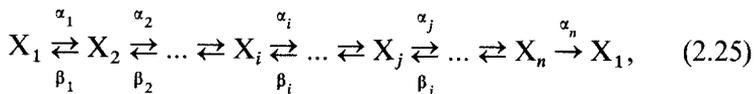
Рис. 2.10. Зависимость кинетических параметров  $\mu_m^{S_2}$  и  $K_2^{S_2}$ , найденных при вариации субстрата  $S_2$ , от концентрации первого субстрата  $S_1$  для механизма с мультиплицирующими субстратами

тальных данных с теоретическими, представленными на рис. 2.6—2.10, позволяет определить, к какой кинетической группе относится тот или иной микробный процесс.

#### 2.4. ОБОБЩЕННАЯ МОДЕЛЬ МНОГОСУБСТРАТНОГО МИКРОБНОГО ПРОЦЕССА

Многосубстратную кинетику микробного роста в экспоненциальной фазе можно рассмотреть и в более общем виде, воспользовавшись теорией многосубстратных ферментативных реакций (П. В. Вржеш, С. Д. Варфоломеев, 1985).

Схему микробиологического превращения субстратов роста представим в следующем виде:



где  $X_i$  могут иметь смысл различных состояний ферментов, осуществляющих трансформацию лимитирующих субстратов;  $\alpha$  и  $\beta$ —константы скорости процессов взаимопревращений форм  $X_i$ . Константы  $\alpha_i$  ( $1 \leq i \leq n$ ) могут отражать как процесс мономолекулярного превращения промежуточной формы  $X_i$  в  $X_{i+1}$  (в этом случае  $\alpha_i = k'_i$ , где  $k'_i$ —константа скорости реакции первого порядка), так и процесс взаимодействия формы  $X$  с молекулой субстрата  $S$  (в этом случае  $\alpha_i = k''_i [S]$ , где  $k''_i$ — константа скорости реакции второго порядка). Все параметры  $\alpha$  положительны.

Рассмотрим процессы в экспоненциальной фазе роста, когда концентрации продуктов ферментации малы и ими можно

пренебречь. Соответственно параметры  $\beta_i (1 \leq i \leq n-1)$  являются константами скорости реакции первого порядка, некоторые из них могут быть равны нулю. При условии  $\beta_n = 0$  не снижается общность схемы (2.25), так как любая стадия роста, сопровождающаяся образованием молекулы продукта, должна иметь необратимый характер. Приписав этой необратимой стадии индекс  $n$ , получим схему (2.25).

Использование методов расчета стационарной скорости ферментативных реакций, разработанных на основе теории графов, позволяет записать выражение для удельной скорости роста:

$$\mu = \alpha_n D_n / \sum_{i=1}^n D_i, \quad (2.26)$$

где  $D_i (1 \leq i \leq n)$  — базовый определитель промежуточной формы  $X_i$ . Выразив все базовые определители через параметры  $\alpha$  и  $\beta$ , преобразуем уравнение (2.26) к виду

$$\mu = \alpha_1 \alpha_2 \dots \alpha_n / \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij}, \quad (2.27)$$

где

$$b_{ij} = \alpha_1 \alpha_2 \dots \alpha_{i-1} \beta_i \beta_{i+1} \dots \beta_{i-1} \cdot 1 \alpha_{j+1} \dots \alpha_n \quad (i < j);$$

$$b_{ij} = \alpha_1 \alpha_2 \dots \alpha_{i-1} \cdot 1 \alpha_{i+1} \dots \alpha_n \quad (i = j), \quad b_{ij} = 0 \quad (i > j).$$

Уравнение (2.27) можно записать в следующей удобной для анализа форме:

$$1/\mu = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n a_{ij}, \quad (2.28)$$

где

$$a_{ij} = \beta_i \beta_{i+1} \dots \beta_{i-1} / (\alpha_1 \alpha_{i+1} \dots \alpha_j) \quad (i < j), \quad a_{ij} = 1/\alpha_i \quad (i = j).$$

▲ Отметим основные свойства уравнения (2.28).

**Свойство 1.** Уравнение (2.28) имеет *гиперболический* характер относительно параметра  $\alpha_l (1 \leq l \leq n)$ :

$$1/\mu = C_0 + C_l/\alpha_l, \quad (2.29)$$

где  $C_0$  и  $C_l$  — строго положительные коэффициенты.

Действительно, каждый член суммы в правой части уравнения (2.28) содержит параметр  $\alpha_l$  только в степени минус единица или нуль;  $C_0 > 0$ , так как любой из членов вида  $a_i = 1/\alpha_i (i \neq l)$  положителен и не содержит  $\alpha_l$ ;  $C_l > 0$ , так как сумма в правой части уравнения (2.28) содержит ненулевой член  $a_{ll} = 1/\alpha_l$ .

**Свойство 2.** Уравнение (2.28) содержит произведение  $\frac{1}{\alpha_l \alpha_m}$  ( $1 \leq l \leq m \leq n$ ) тогда и только тогда, когда в схеме (2.25) все стадии взаимопревращений между формами  $X_l$  и  $X_m$  обратимы, т. е.  $\beta_k \neq 0$  для всех  $l \leq k \leq m-1$ .

Действительно, если  $\beta_k \neq 0$  для всех  $l \leq k \leq m-1$ , то уравнение (2.28) содержит произведение  $(1/\alpha_l)(1/\alpha_m)$ , так как в него входит ненулевой член  $a_{lm} = \beta_l \beta_{l+1} \dots \beta_{m-1} / (\alpha_l \alpha_{l+1} \dots \alpha_m)$ . И, наоборот, все члены суммы в правой части уравнения (2.28), содержащие произведение  $(1/\alpha_l)(1/\alpha_m)$ , содержат и произведение  $\beta_l \beta_{l+1} \dots \beta_{m-1}$ . Если произведение  $(1/\alpha_l)(1/\alpha_m)$  входит в уравнение (2.28), то это означает, что  $\beta_l \beta_{l+1} \dots \beta_{m-1} \neq 0$  или  $\beta_k \neq 0$  для всех  $l \leq k \leq m-1$ .

**Свойство 3.** Уравнение (2.28) не содержит произведения  $(1/\alpha_l)(1/\alpha_m)$  тогда и только тогда, когда в схеме (2.25) между формами  $X_l$  и  $X_m$  есть по меньшей мере одна необратимая стадия, т. е. найдется  $l \leq k \leq m-1$  такое, что  $\beta_k = 0$ . Доказательство свойства 3 аналогично доказательству свойства 2.

Для систематизации дальнейших выкладок введем определение *скалярной связности* форм  $X$ .

Промежуточные формы  $X_l$  и  $X_m$  связаны [их скалярная связность  $(l, m)$  равна единице], если в механизме роста микроорганизма найдется участок, соединяющий эти формы и состоящий из обратимых стадий взаимопревращений. В противном случае  $X_l$  и  $X_m$  не связаны [ $(l, m) = 0$ ], т. е.  $\beta_k = 0$  для всех  $l \leq k \leq m-1$ .

С учетом введенного понятия скалярной связности и свойств 1—3 уравнение (2.28) относительно  $\alpha_l$  и  $\alpha_m$  будет иметь вид

$$\frac{1}{\mu} = C_0 + C_l/\alpha_l + C_m/\alpha_m + (l, m) C_{lm}/(\alpha_l \alpha_m). \quad (2.30)$$

Аналогично, эти рассуждения можно продолжить для трех и большего числа параметров  $\alpha$ .

● Сделаем теперь выводы относительно характера зависимости удельной скорости роста от концентрации субстратов.

1. Если субстрат принимает участие в реакции (2.25) один раз, т. е. взаимодействует только с одной формой  $X_l$  ( $1 \leq l \leq n$ ), то в уравнение (2.25) концентрация субстрата входит только вместе с  $\alpha_l$ . Подставляя равенство  $\alpha_l = k_l'' S$  в уравнение (2.30), получим

$$\frac{1}{\mu} = d_0 + d_1/[S], \quad (2.31)$$

где  $d_0 = C_0 > 0$ ,  $d_1 = C_l/k_l'' > 0$ .

2. Если в реакции (2.25) принимают участие субстраты  $S_1$  и  $S_2$ , причем  $S_1$  взаимодействует только с одной промежуточной формой  $X_l$ ,  $S_2$  взаимодействует только с промежуточной формой  $X_m$ , то уравнение (2.30) относительно  $[S_1]$  и  $[S_2]$  имеет вид

$$1/\mu = d_0 + d_1/[S_1] + d_2/[S_2] + (l, m) d_{1,2}/([S_1][S_2]). \quad (2.32)$$

Таким образом, скалярная связность промежуточных форм  $X$ , с которыми взаимодействуют субстраты  $S_1$  и  $S_2$  в механизме реакций (2.25), является критерием вида зависимости удельной скорости роста микроорганизма от концентрации этих субстратов. График зависимости  $\mu$  от концентрации одного из субстратов в двойных обратных координатах при различных фиксированных концентрациях другого субстрата представляет собой: а) веер прямых, пересекающихся в одной точке во втором или третьем квадранте, в случае связных форм (см. рис. 2.7, а; б) серию параллельных прямых в случае несвязных форм (см. рис. 2.6).

Взаимная однозначность в свойствах 2 и 3 позволяет сделать обратное утверждение: параллельность прямых в двойных обратных координатах свидетельствует о том, что в механизме многосубстратного роста микроорганизма субстраты  $S_1$  и  $S_2$  взаимодействуют с несвязными промежуточными формами  $X$ , наличие точки пересечения свидетельствует о том, что в механизме процесса субстраты взаимодействуют со связными промежуточными формами  $X$ .

3. Субстрат  $S$  может принимать участие в процессе (2.25) два раза, реагируя с промежуточными формами  $X_l$  и  $X_m$ . Подставляя в уравнение (2.32) равенство  $[S_1] = [S_2] = [S]$ , получим

$$1/\mu = d_0 + (d_1 + d_2)/[S] + (l, m)d_{12}/[S]^2. \quad (2.33)$$

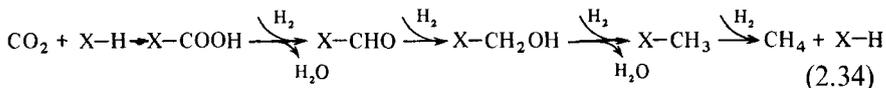
В двойных обратных координатах зависимость (2.33) будет линейной только в том случае, если промежуточные формы  $X_l$  и  $X_m$  несвязны  $[(l, m) = 0]$ . В противном случае [когда  $(l, m) = 1$ ] зависимость (2.33) не гиперболична и в двойных обратных координатах представляет собой параболу. Квадратичная зависимость  $1/\mu$  от  $S$  не будет экспериментально проявляться, если между точками ввода субстрата имеется хотя бы одна необратимая стадия.

## 2.5. МНОГОСУБСТРАТНОСТЬ В КИНЕТИКЕ РОСТА *M. THERMOAUTOTROPHICUM*

Специфика роста микроорганизмов с точки зрения многосубстратности заключается в том, что субстраты акцептируются и конвертируются различными ферментными системами. При этом весьма вероятно наличие хотя бы одной существенно необратимой стадии между точками ввода субстратов в каталитический цикл. Это делает случай с несвязными формами ферментов (случай шинг-понг-механизма) наиболее вероятным в кинетике роста микробных популяций. Можно полагать, что зависимости типа представленных на рис. 2.6, 2.8 должны быть наиболее характерными при анализе кинетики роста

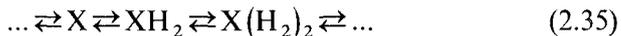
микробных популяций по различным субстратам. Соответственно при описании кинетики роста культур микроорганизмов справедливы уравнения (2.19), (2.21), (2.22).

Для иллюстрации закономерностей роста микроорганизмов в двухсубстратном режиме воспользуемся данными по кинетике роста культуры *M. thermoautotrophicum* при использовании  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ . Зависимость удельной скорости роста этой бактерий от концентрации каждого из субстратов при фиксированной концентрации другого приведены на рис. 2.2 и 2.3. Образование метана бактериями, в том числе *M. thermoautotrophicum*, можно представить следующим образом.



где X — ряд коферментов метаногенеза.

Видно, что водород как субстрат используется четыре раза в реакциях восстановления  $\text{CO}_2$  до  $\text{CH}_4$ . В двойных обратных координатах экспериментальная зависимость  $1/\mu$  от  $1/\text{H}_2$  представляет собой прямую (см. рис. 2.2). Это говорит о том, что все четыре акта активации водорода производятся несвязными формами ферментов, другими словами, стадии ввода четырех молекул водорода в каталитический цикл разделены дополнительными необратимыми химическими реакциями, что согласуется со схемой (2.34). Если бы в механизме процесса имело место последовательное равновесное присоединения хотя бы двух молекул водорода типа



то уравнение скорости роста должно было бы содержать член  $[\text{H}_2]^2$  и кинетические данные не должны были бы линеаризоваться в обратных координатах в соответствии с уравнением смешанного нулевого и первого порядка. При последовательном присоединении четырех молекул водорода уравнение скорости имело бы четвертый порядок по водороду.

Стадии ввода в реакцию водорода и  $\text{CO}_2$  в соответствии со схемой (2.34) также разделены необратимыми химическими трансформациями. Это указывает на то, что кинетические закономерности роста должны иметь характер, соответствующий пинг-понг-механизму.

Использование уравнений, характерных для кинетики роста с несвязными формами фермента (уравнение пинг-понг-механизма), позволяет из значений  $\mu_m^{S_1}$ ,  $\mu_m^{S_2}$ ,  $K_s^{S_1}$ ,  $K_s^{S_2}$  получить истинные значения констант параметров роста популяции.

Из экспериментальных данных, представленных на рис. 2.2 и 2.3, определены параметры роста бактерии по каждому из субстратов при заданной постоянной концентрации второго

субстрата, т. е. вычислены параметры кинетики роста при вариации концентрации водорода  $\mu_m^{H_2}$  и  $K_s^{H_2}$  (эти величины зависят от концентрации  $CO_2$ ),  $\mu_m^{CO_2}$  и  $K_s^{CO_2}$  (эти величины найдены при вариации концентрации  $CO_2$  и зависят от концентрации водорода). Из уравнений (2.19) — (2.20) для роста культуры *M. thermoautotrophicum* следует:

$$K_1 = \frac{K_s^{H_2}(1 + K_s^{CO_2}/CO_2)}{1 - (K_s^{H_2}/H_2)(K_s^{CO_2}/CO_2)}; \quad (2.36)$$

$$K_2 = \frac{K_s^{CO_2}(1 + K_s^{H_2}/H_2)}{1 - (K_s^{H_2}/H_2)(K_s^{CO_2}/CO_2)}; \quad (2.37)$$

$$\mu_m = \mu_m^{H_2}(1 + K_s^{CO_2}/CO_2); \quad (2.38)$$

$$\mu_m = \mu_m^{CO_2}(1 + K_s^{H_2}/H_2). \quad (2.39)$$

Использование экспериментально найденных параметров  $\mu_m^{H_2}$ ,  $\mu_m^{CO_2}$ ,  $K_s^{H_2}$ ,  $K_s^{CO_2}$  позволяет по уравнениям (2.36) — (2.39) определить следующие значения истинных параметров роста;  $K_1 = 35,9\%$  (сродство бактерий к водороду);  $K_2 = 15,9\%$  (сродство бактерий к  $CO_2$ ). Значения  $\mu_m$ , рассчитанные по уравнениям (2.38) и (2.39), совпадают и равны  $0,88 \text{ ч}^{-1}$ . Это максимальная удельная скорость роста, которую должна иметь популяция *M. thermoautotrophicum* при бесконечно больших концентрациях молекулярного водорода и диоксида углерода.

## 2.6. ИНГИБИРОВАНИЕ И АКТИВАЦИЯ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Ингибирование или активация роста популяции микроорганизмов — широко распространенное явление, в большом числе случаев определяющее скорость развития культуры (И. Л. Работнова, И. Н. Позмогова, 1973).

Существует две основные классификации ингибиторов роста микроорганизмов: 1) по «мишени», на которую действует то или иное вещество; 2) по кинетическому механизму действия.

▲ В рамках первой классификации можно выделить следующие типы воздействия.

1. *Ингибиторы, действующие на ДНК.* Характерный пример — налидиксовая кислота, ингибирующая синтез ДНК у *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Hypomicrobium neptunium* и других бактерий.

2. *Ингибиторы, действующие на РНК.* Ингибитор, например актиномицин D, разобщает процесс транскрипции — образование РНК на матрице ДНК.

3. *Ингибиторы синтеза белка,* например хлорамфеникол, левомицетин, эритромицин, тетрациклин, подавляют процессы образования пептидных связей, что очень часто приводит

к значительному накоплению микроорганизмами свободных аминокислот.

4. *Ингибиторы синтеза полимеров бактериальной клеточной стенки* — муреина и тейхоевых кислот. Наиболее изучено действие  $\beta$ -лактамовых антибиотиков, в особенности пенициллина.

5. *Мембраноактивные вещества*. Действие этих ингибиторов связано с повреждением цитоплазматической мембраны и нарушением ее проницаемости. К таким веществам относятся детергенты, органические растворители (толуол, хлороформ), спирты, фенолы, четвертичные аммониевые основания, полипептидные и полиеновые антибиотики.

6. *Ингибиторы энергетических процессов*. Специфическим ингибитором энергетических процессов является 2,4-динитрофенол — разобщитель окислительного фосфорилирования. Он проводит протоны через мембрану и изменяет градиент pH, при этом рост микроорганизмов ингибируется.

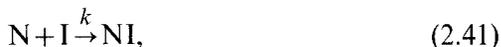
7. *Ингибиторы лимитирующего фермента*. Как известно, ферменты весьма «чувствительны» к различным соединениям, блокирующим функционально важные группы активного центра (Э. Уэбб, 1969). В микробиологической кинетике это проявляется в уменьшении скорости роста популяции.

▲ С точки зрения кинетики действия можно выделить следующие основные классы ингибиторов.

1. Вещества, необратимо взаимодействующие с компонентами растущей микробной клетки, составляют класс *необратимых ингибиторов*. Кинетика их действия в дифференциальной форме может в большинстве случаев быть описана уравнением

$$\frac{dNI}{dt} = kNI, \quad (2.40)$$

соответствующим схеме



где  $N$  — число клеток;  $I$  — концентрация необратимо действующего ингибитора;  $NI$  — число заингибированных клеток;  $k$  — константа скорости второго порядка. Как правило, необратимое ингибирование — относительно медленный процесс, развивающийся во времени.

2. Вещества, быстро и обратимо взаимодействующие с молекулами-«мишенями», объединяют в класс *обратимых ингибиторов*. Процесс обратимого ингибирования можно описать схемой



где  $K$  — эффективная константа равновесия. Действие обратимых ингибиторов проходит, как правило, действительно быстро,

практически мгновенно с точки зрения времени развития микробной популяции.

3. Для микробиологических процессов весьма характерен эффект *ингибирования продуктом ферментации*, в результате чего его накопление в достаточных количествах может приводить к замедлению скорости роста популяции. Ингибирование продуктом ферментации может иметь как обратимый, так и необратимый характер.

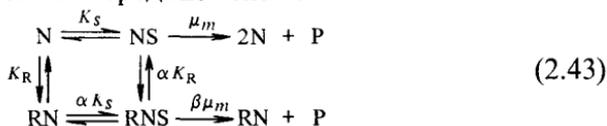
4. Важный регуляторный микробиологический феномен связан с *ингибированием избытком субстрата*. В этом случае субстрат, который при относительно низких концентрациях увеличивает скорость роста популяции, при более высоких концентрациях может быть эффективным ингибитором роста микроорганизмов. Кинетические закономерности процессов с ингибированием субстратом и продуктом при периодическом и непрерывном культивировании детально анализируются в гл. 4, 5, 7.

*Активаторами* называют соединения, которые, не будучи необходимы для роста, могут заметно увеличивать максимальную скорость роста культур микроорганизмов.

Рассмотрим основные закономерности обратимого ингибирования и активации роста популяции микроорганизмов в экспоненциальной фазе.

### 2.6.1. Общая схема действия обратимых эффекторов на кинетику роста микроорганизмов

По аналогии с кинетикой ферментативных реакций влияние эффектора R в процессе роста биомассы с лимитирующим субстратом может быть передано схемой



где  $K_S$ ,  $K_R$  — константы диссоциации комплекса субстрата S и эффектора R с молекулой-«мишенью» клетки N;  $\mu_m$  — максимальная удельная скорость роста.

Можно показать, что математическая обработка схемы (2.43) приводит к следующему выражению для удельной скорости роста:

$$\mu = \frac{\mu_m \frac{\alpha K_R + \beta R}{\alpha K_R + R} S}{\alpha K_S \frac{K_R + R}{\alpha K_R + R} + S} \quad (2.44)$$

Рассмотрим некоторые важные частные случаи, имеющие особое значение для описания кинетики роста культур микроорганизмов.

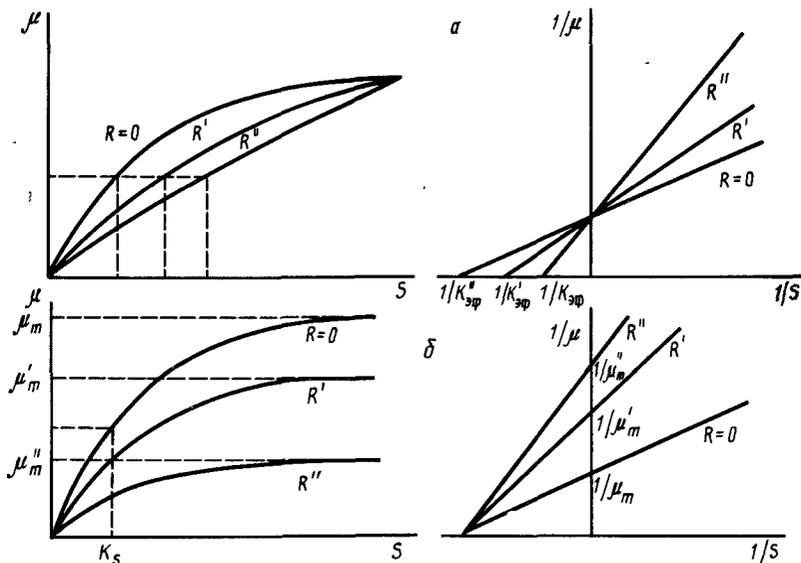


Рис. 2.11. Зависимость  $\mu$  от  $S$  в обычных и двойных обратных координатах при конкурентном (а) и неконкурентном (б) ингибировании роста микроорганизмов

1. *Полное конкурентное ингибирование* ( $\alpha \rightarrow \infty, \beta = 0$ ). В этом случае удельная скорость роста в экспоненциальной фазе определяется выражением

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s (1 + R/K_R) + S} \quad (2.45)$$

Зависимость в обратных координатах имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси ординат (рис. 2.11, а). Константу конкурентного ингибирования  $K_R$  можно определить с помощью выражения

$$K_{эф} = K_s \left( 1 + \frac{R}{K_R} \right), \quad (2.46)$$

если представить экспериментальные данные в координатах  $K_{эф}$  от  $R$ .

Для определения  $K_R$  можно также применять *метод Диксона*, согласно которому экспериментальные данные откладываются в координатах  $(1/\mu, [R])$  (рис. 2.12).

2. *Полное неконкурентное ингибирование*. В этом случае удельная скорость роста культуры определяется выражением

$$\mu = \frac{\mu_m S}{(1 + R/K_R)(K_s + S)} \quad (2.47)$$

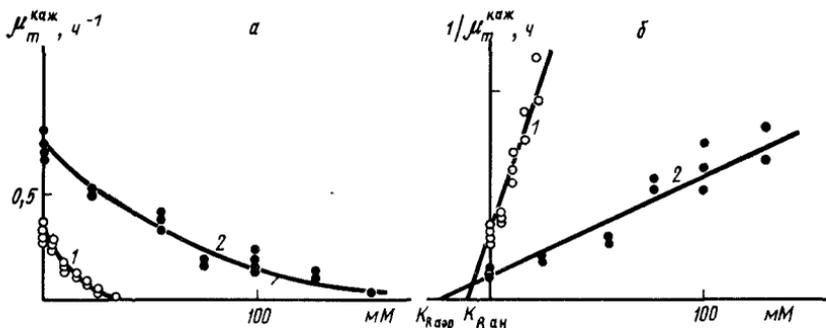


Рис. 2.12. Зависимость  $\mu$  (а) и  $1/\mu$  (б) от концентрации ацетата при росте *E. coli* в анаэробных (кривые 1) и аэробных (кривые 2) условиях

Зависимость в координатах Лайнуивера-Бёрка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси абсцисс (рис. 2.11, б). Константу неконкурентного ингибирования можно определить с помощью выражения

$$\mu_m^{\text{каж}} = \frac{\mu_m}{1 + R/K_R} \quad (2.48)$$

путем построения графика в координатах  $(1/\mu_m, [R])$  или с помощью метода Диксона. В качестве иллюстрации рассмотрим данные Г. В. Смирновой и О. Н. Октябрьского (1985), которые исследовали ингибирование ацетатом роста *E. coli* в аэробных и анаэробных условиях. Ими установлено, что ацетат является неконкурентным ингибитором роста. Зависимость  $\mu$  от концентрации ацетата приведена на рис. 2.12, а. На рис. 2.12, б эти же данные представлены в координатах Диксона, которые позволяют определить константы неконкурентного ингибирования: для анаэробного процесса  $K_R = 11$  мМ, для аэробного —  $K_R = 23,5$  мМ.

3. Неконкурентная активация ( $\alpha = 1, \beta > 1$ ). Как следует из уравнения (2.44), в этом случае максимальная скорость роста увеличивается:

$$\mu = \frac{\mu_m \frac{K_R + \beta R}{K_R + R} S}{K_S + S} \quad (2.49)$$

Зависимость скорости роста в координатах Лайнуивера-Бёрка имеет вид пучка прямых, пересекающихся на оси абсцисс. Анализ уравнения (2.49) можно проводить с помощью выражения

$$\mu_m^{\text{каж}} = \mu_m \frac{K_R + \beta R}{K_R + R}, \quad (2.50)$$

преобразованного к виду

$$\frac{1}{\mu_m^{\text{каж}}/(\mu_m - 1)} = \frac{1}{\beta - 1} + \frac{K_R}{\beta - 1} \frac{1}{R}. \quad (2.51)$$

Из этого выражения видно, что построение графика в координатах  $\left(1/\frac{\mu_m^{\text{каж}}}{\mu_m} - 1, 1/R\right)$  позволяет провести раздельное определение констант  $\beta$  и  $K_R$ . По механизму неконкурентной активации описывается реакция клеток *Nele* человека на инсулин. При недостатке инсулина скорость их роста очень низка. Введение инсулина заметно увеличивает скорость роста клеток. Имеются и другие факты, говорящие об активирующем действии разнообразных веществ на рост микробных клеток и клеток культуры тканей (Дж. Перт, 1978).

4. *Смешанные типы ингибирования и активации* ( $\alpha \neq 1, \beta \neq 1$ ). Графики в двойных обратных координатах имеют вид пучка прямых, соответствующих различным концентрациям эффектора и пересекающихся в общей точке с координатами

$$\left(\frac{1}{S}\right)_n = \frac{1}{K_s} \frac{\beta - 1}{\alpha - \beta}; \quad (2.52)$$

$$\left(\frac{1}{\mu}\right)_n = \frac{1}{\mu_m} \frac{\alpha - 1}{\alpha - \beta}. \quad (2.53)$$

Из выражений (2.52), (2.53) видно, что положение точки пересечения определяется лишь значениями  $\alpha$  и  $\beta$  и не зависит от  $K_R$ . Таким образом, вид графика в обратных координатах может быть использован для определения типа влияния эффектора на процесс роста популяции микроорганизмов.

## 2.7. ВЛИЯНИЕ pH НА КИНЕТИКУ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Одним из важнейших факторов, определяющих скорость роста популяции микроорганизмов, является концентрация ионов водорода. Многие микроорганизмы растут в достаточно узком диапазоне pH, при этом как увеличение концентрации ионов водорода (понижение pH), так и ее уменьшение (повышение pH) приводят к существенному замедлению скорости микробного процесса и даже к его прекращению. Влияние концентрации ионов водорода на скорость роста микроорганизмов — достаточно сложное явление. Ее изменение может затрагивать многие стороны функционирования микробной клетки.

Прежде всего концентрация ионов водорода может регулировать ионное состояние субстрата в том случае, если субстрат содержит ионогенную группу. Например, весьма

распространенная группа субстратов — аминокислоты — содержит две ионогенные группы, присоединение ионов водорода к которым существенным образом изменяет заряд молекулы и соответственно проницаемость клеточной мембраны для этого субстрата. Один из важных субстратов для многих микроорганизмов — диоксид углерода в водных растворах — существует в трех формах. Если клетка акцептирует этот субстрат лишь в одном ионном состоянии, то изменение концентрации ионов водорода до значений, выходящих за пределы соответствующего значения  $pK_a$ , должно изменить концентрацию необходимого субстрата и тем самым скорость роста культуры. Поэтому в первую очередь при интерпретации рН-зависимости роста микроорганизмов необходимо обратить внимание на возможность отражения в кинетике роста ионных состояний субстрата.

Другая важная особенность рН-зависимостей роста микроорганизмов заключается в том, что концентрация ионов водорода внутри клетки может существенным образом отличаться от рН в растворе. В силу буферных свойств молекулярных компонентов клетки либо в силу действия специализированного механизма стабилизации рН в клеточной среде рН может быть смещен на некоторое значение по сравнению с рН культуральной среды.  $\Delta pH$  определяется многими факторами, однако можно думать, что эта величина постоянна. Другими словами, это означает, что концентрация ионов водорода в каком-либо компартменте клетки линейно связана с концентрацией  $H^+$  во внешней среде.

Рассмотрим следующую простейшую модель. Представим себе мембрану, полупроницаемую для ионов водорода, через которую осуществляется перенос ионов водорода в прямом и обратном направлениях. В этом случае кинетика переноса может быть описана следующим дифференциальным уравнением в предположении, что скорости переноса пропорциональны  $H^+$  во внешней ( $H_{\text{внеш}}^+$ ) и во внутренней ( $H_{\text{внутр}}^+$ ) среде:

$$\frac{dH_{\text{внутр}}^+}{dt} = \alpha H_{\text{внеш}}^+ - \beta H_{\text{внутр}}^+, \quad (2.54)$$

где  $\alpha$ ,  $\beta$  — кинетические коэффициенты.

Если равновесие переноса устанавливается относительно быстро,  $dH_{\text{внутр}}^+/dt = 0$ , то соответственно имеем

$$H_{\text{внутр}}^+ = \frac{\alpha}{\beta} H_{\text{внеш}}^+. \quad (2.55)$$

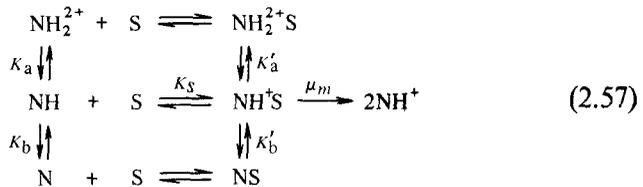
Концентрации ионов водорода во внешней среде и внутри компартмента связаны линейным соотношением, при этом если  $\alpha/\beta > 1$ , то в клетке поддерживается более «кислая»

среда; если  $\alpha = \beta$ , то значение рН внутри и во вне клетки одинаково, если  $\alpha/\beta < 1$ , то в клетке устанавливается более щелочная среда.

Наиболее существенным фактором, определяющим кинетическое поведение популяции микроорганизмов при различных рН, является зависимость от рН кинетики действия ферментов, прежде всего лимитирующего рост фермента. Представим себе случай, при котором состояние активного центра лимитирующего фермента определяется двумя ионогенными группами с константами ионизации  $K_a$  и  $K_b$ :



Если каталитически активна лишь форма  $\text{EH}^+$ , то кинетическую схему можно представить в виде



где  $\text{NH}_2^{2+}$ ,  $\text{NH}^+$ ,  $\text{N}$  — состояния клетки, содержащие лимитирующий фермент в формах  $\text{EH}_2^{2+}$ ,  $\text{EH}^+$ ,  $\text{E}$  соответственно.

Кинетической схеме (2.57) соответствует уравнение роста

$$\mu = \frac{\frac{\mu_m}{1 + \text{H}^+ / K'_a + K'_b / \text{H}^+} \text{S}}{K_s \frac{1 + \text{H}^+ / K_a + K_b / \text{H}^+}{1 + \text{H}^+ / K'_a + K'_b / \text{H}^+} + \text{S}}, \quad (2.58)$$

где  $\text{H}^+$  — внутренняя концентрация ионов водорода в компартменте, в котором функционирует фермент.

Уравнение (2.58) соответствует «классическому» уравнению роста микроорганизмов, в котором максимальная удельная скорость и константа средства зависят от концентрации ионов водорода:

$$\mu_m^{\text{каж}} = \frac{\mu_m}{1 + \text{H}^+ / K'_a + K'_b / \text{H}^+}; \quad (2.59)$$

$$K_s^{\text{каж}} = K_s \frac{1 + \text{H}^+ / K_a + K_b / \text{H}^+}{1 + \text{H}^+ / K'_a + K'_b / \text{H}^+}. \quad (2.60)$$

В соответствии с выражением (2.58) график зависимости от рН представляет собой симметричный колокол.

Из уравнений (2.58) — (2.60) следует, что анализ зависимости  $\mu_m^{\text{каж}}$  от рН позволяет найти значения констант диссоциации

групп комплекса лимитирующего фермента с субстратом ( $K'_a$  и  $K'_b$ ), а анализ рН-зависимости отношения  $\mu_m^{\text{каж}}/K_s^{\text{каж}}$  приводит к значениям констант диссоциации лимитирующего фермента в отсутствие связывания с субстратом ( $K_a$  и  $K_b$ ).

Экспериментально исследуется зависимость  $\mu$  от  $H_{\text{внеш}}^+$ , т. е. от концентрации ионов водорода в культуральной среде. В соответствии с этим уравнения (2.59) и (2.60) модифицируются к виду

$$\mu_m^{\text{каж}} = \frac{\mu_m}{1 + \alpha/\beta(H_{\text{внеш}}^+/K'_a) + \beta/\alpha(K'_b/H_{\text{внеш}}^+)}; \quad (2.61)$$

$$K_s^{\text{каж}} = K_s \frac{1 + \alpha H_{\text{внеш}}^+/\beta K_a + \beta/\alpha(K_b/H_{\text{внеш}}^+)}{1 + \alpha H_{\text{внеш}}^+/\beta K'_a + \beta/\alpha(K'_b/H_{\text{внеш}}^+)}. \quad (2.62)$$

Из уравнений (2.61) и (2.62) видно, что различие внешней и внутренней концентрации ионов водорода приводит к различию в экспериментально определяемых значениях констант ионизации:

$$K_a^{\text{каж}} = \beta/(\alpha K_a); \quad (2.63)$$

$$K_b^{\text{каж}} = \beta/(\alpha K_b). \quad (2.64)$$

На практике широко распространен случай, когда субстрат, связываясь с ферментом, не изменяет значений констант диссоциации ионогенных групп лимитирующего фермента [ $K_a = K'_a$ ,  $K_b = K'_b$  по схеме (2.57)]. В этом случае константа связывания  $K_s$  не зависит от рН:

$$\mu = \frac{\frac{\mu_m}{1 + H_{\text{внеш}}^+/K_a^{\text{каж}} + K_b^{\text{каж}}/H_{\text{внеш}}^+} S}{K_s + S}, \quad (2.65)$$

причем

$$\mu_m^{\text{каж}} = \frac{\mu_m}{1 + H_{\text{внеш}}^+/K_a^{\text{каж}} + K_b^{\text{каж}}/H_{\text{внеш}}^+}. \quad (2.66)$$

При исследованиях рН-зависимостей экспериментатору желательно работать в условиях  $K_s \ll S$ , в этом случае  $\mu = \mu_m^{\text{каж}}$  и для определения констант диссоциации удобно применять логарифмические координаты ( $\lg \mu^{\text{каж}}$ , рН). Логарифмируя выражение (2.66), получаем

$$\lg \mu^{\text{каж}} = \lg \mu_m - \lg (1 + H_{\text{внеш}}^+/K_a^{\text{каж}} + K_b^{\text{каж}}/H_{\text{внеш}}^+). \quad (2.67)$$

В кислой области, где  $H_{\text{внеш}}^+ \gg K_a^{\text{каж}}$ , после пренебрежения малыми членами получаем

$$\lg \mu^{\text{каж}} = \lg \mu_m - \lg H_{\text{внеш}}^+ + \lg K_a^{\text{каж}} \quad (2.68)$$

или

$$\lg \mu^{\text{каж}} = \lg \mu_m + \text{pH}_{\text{внеш}} - \text{p}K_a^{\text{каж}}. \quad (2.69)$$

График зависимости в логарифмических координатах ( $\lg \mu$ ,  $pH$ ) в кислой области имеет вид прямой с тангенсом угла наклона  $+1$ .

Похожая картина наблюдается в щелочной области, где  $K_b^{каж} \gg H_{внеш}^+$ , тогда после упрощений получаем

$$\lg \mu^{каж} = \lg \mu_m - pH_{внеш} + pK_b^{каж}. \quad (2.70)$$

График зависимости в логарифмических координатах также прямая, но с тангенсом  $-1$ .

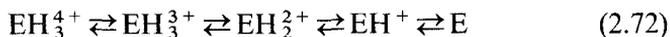
В области нейтральных  $pH$ , если  $K_a^{каж}$  и  $K_b^{каж}$  сильно различаются (плато колокола обширное), то

$$\lg \mu^{каж} = \lg \mu_m. \quad (2.71)$$

Если же  $K_a$  и  $K_b$  различаются меньше чем на порядок (плато колокола отсутствует или очень узкое), то для описания зависимости  $\mu$  от  $pH$  необходимо применять выражение (2.66) в неизменном виде.

● Таким образом,  $pH$ -профиль  $\mu$  в логарифмических координатах должен иметь форму двух соединенных в центре сигмоид и из точек пересечения касательных к обеим ветвям каждой из сигмоид можно определить  $pK_a^{каж}$  и  $pK_b^{каж}$ .

Из теории действия ферментов следует, что присоединение одного протона к активному центру фермента отражается в  $pH$ -зависимости скорости в логарифмических координатах изменением тангенса угла наклона на единицу. Так, в соответствии со схемой (2.56) присоединение протона к форме  $E$  с образованием  $EH^+$  приводит к изменению тангенса угла наклона от  $-1$  до  $0$  (рис. 2.13, *a*). Может быть и более сложная зависимость (рис. 2.13, *б*), где тангенс угла наклона при переходе от низких значений  $pH$  к высшим изменяется следующим образом:  $2:1:0:-2$ . Это соответствует кинетической схеме



На двух последних стадиях присоединение протонов происходит с одинаковым значением  $pK_a$ , так что тангенс угла наклона изменяется от  $-2$  до  $0$ .

Рассмотрим ряд экспериментальных данных (рис. 2.14). Рост дрожжей *Candida utilis* на среде с глицерином контролируется

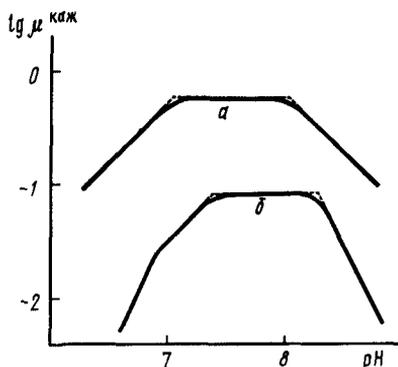


Рис. 2.13. Теоретические зависимости логарифма  $\mu^{каж}$  от  $pH$

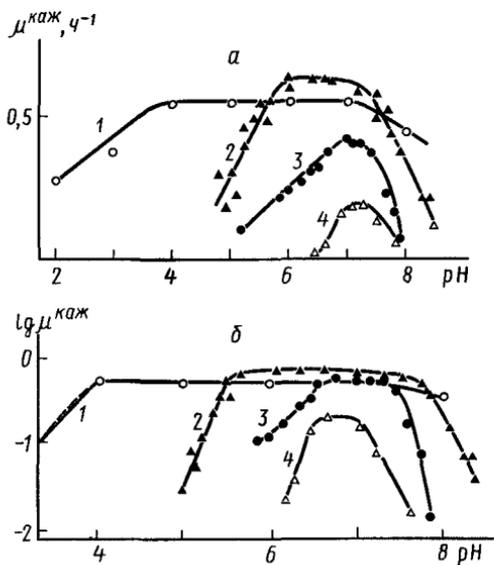


Рис. 2.14. Зависимости  $\mu^{каж}$  от pH для роста некоторых культур микроорганизмов (а) и те же данные в логарифмических координатах (б):

1— *Candida utilis* на среде с глицерином (Е. А. Андреева и др., 1970); 2— *Bac. megaterium* на среде с глюкозой и цитратом (З. В. Сахарова, 1970); 3— *M. thermoautotrophicum* на газовой смеси  $H_2$  и  $CO_2$  (P. Schonheit et al., 1980); 4— *Methanococcus maripaludis* на газовой смеси  $H_2$  и  $CO_2$  (W. Janes et al., 1983)

(тангенс угла наклона правой ветви кривой около  $-5$ ).

Способ представления экспериментальных данных в логарифмических координатах дает возможность провести с той или иной точностью определение  $pK_a^{каж}$ . Основным методом проверки и уточнения найденных значений  $pK_a^{каж}$  (в случаях кривых pH-зависимости любой формы) является проведение теоретической кривой pH-зависимости и осуществление коррекции ее вплоть до оптимального согласования с результатами эксперимента. Такую процедуру удобно проводить на ЭВМ, при этом решают несколько раз прямую задачу по подбору  $pK_a^{каж}$  или обратную задачу — находят  $pK_a^{каж}$  методами минимизации отклонений экспериментальной кривой от теоретической.

! В данной главе была проанализирована кинетика роста клеточной популяции в наиболее активной фазе роста — экспоненциальной. Из зависимости числа клеток (количества биомассы) от времени можно найти удельную скорость роста культуры. Определение этого параметра не зависит от

одной ионогенной группой с  $pK_a^{каж}$  меньше 4 (переход тангенса угла наклона от 1,0 до 0). *Bacillus megaterium* растет в более узком диапазоне pH, при этом рост бактерии контролируется по крайней мере четырьмя ионогенными группами: двумя с  $pK_a^{каж}$  около 5,5 и двумя с  $pK_a^{каж}$  около 8 (переходы от 2 до 0 в области pH 5,5; переход от 0 до  $-2$  в области pH 7,5—8,0). Еще более острые pH-зависимости роста имеют *M. thermoautotrophicum* и *Methanococcus maripaludis*, использующие для роста молекулярный водород и  $CO_2$ . Скорость роста *M. thermoautotrophicum* контролируется одной ионогенной группой с  $pK_a^{каж}$  около 6,5 и пятью ионогенными группами с  $pK_a^{каж}$  около 7,5

метода измерения плотности популяции, количества введенного инокулята. Удельная скорость роста — это временная характеристика развития популяции. При вычислении удельной скорости роста микробной культуры удобным может оказаться разностный метод.

Удельная скорость роста является величиной, зависящей от концентрации лимитирующего субстрата. Эта зависимость в большинстве случаев имеет форму уравнения Моно, поэтому здесь даны методы определения параметров этого уравнения — максимальной удельной скорости роста  $\mu_m$  и константы скорости к субстрату  $K_s$ .

По своей природе рост микроорганизмов — многосубстратный процесс. В главе даны основы кинетики роста микроорганизмов как многосубстратного процесса. Стадии ввода субстратов в метаболические системы разделены, как правило, дополнительными химически необратимыми реакциями, в силу этого уравнение удельной скорости роста микроорганизма должно иметь форму, соответствующую пинг-понг-механизму в кинетике ферментативных реакций.

В экспоненциальной фазе роста активно проявляются различные ингибирующие и активирующие эффекты. Была рассмотрена обобщенная схема действия обратимых эффекторов на кинетику роста микроорганизмов и приведены уравнения, позволяющие на основе экспериментальных данных определить механизм и константы ингибирования. Одним из важных ингибирующих эффектов, влияющих на скорость роста микроорганизмов, является внешняя концентрация ионов водорода. Из зависимости удельной скорости роста культуры от концентрации ионов водорода можно найти эффективные константы ионизации ионогенных групп, контролирующих микробный рост.

## ГЛАВА 3

### ИНТЕГРАЛЬНАЯ ФОРМА УРАВНЕНИЯ РОСТА МИКРОБНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Рассмотрим закономерности роста микробной популяции в более широком интервале времени. Как известно (см. рис. 1.1), за экспоненциальной фазой следует фаза линейного роста, переходящая в фазу замедленного роста. При периодическом культивировании, как правило, рост популяции останавливается на некотором предельном уровне, который может быть охарактеризован *предельной максимальной концентрацией клеток*  $M_m$ . Кинетический анализ позволяет получить уравнения, описывающие поведение микробной популяции во всем интервале времени развития культуры.

#### 3.1. ЗАМЕДЛЕНИЕ СКОРОСТИ РОСТА КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ БОЛЬШОЙ ПЛОТНОСТИ ПОПУЛЯЦИИ

Одна из первых попыток объяснить уменьшение скорости роста культур микроорганизмов и достижение предельного уровня плотности популяции была предпринята Ферхюльстом (см. Н. С. Печуркин, И. А. Терсков, 1975). Было предположено, что уравнение скорости накопления биомассы содержит дополнительный отрицательный член, квадратичный по биомассе:

$$\frac{dM}{dt} = \mu M - \mu \frac{M^2}{M_m}. \quad (3.1)$$

Качественно это означает, что при малых  $M$  происходит увеличение скорости роста культуры, при больших  $M$  — уменьшение за счет квадратичного члена.

Уравнение (3.1) после разделения переменных имеет вид

$$\frac{dM}{M \left( 1 - \frac{M}{M_m} \right)} = \mu t. \quad (3.2)$$

Интегрирование этого уравнения при  $t=0$ ,  $M=N_0$  приводит к

$$\ln \frac{(M/N_0)(M_m - N_0)}{(M_m/N_0 - M/N_0)N_0} = \mu t. \quad (3.3)$$

Это уравнение можно записать в виде

$$\frac{X}{M_m/N_0 - X} \left( \frac{M_m}{N_0} - 1 \right) = e^{\mu t}, \quad (3.4)$$

где  $X = M/N_0$ .

Из уравнения (3.4)  $X$  можно выразить как явную функцию времени:

$$X(t) = \frac{b e^{\mu t}}{1 + a e^{\mu t}}, \quad (3.5)$$

где

$$a = \frac{1}{M_m/N_0 - 1}; \quad (3.6)$$

$$b = \frac{M_m/N_0}{M_m/N_0 - 1}. \quad (3.7)$$

Рассмотрим свойства полученного решения: 1. В начальный момент времени  $t=0$   $X = M/N_0 = 1$ . Общее количество биомассы в системе равно введенной величине  $N_0$ . 2. При бесконечно большом времени при  $t \rightarrow \infty$   $X(t) = \frac{b}{a} = \frac{M_m}{N_0}$ . Количество клеток (концентрация биомассы) выходит на предельный максимальный уровень.

При относительно малых временах процесса на начальном этапе его развития, когда  $a e^{\mu t} \ll 1$ , имеет место экспоненциальный рост числа клеток:

$$X(t) \simeq b e^{\mu t}. \quad (3.8)$$

Обычно микробиологический процесс проводят в режиме, когда  $M_m/N_0 \gg 1$ . В этих условиях

$$a = N_0/M_m; \quad b = 1. \quad (3.9)$$

▲ Соответственно кинетика накопления биомассы будет представлена логистическим уравнением

$$X(t) = \frac{e^{\mu t}}{1 + \frac{N_0}{M_m} e^{\mu t}}. \quad (3.10)$$

На рис. 3.1 приведена зависимость  $X(t)$  при различных значениях параметров кривых  $N_0/M_m$  и  $\mu$ . Видно, что значение  $N_0/M_m$  определяет предел накопления биомассы;  $\mu$  — скорость развития процесса.

Кривые типа (3.10) называют *логистическими*. Эти кривые симметричны относительно времени  $\tau$ , при котором скорость развития процесса максимальна. Время  $\tau$ , при котором

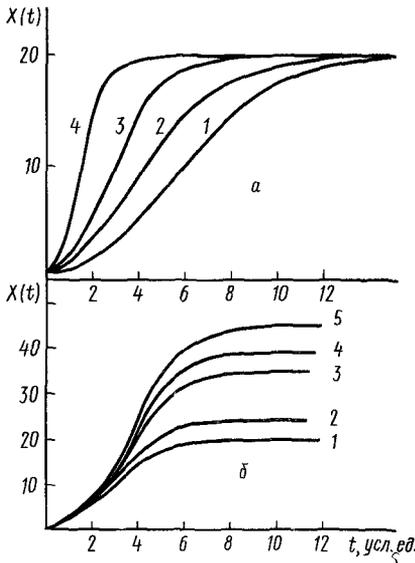


Рис. 3.1. Кинетика накопления биомассы  $[X(t) = M(t)/N_0]$ , описываемая логистическим уравнением (3.10): *a* — зависимость  $X(t)$  при постоянном  $N_0/M_m = 0,05$  и различных  $\mu$  (усл. ед.): 1 — 0,5; 2 — 0,73; 3 — 1,0; 4 — 2,0; *b* — зависимость  $X(t)$  при постоянном  $\mu = 1$  (усл. ед.) и разных значениях  $N_0/M_m$ : 1 — 0,05; 2 — 0,04; 3 — 0,028; 4 — 0,025; 5 — 0,022

динахах. Из уравнения (3.3) при  $M_m/N_0 \gg 1$  следует

$$\ln \frac{M_m/N_0 X}{M_m/N_0 - X} = \mu t. \quad (3.13)$$

Если неизвестно количество клеток в начальный момент времени, а известна кинетика  $M$  во времени, то можно воспользоваться уравнением

$$\ln \frac{M}{M_m - M} = \mu t + C, \quad (3.14)$$

где  $C = \ln(N_0/M_m)$ .

Тангенс угла наклона зависимости логарифмической функции уравнения (3.13) или (3.14) от времени дает возможность определить удельную скорость роста  $\mu$ .

▲ Логистические кривые часто используют для описания популяционной динамики роста микро- и макроорганизмов. В ряде случаев наблюдается хорошее соответствие между теоретическими кривыми и экспериментов. Однако необходимо иметь в виду, что это описание имеет чисто формальный

концентрация биомассы достигает половины предельного значения, можно вычислить по уравнению (3.10), приравняв  $X = \frac{M_m}{2N_0}$ :

$$\mu \tau = \ln \frac{M_m}{N_0}. \quad (3.11)$$

Соответственно, если экспериментально исследована вся кинетическая кривая роста и определены параметры  $\tau$  и  $M_m/N_0$ , значение удельной скорости роста можно достаточно точно определить, используя уравнение

$$\mu = \frac{\ln M_m/N_0}{\tau}. \quad (3.12)$$

▲ Экспериментальным критерием соответствия наблюдаемой кинетической кривой роста логистической кривой может служить линеаризация экспериментальных данных в соответствующих координатах.

характер, так как введение в дифференциальное уравнение роста отрицательного квадратного члена [см. (3.1)] не имеет ясного молекулярно-биологического обоснования. Анализ кинетики роста микроорганизмов в системах с истощением (см. ниже) показал, что в некоторых частных случаях кинетика роста строго описывается уравнением логистической кривой, однако физическая сущность этого связана не со «взаимным ингибированием» роста, а с расходом в системе лимитирующего субстрата.

### 3.2. ИНТЕГРАЛЬНАЯ ФОРМА УРАВНЕНИЯ РОСТА КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Одним из главных факторов, приводящим к замедлению скорости роста популяции клеток, является расход лимитирующего субстрата. Если этот фактор — единственный, который ограничивает рост культуры, то его можно учесть в той или иной модели роста.

Рассмотрим простейшую двухстадийную модель роста микробной популяции, приводящую к гиперболической зависимости скорости роста от концентрации субстрата, и учтем, что между концентрацией биомассы в замкнутой системе и количеством субстрата имеется линейная связь.

Уравнение скорости роста культуры имеет вид  $dM/dt = \mu M$ , или

$$-Y_s \frac{dS}{dt} = \mu M. \quad (3.15)$$

Знак минус показывает, что субстрат расходуется в процессе роста. Коэффициент  $Y_s$  имеет смысл стехиометрического коэффициента, который в микробиологической литературе получил название *экономического коэффициента*. Предполагается, что во всем временном интервале развития культуры  $Y_s$  постоянен.

Из уравнения (3.15) следует

$$Y_s dS = -dM. \quad (3.16)$$

Интегрирование последнего соотношения приводит к линейной связи между концентрацией субстрата и биомассы:

$$M - N_0 = Y_s (S_0 - S); \quad (3.17)$$

$$S = S_0 - \frac{M - N_0}{Y_s}. \quad (3.18)$$

Уравнения (3.15) — (3.18) справедливы для всех механизмов роста, характеризующихся многостадийностью превращения субстрата при отсутствии осложняющих факторов, таких, как ингибирование избытком субстрата или продуктом ферментационного превращения.

Если в уравнение (3.15) подставить  $S$ , выраженное по уравнению (3.18) через  $M$ , то получим

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m M}{1 + \frac{K_s}{S_0 - \frac{M - N_0}{Y_s}}} = \frac{\mu_m}{M + \frac{Y_s K_s}{M(S_0 Y_s - M + N_0)}}. \quad (3.19)$$

Уравнение (3.19) представляет собой дифференциальное уравнение первого порядка с разделяющимися переменными:

$$dM \left[ \frac{1}{M} + \frac{Y_s K_s}{M(S_0 Y_s - M + N_0)} \right] = \mu_m dt. \quad (3.20)$$

Интегрирование этого уравнения следует вести по переменной  $M$  в пределах от  $N_0$  до  $M$ , по переменной  $t$  в пределах от нуля до  $t$ :

$$\ln \frac{M}{N_0} + \int_{N_0}^M \frac{Y_s K_s dM}{M(S_0 Y_s - M + N_0)} = \mu_m t. \quad (3.21)$$

Подинтегральную функцию в уравнении (3.21) можно представить в виде

$$\frac{1}{M(Y_s S_0 - M + N_0)} = \frac{A}{M} + \frac{B}{Y_s S_0 - M + N_0}, \quad (3.22)$$

где коэффициенты  $A$  и  $B$  связаны уравнением

$$A(Y_s S_0 - M + N_0) + BM = 1. \quad (3.23)$$

Из этого уравнения следует система уравнений, позволяющая найти значения коэффициентов  $A$  и  $B$ :

$$\begin{cases} -A + B = 0, \\ A(Y_s S_0 + N_0) = 1 \end{cases} \quad (3.24)$$

или

$$A = B = \frac{1}{Y_s S_0 + N_0}. \quad (3.25)$$

Соответственно интеграл уравнения (3.21) можно записать так:

$$I = \frac{Y_s K_s dM}{Y_s S_0 + N_0} \ln \frac{M}{N_0} - \frac{Y_s K_s}{Y_s S_0 + N_0} \ln \frac{Y_s S_0 + N_0 - M}{Y_s S_0}. \quad (3.26)$$

С учетом этого интегральная форма уравнения (3.15) будет иметь вид

$$\left( 1 + \frac{Y_s K_s}{Y_s S_0 + N_0} \right) \ln \frac{M}{N_0} - \frac{Y_s K_s}{Y_s S_0 + N_0} \ln \frac{Y_s S_0 + N_0 - M}{Y_s S_0} = \mu_m t. \quad (3.27)$$

Это уравнение известно как интегральное уравнение Моно (см. Дж. Пёрт, 1978). Запишем уравнение (3.27) в форме

$$(1+Q) \ln \frac{M}{N_0} - Q \ln \frac{Y_s S_0 + N_0 - M}{Y_s S_0} = \mu_m t, \quad (3.28)$$

где

$$Q = \frac{Y_s K_s}{Y_s S_0 + N_0}. \quad (3.29)$$

Если перейти к безразмерной переменной  $X = M/N_0$ , то уравнение (3.28) можно представить в виде

$$(1+Q) \ln X - Q \ln(1+a-aX) = \mu_m t, \quad (3.30)$$

где  $a = N_0/(Y_s S_0)$ , или

$$\ln X - \frac{Q}{1+Q} \ln(1+a-aX) = \frac{\mu_m}{1+Q} t. \quad (3.31)$$

Культивирование микроорганизмов обычно проводят в условиях, когда предельное накопление биомассы существенно превышает биомассу в исходном инокуляте:  $Y_s S_0 \gg N_0$ , или  $a \ll 1$ . При этом условии уравнение приобретает вид

$$\ln X - \frac{K_s}{S_0 + K_s} \ln(1-aX) = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}. \quad (3.32)$$

Принципиально важны два следующих режима функционирования системы.

1. *Условия малого накопления биомассы и небольшого расхода субстрата:*

$$aX \ll 1, \quad X \ll \frac{1}{a} = \frac{Y_s S_0}{N_0}. \quad (3.33)$$

В этом режиме второй логарифмический член уравнения (3.32) близок к нулю:

$$\ln X \simeq \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}; \quad (3.34)$$

$$\frac{M}{N_0} = e^{\frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} t}. \quad (3.35)$$

Таким образом, имеет место экспоненциальный рост культуры и экспериментально проявляется экспоненциальная фаза роста.

2. *Режим, близкий к истощению субстрата,  $aX \rightarrow 1$ . При этом условии*

$$\frac{K_s}{S_0 + K_s} \ln(1-aX) \gg \ln X; \quad (3.36)$$

$$\frac{K_s}{K_s + S_0} \ln(1 - aX) \approx -\frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}; \quad (3.37)$$

$$1 - aX \approx e^{-\frac{\mu_m S_0}{K_s} t}. \quad (3.38)$$

При бесконечно больших временах (при  $t \rightarrow \infty$ )

$$X \underset{t \rightarrow \infty}{=} \frac{1}{a} = \frac{Y_s S_0}{N_0} \quad (3.39)$$

или

$$M \underset{t \rightarrow \infty}{=} Y_s S_0. \quad (3.40)$$

Накопление биомассы в системе имеет предел, определяемый концентрацией субстрата.

В несколько более общем случае с учетом слагаемого  $a$  во втором логарифмическом члене уравнения (3.31) предельное накопление биомассы будет дано функцией

$$M \underset{t \rightarrow \infty}{=} Y_s S_0 + N_0. \quad (3.41)$$

● Итак, уравнение (3.31) описывает наиболее характерные особенности кинетической кривой роста микробной популяции в закрытой системе: экспоненциальный рост на начальном этапе процесса и предельное накопление биомассы, связанное с полным истощением системы по субстрату.

Форма кинетической кривой накопления биомассы зависит от соотношения начальной концентрации субстрата и константы  $K_s$ .

1. **Рост в условиях первого порядка по субстрату.** Если  $K_s \gg S_0$ ,  $K_s/S_0 \gg 1$ , то уравнение (3.32) будет иметь вид

$$\ln X - \ln(1 - aX) = \frac{\mu_m S_0}{K_s} t \quad (3.42)$$

или

$$\frac{X}{1 - aX} = e^{\frac{\mu_m S_0}{K_s} t}. \quad (3.43)$$

Это уравнение логистической кривой [см. уравнение (3.4) и его решение].

Зависимость  $X(t)$  в условиях  $K_s \gg S_0$  (система не насыщена субстратом) будет представлена функцией

$$X(t) = \frac{M(t)}{N_0} = \frac{e^{\frac{\mu_m S_0}{K_s} t}}{1 + \frac{N_0}{Y_s S_0} e^{\frac{\mu_m S_0}{K_s} t}}. \quad (3.44)$$

Из уравнения (3.44) проясняется молекулярное истолкование уравнения Ферхюльста. В условиях истощения субстрата в замкнутой системе в дифференциальном уравнении роста возникает отрицательный квадратичный по биомассе член вследствие того, что концентрации субстрата и биомассы связаны между собой линейной связью. Действительно, если  $K_s \gg S_0$ , то

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m S M}{K_s}. \quad (3.45)$$

С учетом того, что  $S = S_0 - \frac{M - N_0}{Y_s}$ , имеем

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m S_0 M}{K_s} - \frac{\mu_m M (M - N_0)}{K_s Y_s}. \quad (3.46)$$

По своей форме это дифференциальное уравнение эквивалентно уравнению (3.1).

К анализу кинетических кривых роста в условиях  $K_s \gg S_0$  применимы методы, используемые при исследовании логистических кривых:

а. Если найдено время  $\tau$ , в течение которого величина  $X$  достигает половины от предельно возможной, то при известном значении  $Y_s S_0 / N_0$  можно определить группу параметров:

$$\frac{\mu_m S_0}{K_s} = \frac{\ln \frac{Y_s S_0}{N_0}}{\tau}. \quad (3.47)$$

б. Линеаризация кинетической кривой во всем интервале времени в координатах уравнения

$$\ln \frac{M}{M_m - M} = \frac{\mu_m S_0}{K_s} t + C \quad (3.48)$$

позволяет из тангенса угла наклона прямой определить параметр  $\mu_m S_0 / K_s$ . Если исследование кинетики роста микроорганизмов проводится при нескольких различных начальных концентрациях субстрата, то наблюдаемые тангенсы должны линейно зависеть от концентрации субстрата (критерий справедливости соотношения  $K_s \gg S_0$ ). Это позволяет из экспериментальных данных найти параметр  $\mu_m / K_s$ .

2. Рост в условиях нулевого порядка по субстрату. Если начальная концентрация субстрата существенно превышает значение константы  $K_s$  ( $S_0 \gg K_s$ ), то уравнение роста популяции в неявной форме будет дано выражением

$$\ln X - \frac{K_s}{S_0} \ln(1 + aX) = \mu_m t. \quad (3.49)$$

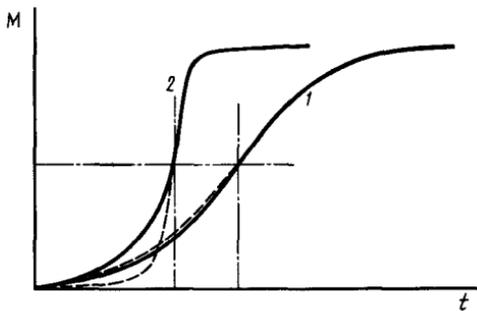


Рис. 3.2. Сравнение кинетических кривых роста микробной популяции в режиме первого ( $K_s \gg S_0$ , кривая 1) и нулевого ( $K_s \ll S_0$ , кривая 2) порядков по концентрации лимитирующего субстрата:

пунктирными линиями обозначены проекции верхней половины кинетических кривых, получаемых в результате их двойного зеркального отражения относительно осей, обозначенных штрихпунктирными линиями

Интегральное уравнение роста микробной популяции в условиях истощения субстрата можно представить в форме

$$\ln X - \Phi \ln(1 - aX) = \mu t, \quad (3.50)$$

где

$$\Phi = \frac{K_s}{S_0 + K_s}; \quad (3.51)$$

$$\mu = \frac{M_m S_0}{S_0 + K_s}; \quad (3.52)$$

$$a = \frac{N_0}{M_m}. \quad (3.53)$$

Это же уравнение можно записать в виде

$$\frac{X}{(1 - aX)^\Phi} = e^{\mu t}, \quad (3.54)$$

при этом

$$\begin{aligned} \Phi &= 1, \text{ если } K_s \gg S_0 \\ \Phi &\ll 1, \text{ если } K_s \ll S_0. \end{aligned} \quad (3.55)$$

Из трех параметров  $\Phi$ ,  $\mu$  и  $a$ , входящих в уравнение (3.50), из экспериментальных данных наиболее просто определяется  $a$  по отношению количества концентраций введенных клеток к предельному количеству (концентрации) клеток. Если известно  $a$ , то параметры  $\Phi$  и  $\mu$  можно определить, воспользовавшись одной из линеаризованных форм уравнения (3.50).

Например, уравнение (3.50) можно трансформировать к виду

В этом случае кинетическая кривая роста не будет иметь вид симметричной логистической кривой (рис. 3.2). В случае нулевого порядка по субстрату система значительный период времени развивается экспоненциально, однако затем на ограниченном отрезке времени выходит на предельное значение биомассы. Таким образом, качественный вид зависимости  $X(t)$  может дать первичную информацию о соотношении начальной концентрации субстрата и  $K_s$ .

$$\frac{\ln X}{t} = \mu + \Phi \frac{\ln(1-aX)}{t}. \quad (3.56)$$

В этом случае зависимость  $\ln(X/t)$  должна быть линейной функцией переменной  $\ln[(1-aX)/t]$ ; при этом отрезок, отсекаемый на оси ординат, дает параметр  $\mu$ , имеющий размерность обратного времени, тангенс угла наклона позволяет определить безразмерный параметр  $\Phi$ .

Для определения параметров  $\Phi$  и  $\mu$  можно использовать также другую анаморфозу уравнения (3.50):

$$\frac{\ln X}{\ln(1-aX)} = \Phi + \mu \frac{t}{\ln(1-aX)}. \quad (3.57)$$

В этом случае отрезок, отсекаемый зависимостью  $\ln X/\ln(1-aX)$  от  $t/\ln(1-aX)$  на оси ординат, равен  $\Phi$ , тангенс угла наклона  $\mu$ .

Аналогично, равноправной анаморфозой является уравнение

$$\frac{\ln(1-aX)}{\ln X} = \frac{1}{\Phi} - \frac{\mu}{\Phi} \frac{t}{\ln X}, \quad (3.58)$$

по которому можно найти параметры  $1/\Phi$  и  $\mu/\Phi$ .

При известной начальной концентрации субстрата и определенных из эксперимента параметрах кривой роста  $\Phi$  и  $\mu$  можно вычислить значение  $K_s$  (при  $\Phi$ , отличном от единицы), т. е.

$$K_s = \frac{\Phi S_0}{1-\Phi}, \quad (3.59)$$

и соответственно найти максимальную удельную скорость:

$$\mu_m = \frac{\mu}{1-\Phi}. \quad (3.60)$$

● Таким образом, на основании одной кривой роста микроорганизма при использовании интегрального уравнения, учитывающего динамику расхода субстрата, можно найти оба кинетических параметра роста микроорганизма: константу средства  $K_s$  и максимальную удельную скорость роста  $\mu_m$ .

### 3.3. ПРИБЛИЖЕННЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА ИНТЕГРАЛЬНОЙ КИНЕТИЧЕСКОЙ КРИВОЙ РОСТА ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ БОЛЬШИХ ГЛУБИНАХ КОНВЕРСИИ СУБСТРАТА

Интегральную форму уравнения роста популяции микроорганизмов можно записать в форме

$$\ln \frac{M}{N_0} - \Phi \ln \left( 1 - \frac{M}{M_m} \right) = \mu t, \quad (3.61)$$

где  $\Phi = \frac{K_s}{K_s + S_0}$ ,  $\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}$ .

Второй логарифмический член уравнения (3.61) может быть представлен в виде степенного ряда, при этом приближенное описание при конечном числе членов ряда будет тем полнее соответствовать точному значению, чем меньше степень конверсии субстрата:

$$\frac{S_0 - S}{S_0} = \frac{M}{M_m} = \xi; \quad (3.62)$$

$$\ln(1 - \xi) = -\xi - \frac{\xi^2}{2} - \frac{\xi^3}{3} - \dots \quad (3.63)$$

Для приближенного описания кинетики процесса при  $\xi \ll 1$  можно воспользоваться первым членом разложения. В этом случае кинетика процесса будет дана уравнением

$$\ln \frac{M}{N_0} + \Phi \xi = \mu t \quad (3.64)$$

или

$$\ln \frac{M_m}{N_0} + \ln \xi + \Phi \xi = \mu t. \quad (3.65)$$

В несколько более общей форме при  $M$ , соизмеримых с  $N_0$ , разложение второго логарифмического члена уравнения (3.61) в ряд дает приближенное уравнение кинетики роста культуры:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \Phi \left( \frac{M - N_0}{M_m} \right) = \mu t. \quad (3.66)$$

Очевидно, что приближенные уравнения (3.64) — (3.66) справедливы лишь при соотношении  $(M - N_0)/M_m \ll 1$ , т. е. при небольших глубинах процесса. Возникает вопрос: до каких глубин можно использовать данное приближение? Чтобы ответить на него, проведем следующий расчетный анализ.

Можно считать, что приближенное уравнение достаточно хорошо описывает кинетику процесса, если отклонение приближенного решения от точного меньше или равно статистической ошибке измерения экспериментальных величин. Обычная точность измерения удельной скорости роста популяции микроорганизмов не превышает 10—12%. Запишем точный вид левой части интегральной формы уравнения роста

$$y_T = \ln \frac{M_m}{N_0} \xi - \Phi \ln \left( 1 - \xi + \frac{N_0}{M_m} \right), \quad (3.67)$$

а приближенный — в виде

$$y_n = \ln \frac{M_m}{N_0} \xi + \Phi \left( \xi - \frac{N_0}{M_m} \right). \quad (3.68)$$

Относительное отклонение приближенного решения от точного будет иметь вид

$$\frac{y_T - y_n}{y_T} = \frac{\Delta y}{y_T} = \frac{\Phi \left[ \ln \left( 1 - \xi + \frac{N_0}{M_m} \right) + \left( \xi - \frac{N_0}{M_m} \right) \right]}{-\ln \frac{M_m}{N_0} \xi + \Phi \ln \left( 1 - \xi + \frac{N_0}{M_m} \right)} \quad (3.69)$$

Видно, что относительное отклонение приближенного значения от точного зависит от глубины расхода лимитирующего субстрата и определяется двумя безразмерными параметрами:  $\Phi$  и  $M_m/N_0$ . Для оценочных расчетов можно принять значения  $M_m/N_0 = 10$ , это соответствует весьма распространенному случаю, при котором число клеток в процессе культивирования увеличивается в 10 раз. На рис. 3.3 приведена зависимость  $(y_T - y_n)/y_T$  для двух принципиально важных режимов протекания процесса: 1) для  $\Phi = 1$  (это случай  $S_0 \ll K_s$ , режим первого порядка по субстрату, т. е. линейной зависимости скорости процесса от концентрации субстрата); 2) для  $\Phi = 0,1$  (это случай  $S_0 \gg K_s$ , режим нулевого порядка по концентрации субстрата, т. е. независимости скорости процесса от концентрации субстрата). Видно, что для точности определения скорости в 10% приближенное решение описывает динамику процесса до глубины конверсии субстрата 60—70% (при  $\Phi = 1$ , кривая 1).

Важно отметить, что в режиме максимальной скорости процесса ( $S_0 \gg K_s$ ) обсуждаемое приближение с линейным разложением второго логарифмического члена адекватно описывает кинетическую кривую роста при весьма высоких глубинах процесса (кривая 2).

Если значение  $\Phi$  превышает единицу (такого рода эффекты могут наблюдаться, когда микробный процесс сопровождается ингибированием продуктом реакции, см. гл. 5),

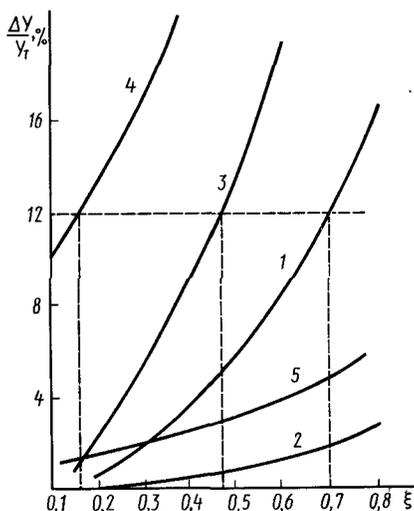


Рис. 3.3. Зависимость относительного отклонения приближенного уравнения от глубины протекания процесса для различных режимов:

1 —  $K_s \gg S_0$ ,  $\Phi = 1$ ; 2 —  $S_0 \gg K_s$ ,  $\Phi = 0,1$ ; 3 — режим ингибирования продуктом ферментации;  $\Phi = 5$ , уравнение (3.69); 4 —  $K_s \gg S_0$ ,  $\Phi = 1,0$ ; 5 —  $S_0 \gg K_s$ ,  $\Phi = 0,1$ , уравнение (3.71). Горизонтальной линией отмечена обычная статистическая ошибка в определении  $\mu$  (12%)

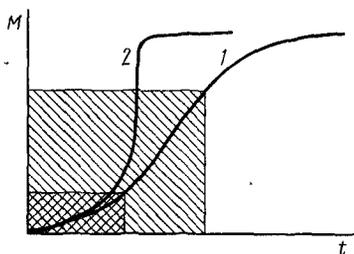


Рис. 3.4. Кинетические кривые роста микробной популяции в режиме первого порядка (кривая 1,  $K_s \gg S_0$ ) и нулевого порядка (кривая 2,  $S_0 \gg K_s$ ) по лимитирующему субстрату:

двойной заштрихованной областью представлены времена и глубины процесса, при которых справедливо экспоненциальное приближение; однократно заштрихованной областью представлены границы применимости приближенного уравнения

то обсуждаемый приближенный подход имеет основание для использования при  $\xi \leq 0,5$  (кривая 3).

Для сравнения на рис. 3.3 представлены данные по относительному отклонению скорости от точно вычисляемой величины в зависимости от глубины протекания процесса в том случае, если используется первое, наиболее грубое, приближение и анализируется лишь экспоненциальная фаза роста:

$$y_{II} = \ln \frac{M_m}{N_0} \xi. \quad (3.70)$$

Относительное отклонение приближенного значения функции от точного имеет вид

$$\frac{\Delta y}{y_I} = \frac{\Phi \ln \left( 1 - \xi + \frac{N_0}{M_m} \right)}{\Phi \ln \left( 1 - \xi - \frac{N_0}{M_m} \right) - \ln \frac{M_m}{N_0} \xi}. \quad (3.71)$$

▲ Видно, что экспоненциальное приближение имеет весьма ограниченную область применения. Без опасения допустить серьезную ошибку экспоненциальное приближение можно использовать до глубин процесса, не превышающих 0,15 (кривая 4 на рис. 3.3). Если реакция протекает по нулевому порядку относительно субстрата ( $\Phi \ll 1$ ,  $S_0 \gg K_s$ , то экспоненциальное приближение может достаточно точно описывать процесс и до более высоких степеней превращения субстрата (кривая 5 на рис. 3.3). Итоги проведенного анализа иллюстрирует рис. 3.4.

Следовательно, при анализе кинетики роста микробной популяции для кинетического описания процесса практически во всех случаях можно обоснованно использовать приближенные уравнения (3.64) — (3.66), если глубина конверсии субстрата (глубина роста культуры до максимально возможной полноты) не превышает 0,7 (рис. 3.3, кривая 1). Это существенно расширяет диапазон времен, в котором кинетика процесса может быть описана более простым уравнением. На основе этого более простого уравнения могут быть найдены параметры роста культуры. Например, кинетические данные, лежащие в области  $\xi \leq 0,7$ , должны достаточно хорошо линеаризоваться в координатах уравнения

$$\frac{\ln(M/N_0)}{t} = \mu - \Phi \frac{M - N_0}{M_m t}. \quad (3.72)$$

Это уравнение при известных  $N_0$  и  $M_m$  позволяет найти параметры  $\mu$  и  $\Phi$  и соответственно определить числовые значения констант  $\mu_m$  и  $K_s$ .

При анализе экспериментальных данных удобно использовать разностный метод, который дает возможность избежать неопределенностей, связанных с неточностью нахождения  $N_0$  и периода индукции  $\tau$ . Для фиксированных времен  $t_i$  и  $t_j$  справедливы соотношения

$$\begin{aligned} \ln M_i - \ln N_0 + \Phi \frac{M_i}{M_m} - \Phi \frac{N_0}{M_m} &= \mu t_i; \\ \ln M_j - \ln N_0 + \Phi \frac{M_j}{M_m} - \Phi \frac{N_0}{M_m} &= \mu t_j. \end{aligned} \quad (3.73)$$

Вычитание этих уравнений приводит к равенству

$$\ln \frac{M_i}{M_j} + \frac{\Phi}{M_m} (M_i - M_j) = \mu (t_i - t_j). \quad (3.74)$$

Представление экспериментальных данных в координатах этого разностного уравнения

$$\frac{\ln M_i/M_j}{t_i - t_j} = \mu - \frac{\Phi}{M_m} \frac{M_i - M_j}{t_i - t_j} \quad (3.75)$$

позволяет определить параметры  $\mu$  и  $\Phi/M_m$  и при известном  $M_m$  найти константы  $\mu_m$  и  $K_s$ .

### 3.4. ПРИМЕРЫ АНАЛИЗА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ КРИВЫХ РОСТА ПОПУЛЯЦИИ

Рассмотрим на нескольких примерах анализ кривых роста популяции микроорганизмов в рамках интегральных кинетических кривых и проиллюстрируем, какую информацию о природе протекающих процессов можно получить используя обсуждаемый подход.

На рис. 3.5 приведена кинетическая кривая роста водород-окисляющей бактерии *Alcaligenes eutrophus*. Рост культуры лимитирован по азоту, и через какое-то время в результате расхода азотного компонента он останавливается. Для количественного анализа экспериментальных данных удобно провести следующие операции.

1. *Оценка параметров  $\mu$  и  $N_0$  из начального участка кинетической кривой.* На начальных этапах развития процесса до глубин накопления  $M$  в 10—20% от предельного значения

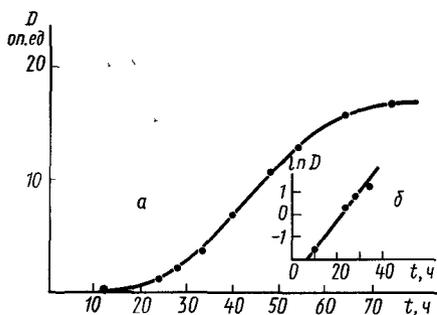


Рис. 3.5. Кинетика роста *A. eutrophus* с лимитацией по источнику азота (а) (Г. А. Заварзин, 1978) и линейризация начального участка кривой в полулогарифмических координатах (б)

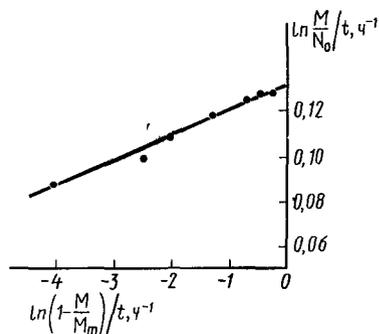


Рис. 3.6. Линейризация данных рис. 3.5 в координатах уравнения (3.77)

$M_m$  (первые четыре точки на кинетической кривой) можно с достаточной степенью достоверности пренебречь расходом субстрата. В этих условиях рост культуры происходит экспоненциально и динамика процесса может быть представлена простейшим уравнением

$$\ln M = \ln N_0 + \mu t. \quad (3.76)$$

Использование этого приближения позволяет сделать оценку параметров  $N_0$  и  $\mu$ . Параметр  $N_0$  предпочтительно определять независимо как начальную концентрацию клеток в инокуляте (или величину, линейно связанную с начальной концентрацией клеток, например оптическую плотность в начальный момент времени). С другой стороны,  $N_0$  можно найти кинетическим методом из экстраполяции кинетических данных к нулевому моменту времени (в предположении, что на кинетической кривой отсутствует период индукции).

На рис. 3.5, б приведены данные начального участка кинетической кривой рис. 3.5, а в полулогарифмических координатах. Тангенс угла наклона этой зависимости дает оценку  $\mu = 0,13 \text{ ч}^{-1}$  и оценку  $N_0 = 6 \cdot 10^{-2}$  оп. ед. (данные рис. 3.5 приведены в единицах оптической плотности, соответственно и значение  $N_0$  также дается в единицах оптической плотности).

2. *Линейризация всей кинетической кривой в координатах интегрального уравнения роста с источником субстрата.* Уравнение (3.56) можно преобразовать к виду

$$\frac{\ln(M/N_0)}{t} = \frac{\mu_m S_0}{S_0 + K_s} + \frac{K_s}{S_0 + K_s} \frac{\ln(1 - M/M_m)}{t}, \quad (3.77)$$

где  $M_m$  — максимальное значение биомассы, наблюдаемое при полном расходе субстрата. Из экспериментальных данных это значение определяется как асимптотическое, к которому стремится количество биомассы в системе. Для данных рис. 3.5 величина  $M_m$  равна 17,2 оп. ед.

Таким образом, определив экспериментальные значения  $N_0$  и  $M_m$ , можно вычислить функции  $\ln(M/N_0)/t$  и  $\ln(1 - M/M_m)/t$  и построить зависимость одной переменной величины от другой. Если экспериментальные данные соответствуют интегральной кривой роста микроорганизма, то эта зависимость должна иметь линейный характер; при этом можно определить два параметра прямой:

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} \quad \text{и} \quad \Phi = \frac{K_s}{S_0 + K_s}.$$

Важно обратить внимание на следующее обстоятельство. Наибольшей статистической ошибке в координатах уравнения (3.77) подвержены точки, лежащие вблизи значения  $M \rightarrow 0$  и  $M \rightarrow M_m$  (первая и последняя точки на кинетической кривой рис. 3.5). Поэтому при обработке данных рис. 3.5 в этих координатах эти две точки не учитывались (рис. 3.6). Из рисунка следует, что тангенс угла наклона прямой дает значение  $\Phi$ , равное  $1,1 \pm 0,1$ ; отрезок, отсекаемый на оси ординат, — удельную скорость роста  $\mu = 0,13 \pm 0,05^{-1}$ .

Для анализа экспериментальных данных можно воспользоваться и другими линейными анаморфозами уравнения (3.50). Например, на рис. 3.7 приведена кинетическая кривая роста указанной водородоксиляющей бактерии в координатах уравнения

$$\frac{\ln(M/N_0)}{\ln(1 - M/M_m)} = \Phi + \mu \frac{t}{\ln(1 - M/M_m)}. \quad (3.78)$$

Из рисунка видно, что  $\mu$  достаточно надежно определяется по тангенсу угла наклона прямой, в то время как  $\Phi$ , равная отрезку, отсекаемому прямой на оси ординат, определяется с большой ошибкой:  $\mu = (0,135 \pm 0,05)^{-1}$  и  $\Phi = 1,5 \mp 0,7$ .

Наконец, можно воспользоваться уравнением

$$\frac{\ln(1 - M/M_m)}{\ln(M/N_0)} = \frac{1}{\Phi} - \frac{\mu}{\Phi} \frac{t}{\ln(M/N_0)}. \quad (3.79)$$

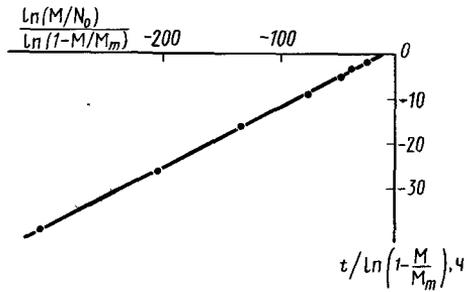


Рис. 3.7. Линейаризация данных рис. 3.5 в координатах уравнения (3.78)

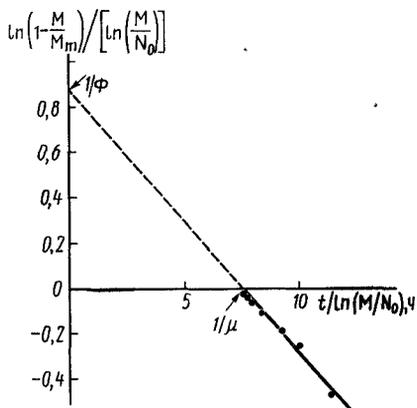


Рис. 3.8. Линеаризация данных рис. 3.5 в координатах уравнения (3.79)

с уравнением (3.51), что в рамках проведенного эксперимента  $K_s \gg S_0$ , т. е. использованная на опыте концентрация субстрата, в данном случае источника азота 1 г/л, существенно меньше наблюдаемой константы средства исследуемого организма к данному субстрату. Соответственно из проведенного эксперимента невозможно определить параметры  $\mu_m$  и  $K_s$ , а можно лишь найти их отношение.

Опыт по выращиванию культуры *Al. eutrophus* проводился в режиме  $S_0 \ll K_s$ . Качественно это можно было бы предположить из вида кривой (см. рис. 3.5), поскольку она практически симметрична относительно точки перегиба. Определение  $\Phi$  показало, что это действительно так. При  $\Phi \sim 1$  кривая роста должна иметь симметричный характер, при  $\Phi \ll 1$  должна возникать асимметрия (см. рис. 3.2). Это означает, что данные рис. 3.5 должны линеаризоваться и в координатах более простого уравнения Ферхюльста, которое, как было показано, является частным случаем общего уравнения (3.30), реализующегося при условии  $S_0 \ll K_s$ .

### 3.5. РАЗНОСТНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА ПОЛНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ КРИВЫХ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

При анализе кривых роста микроорганизмов, как правило, возникают некоторые осложняющие обстоятельства. Часто они связаны с тем, что экспериментально трудно бывает определить начальную концентрацию биомассы  $N_0$  или начальную концентрацию вводимого в систему продукта (если анализ кинетики

В соответствии с этим уравнением отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат, равен  $1/\Phi$ , а тангенс угла наклона — параметру  $\mu/\Phi$  (рис. 3.8). В координатах уравнения (3.78) параметр  $\Phi$  определяется с заметной ошибкой:  $\Phi = 1,1 \pm 0,15$ , в то же время  $\mu$  определяется достаточно точно:  $\mu = (0,133 \pm 0,003) \text{ ч}^{-1}$ .

Все использованные здесь координаты приводят к согласующимся значениям параметров  $\Phi$  и  $\mu$ .

Экспериментально найденное значение  $\Phi$  равно единице. Это означает в соответствии

роста культуры ведется по какому-либо продукту реакции). Их концентрация может быть существенно ниже порога чувствительности метода их регистрации. Вычисление параметра  $N_0$  по экстраполяции экспоненциальных кривых к нулевому времени с использованием уравнения (3.76) может приводить к существенным ошибкам, если кинетика роста микроорганизма включает период индукции, в течение которого идут адаптационные процессы, не связанные с накоплением биомассы. Важно отметить, что часто вообще невозможно сказать, имеет ли место на кинетической кривой роста период индукции, поскольку он может «маскироваться» экспоненциальной фазой.

Указанных сложностей позволяет избежать применение разностного метода анализа. Запишем уравнение (3.61) для некоторого фиксированного времени  $t_i - \tau$ , где  $\tau$  — период индукции;  $t_i$  — общее время развития процесса:

$$\ln M_i - \ln N_0 - \Phi \ln (M_m - M_i) + \Phi \ln M_m = \mu (t_i - \tau), \quad (3.80)$$

где  $M_i$  — количество (концентрация) биомассы, соответствующее времени  $t_i - \tau$ .

Для какого-либо другого времени  $t_j - \tau$  уравнение (3.61) будет иметь вид

$$\ln M_j - \ln N_0 - \Phi \ln (M_m - M_j) + \Phi \ln M_m = \mu (t_j - \tau). \quad (3.81)$$

Если вычесть уравнение (3.80) из уравнения (3.81), то будем иметь

$$\ln \frac{M_j}{M_i} - \Phi \ln \frac{M_m - M_j}{M_m - M_i} = \mu (t_j - t_i). \quad (3.82)$$

Видно, что полученное уравнение не включает неопределенные параметры  $N_0$  и  $\tau$ . Уравнение (3.82) весьма полезно при анализе кривых роста микроорганизмов. Если имеется  $k$  экспериментальных точек, то можно получить  $k(k-1)/2$  положительных разностей  $t_j - t_i$  и такое же количество значений функций  $\ln \frac{M_j}{M_i}$  и  $\ln \frac{M_m - M_j}{M_m - M_i}$ . Величины  $\Phi$  и  $\mu$  могут быть найдены из анализа полученного пула числовых значений при использовании любой из возможных линейных модификаций уравнения (3.82). Например, на рис. 3.9 приведены данные по кинетике роста водородокисляющих бактерий *Al. eutrophus* (рис. 3.5) в координатах уравнения

$$\frac{\ln (M_j/M_i)}{t_j - t_i} = \mu + \Phi \frac{\ln \frac{M_m - M_j}{M_m - M_i}}{t_j - t_i}. \quad (3.83)$$

Видно, что экспериментальные данные весьма хорошо описываются уравнением (3.83). Параметры  $\mu$  и  $\Phi$  соответственно

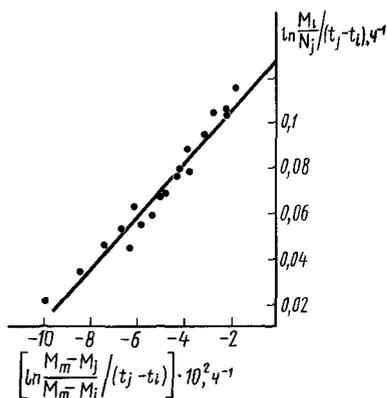


Рис. 3.9 Линеаризация данных рис. 3.5 в координатах уравнения (3.83)

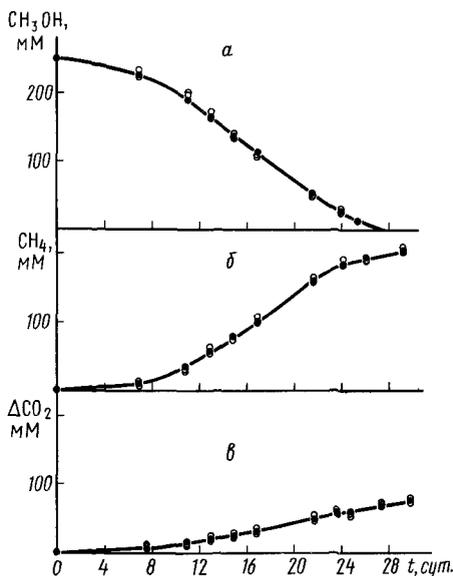


Рис. 3.10. Кинетические кривые расхода метанола (а) и накопления метана (б) и диоксида углерода (в) в процессе роста *Ms. vacuolata*

равны  $(0,13 \pm 0,01) \text{ ч}^{-1}$  и  $1,15 \pm 0,15$  и близки к ранее найденным параметрам для этой же системы по уравнениям (3.77)–(3.79).

В качестве другого примера рассмотрим кинетику метаболизма микробной популяции *Methanosarcina vacuolata* (рис. 3.10). Так как исследование кинетики процесса ведется по субстрату или продукту, то уравнение (3.83) при условии, что  $\frac{N_0}{M_m} < 0,1$ , может быть записано в виде

$$\frac{\ln \frac{S_0 - S_j}{S_0 - S_i}}{t_j - t_i} = \mu + \Phi \frac{\ln(S_j/S_i)}{t_j - t_i}; \quad (3.84)$$

$$\frac{\ln(P_j/P_i)}{t_j - t_i} = \mu + \Phi \frac{\ln \frac{P_m - P_j}{P_m - P_i}}{t_j - t_i}. \quad (3.85)$$

Обработка экспериментальных данных по метаболизму *Ms. vacuolata* в координатах уравнений (3.84)–(3.85) приводит к значениям:

$$\Phi = 0,65 \pm 0,13 \text{ (данные по кинетике расходы метанола);}$$

$$\mu = (0,22 \pm 0,02) \text{ сут}^{-1};$$

$\Phi = 0,67 \pm 0,1$  (данные по кинетике накопления метана);

$$\mu = (0,23 \pm 0,02) \text{ сут}^{-1}.$$

Видно, что обе экспериментальные зависимости приводят к одинаковым значениям параметров и прекрасно согласуются друг с другом (рис. 3.11).

Использование  $\Phi$  и  $\mu$  позволяет определить значения  $\mu_m$  и  $K_s$ :

$$K_s = \frac{\Phi}{1-\Phi} S_0; \quad (3.86)$$

$$\mu_m = \frac{\mu}{1-\Phi}. \quad (3.87)$$

Для исследуемой культуры *Ms. vacuolata* найдено:

$$K_s = (480 \pm 20) \text{ мМ},$$

$$\mu_m = (0,65 \pm 0,05) \text{ сут}^{-1}.$$

Эти значения согласуются с результатами, полученными для других штаммов метаносарцин. Кроме того, эти данные показывают, что удельная максимальная скорость роста культуры в несколько раз превышает наблюдаемую удельную скорость роста и процесс может быть интенсифицирован увеличением начальной концентрации метанола.

▲ В качестве практической рекомендации следует отметить, что наибольший статистический вес и наименьшую случайную ошибку в рамках обсуждаемого подхода имеют точки, лежащие ближе к центру прямой. Крайние точки [высокие значения функции  $\ln(M_j/M_i)/(t_j-t_i)$  и высокие отрицательные значения функции  $\ln \frac{M_m - M_j}{M_m - M_i} / (t_j - t_i)$ ] наиболее подвержены отклонениям, происходящим из статистических ошибок эксперимента. Эти крайние значения лучше из обработать экспериментальных данных исключать.

### 3.6. КИНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ОГРАНИЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО РОСТА

Рост клеточных популяций ограничен рядом факторов, приводящих к существованию предела в накоплении клеточной биомассы. Для микроорганизмов ограничение плотности

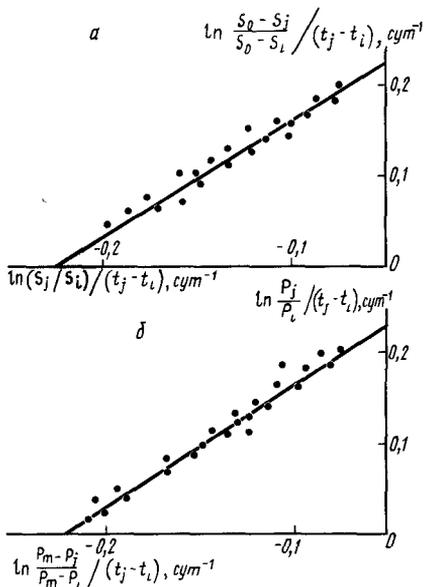


Рис. 3.11. Линеаризация данных рис. 3.10 в координатах разностных уравнений (3.84) (а) и (3.85) (б)

популяций является естественным фактором, регулирующим конверсию вещества в клеточную биомассу. В случае клеток животных и растений ограничение роста представляется жизненной необходимостью. Выход клеток в режим непрерывного или усиленного роста приводит к онкологическому перерождению ткани.

В основе механизмов ограничения роста лежат биохимические процессы, обсуждение кинетических особенностей которых и составляет предмет этого раздела.

К наиболее важным факторам, ограничивающим рост клеточных популяций, относятся: 1) истощение системы по лимитирующему субстрату (см. предыдущие разделы этой главы); 2) появление в популяции клеток, потерявших способность к делению; 3) накопления продуктов— сильных ингибиторов клеточного роста.

Последний фактор представляет особый интерес, поэтому анализу кинетических кривых роста в системах с ингибированием продуктом посвящена гл. 5. Ниже анализируется вторая причина, приводящая к замедлению скорости роста клеточных культур при большой плотности популяции.

### 3.6.1. Кинетические модели роста микробной культуры с появлением субпопуляции, потерявшей способность к размножению

Уравнение (3.27) отражает факт уменьшения скорости процесса за счет расхода основного, лимитирующего, субстрата. Ограничение роста и предельное накопление клеток соответствует материальному переходу субстрата в клеточную биомассу. Это

наиболее простой фактор, ограничивающий рост клеточной популяции. В развитии клеточных популяций заложены и более сложные механизмы ограничения роста. Они связаны с появлением в популяции (по мере ее развития) клеток, потерявших способность к репликации. Рассмотрим кинетические закономерности этих процессов.

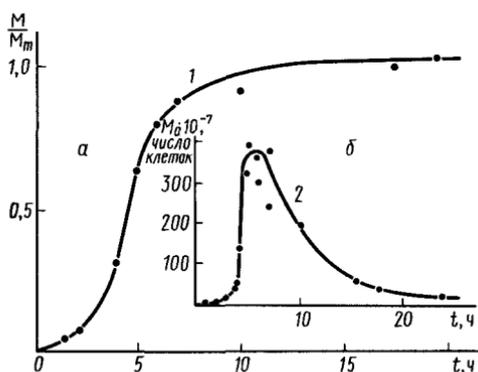


Рис. 3.12. Кинетика роста *E. coli*, штамм PR13: а—кинетика изменения общего числа клеток; б—кинетика изменения числа клеток, способных образовывать колонии на твердой среде

На рис. 3.12, а приведена кинетика роста бактерии *E. coli*. Кине-

тическая кривая роста общего числа клеток имеет типичный вид, включающий экспоненциальную фазу с замедлением роста и выходом на предельный уровень. Совершенно по-другому выглядит популяционная кривая числа клеток ( $M_a$ ), сохраняющих способность к делению (рис. 3.12, б). Видно, что типичная кинетическая кривая изменения в системе жизнеспособных клеток в начальный период времени экспоненциально растет, достигает максимума и в дальнейшем быстро падает, т. е. наряду с процессом экспоненциального роста жизнеспособных клеток протекает процесс их инактивации, заканчивающийся почти полным объединением популяции по жизнеспособным клеткам. Через 15—20 ч общий рост популяции достигает насыщения, при этом в популяции остается всего лишь несколько процентов клеток, способных к делению.

Кинетические кривые типа представленных на рис. 3.12 могут быть получены на основе по крайней мере двух модельных представлений. Назовем эти модели *прогрессирующая некомпетентность* и *запрограммированный отказ*. Рассмотрим кинетические закономерности для обоих механизмов процесса.

**Прогрессирующая некомпетентность.** Изменение концентрации жизнеспособных клеток  $M_a$  можно представить в виде

$$\frac{dM_a}{dt} = \mu_a M_a - \lambda M_a, \quad (3.88)$$

где  $\mu_a$  — удельная скорость роста делящихся клеток, которая зависит от концентрации лимитирующего субстрата, являющегося, в свою очередь, функцией времени;  $\lambda$  — константа скорости инактивации, частота «отказов», приводящих к потере способности клеток к делению.

Накопление в системе «некомпетентных», не способных к делению клеток  $M_i$  описывает уравнение

$$\frac{dM_i}{dt} = \lambda M_a. \quad (3.89)$$

Общее число клеток ( $M$ ) в системе определяется суммой:

$$M = M_a + M_i. \quad (3.90)$$

Соответственно

$$\frac{dM}{dt} = \mu_a M_a. \quad (3.91)$$

Система уравнений (3.88)—(3.91) описывает основные закономерности развития популяций. К сожалению, аналитическое интегрирование этой системы уравнений неосуществимо, однако можно получить достаточно детальную информацию о свойствах системы на основе ее качественного анализа и численного интегрирования.

Важной особенностью в поведении системы является ее экстремальный характер по  $M_a$ . Кроме того, кинетическое поведение системы в значительной степени определяется динамикой изменения в системе концентрации субстрата.

Как видно из уравнения (3.88), по мере развития процесса первый положительный член его уменьшается, второй отрицательный растет за счет роста  $M_a$  и соответственно возникает ситуация, в которой  $dM_a/dt=0$ . Это условие максимума концентрации компетентных клеток.

Если принять, что удельная скорость роста как функция концентрации субстрата дается уравнением Моно (1.3), то из уравнения (3.88) при условии  $dM_a/dt=0$  следует

$$\frac{\mu_m \left( S_0 - \frac{M(t_m) - N_0}{Y_s} \right)}{K_s + S_0 - \frac{M(t_m) - N_0}{Y_s}} = \lambda, \quad (3.92)$$

где  $t_m$  — время достижения максимума по  $M_a$ .

Из уравнения (3.92) можно найти концентрацию клеток  $M(t_m)$  в момент максимальной плотности популяции по компетентным клеткам:

$$M(t_m) = N_0 + Y_s \left[ S_0 - \frac{\lambda K_s}{\mu_m - \lambda} \right]. \quad (3.93)$$

Поскольку концентрация субстрата и общее число клеток  $M$  связаны линейно, концентрация субстрата в момент прохождения максимума по  $M_a$  имеет вид

$$S(t_m) = \frac{\lambda K_s}{\mu_m - \lambda}. \quad (3.94)$$

Время достижения максимума по  $M_a$  соответствует точке перегиба на кинетических кривых роста общего числа клеток  $M$  или расхода субстрата  $S$  (это следует из условия равенства нулю  $d^2M/dt^2$  в точке перегиба). Интересно отметить, что концентрация субстрата в максимуме по  $M_a$  или в точке перегиба кинетической кривой расхода субстрата определяется только кинетическими параметрами роста  $\mu_m$ ,  $\lambda$ ,  $K_s$  и не зависит от начальной концентрации субстрата.

▲ Удобно проанализировать поведение системы в двух приближениях.

1. *Начальный период развития процесса при малых глубинах расхода субстрата.* В период экспоненциального роста концентрация лимитирующего субстрата сохраняется практически постоянной:  $S(t) = S_0$ ,  $\mu_a = \mu_{m,a}$ . Соответственно уравнение (3.88) можно записать в виде

$$\frac{dM_a}{dt} = (\mu_{m,a} - \lambda) M_a. \quad (3.95)$$

Интегрирование этого уравнения при начальных условиях  $t=0$ ,  $M_a = M_{a0}$  приводит к функции

$$M_a = M_{a0} e^{(\mu_{m,a} - \lambda)t}. \quad (3.96)$$

Динамику изменения концентрации некомпетентных клеток можно найти из уравнения (3.89), подставив в него уравнение (3.96), и провести интегрирование:

$$M_i = \frac{\lambda M_{a0}}{\mu_{m,a} - \lambda} e^{(\mu_{m,a} - \lambda)t}. \quad (3.97)$$

И наконец, из условия (3.90) находим

$$M = \frac{\mu_{m,a} M_{a0}}{\mu_{m,a} - \lambda} e^{(\mu_{m,a} - \lambda)t}. \quad (3.98)$$

Видно, что кинетику накопления биомассы описывает экспоненциальная функция, при этом определяемая на опыте удельная скорость роста дается уравнением

$$\mu_{\text{набл.}} = \mu_{m,a} - \lambda. \quad (3.99)$$

2. Развитие процесса на большую глубину, т. е. переход в режим истощения субстрата, когда  $S \approx 0$  и  $\mu_a \approx 0$ .

В этом режиме, согласно (3.88), имеем

$$\frac{dM_a}{dt} = -\lambda M_{a,m}, \quad (3.100)$$

где  $M_{a,m}$  — максимальная концентрация  $M_a$ .

Интегрирование этого уравнения приводит к функции

$$M_a = M_{a,m} e^{-\lambda t}. \quad (3.101)$$

В этом режиме концентрация компетентных клеток должна экспоненциально падать.

**Запрограммированный отказ.** Ограничение роста клеточной популяции может иметь специфический характер запрограммированного отказа. Биохимические механизмы, останавливающие пролиферацию клеток, имеют, по-видимому, различную природу. В настоящее время ясно, что в ряде случаев остановка роста связана с потерей чувствительности клеток к ростовым факторам среды. В качестве примера рассмотрим особенности роста популяции лимфоцитов, индуцированного действием ростовых факторов. Например, динамика появления и исчезновения на клеточной мембране Т-лимфоцитов рецептора к фактору роста характеризуется тем, что быстрая экспрессия рецептора сменяется стадией его потери. Возможно, что

«десенситизация» рецептора к ростовому фактору связана с механизмом его инактивации в процессе реакции.

Рассмотрим кинетику процесса и проследим, как динамика экспрессии рецептора может отражаться на динамике роста клеточной популяции. Кинетику изменения числа рецепторов ( $R$ ) на клеточной мембране достаточно строго описывает уравнение

$$R = A(e^{-\lambda t} - e^{-\alpha t}), \quad (3.102)$$

где  $A$  — постоянная, определяемая кинетическими параметрами;  $\alpha$  — кинетический коэффициент, связанный с динамикой роста количества рецепторов;  $\lambda$  — кинетический коэффициент, определяющий скорость инактивации, потери рецептора.

Если предположить, что скорость деления клеток пропорциональна числу рецепторов на клеточной мембране, т. е.

$$\mu = \mu_0 R, \quad (3.103)$$

то кинетика роста компетентных клеток будет дана уравнением

$$M_a = M_{a0} e^{\mu_0 R t}. \quad (3.104)$$

Если параметры  $\alpha$  и  $\lambda$  отличаются существенно ( $\alpha \gg \lambda$ ), то уравнение скорости роста компетентных клеток будет иметь вид

$$M_a = M_{a0} e^{[\mu_0 e^{-\lambda t}] t}. \quad (3.105)$$

▲ Рассмотрим свойства уравнения (3.105).

1. Число репликационно компетентных клеток экспоненциально растет в начальный период времени (когда справедливо соотношение  $\lambda t \ll 1$ ):

$$M_a = M_{a0} e^{\mu_0 t}. \quad (3.106)$$

2. Наличие максимума при

$$t_m = 1/\lambda, \quad (3.107)$$

т. е. время достижения максимума определяется только кинетическим параметром экспоненциального отказа и не зависит от концентрации субстратов, начальной концентрации клеток [уравнение (3.107) следует из условия  $dM_a/dt = 0$ ].

3. Коэффициент амплификации  $M_{a,m}$ , или максимальное число компетентных клеток, определяется кинетическими параметрами процесса в соответствии с уравнением

$$\frac{M_{a,m}}{M_{a0}} = e^{\mu_0/\lambda e}. \quad (3.108)$$

4. При бесконечно больших временах процесса число компетентных клеток выходит на исходный уровень:

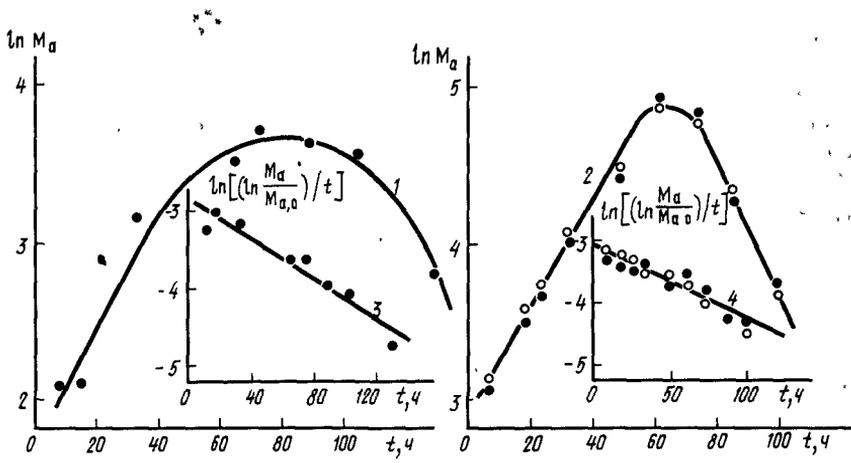


Рис. 3.13. Кинетические закономерности роста В-лимфоцитов, индуцированного фактором роста В-клеток (кривая 1), и Т-лимфоцитов, индуцированного интерлейкином (кривая 2): прямые 3, 4 отражают преобразование кривых 1, 2 в координатах уравнения (3.113)

$$\lim_{t \rightarrow \infty} M_a = M_{a0}. \tag{3.109}$$

Уравнение (3.106) удовлетворительно описывает динамику применения В- и Т-лимфоцитов в культуре ткани (рис. 3.13). Это уравнение получено из предпосылок, связанных с экспоненциальной потерей чувствительности клеток к ростовому фактору, однако оно справедливо для любых систем с экспоненциальным отказом (экспоненциальная инактивация реплицирующего комплекса, экспоненциальная инактивация ключевых ферментных систем и др.).

### 3.6.2. Сравнение и дискриминация кинетических моделей ограничения клеточного роста

Как следует из вышеизложенного, существует две группы механизмов, определяющих пределы роста клеточных популяций: 1) расход лимитирующих субстратов; 2) появление в процессе роста культуры субпопуляции клеток, потерявших способность к активному делению. Последнюю группу механизмов можно разбить на два подкласса: прогрессирующая некомпетентность и запрограммированный отказ.

Отличить механизм истощения системы по субстрату от механизма появления неактивной субпопуляции клеток достаточно просто. Наиболее надежным способом представляется определение в процессе роста культуры числа клеток, способных к активному росту. Для бактериальных клеток это может

быть метод подсчета колоний при посеве на твердые среды для клеток культуры ткани — метод, основанный на использовании витальных красителей.

Как следует из рис. 3.12 и 3.13, ограничение роста как бактериальных клеток, так и лимфоцитов связано с накоплением неактивной клеточной субпопуляции. Естественно возникает вопрос: можно ли в рамках этого механизма разграничить случаи запрограммированного отказа и прогрессирующей некомпетентности?

Рассмотренные модели роста путем накопления субпопуляции клеток, потерявших способность к репликации, приводят к качественно близким кинетическим картинам развития активной субпопуляции клеток. Однако количественные различия позволяют дискриминировать модели и из анализа экспериментальных данных получить информацию о механизме остановки роста. Можно предложить следующие критерии дискриминации моделей.

▲ 1. *Кинетическое поведение на начальном этапе развития процесса.* Отклонение от экспоненциального поведения в случае механизма прогрессирующей некомпетентности определяется степенью конверсии субстрата и должно наблюдаться при достаточно высоких глубинах реакции, в то время как в случае запрограммированного отказа отклонение от экспоненциального поведения должно наблюдаться уже при малых конверсиях субстрата.

Отклонение от экспоненциального роста в случае запрограммированного отказа весьма существенно. Из уравнений (3.88), (3.104) следует

$$\frac{d \ln M_a}{dt} = \mu_a - \lambda; \quad (3.110)$$

прогрессирующая некомпетентность

$$\frac{d \ln M_a}{dt} = \mu_0 e^{-\lambda t} (1 - \lambda t). \quad (3.111)$$

запрограммированный отказ

В условиях справедливости (3.110)  $d \ln M_a / dt = \text{const}$  до 20—40% конверсии субстрата в случае запрограммированного отказа с самого начала должно наблюдаться уменьшение тангенса угла наклона начального участка кривой в полупологарифмических координатах. Даже при постоянной концентрации субстрата механизм запрограммированного отказа обеспечивает полное прекращение клеточного роста.

Из рис. 3.14 видно, что культура *Namalva*, лишенная механизма запрограммированного отказа, развивается экспоненциально (2), что говорит о достаточном количестве субстратов, в то время как нормальные клетки В-лимфоцитов замедляют, а потом прекращают свой рост (1).

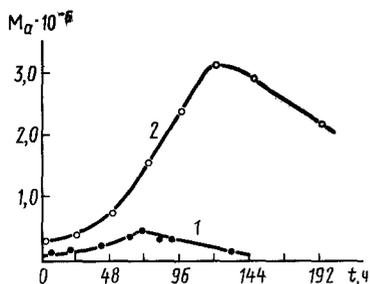


Рис. 3.14. Сравнение кинетических кривых роста нормальных В-лимфоцитов (1) и клеток лимфоидной культуры *Namalva* (2) (рост клеток индуцировался действием специфического белкового фактора роста В-клеток)

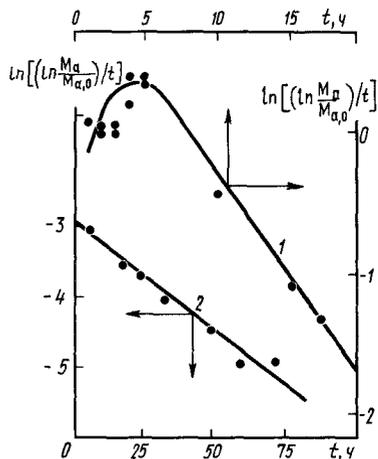


Рис. 3.15. Сравнение кинетических кривых роста популяции *E. coli* (кривая 1) и Т-лимфоцитов (кривая 2) в координатах уравнения «запрограммированного отказа» (3.113)

2. *Различия в кинетических уравнениях и их анализ.* Из уравнения модели запрограммированного отказа (3.105) следует

$$\ln\left(\frac{1}{t} \ln \frac{M_a}{M_{a0}}\right) = \ln \mu_0 - \lambda t, \quad (3.112)$$

т. е. экспериментальные данные в случае реализации этого механизма остановки роста должны линеаризоваться в координатах  $\ln(1/t)$  и  $\ln(M_a/M_{a0})$  от  $t$ , в то время как кинетические данные по развитию популяции с механизмом «прогрессирующей некомпетентности» не должны описываться этим уравнением.

Из рис. 3.15 видно, что экспериментальные данные по росту Т-лимфоцитов достаточно хорошо описываются уравнением (3.112), т. е. остановка роста популяции лимфоцитов осуществляется по механизму запрограммированного отказа. Напротив, рост *E. coli* не описывается уравнением (1.112) и, по-видимому, согласуется с механизмом прогрессирующей некомпетентности.

3. *Запрограммированный отказ — жесткий механизм, ограничивающий рост клеток.* Максимальное увеличение числа клеток определяется уравнением (3.108). Если известны  $\mu_0$  и  $\lambda$ , то может быть вычислено теоретическое значение коэффициента амплификации. Так, из экспериментальных данных по росту *E. coli*, представленных на рис. 3.12, а также

из серии нескольких независимых экспериментов было оценено  $\mu \approx 2 \text{ ч}^{-1}$ ,  $\lambda = 0,4 \text{ ч}^{-1}$ . Соответственно теоретический коэффициент амплификации для этой системы  $\mu_{a,m}$  должен быть равен 6,35. Экспериментально наблюдается величина выше 600. Видно, что рост популяции *E. coli* не описывается уравнениями механизма запрограммированного отказа.

Таким образом, сравнение экспериментальных данных по росту бактериальной и лимфоцитарной клеточных популяций показывает принципиальное различие в механизмах остановки клеточного роста. В то время как предельная плотность бактериальной популяции определяется механизмом прогрессирующей некомпетентности, рост популяции В- и Т-лимфоцитов ограничивается механизмом запрограммированного отказа.

● По-видимому, в механизме репликации клетки *E. coli* заложен процесс, приводящий к потере репликационного потенциала. Это может быть как специфическая инактивация репликационного комплекса (например, через термоинактивацию или протеолиз), так и неспецифический процесс «старения» клетки, связанный, например, с разрушением мембранных структур.

Ограничение роста лимфоцитарных клеток происходит по существенно более «жесткому» механизму. Наиболее вероятным представляется механизм десенситизации рецепторов к специфическим белковым факторам роста.

! В данной главе рассмотрены кинетические уравнения, описывающие динамику роста микробной популяции во всем диапазоне времени процесса. С учетом связи между расходом субстрата и накоплением микробной биомассы уравнение скорости роста может быть проинтегрировано и получено соотношение в неявной форме между числом клеток и времени. Однако и в неявной форме найденное решение можно согласовать с экспериментальными данными и определить параметры роста популяции микроорганизма. Важно отметить, что традиционное представление о замедлении скорости роста культуры при высокой плотности популяции (появление отрицательного квадратного члена) является отражением расхода субстрата.

В данной главе обсуждается несколько методов, позволяющих интерпретировать экспериментальные данные в рамках интегральной формы уравнения роста. В ряде случаев наиболее удобен разностный метод анализа полных кинетических кривых.

Помимо расхода лимитирующего субстрата замедление роста может быть вызвано накоплением продуктов — ингибиторов роста, а также появлением в популяции клеток, потерявших способность к размножению. Последний случай можно описать в рамках двух моделей: прогрессирующая некомпетентность и запрограммированный отказ.

## ГЛАВА 4

### ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗБЫТКОМ СУБСТРАТА

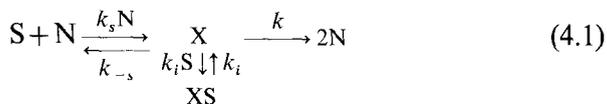
Одной из характерных особенностей роста микроорганизмов являются часто наблюдаемые эффекты его ингибирования избытком субстрата. Удельная скорость роста культур микроорганизмов на начальном участке зависимости растет с увеличением концентрации субстрата, выходит на «насыщение», а затем при высоких концентрациях субстрата начинает уменьшаться. В силу этого активный рост популяции становится возможным лишь в узком диапазоне концентраций субстрата. Феномены такого рода требуют тщательного анализа и объяснения.

Рассмотрим ряд кинетических схем, объясняющих эффекты ингибирования роста микроорганизма избытком субстрата, и попробуем выявить общие их особенности.

#### 4.1. КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ РОСТА С ИНГИБИРОВАНИЕМ СУБСТРАТОМ

##### 4.1.1. Простейшая кинетическая схема

Простейший кинетический механизм, объясняющий эффект ингибирования автокаталитической реакции избытком субстрата, может быть представлен схемой



Если в рамках химико-кинетического приближения записать систему уравнений для каждого из состояний N, X и XS, концентрация которых изменяется в ходе процесса, то получим систему уравнений при условии, что концентрация субстрата постоянна и равна  $S_0$ :

$$\frac{dN}{dt} = 2kX + k_{-s}X - k_s S_0 X; \quad (4.2)$$

$$\frac{dX}{dt} = k_s S_0 N + k_{-i} XS - (k + k_i + k_{-s})X; \quad (4.3)$$

$$\frac{d(XS)}{dt} = k_i S_0 X - k_{-i}(XS). \quad (4.4)$$

Общее количество биомассы  $M$  в системе равно

$$M = N + X + XS \quad (4.5)$$

или

$$\frac{dM}{dt} = \frac{dN}{dt} + \frac{dX}{dt} + \frac{d(XS)}{dt}. \quad (4.6)$$

Подставив уравнения (4.2) — (4.4) в (4.6), получим

$$\frac{dM}{dt} = \frac{dN}{dt} + \frac{dX}{dt} + \frac{d(XS)}{dt} = kX. \quad (4.7)$$

Если процессы на обратимых стадиях схемы (4.1) протекают относительно быстро и эти реакции имеют равновесный характер, то можно выразить связи между переменными  $X$ ,  $N$  и  $XS$  с помощью уравнений для констант равновесия

$$K_s = \frac{NS_0}{X}; \quad (4.8)$$

$$K_i = \frac{XS_0}{(XS)}. \quad (4.9)$$

где  $K_s = k_{-s}/k_s$  и  $K_i = k_{-i}/k_i$  — равновесные константы диссоциации комплексов.

В этом случае уравнение (4.5) может быть записано в виде

$$M = X \left( 1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right) \quad (4.10)$$

или

$$X = \frac{M}{1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}. \quad (4.11)$$

Подстановка этого соотношения в уравнение (4.7) приводит к дифференциальному уравнению

$$\frac{dM}{dt} = \frac{kM}{1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}. \quad (4.12)$$

Решение его при использовании начального условия  $t=0$ ,  $M=N_0$  имеет вид

$$M(t) = N_0 e^{\frac{k}{1 + K_s/S_0 + S_0/K_i} t}. \quad (4.13)$$

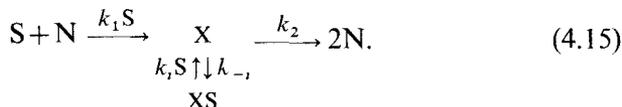
Общее число клеток экспоненциально увеличивается во времени, при этом удельная скорость роста должна быть представлена уравнением

$$\mu = \frac{k}{1 + K_s/S_0 + S_0/K_i}. \quad (4.14)$$

Свойства этого уравнения обсуждаются ниже, после анализа некоторых возможных кинетических схем.

#### 4.1.2. Двухстадийная кинетическая схема

Рассмотрим кинетическую схему с необратимой трансформацией субстрата на первой стадии процесса:



Представим себе, что промежуточное состояние X способно обратимо и равновесно образовывать комплекс с субстратом, при этом состояние (XS) теряет свою способность к делению с образованием двух новых клеток N.

Система уравнений по всем изменяющимся во времени переменным будет иметь вид ( $S = S_0$ )

$$\frac{dN}{dt} = 2k_2 X - k_1 S_0 N; \quad (4.16)$$

$$\frac{dX}{dt} = k_1 S_0 N + k_{-1}(XS) - k_2 X - k_1 S_0 X; \quad (4.17)$$

$$\frac{d(XS)}{dt} = k_1 S_0 X - k_{-1}(XS). \quad (4.18)$$

Сложив уравнения (4.16) — (4.18), получим

$$\frac{dM}{dt} = \frac{dN}{dt} + \frac{dX}{dt} + \frac{d(XS)}{dt} = k_2 X. \quad (4.19)$$

Если образование комплекса (XS) протекает быстро и равновесно [ $d(XS)/dt = 0$ ], то из уравнений (4.17) и (4.18) следует два важных соотношения:

$$X = \frac{k_1 S_0 N}{k_2}; \quad (4.20)$$

$$K_i = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{XS_0}{(XS)}.$$

Эти соотношения позволяют выразить концентрацию X через M на основе использования уравнения (4.5):

$$X = \frac{M}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} + \frac{S_0}{K_i}}. \quad (4.21)$$

Подстановка этого соотношения в уравнение (4.19) приводит к следующему дифференциальному уравнению, которое легко может быть проинтегрировано:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_2 M}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} + \frac{S_0}{K_i}}. \quad (4.22)$$

Решение этого уравнения с использованием начального условия  $t=0$ ,  $M=N_0$  дает уравнение экспоненциального роста

$$M(t) = N_0 e^{\mu t}, \quad (4.23)$$

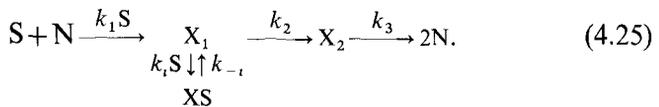
где удельная скорость роста представлена функцией

$$\mu = \frac{k_2}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} + \frac{S_0}{K_i}}. \quad (4.24)$$

Удельная скорость роста, как и во всех предыдущих случаях, представлена коэффициентом перед переменной  $M$  в дифференциальном уравнении (4.22).

### 4.1.3. Трехстадийные кинетические схемы

Рассмотрим более усложненные механизмы развития автокаталитического процесса с учетом возможной многостадийности:



Представим себе, что субстрат равновесно образует комплекс с состоянием  $X_1$ , блокируя его дальнейшее превращение.

Система уравнений, соответствующая схеме (4.25), имеет вид

$$\frac{dN}{dt} = 2k_3 X_2 + k_1 S_0 N; \quad (4.26)$$

$$\frac{dX_1}{dt} = k_1 S_0 N + k_{-i}(XS) - k_2 X_1 - k_i S_0 X_1; \quad (4.27)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_2 X_1 - k_3 X_2; \quad (4.28)$$

$$\frac{dX_1 S}{dt} = k_i S_0 X_i - k_{-i}(X_1 S). \quad (4.29)$$

Из этой системы уравнений с учетом того, что

$$M = N + X_1 + X_2 + X_1 S, \quad (4.30)$$

следует

$$\frac{dM}{dt} = k_3 X_2. \quad (4.31)$$

Если принять во внимание, что  $dX_1 S/dt = 0$ , а также соответствующие упрощающие условия для уравнений (4.27) и (4.28), то будем иметь:

$$k_1 S_0 N = k_2 X_1; \quad (4.32)$$

$$k_2 X_1 = k_3 X_2; \quad (4.33)$$

$$(X_1 S) = \frac{(X_1) S_0}{K_1}. \quad (4.34)$$

Из этих уравнений и уравнения (4.31) следует

$$M = X_2 \left[ 1 + \frac{k_3}{k_1 S_0} + \frac{k_3}{k_2} \left( 1 + \frac{S_0}{K_1} \right) \right]. \quad (4.35)$$

Соответственно (4.31) можно представить в виде

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_3 M}{1 + \frac{k_3}{k_1 S_0} + \frac{k_3}{k_2} \left( 1 + \frac{S_0}{K_1} \right)}. \quad (4.36)$$

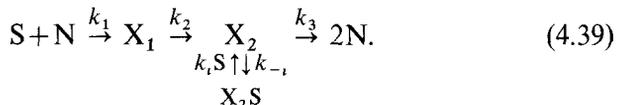
Решение (4.36) приводит к уравнению экспоненциального роста с удельной скоростью

$$\mu = \frac{k_3}{1 + \frac{k_3}{k_1 S_0} + \frac{k_3}{k_2} \left( 1 + \frac{S_0}{K_1} \right)}, \quad (4.37)$$

которое может быть модифицировано к виду

$$\mu = \frac{\frac{k_3}{1 + k_3/k_2} S_0}{\frac{k_3}{k_1 (1 + k_3/k_2)} + S_0 + \frac{1}{1 + k_3/k_2} \frac{S_0^2}{K_1}}. \quad (4.38)$$

Если  $X_2$  образует комплекс с молекулой исходного субстрата, то при этом этот комплекс является нереакционноспособным с точки зрения последующих превращений, а кинетическая схема процесса может быть записана в виде



Соответствующая система уравнений, описывающая динамическое поведение автокаталитического процесса, имеет вид

$$\frac{dN}{dt} = 2k_3 X_2 - k_1 S_0 N; \quad (4.40)$$

$$\frac{dX_1}{dt} = k_1 S_0 N - k_2 X_1; \quad (4.41)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_2 X_1 + k_{-1}(X_2 S) - k_i S_0 X_2 - k_3 X_2; \quad (4.42)$$

$$\frac{d(X_2 S)}{dt} = k_i S_0 X_2 - k_{-1}(X_2 S); \quad (4.43)$$

$$M = N + X_1 + X_2 + X_2 S. \quad (4.44)$$

Сложение уравнений (4.40) — (4.43) приводит к дифференциальному уравнению

$$\frac{dM}{dt} = k_3 X_2. \quad (4.45)$$

В условиях  $\frac{d(X_2 S)}{dt} = 0$ , а также малости параметров  $1/k_2$  и  $1/k_3$  ( $\frac{1}{k_2} \frac{dX_1}{dt} \ll k_2 X_1$ ,  $\frac{1}{k_3} \frac{dX_2}{dt} \ll k_3 X_2$ ) имеются дополнительные соотношения между переменными:

$$X_1 = \frac{k_3}{k_2} X_2; \quad (4.46)$$

$$N = \frac{k_3}{k_1 S_0} X_2. \quad (4.47)$$

Концентрация комплекса  $X_2 S$  может быть найдена как функция концентрации  $X_2$  из уравнения для константы диссоциации комплекса:

$$X_2 S = \frac{X_2 S_0}{K_i}, \quad (4.48)$$

Соотношения (4.46) — (4.48) и уравнение (4.47) приводят к функции

$$X_2 = \frac{M}{1 + \frac{S_0}{K_i} + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}} \quad (4.49)$$

и соответственно к дифференциальному уравнению

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_3 M}{1 + \frac{S_0}{K_i} + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}}. \quad (4.50)$$

Решение (4.50) представляет собой экспоненциальную функцию времени ( $t=0$ ,  $M=N_0$ )

$$M(t) = N_0 e^{\mu t}, \quad (4.51)$$

где удельная скорость роста дана функцией

$$\mu = \frac{k_3}{1 + \frac{S_0}{K_1} + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}} \quad (4.52)$$

или

$$\mu = \frac{\frac{k_3}{1 + k_3/k_2} S_0}{S_0 + \frac{k_3}{k_1(1 + k_3/k_2)} + \frac{S_0^2}{K_1(1 + k_3/k_2)}}. \quad (4.53)$$

Проведение анализа нескольких схем процесса позволяет сравнить основные результаты и выявить общие инвариантные и наиболее характерные свойства обсуждаемых закономерностей ингибирования роста микроорганизмов избытком субстрата.

▲ Если проанализировать уравнения удельной скорости роста для всех рассмотренных механизмов процессов, то можно увидеть, что все кинетические схемы приводят формально к одному и тому же уравнению

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_{s\text{эфф}} + S_0 + S_0^2/K_{i\text{эфф}}}. \quad (4.54)$$

Уравнение качественно соответствует наблюдаемым зависимостям скорости роста от концентрации субстрата. При малых концентрациях в условиях  $S_0^2/K_{i\text{эфф}} \ll S_0$ ,  $S_0 \ll K_{s\text{эфф}}$  удельная скорость роста должна увеличиваться с возрастанием концентрации субстрата:

$$\mu \cong \mu_m S_0 / K_{s\text{эфф}}. \quad (4.55)$$

При больших концентрациях субстрата, когда  $S_0^2 \gg K_{i\text{эфф}}$  и  $S_0 \gg K_s$ ,

$$\mu \cong \frac{\mu_m k_{i\text{эфф}}}{S_0}, \quad (4.56)$$

т. е. скорость роста должна уменьшаться при увеличении концентрации субстрата и в пределе должна стремиться к нулю.

Очевидно, что зависимость удельной скорости роста от концентрации субстрата проходит через максимальное значение (рис. 4.1).

Экспериментально при проведении исследования удельной скорости роста от концентрации субстрата могут быть найдены три параметра:  $\mu_m$ ,  $K_{s\text{эфф}}$  и  $K_{i\text{эфф}}$  (методы определения этих параметров обсуждаются в последующих разделах этой главы).

В табл. 4.1 приведены функции  $\mu_m$ ,  $K_{s\text{эфф}}$  и  $K_{i\text{эфф}}$  для всех рассмотренных кинетических схем.

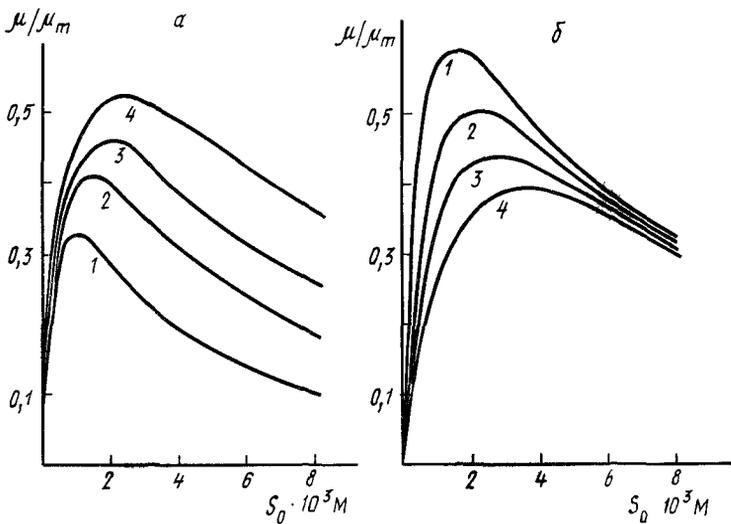


Рис. 4.1. Зависимость удельной скорости роста микроорганизмов от концентрации субстрата для режима с ингибированием избытком субстрата:

*a*—кривые зависимости при постоянной  $K_s = 1 \cdot 10^{-4} M$  и различных значениях  $K_i \cdot 10^4 M$ : 1—1,0; 2—2,0; 3—3,0; 4—5,0; *б*—кривые зависимости при постоянной  $K_i = 4 \cdot 10^{-4} M$  и различных значениях  $K_s \cdot 10^4 M$ : 1—0,5; 2—1,0; 3—1,5; 4—2,5

Таблица 4.1

**Кинетические параметры процессов роста популяции микроорганизмов с ингибированием избытком субстрата**

№	Кинетическая схема	$\mu_m$	$K_{s,эфф}$	$K_{i,эфф}$
1.	$S + N \xrightleftharpoons[k-s]{k_2} X \xrightarrow{k} 2N$ $X + S \xrightleftharpoons{K_i} XS$	$k$	$K_s$	$K_i$
2.	$S + N \xrightarrow{k_1} X \xrightarrow{k_2} 2N$ $X + S \xrightleftharpoons{K_i} XS$	$k_2$	$k_2/k_1$	$K_i$
3.	$S + N \xrightarrow{k_1} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \xrightarrow{k_3} 2N$ $X_1 + S \xrightleftharpoons{K_i} X_1S$	$\frac{k_3}{1+k_3/k_2}$	$\frac{k_3}{k_1(1+k_3/k_2)}$	$\frac{1}{(1+k_3/k_2)K_i}$
4.	$S + N \xrightarrow{k_1} X_1 \xrightarrow{k_2} X_2 \rightarrow 2N$ $X_2 + S \xrightarrow{K_i} X_2S$	$\frac{k_3}{1+k_3/k_2}$	$\frac{k_3}{k_1(1+k_3/k_2)}$	$\frac{1}{(1+k_3/k_2)K_i}$

Видно, что в зависимости от механизма процесса  $\mu_m$ ,  $K_{s\text{эфф}}$  и  $K_{i\text{эфф}}$  могут иметь несколько различающийся смысл.

● Качественно общим свойством всех обсуждаемых механизмов является образование комплекса промежуточных состояний со второй молекулой субстрата, т. е. комплекса, который не обладает реакционной способностью для дальнейшей трансформации. Сравнение кинетических схем 3 и 4 (табл. 4.1) показывает, что принципиально неважно, с каким компонентом процесса  $X_1$ ,  $X_2$  или каким-либо последующим происходит комплексообразование. Уравнения, описывающие кинетику процесса, будут совершенно аналогичны. По своему физическому смыслу кинетические схемы, приведенные в табл. 4.1, могут иметь два равноправных истолкования.

При чисто автокаталитическом истолковании исходят из предположения, что  $X_1, X_2, \dots, X_n$  — интермедиаты в механизмах трансформации субстрата в активном центре лимитирующей ферментной системы. Стадия удвоения катализатора представляет собой стадию биосинтеза белка. Интермедиаты  $X_1, \dots, X_n$  способны образовать совокупность метаболитов, необходимых для удвоения активных центров лимитирующего фермента. Образование нереакционноспособного комплекса субстрата с любым из интермедиатов приводит к ингибированию процесса, поскольку может происходить блокировка синтеза метаболитов, необходимых для удвоения активных центров катализатора.

Второе истолкование предполагает, что  $N, X_1, X_2$  представляют собой состояния клетки на различных этапах ее развития. Образование комплекса субстрата с каким-то специфическим компонентом клетки может блокировать ее дальнейший цикл развития. Это может привести к ингибированию роста клеточной популяции при высоких концентрациях субстрата.

#### 4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ РОСТА ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ ФАЗЕ ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ ПРОЦЕССА ВЫСОКИМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ СУБСТРАТА

Уравнение удельной скорости роста микроорганизмов при ингибировании процесса субстратом можно представить следующим образом:

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_{s\text{эфф}} + S_0 \left( 1 + \frac{S_0}{K_{i\text{эфф}}} \right)}. \quad (4.57)$$

При анализе экспериментальных данных часто приходится вычислять параметры, входящие в это уравнение.

Уравнение (4.57) — трехпараметрическое и достаточно часто используется в стационарной кинетике ферментативного катализа. Помимо субстратного торможения трехпараметрическое уравнение описывает рН-зависимости ферментативных реакций, активацию, ингибирование ионами металлов и другие процессы. Для определения числовых значений параметров, если  $K_{iэфф}$  и  $K_{sэфф}$  существенно различаются, например  $K_{sэфф}/K_{iэфф} \leq 0,1$ , с достаточной степенью точности можно использовать асимптотические приближения. При относительно низких концентрациях субстрата, когда  $S_0 \ll K_{iэфф}$ , уравнение (4.57) трансформируется к виду

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_{sэфф} + S_0}, \quad (4.58)$$

т. е. представляет собой обычное уравнение Моно, из которого стандартными способами могут быть найдены параметры  $\mu_m$  и  $K_s$ .

При высоких концентрациях субстрата ( $S_0 \gg K_{sэфф}$ ) скорость роста микроорганизма будет описываться уравнением

$$\mu = \frac{\mu_m}{1 + \frac{S_0}{K_{iэфф}}}. \quad (4.59)$$

Из этого уравнения при использовании анаморфозы

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{1}{\mu_m K_{iэфф}} S_0 \quad (4.60)$$

могут быть найдены параметры  $\mu_m$  и  $K_{iэфф}$ .

Если константы  $K_{sэфф}$  и  $K_{iэфф}$  соизмеримы, использование указанных приближений приводит к большим ошибкам. В подобных случаях лучше использовать разностный метод, развитый О. М. Полтораком с сотр. (1976). Сущность метода заключается в следующем. Уравнение (4.57) можно преобразовать к виду

$$y = ax^2 + bx + c, \quad (4.61)$$

где  $a$ ,  $b$  и  $c$  — постоянные;  $y$  и  $x$  — некоторые функции экспериментально определяемых переменных величин. Например, уравнение удельной скорости при ингибировании субстратом можно записать так:

$$\frac{S_0}{\mu} = \frac{K_{sэфф}}{\mu_m} + \frac{1}{\mu_m} S_0 + \frac{1}{\mu_m K_{iэфф}} S_0^2. \quad (4.62)$$

В этом случае  $y = S_0/\mu$ ,  $x = S_0$ . Если провести измерение скорости при двух различных концентрациях субстрата  $x_1$  и  $x_m$

и вычислить соответственно  $y_l$  и  $y_m$ , то, взяв разность между этими величинами, будем иметь

$$\Delta y = a\Delta x(x_l + x_m) + b\Delta x. \quad (4.63)$$

Это уравнение можно представить следующим образом:

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = a(x_l + x_m) + b, \quad (4.64)$$

где  $\Delta y/\Delta x$  — отношение разностных функций.

Как видно из уравнения (4.64), из зависимости  $\Delta y/\Delta x$  от  $(x_l + x_m)$  можно найти параметры  $a$  и  $b$ . Из уравнения (4.62) следует, что  $a = 1/(\mu_m K_{i\text{эфф}})$ ,  $b = 1/\mu_m$ . Это позволяет определить параметры  $\mu_m$  и  $K_{i\text{эфф}}$ . Для нахождения параметра  $K_{s\text{эфф}}$  воспользуемся преобразованием:

$$\frac{1}{\mu S_0} = \frac{K_{s\text{эфф}}}{\mu_m} \frac{1}{S_0^2} + \frac{1}{\mu_m} \frac{1}{S_0} + \frac{1}{K_{i\text{эфф}}}. \quad (4.65)$$

Если использовать другие переменные, т. е.  $y = 1/(\mu S_0)$  и  $x = 1/S_0$ , то соответствующее уравнение запишется в виде

$$\frac{\Delta(1/\mu S_0)}{\Delta(1/S_0)} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_{s\text{эфф}}}{\mu_m} \left[ \left( \frac{1}{S_0} \right)_l + \left( \frac{1}{S_0} \right)_m \right]. \quad (4.66)$$

Из линейной зависимости  $\Delta y/\Delta x$  от  $(x_l + x_m)$  будут найдены параметры  $1/\mu_m$  и  $K_{s\text{эфф}}/\mu_m$  и тем самым параметры  $\mu_m$  и  $K_{s\text{эфф}}$ .

● Разностные методы — удобный инструмент при анализе многопараметрических уравнений. Однако применять их следует с известной осторожностью. Например, они мало пригодны для экспериментальных данных, полученных с большой случайной погрешностью, так как разностные функции дают значительный разброс точек, что приводит к высокой неопределенности в искомым параметрах. Кроме того, при построении разностных функций необходимо использовать достаточно большие значения  $\Delta y$  и  $\Delta x$ , так чтобы они существенно превосходили случайную ошибку эксперимента. Целесообразно для вычисления разностей применять значения функций на различных «восходящих» и «нисходящих» участках экспериментальной зависимости.

### 4.3. АНАЛИЗ ПОЛНОЙ КИНЕТИЧЕСКОЙ КРИВОЙ РОСТА

Рассмотрим кинетику процесса до полного истощения субстрата. Дифференциальное уравнение роста культуры в условиях ингибирования субстратом имеет вид

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m MS}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}}, \quad (4.67)$$

где  $S$  — текущая концентрация субстрата;  $K_s$  и  $K_i$  — эффективные значения субстратной константы и константы ингибирования. Это уравнение после разделения переменных можно записать в форме

$$\left[ \frac{K_s}{MS} + \frac{1}{M} \right] dM + \frac{S}{K_i M} dM = \mu_m dt. \quad (4.68)$$

Первый член этого уравнения соответствует обычному случаю без ингибирования субстратом, и при его интегрировании можно воспользоваться полученной ранее интегральной формой уравнения (3.27).

С учетом балансового соотношения  $S = S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s}$  интеграл от второго слагаемого уравнения (4.68) имеет вид

$$\int_{N_0}^M \frac{S dM}{K_i M} = \int_{N_0}^M \frac{S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s}}{K_i M} dM = \frac{S_0 + \frac{N_0}{Y_s}}{K_i} \ln \frac{M}{N_0} - \frac{1}{K_i Y_s} (M - N_0). \quad (4.69)$$

Поскольку обычно достаточно строго выполняется неравенство  $S_0 \gg N_0/Y_s$ , интегральную форму уравнения (4.67) можно записать следующим образом:

$$\left( 1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right) \ln \frac{M}{N_0} - \frac{K_s}{S_0} \ln \left( 1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right) - \frac{1}{K_i Y_s} (M - N_0) = \mu_m t. \quad (4.70)$$

Видно, что отличие этого уравнения от уравнения для процесса в отсутствие ингибирования субстратом заключается в дополнительном члене при множителе первого логарифмического слагаемого и в дополнительном отрицательном линейном члене. Из уравнения (4.70) следует, что при  $K_i \rightarrow \infty$  (отсутствие или очень «плохое» ингибирование субстратом) уравнение (4.70) трансформируется в обычное интегральное уравнение роста культуры [см. (3.27)].

Уравнение (4.70) можно преобразовать к виду

$$\ln \frac{M}{N_0} - \frac{K_s/S_0}{1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \ln \left( 1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right) - \frac{M - N_0}{1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} = \frac{\mu_m t}{1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}. \quad (4.71)$$

Правая часть выражения (4.71) представляет собой удельную скорость роста культуры в экспоненциальной фазе. Действительно, когда величина  $M$  близка к  $N_0$  ( $M - N_0 \approx 0$ ), уравнение (4.71) трансформируется к

$$\ln \frac{M}{N_0} = \mu t, \quad (4.72)$$

где

$$\mu = \frac{\nu_m}{1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}}. \quad (4.73)$$

Удельная скорость роста культуры в этом случае является экстремальной функцией концентрации субстрата: при низких концентрациях субстрата скорость роста культуры растет с увеличением его концентрации, при высоких — падает. Для того чтобы выявить ингибирование процесса роста культуры избытком субстрата, в первую очередь необходимо исследовать его динамику в экспоненциальной фазе и показать соответствие экспериментальных данных уравнению (4.73).

Рассмотрим приближенное решение в условиях справедливости разложения второго логарифмического члена уравнения (4.71) в степенной ряд и при использовании первого линейного члена разложения (это разложение справедливо до значений 0,5—0,6 по глубине конверсии субстрата). Разложение этого логарифмического члена в ряд имеет вид

$$\ln \left( 1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right) = -\frac{M - N_0}{M_m} - \frac{1}{2} \left( \frac{M - N_0}{M_m} \right)^2 - \frac{1}{3} \left( \frac{M - N_0}{M_m} \right)^3 - \dots \quad (4.74)$$

Если переменная  $(M - N_0)/M_m \ll 1$ , то это быстросходящийся ряд; для приближенного решения можно воспользоваться первым членом этого ряда. При таком условии  $\ln [1 - (M - N_0)/M_m] \approx -(M - N_0)/M_m$  и уравнение (4.71) трансформируется в

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{K_s/S_0}{1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \frac{M - N_0}{M_m} - \frac{(M - N_0)}{K_i Y_s \left( 1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right)} = \mu t. \quad (4.75)$$

Если учесть, что  $M_m/Y_s \approx S_0$ , то можно отрицательный член этого уравнения представить в виде

$$\frac{M - N_0}{K_i Y_s \left( 1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right)} = \frac{(M - N_0) S_0}{M_m K_i \left( 1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right)}. \quad (4.76)$$

Таким образом, уравнение (4.71) можно записать так:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \Phi \frac{(M - N_0)}{M_m} = \mu t, \quad (4.77)$$

где

$$\Phi = \frac{1}{1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}} \left[ \frac{K_s}{S_0} - \frac{S_0}{K_i} \right]. \quad (4.78)$$

Следовательно, в этом уравнении удалось сгруппировать переменные таким образом, чтобы экспериментальные данные можно было представить в виде линейной анаморфозы, при этом параметры  $\Phi$  и  $\mu$  зависят от начальной концентрации субстрата, что позволяет идентифицировать случай развития процесса с ингибированием избытком субстрата.

● Уравнение (4.27) является общей формой уравнения роста до глубин 0,5—0,6 и справедливо как для процессов без осложнений роста, так и для процессов ингибирования продуктом (см. гл. 5). Это же уравнение выполняется и для роста культуры, ингибируемой избытком субстрата.

Параметры  $\mu$  и  $\Phi$  могут быть найдены по известной процедуре линеаризации экспериментальных данных в координатах уравнения

$$\frac{\ln(M/N_0)}{t} = \mu - \Phi \frac{M - N_0}{tM_m} \quad (4.79)$$

или разностного уравнения

$$\frac{\ln(M_i/M_j)}{t_i - t_j} = \mu - \Phi \frac{M_i - M_j}{(t_i - t_j)M_m}. \quad (4.80)$$

▲ Как видно из уравнения (4.78), параметр  $\Phi$  весьма сложно зависит от начальной концентрации субстрата. Можно выделить три области этой зависимости.

1.  $\frac{K_s}{S_0} \gg \frac{S_0}{K_i}$  или  $S_0 \ll \sqrt{K_s K_i}$ . При этом

$$\Phi = \frac{K_s}{K_s + S_0}. \quad (4.81)$$

Параметр  $\Phi$  не включает в себя константу ингибирования, и, следовательно, ингибирование избытком субстрата не обнаруживается.

2.  $K_i/S_0 \approx S_0/K_i$  или  $S_0 \approx \sqrt{K_s K_i}$ . Здесь проявляется максимальная независимость удельной скорости роста от концентрации субстрата, при этом  $\Phi \approx 0$ , а микробная популяция развивается строго экспоненциально вплоть до глубины конверсии 0,6—0,8.

3.  $\frac{K_s}{S_0} \ll \frac{S_0}{K_i}$  или  $S_0 \gg \sqrt{K_i K_s}$ . В этой области  $\Phi$  имеет отрицательное значение:

$$\Phi = -\frac{S_0}{(K_i + S_0)}, \quad (4.82)$$

а скорость роста культуры увеличивается по мере израсходования субстрата; накопление продукта реакции и рост клеток опережают экспоненциальный рост.

Для того чтобы определить константу ингибирования избытком субстрата, необходимо исследовать зависимость от концентрации субстрата, в первую очередь в режиме  $S_0 \gg \sqrt{K_s K_i}$ .

При этом можно воспользоваться преобразованием уравнения (4.82) к виду

$$-1/\Phi = 1 + K_i/S_0. \quad (4.83)$$

Линеаризация экспериментальных данных в координатах зависимости  $-1/\Phi$  от  $1/S_0$  позволяет определить  $K_i$ .

В общем случае при анализе зависимости  $\Phi$  от концентрации субстрата можно использовать трансформированное уравнение (4.75):

$$\Phi \left( 1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right) = \frac{K_s}{S_0} - \frac{S_0}{K_i}. \quad (4.84)$$

Необходимо обратить внимание, что

$$1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} = \frac{\mu_m}{\mu}. \quad (4.85)$$

С учетом соотношения (4.85) уравнение (4.84) запишется как

$$\Phi \frac{\mu_m}{\mu} = \frac{K_s}{S_0} - \frac{S_0}{K_i}. \quad (4.86)$$

Уравнение (4.86) можно представить следующим образом:

$$\frac{\Phi \mu_m}{\mu S_0} = \frac{K_s}{S_0^2} - \frac{1}{K_i}, \quad (4.87)$$

при этом весь пул измерений при росте культур микроорганизмов в условиях ингибирования субстратом должен линеаризоваться в координатах зависимости  $\Phi \mu_m (\mu S_0)$  от  $1/S_0^2$ . Из этой зависимости определяются параметры  $K_s$  и  $K_i$ .

**!** При анализе экспериментальных данных, если есть основания считать, что процесс может ингибироваться избытком субстрата, можно рекомендовать следующую процедуру. Необходимо исследовать зависимость накопления клеток (или продуктов реакции) в экспоненциальной фазе при различных начальных концентрациях субстрата с определением  $\mu$  известными и описанными ранее способами. Если зависимость обнаружит экстремальный характер (см. рис. 4.1), это будет однозначно свидетельствовать в пользу процесса с ингибированием избытком субстрата.

Однако информацию о том, что развитие микроорганизма связано с ингибированием избытком субстрата, можно получить и из анализа одной-единственной кинетической кривой роста. Если использовать линеаризацию экспериментальных данных в координатах уравнений (4.79), (4.80) до степени конверсии 0,4—0,6, то можно определить значения  $\mu$  и  $\Phi$ . В том случае, если найденное  $\Phi$  отрицательно, можно с уверенностью утверждать, что процесс протекает с ингибированием избытком субстрата.

## ГЛАВА 5

### ИНГИБИРОВАНИЕ РОСТА ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРОДУКТАМИ ФЕРМЕНТАЦИИ

Один из наиболее часто встречающихся эффектов, приводящих к отклонению кинетики роста микроорганизмов от экспоненциальной кривой, связан с ингибированием их роста продуктами ферментативных превращений. Накопление какого-либо одного продукта превращения субстрата или их совокупности способно приводить к заметному уменьшению скорости роста культуры, переходу ее в стадию стационарного роста и даже к полной остановке процесса.

В качестве иллюстрации можно указать, что наиболее типичным случаем ингибирования роста микроорганизма продуктами жизнедеятельности является случай накопления в культуре органических кислот, снижающих значение рН среды культивирования. Как известно, скорость ферментативных процессов и, как следствие, скорость роста микроорганизмов рН-чувствительны. Если протоны, взаимодействуя с функционально важными компонентами клетки, блокируют метаболические процессы, феноменологически это означает, что они выступают в качестве ингибиторов роста.

Другим характерным примером могут быть процессы, протекающие с накоплением органических продуктов, в частности спиртов. Как правило, спиртовое брожение останавливается при накоплении в системе определенной концентрации продукта. Эффекты такого рода весьма распространены, в силу этого они требуют тщательного кинетического анализа.

#### 5.1. КИНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ ИНГИБИРОВАНИЯ ПРОДУКТОМ

Рассмотрим кинетику роста микробной популяции в приближении, учитывающем кинетически дискриминированные два процесса: стадию взаимодействия субстрата с клеткой и стадию деления клеток.

##### 5.1.1. Ингибирование продуктом на стадии взаимодействия субстрата с клеткой

Если продукт реакции  $P$  образуется на второй стадии, а процесс ингибирования заключается во взаимодействии

продукта с формой N, то кинетическую схему процесса можно представить в виде



Качественно ингибирование процесса продуктом заключается в том, что образуется его комплекс с активной формой N, при этом частица NP теряет способность к осуществлению последующего превращения в X и дальнейшему делению клетки. При развитии процесса с накоплением продукта все большая и большая доля N должна выводиться из реакционноспособного состояния, что должно тормозить процесс роста культуры.

В режиме постоянства концентрации субстрата ( $S=S_0$ ) переменными во времени компонентами системы являются частицы X, P и NP. Эти переменные связаны между собой системой дифференциальных уравнений

$$\frac{dN}{dt} = 2k_2X - k_1S_0N - k_iPN + k_{-i}(NP); \quad (5.2)$$

$$\frac{dX}{dt} = k_1S_0N - k_2X; \quad \frac{1}{k_2} \frac{dX}{dt} + X = \frac{k_1S_0N}{k_2}; \quad (5.3)$$

$$\frac{dNP}{dt} = k_iPN - k_{-i}(NP). \quad (5.4)$$

Сложение этих уравнений с учетом того, что общая биомасса M является суммой концентраций отдельных составляющих, т. е.

$$M = N + X + NP, \quad (5.5)$$

приводит к соотношению

$$\frac{dM}{dt} = \frac{dN}{dt} + \frac{dX}{dt} + \frac{d(NP)}{dt} = k_2X. \quad (5.6)$$

Если продукт P выступает в качестве быстрого и обратимого ингибитора (это означает, что  $d(NP)/dt \approx 0$ ), то процесс образования комплекса активного центра какого-либо фермента с продуктом может быть охарактеризован константой равновесия:

$$K_i = \frac{k_{-i}}{k_i} = \frac{NP}{(NP)}. \quad (5.7)$$

В этом режиме динамика накопления продукта описывается уравнением

$$\frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt} = k_2X, \quad (5.8)$$

где  $Y_p$  — стехиометрический коэффициент, характеризующий количество продукта на единицу клеточной биомассы.

Из уравнений (5.6) и (5.8) следует весьма важное соотношение

$$Y_p dP = dM. \quad (5.9)$$

Это означает, что продукт реакции и биомасса связаны между собой простой линейной связью

$$Y_p(P - P_0) = (M - N_0) \text{ или, если } P_0 \ll P, N_0 \ll M, \text{ то } Y_p P \approx M. \quad (5.10)$$

Для дальнейшего анализа воспользуемся условиями малости параметра при производной в уравнении (5.3). Если значение константы скорости процесса  $k_2$  достаточно велико, то в уравнении (5.3) можно пренебречь членом  $(1/k_2)dX/dt$  по сравнению с  $X$ . Это приводит к следующему соотношению между переменными:

$$N = \frac{k_2 X}{k_1 S_0}. \quad (5.11)$$

С учетом (5.11) уравнение (5.5) можно записать в виде

$$M = X \left( 1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} + \frac{k_2 P}{k_1 S_0 K_i} \right). \quad (5.12)$$

Если учесть, что переменные  $P$  и  $M$  связаны линейно по уравнению (5.10), то будем иметь

$$X = \frac{M}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} \left( 1 + \frac{M}{Y_p K_i} \right)}. \quad (5.13)$$

Подставляя это выражение в (5.6), получим дифференциальное уравнение, описывающее динамику изменения в системе общего количества клеток или общей биомассы:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_2 M}{1 + \frac{k_2}{k_1 S_0} \left( 1 + \frac{M}{Y_p K_i} \right)}. \quad (5.14)$$

Уравнение (5.14) может быть записано в форме

$$\frac{dM}{dt} = \mu_p M, \quad (5.15)$$

где

$$\mu_p = \frac{\mu_m S_0}{K_i \left( 1 + \frac{P}{K_i} \right) + S_0} \quad (5.16)$$

$$(\mu_m = k_2, K_s = k_2/k_1, P = M/Y_p).$$

Видно, что по своему содержанию уравнение (5.16) соответствует случаю конкурентного ингибирования продуктом. Это уравнение с разделяющимися переменными

$$\left(1 + \frac{k_2}{k_1 S_0}\right) \frac{dM}{M} + \frac{k_2}{Y_p k_1 S_0 K_i} dM = k_2 dt, \quad (5.17)$$

которое может быть достаточно просто проинтегрировано:

$$\int_{N_0}^M \frac{dM}{M} + \int_{N_0}^M \frac{k_2}{Y_p k_1 S_0 K_i \left(1 + \frac{k_2}{k_1 S_0}\right)} dM = \int_0^t \frac{k_2}{\left(1 + \frac{k_2}{k_1 S_0}\right)} dt \quad (5.18)$$

или

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{1}{Y_p K_i k_2 + k_1 S_0} (M - N_0) = \frac{k_2 k_1 S_0}{k_2 + k_1 S_0} t. \quad (5.19)$$

Если процесс развивается достаточно глубоко, то в уравнении (5.19) можно без особой погрешности пренебречь  $N_0$  по сравнению с  $M$  и тогда оно примет вид

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{1}{Y_p K_i k_2 + k_1 S_0} M = \frac{k_2 k_1 S_0}{k_2 + k_1 S_0} t. \quad (5.20)$$

Следует обратить внимание на то, что множитель перед  $t$  в правой части уравнения (5.20) представляет собой удельную скорость роста микроорганизма в отсутствие процесса ингибирования продуктом  $\left(\mu = \frac{k_2 k_1 S_0}{k_2 + k_1 S_0}\right)$ . С учетом этого уравнение (5.20) можно записать так:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{\mu M}{Y_p K_i k_1 S_0} = \mu t. \quad (5.21)$$

▲ Система будет функционировать в двух принципиально различающихся крайних режимах.

1. Если соотношения параметров уравнения (5.21) таковы, что в исследуемом интервале времени

$$\ln \frac{M}{N_0} \gg \frac{\mu M}{Y_p K_i k_1 S_0} \quad (5.22)$$

(например, исключительно велика константа ингибирования,  $K_i \rightarrow \infty$ ), то кинетика роста популяции микроорганизма имеет обычный экспоненциальный вид

$$M(t) = N_0 e^{\mu t} \quad (5.23)$$

и процесс ингибирования продуктом никоим образом не отражается на кинетике роста популяции. Эффекты ингибирования пренебрежимо малы.

2. Если соотношения параметров уравнения (5.21) таковы, что имеет место обратное неравенство

$$\ln \frac{M}{N_0} \ll \frac{\mu}{Y_p K_i k_1 S_0} M \quad (5.24)$$

(малое значение  $K_i$  или  $k_1 S_0$ ), то кинетика роста культуры не описывается экспоненциальной кривой и должно наблюдаться линейное увеличение биомассы:

$$M(t) = k_1 S_0 Y_p K_i t. \quad (5.25)$$

Для выявления необходимых соотношений между параметрами, регулирующих направление неравенств (5.22) и (5.24), запишем (5.22) в виде

$$\frac{M}{N_0} \gg \exp\left(\frac{\mu}{Y_p K_i k_1 S_0} M\right). \quad (5.26)$$

Поскольку сравнивать функции, указанные в правой и левой частях неравенства, достаточно неудобно, сравним их производные в точке  $M=0$ , так как неравенство производных в этой точке практически однозначно приводит к неравенству функции при произвольном  $M$ . Дифференцирование правой и левой частей неравенства (5.26) по переменной  $M$  в точке  $M=0$  приводит к выражению

$$\frac{1}{N_0} \gg \frac{\mu}{Y_p K_i k_1 S_0} \quad (5.27)$$

или

$$\frac{\mu N_0}{Y_p K_i k_1 S_0} \ll 1. \quad (5.28)$$

Соотношение (5.28) может быть записано как

$$\frac{N_0 k_2}{Y_p K_i (k_2 + k_1 S_0)} \ll 1. \quad (5.29)$$

С учетом того что в рамках используемой схемы  $k_2/k_1 = K_s$ , неравенство (5.29) будет иметь вид

$$\frac{N_0}{Y_p K_i (1 + S_0/K_s)} \ll 1. \quad (5.30)$$

Из этих неравенств следует, что экспоненциальный или линейный рост микробиологической системы зависит от многих параметров: начальной концентрации клеток, удельной скорости роста, концентрации субстрата. Однако наиболее важным является значение  $K_i$ . На качественном уровне можно утверждать, что чем меньше  $K_i$ , тем больше значение коэффициента перед линейным членом уравнения (5.21) и тем сильнее проявляются эффекты ингибирования продуктом.

Введем безразмерную переменную  $M/N_0$ . Уравнение (5.21) при соизмеримых  $M$  и  $N_0$  можно записать в виде

$$\ln\left(\frac{M}{N_0}\right) + \frac{N_0\mu}{Y_p K_i k_1 S_0} \left(\frac{M}{N_0} - 1\right) = \mu t \quad (5.31)$$

или

$$\ln\left(\frac{M}{N_0}\right) + \varphi \left(\frac{M}{N_0} - 1\right) = \mu t, \quad (5.32)$$

где  $\varphi = N_0\mu/(K_i k_1 S_0 Y_p)$ . Это уравнение может быть представлено рядом линейных модификаций:

$$\frac{1}{t} \ln \frac{M}{N_0} = \mu - \varphi \frac{M/N_0 - 1}{t}; \quad (5.33)$$

$$\mu \left[ \frac{t}{\ln(M/N_0) - 1} \right] = 1 + \varphi \left[ \frac{M/N_0 - 1}{\ln(M/N_0)} \right]; \quad (5.34)$$

$$\frac{\ln(M/N_0)}{M/N_0 - 1} = \mu \left( \frac{t}{M/N_0 - 1} \right) - \varphi. \quad (5.35)$$

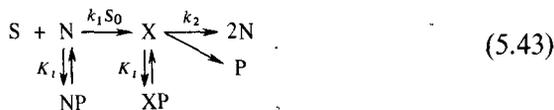
Если механизм процесса сопряжен с ингибированием продуктом реакции, то экспериментально наблюдаемые зависимости должны линейризоваться в координатах уравнений. Например, как следует из уравнения (5.33), должна существовать линейная зависимость экспериментально определяемой величины  $(1/t) \times \ln(M/N_0)$  от  $(M/N_0 - 1)/t$ . В соответствии с уравнением (5.33) отрезок, отсекаемый этой линейной зависимостью на оси ординат, равен удельной скорости роста; тангенс угла зависимости дает параметр  $\varphi$ .

● Величина  $\varphi$  является безразмерным параметром и характеризует эффекты ингибирования продуктом. Если экспериментально найденное значение  $\varphi$  близко к нулю, то можно утверждать, что в исследуемой системе отсутствуют эффекты ингибирования продуктом. Если значение  $\varphi$  в рамках статистической ошибки отлично от нуля, это говорит о заметном вкладе ингибирования продуктом в кинетику роста популяции. Значение константы ингибирования  $K_i$  можно определить из уравнения для  $\varphi$ , если известны параметры удельной скорости роста и значение  $N_0/Y_p$ .

### 5.1.2. Ингибирование продуктом на стадии деления клетки

Рассмотрим кинетику роста микробной популяции для двухстадийной схемы в предположении, что ингибирующее воздействие продуктом осуществляется на стадии взаимодействия его с промежуточной формой X:





В этом случае основное уравнение роста **популяции** можно записать следующим образом:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_2 S_0 M}{(S_0 + k_2/k_1)[1 + M/(Y_p K_i)]} \quad (5.44)$$

или

$$\frac{dM}{dt} = \mu_p M, \quad (5.45)$$

где

$$\mu_p = \frac{\mu_m S_0}{(S_0 + K_s)(1 + P/K_i)}. \quad (5.46)$$

Ингибитор влияет только на  $\mu_m$ , т. е. это случай неконкурентного ингибирования продуктом [см. (2.47)].

Интегрирование (5.44) при начальном условии  $t=0$ ,  $M=N_0$  приводит к уравнению

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{N_0}{Y_p K_i} \left( \frac{M}{N_0} - 1 \right) = \mu t, \quad (5.47)$$

где  $\mu$ , как и в предыдущих случаях,— истинное значение удельной скорости роста при данной концентрации субстрата, не осложненное ингибированием продуктом.

▲ Общим свойством уравнений (5.32), (5.41), (5.47), описывающих процесс роста с ингибированием продуктом, является отличие  $\varphi$  от нуля. Если  $\varphi$  близко к нулю, процесс в рассматриваемые промежутки времени развивается экспоненциально и эффектами ингибирования можно пренебречь.

Для обсуждаемых выше случаев должна наблюдаться зависимость параметра  $\varphi$  от концентрации субстрата:

$$\varphi = \frac{N_0}{Y_p K_i} \quad (\text{неконкурентное ингибирование}); \quad (5.48)$$

$$\varphi = \frac{N_0}{Y_p K_i} \frac{K_s}{S_0 + K_s} \quad (\text{конкурентное ингибирование}); \quad (5.49)$$

$$\varphi = \frac{N_0}{Y_p K_i} \frac{S_0}{S_0 + K_s} \quad (\text{бесконкурентное ингибирование}). \quad (5.50)$$

Если ингибитор взаимодействует с формой N, то увеличение концентрации субстрата должно приводить к уменьшению параметра  $\varphi$ . При взаимодействии ингибитора с формой X рост концентрации субстрата должен увеличивать  $\varphi$  по зависимости с «насыщением» при высокой концентрации субстрата.

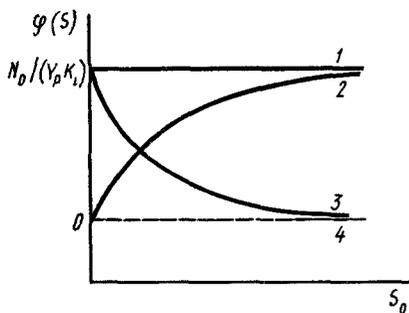
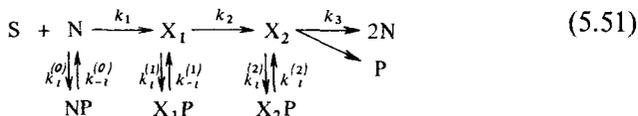


Рис. 5.1. Зависимость  $\varphi(S)$  для различных кинетических схем с ингибированием роста популяции микроорганизмов продуктом ферментации:  
 1 — неконкурентное ингибирование; 2 — бесконкурентное ингибирование; 3 — кооперативное ингибирование; 4 — неосложненный рост

● На рис. 5.1 приведены кривые зависимости  $\varphi(S)$  для обсуждаемых кинетических схем, а также для неосложненного роста. Зависимости  $\varphi(S)$  могут быть основой для дискриминации механизмов ингибирования.

### 5.1.4. Трехстадийная схема

Рассмотрим несколько более общий случай в рамках трехстадийной кинетической схемы:



Будем считать, что продукт способен образовывать неактивные комплексы с каждым из состояний клетки —  $N$ ,  $X_1$  или  $X_2$ . Эти процессы имеют быстрый и обратимый характер и могут быть охарактеризованы константами диссоциации  $K_{i,0}$ ,  $K_{i,1}$ ,  $K_{i,2}$ .

Запишем систему уравнений, описывающих динамическое поведение каждого из компонентов системы:

$$\left. \begin{array}{l}
 M = N + NP + X_1 + X_1P + X_2 + X_2P; \\
 \frac{dN}{dt} = 2k_3X_2 - k_1S_0N + k_i^{(0)}(NP) - k_i^{(0)}PN; \\
 \frac{d(NP)}{dt} = k_i^{(0)}PN - k_i^{(0)}(NP) \approx 0; \\
 \frac{dX_1}{dt} = k_1S_0N - k_2X_1 + k_i^{(1)}(X_1P) - k_i^{(1)}PX_1; \\
 \frac{d(X_1P)}{dt} = k_i^{(1)}PN - k_i^{(1)}(X_1P) \approx 0; \\
 \frac{dX_2}{dt} = k_2X_1 - k_3X_2 + k_i^{(2)}(X_2P) - k_i^{(2)}PX_2; \\
 \frac{d(X_2P)}{dt} = k_i^{(2)}PX_2 - k_i^{(2)}(X_2P) \approx 0.
 \end{array} \right\} \quad (5.52)$$

Сложение уравнения (5.53) с учетом (5.52) приводит к основному дифференциальному уравнению

$$\frac{dM}{dt} = k_3 X_2. \quad (5.54)$$

Поскольку в условиях равновесия  $d(X_1P)/dt \simeq 0$ ,  $d(X_2P)/dt \simeq 0$ ,  $d(NP)/dt \simeq 0$ , кинетика накопления продукта описывается следующим образом:

$$\frac{1}{Y_p} \frac{dP}{dt} = k_3 X_2. \quad (5.55)$$

Если справедливы основные предположения о малости параметров перед производными  $dX_1/dt$  и  $dX_2/dt$ , т. е. справедливы неравенства  $(1/k_2)dX_1/dt \ll X_1$ ,  $(1/k_2)dX_2/dt \ll X_2$ , то между переменными  $N$ ,  $X_1$  и  $X_2$  существуют соотношения

$$k_1 S_0 N = k_2 X_1; \quad (5.56)$$

$$k_2 X_1 = k_3 X_2. \quad (5.57)$$

С учетом этих соотношений, а также уравнений для констант диссоциации комплексов с продуктом

$$K_i^{(0)} = \frac{NP}{(NP)}; \quad K_i^{(1)} = \frac{X_1P}{(X_1P)}; \quad K_i^{(2)} = \frac{X_2P}{(X_2P)} \quad (5.58)$$

уравнение (5.52) выглядит так:

$$M = X_2 \left[ 1 + \frac{P}{K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_2} \left( 1 + \frac{P}{K_i^{(1)}} \right) + \frac{k_3}{k_1 S_0} \left( 1 + \frac{P}{K_i^{(0)}} \right) \right]. \quad (5.59)$$

Учитывая линейную зависимость между концентрациями продукта и биомассы

$$Y_p P = M, \quad (5.60)$$

можно записать

$$X_2 = \frac{M}{1 + \frac{M}{Y_p K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3 M}{k_2 Y_p K_i^{(1)}} + \frac{k_3}{k_1 S_0} + \frac{k_3}{k_1 S_0} + \frac{M}{Y_p K_i^{(0)}}}. \quad (5.61)$$

Подставим это выражение в дифференциальное уравнение (5.54):

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_3 M}{\left( 1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0} \right) + \frac{M}{Y_p} \left( \frac{1}{K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_2} \frac{1}{K_i^{(1)}} + \frac{k_3}{k_1 S_0} \frac{1}{K_i^{(0)}} \right)}. \quad (5.62)$$

Для кинетической схемы (5.51) могут реализоваться все основные типы закономерностей ингибирования. Уравнение (5.62) можно представить в виде

$$\frac{dM}{dt} = \mu_p M, \quad (5.63)$$

где

$$\mu_p = \frac{k_3}{\left(1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}\right) + P \left(\frac{1}{K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_2} \frac{1}{K_i^{(1)}} + \frac{k_3}{k_1 S_0} \frac{1}{K_i^{(0)}}\right)}. \quad (5.64)$$

Если продукт взаимодействует со всеми формами N, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> с одинаковой эффективностью, т. е. если  $K_i^{(2)} = K_i^{(1)} = K_i^{(0)}$ , то имеем

$$\mu_p = \frac{\frac{k_3}{(1 + k_3/k_2)(1 + P/K_i)} S_0}{S_0 + \frac{k_3}{K_i(1 + k_3/k_2)}}. \quad (5.65)$$

Видно, что концентрация продукта влияет на  $\mu_m$ ; это типичный случай *неконкурентного ингибирования*.

Если продукт избирательно взаимодействует лишь с формой N,  $K_i^{(1)} \rightarrow \infty$ ,  $K_i^{(2)} \rightarrow \infty$ , то уравнение роста культуры будет иметь форму

$$\mu_p = \frac{k_3 / [(1 + k_3/k_2) S_0]}{S_0 + \frac{k_3}{k_1(1 + k_3/k_2)} \left(1 + \frac{P}{K_i^{(0)}}\right)}, \quad (5.66)$$

что соответствует механизму *конкурентного ингибирования*.

В общем случае при произвольном соотношении между константами  $K_i^{(0)}$ ,  $K_i^{(1)}$  и  $K_i^{(2)}$  имеет место *смешанное ингибирование продуктом*. Если ввести обозначения

$$1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0} = a + \frac{b}{S_0}, \quad (5.67)$$

$$\frac{1}{K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_2} \frac{1}{K_i^{(1)}} + \frac{k_3}{k_1 S_0} \frac{1}{K_i^{(0)}} = c + \frac{d}{S_0}, \quad (5.68)$$

то уравнение скорости роста популяции можно записать так:

$$\mu_p = \frac{[k_3 / (a + cP)] S_0}{S_0 + \frac{b + dP}{a + cP}}, \quad (5.69)$$

т. е. ингибитор оказывает влияние на  $\mu_m$  и на  $K_s$ .

Введем параметр, обозначающий наблюдаемую константу и ингибирование продуктом  $K_{эфф}$ :

$$\frac{1}{K_{эфф}} = \frac{1}{K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_2} \frac{1}{K_i^{(1)}} + \frac{k_3}{k_1 S_0} \frac{1}{K_i^{(0)}}. \quad (5.70)$$

В числовое значение  $K_{эфф}$  наибольший вклад вносит процесс ингибирования с наименьшей константой диссоциации. Действительно, если в сумме (5.70)

$$\frac{1}{K_i^{(2)}} \gg \frac{k_3}{k_2 K_i^{(1)}} + \frac{k_3}{k_1 S_0 K_i^{(0)}}, \quad (5.71)$$

то

$$K_{эфф} = K_i^{(2)}. \quad (5.72)$$

Это означает, что ингибирование осуществляется путем блокировки состояния  $X_2$ .

Если

$$\frac{k_3}{k_2 K_i^{(1)}} \gg \frac{1}{K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_1 S_0 K_i^{(0)}}, \quad (5.73)$$

то

$$K_{эфф} = K_i^{(1)} \frac{k_2}{k_3}. \quad (5.74)$$

Это соответствует механизму ингибирования через форму  $X_1$ . Соответственно если

$$\frac{k_3}{k_1 S_0 K_i^{(0)}} \gg \frac{1}{K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_2 S_0 K_i^{(1)}}, \quad (5.75)$$

то

$$K_{эфф} = K_i^{(0)} \frac{k_1 S_0}{k_3}, \quad (5.76)$$

т. е. продукт взаимодействует с формой  $N$ .

Запишем уравнение (5.62) следующим образом:

$$\left(1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}\right) \frac{dM}{dt} + \frac{M}{Y_p K_{эфф}} \approx k_3 dt. \quad (5.77)$$

Интегрирование этого уравнения с использованием начальных условий  $t=0$ ,  $M=N_0$  приводит к уравнению

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{M - N_0}{Y_p K_{эфф} \left(1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}\right)} = \frac{k_3}{1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}} t. \quad (5.78)$$

По своей форме это уравнение полностью совпадает с полученными ранее для двухстадийных схем роста микроорганизмов с ингибированием продуктом:

$$\ln \frac{M}{N_0} + \varphi \frac{M - N_0}{N_0} = \mu t, \quad (5.79)$$

где

$$\mu = \frac{k_3}{1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0}} \quad (5.80)$$

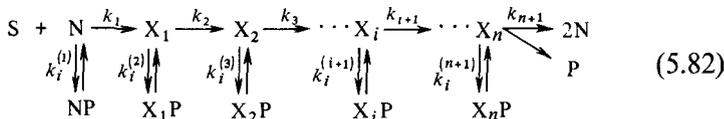
и

$$\varphi = \frac{N_0 \left( \frac{1}{K_i^{(2)}} + \frac{k_3}{k_2} \frac{1}{K_i^{(1)}} + \frac{k_3}{k_1 S_0} \frac{1}{K_i^{(0)}} \right)}{Y_p \left( 1 + \frac{k_3}{k_2} + \frac{k_3}{k_1 S_0} \right)} \quad (5.81)$$

● Таким образом, уравнение (5.79) является общим уравнением для кинетики роста с ингибированием продуктом и его вид не зависит от числа промежуточных состояний. Для анализа процесса в обсуждаемом варианте полностью применим подход, описанный для двухстадийной схемы, поскольку интегральные формы здесь полностью эквивалентны.

### 5.1.5. Многостадийная схема

Рассмотрим кинетику роста микробной популяции, когда в механизме роста участвует произвольное число  $n$  различных состояний. Будем считать, что продукт способен быстро и обратимо взаимодействовать с каждым из этих промежуточных состояний и это взаимодействие может быть охарактеризовано константой равновесия



Кинетика накопления биомассы (общего числа клеток) описывается уравнением

$$\frac{dM}{dt} = k_{n+1} X_n, \quad (5.83)$$

где

$$M = N + NP + \sum_{i=1}^n X_i + \sum_{i=1}^n X_i P. \quad (5.84)$$

При условии малости параметров перед производными  $\left( \frac{1}{k_{i+1}} \frac{dX_i}{dt} \ll X_i \right)$  концентрации различных форм связаны между собой соотношениями

$$\begin{aligned}
 N &= \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0} X_n; \\
 X_1 &= \frac{k_{n+1}}{k_2} X_n; \\
 &\dots \dots \dots \\
 X_i &= \frac{k_{n+1}}{k_{i+1}} X_n; \\
 &\dots \dots \dots \\
 X_{n-1} &= \frac{k_{n+1}}{k_n} X_n.
 \end{aligned} \quad (5.85)$$

Концентрации комплексов (NP), (X<sub>1</sub>P), ..., (X<sub>n</sub>P) могут быть найдены по уравнениям

$$\begin{aligned}
 (\text{NP}) &= \frac{\text{NP}}{K_i^{(1)}}; \\
 (\text{X}_1\text{P}) &= \frac{\text{X}_1\text{P}}{K_i^{(2)}}; \\
 &\dots\dots\dots \\
 (\text{X}_i\text{P}) &= \frac{\text{X}_i\text{P}}{K_i^{(i+1)}}; \\
 (\text{X}_n\text{P}) &= \frac{\text{X}_n\text{P}}{K_i^{(n+1)}}.
 \end{aligned}
 \tag{5.86}$$

Этот набор уравнений позволяет выразить концентрации состояний N, ..., X<sub>n-1</sub> и комплексов (NP), ..., (X<sub>n-1</sub>P) через концентрацию X<sub>n</sub> и соответствующие кинетические параметры. При этом необходимо принять во внимание, что между M и P имеется линейная связь

$$M = X_n \left( 1 + \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{k_i} \right) + \frac{M X_n}{Y_p} \left( \frac{1}{K_i^{(n+1)}} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{k_i K_i^{(i)}} + \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0 K_i^{(1)}} \right).
 \tag{5.87}$$

Используя это уравнение, можно выразить X<sub>n</sub> через M:

$$X_n = \frac{M}{\left( 1 + \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{k_i} \right) + \frac{M}{Y_p} \left( \frac{1}{K_i^{(n+1)}} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{K_i^{(i)} k_i} + \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0 K_i^{(1)}} \right)}
 \tag{5.88}$$

или

$$X_n = \frac{M}{f_1 + \frac{M}{Y_p} f_2},
 \tag{5.89}$$

где

$$f_1 = 1 + \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{k_i};
 \tag{5.90}$$

$$f_2 = \frac{1}{K_i^{(n+1)}} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{K_i^{(i)} k_i} + \frac{k_{n+1}}{K_i^{(1)} k_1 S_0}.
 \tag{5.91}$$

Дифференциальное уравнение (5.83) примет вид

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k_{n+1} M}{f_1 + \frac{M}{Y_p} f_2}.
 \tag{5.92}$$

Это уравнение с разделяющимися переменными

$$\frac{dM}{M} + \frac{f_2}{Y_p f_1} dM = \frac{k_{n+1}}{f_1} dt, \quad (5.93)$$

интегрирование которого с использованием условий  $t=0$ ,  $M=N_0$  дает

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{f_2 N_0}{f_1 Y_p} \frac{M - N_0}{N_0} = \frac{k_{n+1}}{f_1} t. \quad (5.94)$$

Полученное уравнение имеет тот же вид, что и рассмотренные уравнения для случаев двухстадийного и трехстадийного процессов.

При этом

$$\mu = \frac{k_{n+1}}{f_1} = \frac{1}{\frac{1}{k_1 S_0} + \sum_{i=2}^{n+1} \frac{1}{k_i}}; \quad (5.95)$$

$$\varphi = \frac{N_0 f_2}{f_1 Y_p} = \frac{N_0 \left( \frac{1}{K_i^{(n+1)}} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{K_i^{(i)}} + \frac{k_{n+1}}{K_i^1 k_1 S_0} \right)}{Y_p \left( 1 + \frac{k_{n+1}}{k_1 S_0} + k_{n+1} \sum_{i=2}^n \frac{1}{k_i} \right)}. \quad (5.96)$$

● Главный вывод анализа заключается в том, что экспериментально наблюдаемая кинетика роста микроорганизмов в условиях ингибирования процесса продуктом не зависит от числа промежуточных соединений и числа стадий реакции. Кинетику роста в этих условиях описывает общее уравнение (5.92). Это позволяет воспользоваться при анализе кинетики процесса общей процедурой, детально рассмотренной в следующем разделе при сравнении кинетических закономерностей неосложненного роста и роста при ингибировании субстратом или продуктом.

## 5.2. АНАЛИЗ ПОЛНЫХ КИНЕТИЧЕСКИХ КРИВЫХ РОСТА

Рассмотрим кинетические закономерности роста микробной популяции в условиях, когда процесс развития ингибируется продуктом реакции и протекает во всем диапазоне времени до полного исчерпания субстрата.

### 5.2.1. Конкурентное ингибирование продуктом реакции

В том случае, если динамика развития микробной популяции ингибируется накоплением продукта по конкурентному механизму, уравнение для скорости процесса описывается следующим образом:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m SM}{K_s \left(1 + \frac{P}{k_i}\right) + S}. \quad (5.97)$$

С учетом двух балансовых уравнений

$$Y_s(S_0 - S) = M - N_0; \quad (5.98)$$

$$Y_p P = M - N_0 \approx M^* \quad (5.99)$$

кинетическое уравнение развития популяции будет иметь вид

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m \left(S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s}\right) M}{K_s \left(1 + \frac{M}{Y_p K_i}\right) + S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s}}. \quad (5.100)$$

Это уравнение с разделяющимися переменными можно представить в форме

$$\left[ \frac{1}{M} + \frac{K_s}{M \left(S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s}\right)} \right] dM + \frac{K_s dM}{Y_p K_i \left(S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s}\right)} = \mu_m t. \quad (5.101)$$

Первая часть этого уравнения соответствует дифференциальному уравнению для полной кинетической кривой роста микроорганизма в отсутствие процесса ингибирования продуктом [см. (3.27)]. Второе слагаемое левой части уравнения (5.101) при интегрировании дает функцию

$$\int_{N_0}^M \frac{K_s dM}{Y_p K_i \left(S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s}\right)} = -\frac{Y_s K_s}{Y_p K_i} \ln \frac{S_0 + \frac{N_0}{Y_p} - \frac{M}{Y_s}}{S_0 + \frac{N_0}{Y_s}}. \quad (5.102)$$

В соответствии с этим общее выражение для интегральной формы уравнения роста культуры с участием процесса конкурентного ингибирования продуктом имеет вид (при  $S_0 \gg \frac{N_0}{Y_s}$ )

$$\left(1 + \frac{K_s}{S_0}\right) \ln \frac{M}{N_0} - \left(\frac{K_s}{S_0} + \frac{Y_s K_s}{Y_p K_i}\right) \ln \left(1 - \frac{M - N_0}{Y_s S_0}\right) = \mu_m t \quad (5.103)$$

или (учитывая, что  $Y_s S_0 = M_m$ )

$$\ln \frac{M}{N_0} - \Phi \ln \left(1 - \frac{M - N_0}{M_m}\right) = \mu t, \quad (5.104)$$

---

\* Предполагается, что в процессе роста микроорганизма происходит существенное накопление биомассы по сравнению с  $N_0$

где

$$\mu = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}. \quad (5.105)$$

Параметр  $\Phi$  отражает эффект ингибирования продуктом:

$$\Phi = \frac{K_s}{K_s + S_0} \left( 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \right). \quad (5.106)$$

Из уравнения (5.106) видно, что, если константа ингибирования продуктом существенно больше используемой начальной концентрации субстрата ( $Y_s S_0 \ll Y_p K_i$ ), эффектом ингибирования продуктом можно практически пренебречь. В предельном случае, когда ингибирование продуктом вообще отсутствует ( $K_i \rightarrow \infty$ ), уравнение (5.103) трансформируется в интегральное уравнение роста культуры без осложнений роста (3.27).

Если кинетика процесса исследуется до глубин конверсии лимитирующего субстрата 0,5—0,6, то кинетику процесса достаточно строго описывает уравнение

$$\ln \frac{M}{N_0} + \frac{K_s}{K_s + S_0} \left( 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \right) \left( \frac{M - N_0}{M_0} \right) = \mu t. \quad (5.107)$$

Это уравнение получается при разложении в ряд второго логарифмического члена уравнения (5.103) и использовании только первого члена разложения.

● Принципиальное отличие кинетики процесса с конкурентным ингибированием продуктом от процесса без ингибирования заключается лишь в зависимости параметра  $\Phi$  от концентрации субстрата. Для процессов без ингибирования продуктом, как правило,  $\Phi \ll 1$ . В случае ингибирования продуктом  $\Phi_\infty \rightarrow \frac{Y_s K_s}{Y_p K_i}$  при  $S_0 \rightarrow \infty$ . Видно, что при  $Y_s K_s = Y_p K_i$   $\Phi_\infty = 1$ ; если  $Y_s K_s < Y_p K_i$ , то  $\Phi_\infty < 1$ ; если константа ингибирования очень мала по сравнению с константой сродства  $Y_s K_s > Y_p K_i$ , то  $\Phi_\infty = Y_s K_s / (Y_p K_i) > 1$ .

### 5.2.2. Неконкурентное ингибирование продуктом

Для кинетической схемы процесса с неконкурентным ингибированием роста культуры продуктом реакции скорость роста культуры должна быть представлена уравнением:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m S M}{\left( 1 + \frac{P}{K_i} \right) (K_s + S)} \quad (5.108)$$

или

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m SM}{K_s + S + K_s \frac{P}{K_i} + \frac{SP}{K_i}}. \quad (5.109)$$

Дифференциальное уравнение (5.109) представляет собой уравнение с разделяющимися переменными:

$$\left( \frac{K_s}{SM} + \frac{1}{M} + \frac{K_s P}{K_i SM} + \frac{P}{MK_i} \right) dM = \mu_m t. \quad (5.110)$$

С учетом соотношений  $Y_s[S_0 - S] = M - N_0$ ;  $Y_p P = M$  уравнение (5.110) может быть записано в виде

$$\left[ \frac{1}{M} + \frac{K_s}{M \left( S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s} \right)} + \frac{K_s}{Y_p K_i \left( S_0 + \frac{N_0}{Y_s} - \frac{M}{Y_s} \right)} \right] dM + \frac{dM}{Y_p K_i} = \mu_m t. \quad (5.111)$$

Видно, что в этом уравнении слагаемое в скобках совпадает с уравнением (5.101), описывающим кинетику процесса с конкурентным ингибированием продуктом. Следовательно, при интегрировании уравнения (5.111) по сравнению с (5.103) появляется один дополнительный линейный член:

$$\left( 1 + \frac{K_s}{S_0} \right) \ln \frac{M}{N_0} - \left( \frac{K_s}{S_0} + \frac{K_s Y_s}{Y_p K_i} \right) \ln \left( 1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right) + \frac{1}{Y_p K_i} (M - N_0) = \mu_m t. \quad (5.112)$$

Из уравнения (5.112) следует, что при «плохих» константах ингибирования продуктом (в пределе при  $K_i \rightarrow \infty$ ) уравнение (5.112) трансформируется в обычное уравнение роста культуры (члены, включающие  $1/K_i$ , становятся пренебрежимо малы).

Дополнительный линейный член в уравнении (5.112) существенным образом меняет кинетику процесса. Кинетические данные в случае механизма неконкурентного ингибирования продуктом теряют способность линеаризоваться в координатах  $\ln(M/N_0)/t$  от  $\ln \left( 1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right) / t$ . Каких-либо приемлемых координат, позволяющих линеаризовать экспериментальные данные, найти не представляется возможным, поскольку в уравнение (5.112) входят три переменные функции:  $\ln(M/N_0)$ ,  $\ln \left( 1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right)$ ,  $M - N_0$ . Определенные возможности в анализе кинетического процесса дает приближенный подход, в котором используется разложение в степенной ряд логарифмического члена  $\ln \left( 1 - \frac{M - N_0}{M_m} \right)$ . Если кинетика исследуется до глубин

0,5—0,6, то достаточно обоснованно можно воспользоваться уравнением

$$\left(1 + \frac{K_s}{S_0}\right) \ln \frac{M}{N_0} + \left(\frac{K_s}{S_0} + \frac{K_s Y_s}{Y_p K_i} + \frac{M_m}{Y_p K_i}\right) \left(\frac{M - N_0}{M_m}\right) = \mu_m t \quad (5.113)$$

▲ Экспериментальные данные должны линейризоваться в координатах

$$\ln \frac{M}{N_0} / t \text{ от } \left(\frac{M - N_0}{M_m}\right) / t:$$

$$\ln \frac{M}{N_0} / t = \frac{\mu_m}{1 + K_s/S_0} - \left[ \frac{\frac{K_s}{S_0} + \frac{K_s Y_s}{Y_p K_i}}{1 + \frac{K_s}{S_0}} + \frac{M_m}{Y_p K_i \left(1 + \frac{K_s}{S_0}\right)} \right] \frac{M - N_0}{M_m t} \quad (5.114)$$

На основе такой линейризации могут быть найдены  $\mu$  и параметр  $\Phi$ , который равен

$$\Phi = \frac{\frac{K_s}{S_0} + \frac{K_s Y_s}{Y_p K_i}}{1 + \frac{K_s}{S_0}} + \frac{M_m}{Y_p K_i \left(1 + \frac{K_s}{S_0}\right)} \quad (5.115)$$

Если учесть, что  $M_m = Y_s S_0$ , то функция может быть преобразована к виду

$$\Phi = \frac{K_s}{K_s + S_0} \left[ 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \left( 1 + \frac{S_0}{K_s} \right) \right] \quad (5.116)$$

### 5.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМА ИНГИБИРОВАНИЯ ИЗ ВИДА КИНЕТИЧЕСКОЙ КРИВОЙ РОСТА ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Как правило, кинетические исследования в микробиологии заключаются в изучении кривых роста микробной популяции. При этом важно из такого рода данных получить максимальную информацию. Проведенный анализ дает возможность из вида измененной кривой роста ответить на вопрос: имеет ли место в данном конкретном случае неосложненный рост или развитие культуры сопряжено с эффектами ингибирования продуктом или субстратом?

Сравнение кинетических уравнений для процессов без ингибирования с уравнением для конкурентного ингибирования, неконкурентного и ингибирования избытком субстрата показывает, что в рамках приближенного рассмотрения при глубинах

процесса, не превышающих 0,5—0,6, кинетика роста популяции может быть описана формально одним и тем же уравнением

$$\ln \frac{M}{N_0} + \Phi \frac{M - N_0}{M_m} = \mu t; \quad (5.117)$$

$$\ln \frac{M}{N_0} + \phi \frac{M - N_0}{N_0} = \mu t, \quad (5.118)$$

где  $\Phi$ ,  $\phi$  — параметры, отражающие механизм процесса.

Различие параметров  $\Phi$  и  $\phi$  заключается в использовании нормировочного множителя, приводящего переменную  $M - N_0$  к безразмерному виду. Если экспериментальные данные получены в условиях, при которых наиболее точно определяется максимальная плотность культуры  $M_m$  или  $Y_s$  и  $S_0$ , то наиболее правильно использовать безразмерную переменную  $(M - N_0)/M_m$ . Это приводит к уравнению (5.117) и соответственно к параметру  $\Phi$ . Если достаточно точно найдено значение  $N_0$ , то удобно нормировать данные  $M - N_0$  на значение  $N_0$ , что приведет к параметру  $\phi$ .

В табл. 5.1 приведен вид параметров  $\Phi$  и  $\phi$  как функций концентрации  $S_0$  и параметров  $M_m$ ,  $N_0$ ,  $S_0$ ,  $K_i$ . Видно, что неосложненный рост, ингибирование продуктом и субстратом могут быть дифференцированы, если экспериментально найти значение  $\Phi$  или  $\phi$ . Действительно, в условиях глубокого эффективного ингибирования продуктом параметр  $\Phi$  существенно больше единицы, для ингибирования субстратом  $\Phi < 0$  (отрицательное число), в то время как для неосложненного роста характерно  $1 > \Phi > 0$ . Уже на основании определения  $\Phi$  можно провести идентификацию условий роста популяции.

Для определения параметра  $\Phi$  (или  $\phi$ ) необходимо воспользоваться одной из линейных анаморфоз уравнения (5.117) [(см., например, уравнения (5.33)—(5.35)]. Важно еще раз подчеркнуть, что значение  $\Phi$  (или  $\phi$ ) определяется из экспериментальных данных для всех условий развития процесса по одному и тому же уравнению, например, из зависимости

$\ln(M/N_0)/t$  от  $\frac{M - N_0}{M_m} / t$ :

$$\ln \frac{M}{N_0} / t = \mu - \Phi \frac{M - N_0}{M_m t}. \quad (5.119)$$

Для определения  $\mu$  и  $\Phi$  можно также воспользоваться разностным методом, поскольку  $M_i$  и  $M_j$ , определенные при двух фиксированных временах  $t_i$  и  $t_j$ , связаны между собой уравнением

$$\ln \frac{M_i}{M_j} / (t_i - t_j) = \mu - \Phi \frac{M_i - M_j}{(t_i - t_j) M_m}. \quad (5.120)$$

Условия роста популяции	$\Phi$	$\varphi$	При эффективном ингибировании продуктом или субстратом $Y_p K_i \ll Y_s S_0$ или $K_i \ll M_m / Y_p$
Неосложненный рост	$\frac{K_s}{K_s + S_0}$	$\frac{N_0 K_s}{M_m K_i + S_0}$	—
Конкурентное ингибирование продуктом	$\frac{K_s}{K_s + S_0} \left( 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \right)$	$\frac{K_s}{K_s + S_0} \left( \frac{N_0}{M_m} + \frac{N_0}{Y_p K_i} \right)$	$\Phi = \frac{K_s}{K_s + S_0} \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i}; \Phi \gg 1;$ $\varphi = \frac{K_s}{K_s + S_0} \frac{N_0}{Y_p K_i};$ $\varphi \rightarrow \infty$ при $K_i \rightarrow \infty$
Неконкурентное ингибирование продуктом	$\frac{K_s}{K_s + S_0} \left[ 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \left( 1 + \frac{S_0}{K_s} \right) \right]$	$\frac{N_0}{M_m} \left[ \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \left( 1 + \frac{S_0}{K_s} \right) + 1 \right] \frac{K_s}{K_s + S_0}$	$\Phi = \frac{Y S_0}{Y_p K_i}, \Phi \gg 1;$ $\varphi = \frac{N_0}{Y_p K_i} \left( \frac{2K_s + S_0}{K_s + S_0} \right) \approx \frac{N_0}{Y_p K_i},$ $\varphi \rightarrow \infty$ при $K_i \rightarrow \infty$
Ингибирование субстратом	$\frac{K_s}{S_0} \frac{S_0}{K_i}$ $1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i}$	$\frac{K_s}{S_0} \frac{S_0}{K_i}$ $\frac{N_0}{M_m} \left( 1 + \frac{K_s}{S_0} + \frac{S_0}{K_i} \right)$	$\Phi = \frac{S_0}{K_i (1 + K_s/S_0 + S_0/K_i)}, \Phi < 0$ $\varphi = - \frac{S_0}{K_i (1 + K_s/S_0 + S_0/K_i)} \frac{N_0}{M_m}, \varphi < 0$

В этих уравнениях параметр  $\Phi$  определяется как тангенс угла наклона зависимости  $\ln \frac{M_j}{M_i} / (t_i - t_j)$

от  $\frac{M_i - M_j}{(t_i - t_j) M_m}$  (рис. 5.2). Видно, что при сильном проявлении осложняющих эффектов механизм роста культуры может быть идентифицирован весьма строго.

Данные по механизму роста с ингибированием избытком субстрата приведены на рис. 5.3, из которого видно, что  $\mu = 0,032 \text{ ч}^{-1}$ , а  $\Phi = -0,85$ . Так как ингибирование заметно, то это говорит о том, что область используемых концентраций сульфита сравнима с  $K_i$  и превышает  $K_s$ , т. е. для определения числовых значений кинетических параметров можно воспользоваться уравнением (4.82), преобразовав его к виду

$$K_i \cong S_0(1 - \Phi) / \Phi.$$

Найденное значение  $K_i = 50 \text{ мг/мл}$ .

При сравнении кинетических кривых роста *M. thermoautotrophicum* и *Bacillus thuringiensis* (рис. 5.4) видно, что рост первого микроорганизма осуществляется без осложнений ( $\Phi < 1$ ), в то время как рост *Bac. thuringiensis* характеризуется эффективным ингибированием продуктом ( $\Phi > 1$ ).

Возможен и более глубокий анализ. Например, теоретически можно дискриминировать механизм ингибирования (отличить конкурентное ингибирование от неконкурентного) и найти числовые значения параметров, в первую очередь константы ингибирования  $K_i$ . При этом нужно иметь в виду, что с усложнением анализа возрастают требования к точности экспериментального изучения кривых роста культуры. По-видимому, точность измерений в обычном микробиологическом эксперименте в большинстве случаев недостаточна для углубленного анализа. Тем не менее интересно рассмотреть принципиальные возможности метода.

Для того чтобы достоверно выявить ингибирование продуктом, идентифицировать механизм ингибирования, необходимо снять кривые роста культуры при нескольких исходных концентрациях субстрата в широком диапазоне его концентраций.

Для идентификации механизма и определения константы ингибирования продуктом предлагается следующая процедура.

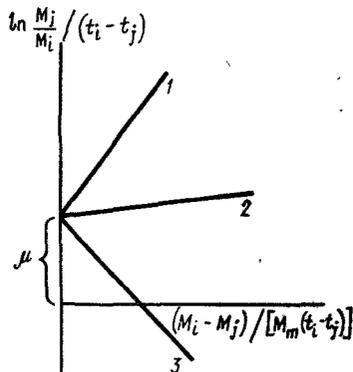


Рис. 5.2. Кривые роста, построенные в координатах уравнения (5.120) для случаев:

- 1 — ингибирования продуктом ( $\Phi > 1$ );
- 2 — неосложненного роста ( $0 < \Phi < 1$ );
- 3 — ингибирования субстратом ( $\Phi < 0$ )

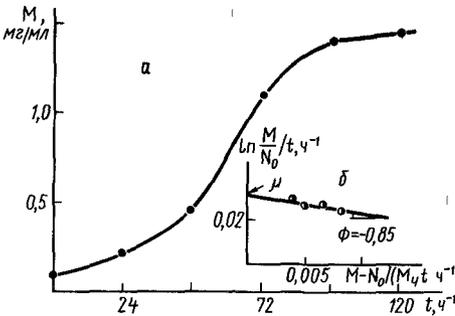


Рис. 5.3. Кинетическая кривая роста *Proionibacterium shermanii* в присутствии сульфита (а) (Л. И. Воробьева, И. А. Чаракхьян, 1983) и те же данные в координатах уравнения (5.119) для роста с ингибированием субстратом (б)

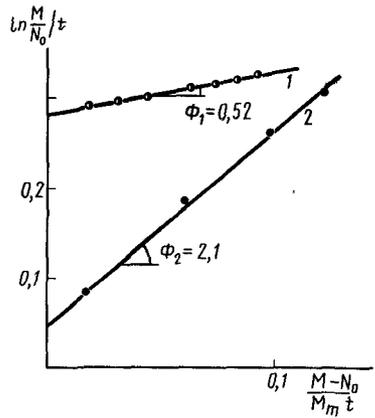


Рис. 5.4. Анализ кривых роста *M. thermoautotrophicum* (1), *Bac. thuringiensis* (2) построен с использованием уравнения (5.119). Несовершенно развитый рост характеризуется  $\Phi = 0,52 < 1$ , прямая 1; ингибирование продуктом  $\Phi = 2,1 > 1$ , прямая 2

Исследование зависимости кинетической кривой роста от концентрации субстрата дает два параметра:  $\mu$  и  $\Phi$ . Значения  $\mu_m$  и  $K_s$  находят из обычной линейризации уравнения для удельной скорости роста (см. гл. 2). Далее, для каждой концентрации  $S_0$  при найденном значении  $K_s$  может быть вычислена функция  $K_s/(K_s + S_0)$ . Воспользовавшись данными табл. 5.1, можно записать соотношения:

$$\Phi \left( \frac{K_s + S_0}{K_s} \right) = 1 \text{ (неосложненный рост); (5.121)}$$

$$\Phi \left( \frac{K_s + S_0}{K_s} \right) = 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_p K_i} \text{ (конкурентное ингибирование); (5.122)}$$

$$\Phi \left( \frac{K_s + S_0}{K_s} \right) = 1 + \frac{Y_s S_0}{Y_0 K_i} \left( 1 + \frac{S_0}{K_s} \right) \text{ (неконкурентное ингибирование). (5.123)}$$

Видно, что механизмы роста могут быть дискриминированы на основании зависимости экспериментально найденных параметров, представленных в левой части уравнений (5.121) — (5.123) от концентрации субстрата. Как следует из уравнения (5.121), в том случае, если при развитии культуры отсутствуют процессы ингибирования избытка продукта, зависимость  $\Phi \left( \frac{K_s + S_0}{K_s} \right)$  от концентрации субстрата должна быть представ-

лена прямой линией с нулевым тангенсом угла наклона. Если развитие культуры сопровождается конкурентным ингибированием продуктом, то кривая зависимости  $\Phi\left(\frac{K_s+S_0}{K_s}\right)$  от  $S_0$  должна иметь линейный характер, тангенс угла наклона которой позволяет определить константы  $Y_s/(Y_p K_i)$ . Для микробного процесса с неконкурентным ингибированием продуктом зависимость  $\Phi\left(\frac{K_s+S_0}{K_s}\right)$  имеет не линейный, а квадратичный характер. Экспериментальные данные для механизма неконкурентного ингибирования продуктом должны линеаризоваться в координатах зависимости  $\Phi(K_s+S_0)/K_s$  от  $S_0(1+S_0/K_s)$ . Тангенс угла наклона кривой этой зависимости равен  $Y_s/(Y_p K_i)$ .

● Таким образом, кинетический анализ позволяет интерпретировать достаточно сложные кривые роста популяции микроорганизмов в условиях ингибирования продуктом и субстратом и определить основные количественные характеристики процесса.

! В данной главе рассмотрены особенности микробного роста, осложненного ингибированием продуктом ферментации. Наблюдаемый феномен может быть описан с помощью нескольких кинетических схем, которые, однако, характеризуются похожей формой кинетической кривой роста. При сильном ингибировании продуктом реакции на кинетических кривых роста клеточной популяции отсутствует ярко выраженная экспоненциальная фаза. Развитие клеточной популяции как бы сразу переходит в фазу линейного роста. Это находит свое отражение в математическом описании процесса. Для механизма, протекающего с ярко выраженным ингибированием продуктом, параметр  $\Phi$  (или  $\phi$ ), характеризующий отклонение системы от экспоненциального развития, может быть существенно больше единицы. В то же время  $\Phi$  для неосложненного роста меньше единицы, а для случая ингибирования субстратом этот пример отрицателен.

Таким образом, возникает общий подход к анализу кинетических кривых роста микробных популяций. Важно подчеркнуть, что наличие ингибирования и его механизм можно прояснить на основе использования единственной кинетической кривой роста популяции. Для этого необходимо определить параметр  $\Phi$ , используя экспериментальные данные до 50—60% конверсии субстрата. Этот параметр может быть найден либо на основе применения уравнения (5.117), либо разностного уравнения (5.120). Вычислив его и используя данные табл. 5.1, можно идентифицировать механизм протекания процесса.

Идентификация механизма дает в руки исследователя или практика мощный инструмент управления ростом популяции. Если развитие процесса протекает в условиях неосложненного роста, интенсифицировать рост клеток до определенного предела можно путем увеличения концентрации субстрата. Если параметр  $\Phi$  отрицателен и процесс протекает с ингибированием субстратом, этот эффект можно предотвратить уменьшением концентрации субстрата, при этом скорость роста популяции возрастет. Если обнаружено, что  $\Phi$  существенно превышает единицу, то ингибированию продуктом можно воспрепятствовать, уводя его из зоны ферментационного процесса.

## ГЛАВА 6

### ПЕРИОДЫ ИНДУКЦИИ НА КИНЕТИЧЕСКИХ КРИВЫХ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ

Часто наблюдаемые периоды (лаг-фаза) индукции на кинетических кривых роста микроорганизмов могут иметь различную природу. Можно представить себе по крайней мере три механизма, реализация которых приводит к появлению на кинетической кривой роста популяции периода, в течение которого не происходит увеличения числа клеток или заметного образования продуктов реакции. Следует подчеркнуть, что период индукции трудно обнаружить из зависимости числа клеток или количества продуктов от времени при прямом наблюдении за этими параметрами, поскольку логарифмический рост культуры приводит к появлению кажущейся лаг-фазы. Период индукции  $\tau$  определяется при анализе экспоненциальной фазы роста в полулогарифмических координатах из зависимости  $\ln(M/N_0)$  от  $t$  как отрезок, отсекаемый на оси абсцисс при  $\ln(M/N_0)=0$ . ▲ Период индукции может отражать следующие процессы.

1. *Неспецифическую, неферментативную трансформацию исходного субстрата в продукт*, приемлемый для дальнейшего метаболизма микроорганизмом:



Вещество  $S'$  не используется микроорганизмом в силу его химической природы или физического состояния. Процесс перехода вещества  $S'$  в субстрат  $S$  характеризуется константой скорости  $k_0$  и может представлять собой химическое превращение вещества или его физическую трансформацию (например, переход из одной фазы в другую).

2. *Адаптационные процессы в клетке*, в первую очередь синтез необходимого фермента или ферментной системы:



Состояние клеток  $N'$  характеризуется отсутствием необходимой ферментной системы и неспособностью клетки усваивать тот или иной субстрат и проводить акт деления (автоумножения биокаталитической системы). Образовавшаяся в результате адаптационного процесса клетка в состоянии  $N$  способна к автокаталитическому росту:

$$N \rightarrow 2N \quad (6.3)$$

3. *Присутствие в культуральной среде ингибитора роста, блокирующего развитие популяции.* С течением времени концентрация ингибитора  $I$  может падать в результате его расхода или вывода из системы:

$$I \xrightarrow{k_0} A \quad (6.4)$$

В качестве типичного примера данного механизма, вызывающего период индукции, можно привести влияние кислорода на рост анаэробных микроорганизмов. В присутствии заметных количеств кислорода рост популяции блокирован, однако за счет процессов восстановления кислорода или вытеснения его в газовую фазу системы «избавляется» от сильного ингибитора и начинается рост микробной популяции.

Три обсуждаемых механизма, приводящих к возникновению периода индукции, могут быть дифференцированы путем кинетического анализа и эксперимента.

#### 6.1. ТРАНСФОРМАЦИЯ ПРЕСУБСТРАТА В СУБСТРАТ

В том случае, если накопление субстрата в системе идет в соответствии со схемой (6.1), кинетику его роста описывает уравнение

$$\frac{dS}{dt} = k_0 S', \quad (6.5)$$

интегрирование которого дает

$$S = S_0 (1 - e^{-k_0 t}), \quad (6.6)$$

где  $S_0$  — начальная введенная в систему концентрация вещества  $S'$ . Если зависимость скорости роста микроорганизма от концентрации субстрата определяется классическим уравнением Моно (1.3), то дифференциальное уравнение роста будет иметь вид

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m S_0 (1 - e^{-k_0 t}) M}{K_s + S_0 (1 - e^{-k_0 t})}. \quad (6.7)$$

Это уравнение с разделяющимися переменными:

$$\frac{dM}{M} = \frac{\mu_m S_0 (1 - e^{-k_0 t})}{K_s + S_0 (1 - e^{-k_0 t})} dt. \quad (6.8)$$

Интегрирование правой части этого уравнения дает

$$\int_0^t \frac{\mu_m S_0 (1 - e^{-k_0 t})}{K_s + S_0 (1 - e^{-k_0 t})} dt = \mu_m \int_0^t \frac{dt}{1 + \frac{K_s}{S_0} - e^{-k_0 t}} = \mu_m \int_0^t \frac{e^{-k_0 t} dt}{1 + \frac{K_s}{S_0} - e^{-k_0 t}}. \quad (6.9)$$

Если ввести обозначение

$$a = 1 + K_s/S_0, \quad (6.10)$$

то интеграл правой части уравнения (6.8) будет иметь вид

$$I = \frac{\mu_m}{a} t + \frac{\mu_m}{k_0} \left( \frac{1}{a} - 1 \right) \ln \frac{a - e^{-k_0 t}}{a-1}. \quad (6.11)$$

Таким образом, решение дифференциального уравнения принимает форму

$$\ln \frac{M}{N_0} = \frac{\mu_m}{a} t + \frac{\mu_m}{k_0} \left( \frac{1-a}{a} \right) \ln \frac{a - e^{-k_0 t}}{a-1}. \quad (6.12)$$

С учетом зависимости  $a$  от концентрации субстрата имеем

$$\ln \frac{M}{N_0} = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} t - \frac{\mu_m}{k_0} \left( \frac{K_s}{K_s + S_0} \right) \ln \frac{1 + \frac{K_s}{S_0} - e^{-k_0 t}}{K_s/S_0}. \quad (6.13)$$

Из уравнения (6.13) следует, что при  $t=0$   $\ln(M/N_0)=0$  или  $M=N_0$ , т. е. уравнение (6.13) справедливо при данных начальных условиях.

В процессе развития системы экспоненциальный член, входящий в логарифмическую часть уравнения (6.14), уменьшается и достигает уровня, когда справедливо неравенство

$$e^{-k_0 t} \ll 1 \quad (6.14)$$

(или в общем случае  $e^{-k_0 t} \ll a$ ). При этом условии уравнение (6.14) трансформируется к виду

$$\ln \frac{M}{N_0} = \frac{\mu_m t}{a} + \frac{\mu_m}{k_0} \left( \frac{1-a}{a} \right) \ln \frac{a}{a-1}. \quad (6.15)$$

Это уравнение прямой, тангенс угла наклона которой представляет собой нечто иное, как удельную скорость роста микроорганизма:

$$\mu_m/a = \mu.$$

В точке  $\ln(M/N_0)=0$ , где  $t=\tau$ , имеем

$$\frac{\mu_m}{a} \tau = - \frac{\mu_m}{k_0} \left( \frac{1-a}{a} \right) \ln \frac{a}{a-1} \quad (6.16)$$

или

$$\tau_s = \frac{a-1}{k_0} \ln \frac{a}{a-1}. \quad (6.17)$$

● Таким образом, на кинетической кривой роста культуры в случае наличия в механизме процесса кинетической стадии

трансформации исходного вещества в приемлемый метаболит должен наблюдаться период индукции. Протяженность периода индукции связана с начальной концентрацией пресубстрата соотношением

$$\tau_s = \frac{K_s/S_0}{k_0} \ln \left( 1 + \frac{S_0}{K_s} \right). \quad (6.18)$$

Из уравнения (6.18) следует важная особенность кинетики процесса для механизма, включающего стадию трансформации пресубстрата: высокие концентрации пресубстрата могут полностью элиминировать период индукции.

Рассмотрим *два частных случая*.

1. Если начальная концентрация пресубстрата очень мала по сравнению с константой  $K_s$ ,  $S_0 \ll K_s$ , то

$$\left( 1 + \frac{S_0}{K_s} \right) \simeq \frac{S_0}{K_s} \quad (6.19)$$

и

$$\tau_s = 1/k_0. \quad (6.20)$$

Период индукции не зависит от концентрации субстрата и определяется только константой скорости трансформации пресубстрата в субстрат.

2. Если начальная концентрация пресубстрата существенно превышает значение константы  $K_s$ ,  $S_0 \gg K_s$ , то имеем

$$\tau_s = \frac{(K_s/S_0) \ln(S_0/K_s)}{k_0}. \quad (6.21)$$

Период индукции существенно уменьшается с увеличением начальной концентрации пресубстрата. В пределе при  $S_0 \rightarrow \infty$   $\tau_s \rightarrow 0$ , т. е. при больших концентрациях субстрата период индукции отсутствует.

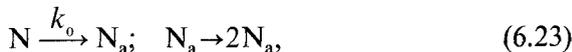
## 6.2. АДАПТАЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС

Если период индукции связан с каталитической адаптацией организма к новым условиям, то популяция введенных в систему клеток будет состоять из двух видов:

$$M = N + N_a, \quad (6.22)$$

где клетки типа  $N$  не адаптированы к новым условиям (не прошел синтез необходимых ферментов); клетки типа  $N_a$  — адаптированные клетки, способные к активному процессу деления.

Кинетическая схема для обсуждаемого случая имеет вид



где  $k_0$  — константа скорости адаптационного процесса.

Систему уравнений, описывающих кинетику роста, можно представить в виде

$$-\frac{dN}{dt} = k_0 N; \quad (6.24)$$

$$\frac{dN_a}{dt} = k_0 N + \mu N_a. \quad (6.25)$$

Для того чтобы найти, как в системе растет общее число клеток, необходимо рассчитать динамику изменения количества (концентраций) клеток типа  $N$  и  $N_0$  и затем, используя (6.24), выяснить динамику изменения общего числа клеток:

$$N = N_0 e^{-k_0 t}, \quad (6.26)$$

где  $N_0$  — начальная концентрация клеток, введенная с инокулятом.

Используя уравнения (6.25) и (6.26), находим

$$\frac{dN_a}{dt} - \mu N_a = k_0 N_0 e^{-k_0 t}. \quad (6.27)$$

Уравнение (6.27) представляет собой неоднородное линейное уравнение с постоянными коэффициентами; его решение имеет вид

$$N_a(t) = C(t) e^{\mu t}, \quad (6.28)$$

где функция  $C(t)$  может быть найдена путем подстановки функции  $N_a(t)$  (6.28) в уравнение (6.27):

$$\frac{dC(t)}{dt} e^{\mu t} + \mu e^{\mu t} C(t) - \mu C(t) e^{\mu t} = k_0 N_0 e^{-k_0 t}. \quad (6.29)$$

Из этого уравнения следует

$$\frac{dC}{dt} = k_0 N_0 e^{-(k_0 + \mu)t} \quad (6.30)$$

или

$$C(t) = \int_0^t k_0 N_0 e^{-(k_0 + \mu)t} dt = \frac{k_0 N_0}{k_0 + \mu} [1 + e^{-(k_0 + \mu)t}], \quad (6.31)$$

соответственно

$$N_a(t) = \frac{k_0 N_0}{k_0 + \mu} (e^{\mu t} - e^{-k_0 t}). \quad (6.32)$$

После подстановки (6.26) и (6.32) в (6.22) имеем

$$M = \frac{k_0 N_0}{k_0 + \mu} e^{\mu t} + \frac{N_0 \mu}{k_0 + \mu} e^{-k_0 t}. \quad (6.33)$$

Из уравнения (6.33) видно, что при  $t=0$ ,  $M=N_0$ , при больших  $t$ , когда  $k_0 e^{\mu t} \gg \mu e^{-k_0 t}$ , уравнение (6.33) трансформируется в обычное уравнение экспоненциального роста.

Преобразуем уравнение (6.33) в форму, удобную для анализа в полулогарифмических координатах:

$$\frac{M}{N_0} = \frac{k_0}{k_0 + \mu} e^{\mu t} + \frac{\mu}{k_0 + \mu} e^{-k_0 t}; \quad (6.34)$$

$$\ln \frac{M}{N_0} = \mu t + \ln \left\{ \frac{k_0}{k_0 + \mu} \left[ 1 + \frac{\mu}{k_0} e^{-(k_0 + \mu)t} \right] \right\}. \quad (6.35)$$

Из уравнения (6.35) следует, что при больших временах процесса в условиях, когда  $(\mu/k_0)e^{-(k_0 + \mu)t} \ll 1$ , зависимость от времени (6.35) вырождается в линейную функцию:

$$\ln \frac{M}{N_0} = \mu t + \ln \frac{k_0}{k_0 + \mu}. \quad (6.36)$$

Тангенс угла наклона зависимости (6.36) равен удельной скорости роста микроорганизма; отрезок, отсекаемый прямой на оси времени (период индукции), имеет вид

$$\tau_a = \frac{1}{\mu} \ln \left( 1 + \frac{\mu}{k_0} \right). \quad (6.37)$$

▲ Если использовать для  $\mu$  уравнение типа уравнения Моно, можно найти зависимость периода индукции от концентрации субстрата:

$$\tau_a = \frac{1}{\mu} \ln \left( 1 + \frac{\mu}{k_0} \right). \quad (6.38)$$

Рассмотрим три важных частных случая:

1. Если удельная скорость роста организма существенно превышает скорость адаптационного процесса ( $\mu \gg k_0$ ), то период индукции имеет конечное значение, представленное уравнением

$$\tau_a = \frac{\ln(\mu/k_0)}{\mu}. \quad (6.39)$$

2. Если скорость адаптационного процесса существенно выше, чем удельная скорость роста культуры, то период индукции, связанный с адаптационным процессом, не будет замечен. Действительно, если

$$\mu/k_0 \ll 1, \quad \mu \ll k_0, \quad \text{то } \tau_a = 0. \quad (6.40)$$

3. Увеличение концентрации субстрата приводит к увеличению удельной скорости роста культуры. В пределе при  $S_0 \rightarrow \infty$  имеем

$$\tau_a = \frac{1}{\mu_m} \ln \left( 1 + \frac{\mu_m}{k_0} \right). \quad (6.41)$$

Это предельная величина периода индукции, которая должна наблюдаться при бесконечно большой концентрации субстрата.

### 6.3. РАСХОДУЕМЫЙ ИНГИБИТОР РОСТА

Рассмотрим кинетику процесса в условиях присутствия сильного ингибитора, расходуемого в независимом от роста культуры процессе. Предполагается, что ингибитор, равновесно взаимодействуя с ключевой ферментной системой, предотвращает рост культуры:



При этом комплекс NI не активен в автокаталитическом процессе роста.

Концентрация ингибитора в системе в соответствии со схемой (6.4) может быть описана дифференциальным уравнением

$$\frac{dI}{dt} = -k_0 I \quad (6.43)$$

и как функция времени будет иметь вид

$$I = I_0 e^{-k_0 t}, \quad (6.44)$$

где  $I_0$  — концентрация ингибитора в начальный момент времени.

Дифференциальное уравнение для скорости роста культуры в условиях, при которых часть клеток будет находиться в неактивном комплексе NI, можно записать в форме

$$\frac{dN}{dt} = \mu(N - NI). \quad (6.45)$$

Концентрация клеток в инактивированном состоянии будет дана функцией

$$NI = \frac{NI}{K_i} = N \frac{I}{K_i} e^{-k_0 t}. \quad (6.46)$$

После подстановки (6.46) в (6.45) имеем

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left( 1 - \frac{I_0}{K_i} e^{-k_0 t} \right). \quad (6.47)$$

Решение этого дифференциального уравнения с разделяющимися переменными имеет вид

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu \int_0^t \left( 1 - \frac{I_0}{K_i} e^{-k_0 t} \right) dt = \mu t + \frac{I_0 \mu}{k_0 K_i} (e^{-k_0 t} - 1) \quad (6.48)$$

или

$$\ln \frac{N}{N_0} = \frac{\mu_m S_0 t}{K_s + S_0} + \frac{I_0 \mu_m S_0}{k_0 K_i (K_s + S_0)} (e^{-k_0 t} - 1). \quad (6.49)$$

С течением времени экспоненциальный член, входящий в уравнения (6.44) и (6.49), уменьшается при временах, превышающих  $1/k_0$ , и становится пренебрежимо мал по сравнению с единицей. В этом случае зависимость  $\ln(N/N_0)$  представляет собой линейную функцию от времени:

$$\ln \frac{N}{N_0} = \mu t - \frac{\mu I_0}{k_0 K_i}. \quad (6.50)$$

▲ Тангенс угла наклона этой зависимости представляет собой удельную скорость роста культуры; отрезок, отсекаемый на оси времени, — период индукции, равный

$$\tau_i = (I_0/K_i)(1/k_0). \quad (6.51)$$

В этом случае период индукции на кинетической кривой роста культуры не зависит от концентрации субстрата или удельной скорости роста микроорганизма, а определяется только концентрацией ингибитора.

#### 6.4. ДИСКРИМИНАЦИЯ МЕХАНИЗМОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Проведенный выше анализ показывает, что три обсуждаемых механизма появления на кинетических кривых роста периода индукции описываются различающимися уравнениями, которые могут быть сопоставлены с экспериментальными данными.

Достаточно несложно показать участие или отсутствие в механизме процесса ингибитора, блокирующего развитие культуры. Если экспериментально найденный при различных концентрациях субстрата или удельной скорости роста культуры, то можно думать, что период индукции связан с действием расходуемого ингибитора [уравнение (6.51)]. Строгим доказательством этого можно считать обнаружение линейной зависимости между концентрацией введенного в систему ингибитора и периодом индукции.

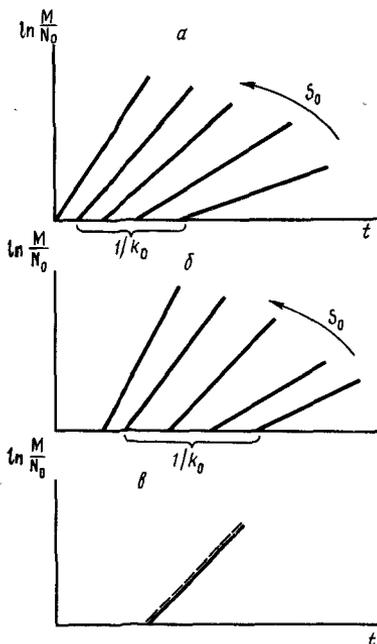


Рис. 6.1. Кинетические кривые роста микробных популяций в экспоненциальной фазе в полулогарифмических координатах для различных механизмов роста:

*a* — конверсия пресубстрата в субстрат; *б* — адаптационный процесс; *в* — расход ингибитора роста

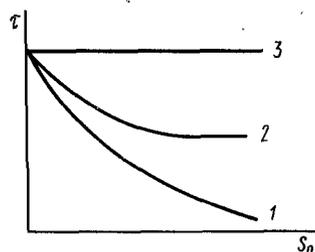


Рис. 6.2. Зависимость периода индукции от концентрации субстрата для различных механизмов, определяющих период индукции:

1 — конверсия пресубстрата в субстрат; 2 — адаптационный процесс; 3 — расходуемый ингибитор роста

Из рис. 6.1, *в* видно, что кинетические кривые роста в экспоненциальной фазе зависят от концентрации субстрата (это указывает на механизм с расходуемым ингибитором роста). В двух других случаях (рис. 6.1, *a*, *б*) наблюдается ярко выраженная зависимость  $\tau$  от концентрации субстрата, при этом предельно большой период индукции, реализуемый при малых концентрациях субстрата, соответствует обратному значению константы скорости конверсии пресубстрата в субстрат (рис. 6.1, *a*) или адаптационного процесса (рис. 6.1, *б*). Для механизма с конверсией пресубстрата в субстрат период индукции элиминируется высокими концентрациями субстрата. При адаптационном процессе, даже при очень высоких концентрациях субстрата, может детектироваться остаточный предельный период индукции.

● Два последних механизма можно дискриминировать на основании изучения зависимости периода индукции от

начальной концентрации субстрата или удельной скорости роста.

Из уравнений (6.18) и (6.38) следует, что при  $S_0 \rightarrow 0$   $S_0/K_s$  становится много меньше единицы, а

$$\tau_s \xrightarrow{S_0 \rightarrow 0} 1/k_0; \quad \tau_a \xrightarrow{S_0 \rightarrow 0} 1/k_0. \quad (6.52)$$

При  $S_0/K_s \ll 1$  логарифмические функции в уравнениях (6.18) и (6.38) разлагаются в быстро расходящийся ряд относительно параметра  $S_0/K_s$  или  $\frac{\mu_m S_0}{K_s k_0}$ . Эта зависимость позволяет определить параметр  $k_0$ :

$$k_0 = 1 / \lim_{S_0 \rightarrow 0} \tau_{a,s}. \quad (6.53)$$

Однако при больших концентрациях субстрата зависимости периода индукции от начальной концентрации субстрата существенно различаются:

$$\tau_s (\text{при } S_0 \rightarrow \infty) = 0; \quad (6.54)$$

$$\tau_0 (\text{при } S_0 \rightarrow \infty) = \frac{\ln \left( 1 + \frac{\mu_m}{k_0} \right)}{\mu_m}. \quad (6.55)$$

В случае адаптационного механизма период индукции не снимается высокими концентрациями субстрата.

Рис. 6.2 иллюстрирует зависимость периода индукции от концентрации субстрата для всех обсуждаемых механизмов процесса. Совершенно аналогично выглядят зависимости периода индукции от удельной скорости роста популяции.

Зависимости периода индукции для механизмов (6.1) и (6.2) от экспериментально найденной удельной скорости роста имеют вид

$$\tau_s = \frac{\mu_m - \mu}{k_0 \mu} \ln \frac{\mu_m}{\mu_m - \mu}; \quad (6.56)$$

$$\tau_a = \frac{1}{\mu} \ln \left( 1 + \frac{\mu}{k_0} \right). \quad (6.57)$$

Совершенно аналогично

$$\tau_s (\text{при } \mu \rightarrow 0) = 1/k_0; \quad \tau_a (\text{при } \mu \rightarrow 0) = 1/k_0, \quad (6.58)$$

в то же время большие концентрации субстрата и высокие удельные скорости роста ( $\mu \rightarrow \mu_m$ ) приводят к уравнениям (6.54) и (6.55).

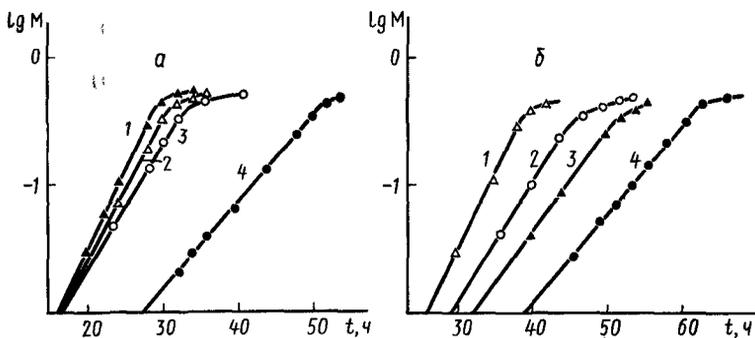


Рис. 6.3. Кривые роста *Pseudomonas aeruginosa* Pl (г/л) на среде с хинолином при различных концентрациях ионов железа (М) в полулогарифмических координатах (Н. В. Дзумедзей и др., 1983):  
 а— $\text{Fe}^{2+}$ ; б— $\text{Fe}^{3+}$ ;  $C_{\text{Fe}} \cdot 10^6$  (1—13; 2—72; 3—36; 4—18)

Параметр  $k_0$  может быть вычислен на основе использования уравнений (6.56) и (6.57). Для механизма с участием стадии конверсии пресубстрата

$$k_0 = \frac{\mu_m - \mu}{\tau_s \mu} \ln \frac{\mu_m}{\mu_m - \mu}. \quad (6.59)$$

При найденном значении  $\mu_m$  и вычислении переменной  $\rho = \left(1 - \frac{\mu_m}{\mu}\right) \ln \left(1 - \frac{\mu}{\mu_m}\right)$  в случае справедливости этого механизма должно наблюдаться постоянство  $\rho/\tau_s$  при вариации удельной скорости роста культуры. Эта постоянная равна константе скорости конверсии пресубстрата в субстрат.

В случае механизма (6.2) должно выполняться соотношение

$$e^{\mu \tau_s} = 1 + \mu/k_0, \quad (6.60)$$

т. е. должна наблюдаться линейная зависимость между переменной  $e^{\mu \tau_s}$  и  $\mu$ , проходящей через единицу. Тангенс угла наклона этой зависимости дает значение  $1/k_0$ .

Проиллюстрируем сделанные выводы, имеющиеся в литературе, экспериментальными данными (рис. 6.3). Определим природу наблюдаемых лаг-периодов, представленных на рисунке отрезками, отсекаемыми на оси абсцисс. Так как периоды индукции для обоих примеров зависят от концентрации иона железа и уменьшаются с ростом его концентрации, то можно исключить из рассмотрения механизм с расходуемым ингибитором роста (см. рис. 6.1). В случае  $\text{Fe}^{2+}$  лаг-период с увеличением концентрации субстрата уменьшается и стремится к постоянному значению ( $\sim 16$  ч) (рис. 6.3, а), что говорит об адаптационном механизме природы  $\tau$ . Для  $\text{Fe}^{3+}$  ситуация сложнее.

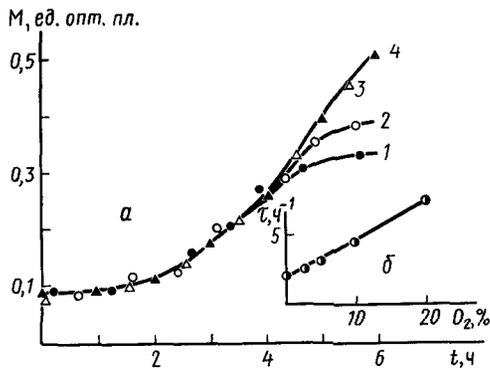


Рис. 6.4. Кривые роста термофильной водородообразующей бактерии *Thermoanaerobium lactoethylicum* при различных концентрациях глюкозы (1—2,8 мМ; 2—5,5 мМ; 3—13,9 мМ; 4—27,8 мМ) (а) и зависимость величин периодов индукции от концентрации кислорода (б) (В. И. Скляр и др., 1986 г.)

→ Fe<sup>2+</sup>) существенную роль играет и механизм, связанный с адаптационными процессами в клетке. Кинетику этих процессов иллюстрирует рис. 6.3, а, на котором отчетливо виден предел уменьшения периода индукции τ.

Определим некоторые параметры. Как видно из рис. 6.3, а, τ<sub>а</sub> (при S<sub>0</sub> → ∞) равен 16 ч. В соответствии с уравнением (6.60) имеем

$$e^{\mu_m \tau_a} = 1 + \mu_m / k_0,$$

поскольку процесс проводится при насыщении по субстрату. Следовательно,

$$k_0 = \mu_m / e^{\mu_m \tau_a} - 1.$$

Данные, приведенные на рис. 6.3, дают значение  $\mu_m = 0,1 \text{ ч}^{-1}$ , отсюда  $k_0 = 0,025 \text{ ч}^{-1}$ .

Как отмечалось выше, типичным примером проявления механизма с расходуемым ингибитором роста является влияние молекулярного кислорода на развитие анаэробных бактерий (рис. 6.4, а). Видно, что лаг-период практически не зависит от концентрации глюкозы как лимитирующего субстрата. Сопоставление этих экспериментальных результатов с теоретическими (см. рис. 6.2) указывает на то, что в данном случае наиболее вероятен механизм, согласно которому в течение лаг-фазы кислород как ингибитор расходуется в процессе развития популяции (поглощается как окислитель или вытесняется из среды образующимся водородом). Доказательством этому служит линейная зависимость периода индукции от

С одной стороны, увеличение концентрации Fe<sup>3+</sup> приводит к уменьшению τ, который не стремится к постоянному значению (рис. 6.3, б), что говорит в пользу механизма с конверсией пресубстрата. В данном случае, по-видимому, осуществляется переход Fe<sup>3+</sup> → Fe<sup>2+</sup>. С другой стороны, даже при относительно больших концентрациях Fe<sup>3+</sup> лаг-период не снимается. Это говорит о том, что природа τ в данном случае смешанная. Наряду с механизмом конверсии пресубстрата (Fe<sup>3+</sup> →

начальной концентрации кислорода в культурной среде (рис. 6.4, б). Из тангенса угла наклона этой прямой в соответствии с (6.54) получаем произведение  $K_i/k_0$ , равное  $3,6 (\% \cdot \text{ч}^{-1})$ . Отрезок, отсекаемый на оси ординат, по-видимому, соответствует значению адаптационного лаг-периода ( $\sim 2$  ч).

! В данной главе были рассмотрены основные механизмы, приводящие к появлению на кинетической кривой роста микробной популяции хорошо идентифицированных периодов индукции. Лаг-фаза в росте культуры микроорганизмов может быть связана с процессом накопления в среде вещества, являющегося истинным субстратом для микроорганизма, может определяться адаптационными процессами синтеза необходимых ферментов и служить отражением процесса расхода сильного ингибитора роста. По-видимому, эти случаи не исчерпывают всей совокупности возможных процессов, приводящих к задержкам на кинетических кривых роста микроорганизмов, однако описывают значительную долю наблюдаемых экспериментальных кривых.

Проведенные кинетические расчеты показывают, что эти основные случаи могут быть различены, определены и интерпретированы на основе кинетического эксперимента. Основой интерпретации, как это часто бывает в кинетике, являются зависимости кинетического параметра, в данном случае периода индукции, от начальной, вводимой в процесс концентрации субстрата. Информация, полученная таким путем, может быть использована для интенсификации процесса и элиминирования продолжительной лаг-фазы.

## ГЛАВА 7

### КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В РЕЖИМЕ ХЕМОСТАТА

Культивирование микроорганизмов в открытых системах (проточных реакторах) — один из наиболее перспективных и развитых способов их выращивания. Преимущества этого способа культивирования состоят в стандартности условий проведения процесса, высокой производительности, возможностях тонкого управления кинетикой роста популяции. Кинетические закономерности роста и эволюции микробных популяций в открытых системах достаточно просты и наиболее изучены\*.

Ниже анализируются основные уравнения, описывающие рост популяции в режиме хемостата, при этом главное внимание обращено на дискриминацию механизмов и условий роста, на сопоставление теории и эксперимента, на определение экспериментальных данных параметров роста культур.

#### 7.1. НЕОСЛОЖНЕННЫЙ РОСТ

Рассмотрим кинетические закономерности роста микроорганизмов в открытой системе при непрерывной подаче субстрата.

Представим, что в сосуд объемом  $V$  подается раствор лимитирующего субстрата с концентрацией  $S_0$  с объемной скоростью  $u$ . Под действием микроорганизма субстрат конвертируется в продукт (продукты)  $P$  и осуществляется прирост биомассы. Поскольку система ограничена по объему, избыточный раствор непрореагировавшего субстрата, продуктов реакции и часть клеток микроорганизмов выводятся из реакционного объема с той же объемной скоростью  $u$ . Предполагается, что режим перемешивания в реакторе организован таким образом, что обеспечивает постоянные по всему объему концентрации субстрата  $S$ , продукта  $P$  и клеток  $M$ . Эти условия так называемого безградиентного ферментера известны еще и как режим *хемостата*.

Через некоторое время в системе устанавливаются стационарные концентрации исходного субстрата, продуктов реакции, числа клеток (биомассы) микроорганизма. Рассмотрим, каково

---

\* Читатель может ознакомиться с основами кинетики роста микроорганизмов в проточных реакторах в монографиях Дж. Пёрта (1978) и Н. С. Печуркина (1975).

значение стационарных концентраций компонентов процесса, как эти стационарные концентрации зависят от параметров роста культуры, от скорости ввода в систему субстрата.

Динамика изменения в системе концентрации клеток  $M$  определяется скоростью роста культуры  $\mu$  и скоростью вывода ее из ферментера:

$$\frac{dM}{dt} = \mu M - \frac{u}{V} M. \quad (7.1)$$

Параметр  $u/V$ , имеющий размерность обратного времени, называется скоростью разбавления  $D$ .

Экспериментально параметр  $D$  может быть найден при изучении кинетики вымывания какого-либо вещества  $A$ , присутствующего в ферментере в начальный момент времени  $t=0$ . Скорость вывода вещества  $A$  описывается уравнением

$$\frac{dA}{dt} = -DA, \quad (7.2)$$

которое приводит к экспоненциальной зависимости вида

$$A(t) = A_0 e^{-Dt}, \quad (7.3)$$

где  $A_0$  — концентрация  $A$  в начальный момент времени. Линейаризация экспериментальных данных в координатах уравнения

$$\ln \frac{A(t)}{A_0} = -Dt, \quad (7.4)$$

позволяет утверждать, что используемая система достаточно хорошо описывается уравнениями идеального, безградиентного, реактора с перемешиванием и позволяет определить параметр  $D$ .

Изменение концентрации исходного субстрата будет описываться дифференциальным уравнением

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \frac{1}{Y_s} \mu(S) M. \quad (7.5)$$

Первое слагаемое в этом уравнении характеризует скорость ввода субстрата, второе — вывод из системы непрореагировавшего субстрата, третье — расход субстрата в результате его потребления для роста культуры.

Соответственно концентрация продукта ферментационной конверсии  $P$  также зависит от скорости роста микроорганизма и скорости протока:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_p} \mu(S) M - DP. \quad (7.6)$$

Первое слагаемое характеризует скорость ферментационного накопления продукта, второе — вывод продукта из ферментера.

Если принять, что удельная скорость роста микроорганизма как функция концентрации субстрата дается уравнением Моно (1.3), то все кинетические закономерности роста культуры в режиме хемостата описывает система уравнений

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m SM}{K_s + S} - DM; \quad (7.7)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_s} \frac{\mu_m SM}{K_s + S}; \quad (7.8)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_p} \frac{\mu_m SM}{K_s + S} - DP. \quad (7.9)$$

Если система функционирует при постоянной скорости разбавления  $D$  достаточно большое время, то концентрации биомассы, субстрата и продукта становятся постоянными, не зависящими от времени. В этих условиях  $dM/dt=0$ ,  $dS/dt=0$ ,  $dP/dt=0$ . Условия равенства нулю во времени всех компонентов процесса соответствуют условиям стационарности.

● Из уравнений (7.7)—(7.9) в условиях стационарности следует ряд важных выводов.

*В стационарном режиме удельная скорость роста микроорганизма соответствует скорости разбавления.* При  $dM/dt=0$  из уравнения (7.9) следует

$$\mu(S) = D.$$

Таким образом, скоростью разбавления в рамках определенных ограничений (см. ниже) можно задавать удельную скорость роста культуры.

*Стационарная концентрация субстрата  $S_{ст}$  в ферментере определяется скоростью разбавления и кинетическими параметрами роста микроорганизма и не зависит от начальной концентрации субстрата.* Из уравнения (7.7) следует

$$S_{ст} = \frac{DK_s}{\mu_m - D}. \quad (7.10)$$

Стационарная концентрация субстрата в ферментере тем меньше, чем больше максимальная удельная скорость роста культуры и чем меньше значение константы сродства микроорганизма к субстрату  $K_s$ . Важно подчеркнуть, что  $S_{ст}$  не зависит от концентрации вводимого субстрата. Это позволяет говорить об аутостабилизации условия роста культуры по субстрату в режиме хемостата (Н. С. Печуркин, 1978).

Зависимость стационарной концентрации субстрата от скорости разбавления имеет сложный характер. При низких скоростях разбавления в условиях  $D \ll \mu_m$  стационарная кон-

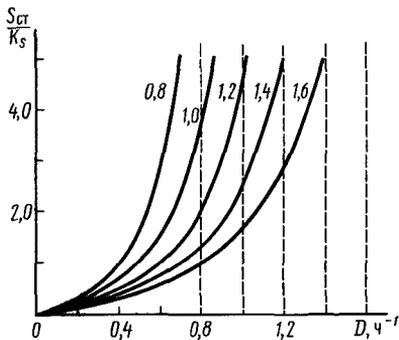


Рис. 7.1. Зависимость относительной стационарной концентрации субстрата  $S_{ст}/K_s$  от скорости разбавления при различных значениях  $\mu_m$ ,  $\text{ч}^{-1}$  (цифры на кривых); пунктирные линии —  $D_c = \mu_m$

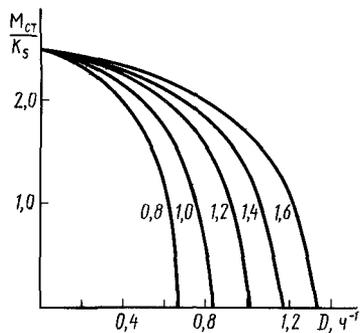


Рис. 7.2. Зависимость относительной стационарной концентрации биомассы от скорости разбавления при различных значениях  $\mu_m$ ,  $\text{ч}^{-1}$  (цифры на кривых);  $S_0/K_s$  принято равным 5,0;  $Y_s = 0,5$

центрация субстрата линейно зависит от скорости разбавления (рис. 7.1):

$$S_{ст} \approx \frac{K_s}{\mu_m} D. \quad (7.11)$$

При скоростях разбавления, приближающихся к  $\mu_m$  ( $D \rightarrow \mu_m$ ), стационарная концентрация субстрата начинает неограниченно расти.

Стационарная концентрация биомассы линейно зависит от концентрации вводимого в ферментер раствора субстрата. Из уравнения (7.7) следует (рис. 7.2)

$$M_{ст} = Y_s \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m - D} \right). \quad (7.12)$$

Видно, что при  $D \rightarrow 0$   $M_{ст} \approx S_0 Y_s$  (рис. 7.3).

Из рисунка следует, что стационарная концентрация метанола при постоянной  $D$  не зависит от концентрации вводимого раствора субстрата, а стационарная концентрация биомассы в условиях неосложненного роста линейно возрастает с увеличением начальной концентрации метанола.

Рост культуры в режиме хемостата характеризуется критической скоростью разбавления  $D_c$ , выше которой не наблюдается роста популяции. При скоростях разбавления, соизмеримых с максимальной скоростью роста микроорганизма, культура вымывается из ферментера. Значение критической скорости разбавления может быть найдено из уравнения (7.12) при условии, что  $M_{ст} = 0$  (при этом  $S = S_0$ ):

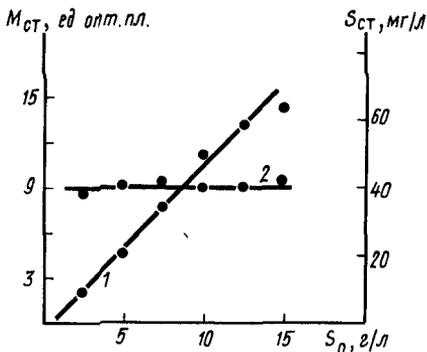


Рис. 7.3. Эффект аутостабилизации концентрации метанола, лимитирующего рост популяции псевдомонад в проточной культуре при  $D=0,35 \text{ ч}^{-1}$  (R. J. Mateles, E. Battat, 1975):  
 1 — концентрация биомассы; 2 — концентрация метанола в среде

от этих переменных стационарной концентрации клеток.

### 7.1.1. Определение параметров роста культуры из данных по стационарным состояниям компонентов процесса

Определение таких параметров, как  $Y_s$ ,  $Y_p$ ,  $\mu_m$ ,  $K_s$ , необходимо при описании роста микроорганизмов в режиме хемостата. Наиболее просто могут быть найдены экономические коэффициенты  $Y_s$  и  $Y_p$  из уравнений (1.7), (3.17). Для этого необходимо знать стационарные концентрации субстрата, биомассы и продукта. В рамках рассматриваемого приближения предполагается, что  $Y_s$  и  $Y_p$  постоянны в течение развития процесса и не зависят от скорости потока. Это допущение в большинстве случаев оправдано, хотя возможны и существенные отклонения. Проверкой этого предположения является независимость найденных параметров  $Y_s$  и  $Y_p$  от скорости разбавления.

Кроме того, значение  $Y_s$  также может быть найдено как тангенс угла наклона зависимости  $M_{ст}$  от  $S_0$ . Например, из данных, представленных на рис. 7.3, следует, что  $Y_s$  для роста изученной культуры в исследованном диапазоне концентраций равен 1.12 оп.ед/(г/л).

**Изучение зависимости стационарной концентрации субстрата от скорости разбавления.** Воспользуемся одной из анаморфоз уравнения (7.10):

$$D_c = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}. \quad (7.13)$$

Графически  $D_c$  может быть найдено из точки пересечения кривых с осью абсцисс (рис. 7.2).

Стационарная концентрация продукта линейно связана с концентрацией вводимого субстрата:

$$P_{ст} = \frac{M_{ст}}{Y_p}, \quad P_{ст} = \frac{Y_s}{Y_p} \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m - D} \right). \quad (7.14)$$

Зависимость стационарной концентрации продукта от  $S_0$  и  $D$  аналогична зависимости

$$\frac{1}{S_{\text{ст}}} = \frac{\mu_m}{K_s} \frac{1}{D} - \frac{1}{K_s} \quad (7.15)$$

или

$$D = \mu_m - K_s \frac{D}{S_{\text{ст}}} \quad (7.16)$$

Согласно уравнению (7.15), зависимость  $1/S_{\text{ст}}$  от  $1/D$  должна представлять прямую с тангенсом угла наклона  $\mu_m/K_s$ ; отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен  $-1/K_s$  (рис. 7.4). Значение  $\mu_m$  может быть найдено из длины отрезка, отсекаемого прямой на оси абсцисс.

Использование уравнения (7.16) также позволяет графически найти значения  $\mu_m$  и  $K_s$ . Тангенс угла наклона дает значение  $K_s$ ; отрезок, отсекаемый на оси  $D$ , —  $\mu_m$ .

Для определения  $\mu_m$  и  $K_s$  из зависимости  $S_{\text{ст}}$  от  $D$  экспериментально необходимо найти  $S_{\text{ст}}$  ( $S_1$  и  $S_2$ ) по крайней мере при двух значениях скорости разбавления ( $D_1$  и  $D_2$ ). В этом случае параметры  $\mu_m$  и  $K_s$  могут быть вычислены по формуле

$$K_s = \frac{D_1 - D_2}{\frac{D_2}{S_2} - \frac{D_1}{S_1}} \quad (7.17)$$

**Изучение зависимости стационарной концентрации биомассы от скорости разбавления и вводимой концентрации субстрата.** Как следует из уравнения (7.12), стационарная концентрация биомассы линейно зависит от начальной концентрации субстрата (рис. 7.6). Из данных рисунка можно определить  $Y_s$  и отрезок, отсекаемый на оси абсцисс:

$$a = -\frac{DK_s Y_s}{\mu_m - D} \quad (7.18)$$

В том случае, если  $Y_s$  не зависит от скорости потока в ферментере, тангенсы углов наклона прямых  $M_{\text{ст}}$  от  $S_0$  должны быть одинаковы. Если  $M_{\text{ст}}$  известно, то параметры роста культуры  $\mu_m$  и  $K_s$  можно установить используя линейную анаморфозу уравнения (7.12):

$$\frac{1}{S_0 - M_{\text{ст}}/Y_s} = \frac{\mu_m}{DK_s} - \frac{1}{K_s} \quad (7.19)$$

Так же как и в случае уравнения (7.15), тангенс угла наклона зависимости  $1/S_0 - M_s/Y_s$  от  $1/D$  дает значение  $\mu_m/K_s$ , отрезок, отсекаемый на оси ординат, —  $1/K_s$ . Уравнение (7.20) полностью соответствует уравнению (7.15), поскольку  $S_{\text{ст}} = S_0 - M_s/Y_s$ .

Совершенно аналогично параметры роста культуры могут быть найдены и при использовании другой анаморфозы уравнения (7.12)

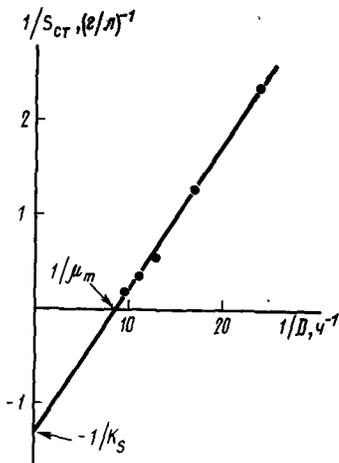


Рис. 7.4. Графический метод определения кинетических параметров на основе уравнения (7.15) (К. И. Гришин и др., 1983). [Хемостатное культивирование *Thiobacillus ferrooxidans*, pH 2,3, 30° С ( $\text{Fe}^{2+}$ )<sub>0</sub> = 9 г/л.]

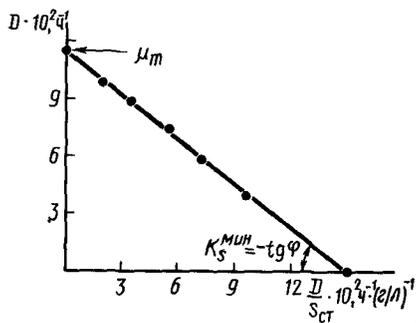


Рис. 7.5. Данные рис. 7.4 в координатах уравнения (7.16)

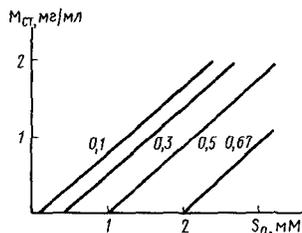


Рис. 7.6. Теоретические зависимости стационарной концентрации биомассы от начальной концентрации субстрата при различных скоростях разбавления: параметры:  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_s = 1 \text{ мМ}$ ;  $Y_s = 1,0 \text{ мг}/(\text{мл} \cdot \text{мМ})$ ;  $D$ ,  $\text{ч}^{-1}$  — цифры на прямых

$$\frac{D}{S_0 - M_{\text{ст}}/Y_s} = \frac{\mu_m}{K_s} \frac{D}{K_s} \quad (7.20)$$

из зависимости  $D / (S_0 - M_{\text{ст}}/Y_s)$  от  $D$ .

Если значения  $M_{\text{ст}}$  ( $M_1$  и  $M_2$ ) определены при двух различающихся скоростях разбавления  $D_1$  и  $D_2$ , то параметры  $\mu_m$  и  $K_s$  могут быть вычислены по уравнениям

$$\mu_m = \frac{M_2 - M_1}{\frac{Y_s S_0 - M_1}{D_1} - \frac{Y_s S_0 - M_2}{D_2}}; \quad (7.21)$$

$$K_s = \frac{1}{Y_s} \frac{D_1 - D_2}{\frac{D_2}{Y_s S_0 - M_1} - \frac{D_1}{Y_s S_0 - M_2}}. \quad (7.22)$$

Кинетические параметры роста популяции могут быть установлены также и при исследовании стационарного уровня продукта как функции скорости разбавления. Из уравнения

(7.14) видно, что стационарная концентрация продукта связана со стационарной концентрацией биомассы. Поэтому для определения параметров роста из данных по стационарным уровням продукта полностью применимы методы, описанные при исследовании системы по накоплению биомассы.

## 7.2. ИНГИБИРОВАНИЕ СУБСТРАТОМ

Рассмотрим закономерности развития культуры в хемостате, если рост микроорганизма ингибируется избытком субстрата. Основные дифференциальные уравнения, описывающие кинетику процесса, имеют вид базовых уравнений типа (7.1), (7.5), (7.6), только удельную скорость роста культуры как функцию концентрации субстрата надо представить в виде уравнения (4.73).

В стационарном состоянии в условиях  $dM/dt=0$   $dS/dt=0$ ,  $dP/dt=0$  кинетику процесса описывает система уравнений

$$\frac{\mu_m S_{ст}}{K_s + S_{ст} + S_{ст}^2/K_i} = D; \quad (7.23)$$

$$D(S_0 - S_{ст}) = \frac{\mu_m S_{ст}}{K_s + S_{ст} + S_{ст}^2/K_i} \frac{M_{ст}}{Y_s}; \quad (7.24)$$

$$\frac{\mu_m S_{ст} M_{ст}}{K_s + S_{ст} + S_{ст}^2/K_i} = DP_{ст} Y_p. \quad (7.25)$$

Так же как и в случае неосложненного ингибирования процесса, видно, что скоростью разбавления можно задавать системе удельную скорость роста популяции:

$$\mu(S) = D. \quad (7.26)$$

Принципиальной особенностью системы с ингибированием избытком субстрата в проточном режиме является существование двух устойчивых, стационарных состояний. Это следует из анализа уравнения (7.23). Рассмотрим его графическое решение (рис. 7.7). Прямые, параллельные оси  $S$ , представляют собой функции  $\mu = \text{const} = D$ . Пересечения этих прямых с графиком  $\mu(S)$  дают значения  $S_{ст}$ , представляющие собой корни уравнения (7.23). Из рисунка видно, что система может функционировать в трех принципиально различных режимах.

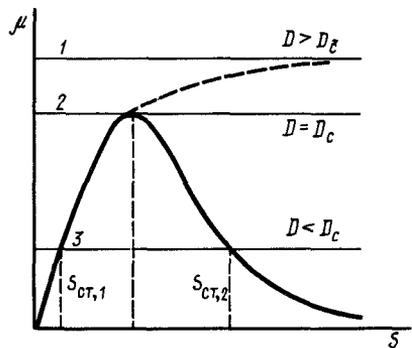


Рис 7.7 Графическое решение уравнение (7.24)

Если  $D > D_c$ , где  $D_c$  — некоторая критическая скорость разбавления, то в системе вообще невозможно образование стационарного состояния, кривая  $\mu(S)$  и прямая  $\mu = D$  не имеют общей точки пересечения. Эту ситуацию иллюстрирует прямая 1, которая соответствует случаю  $D = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}$ . Таким образом, в отличие от процесса неосложненного ингибирования субстратом критическая скорость разбавления, при которой возможно стационарное состояние, для системы с ингибированием субстратом ниже  $\mu_m S_0 / (K_s + S_0)$ .

При  $D = D_c$  система может иметь одно стационарное состояние. Это иллюстрируется пересечением  $\mu(S)$  с прямой 2 в точке максимума.

Наконец, если  $D < D_c$ , в ферментере могут быть реализованы два стационарных состояния. Прямая 3 с кривой  $\mu(S)$  имеет две точки пересечения, два стационарных состояния, характеризующихся различными значениями  $S_{ст,1}$ ,  $M_{ст,1}$  и  $S_{ст,2}$ ,  $M_{ст,2}$ .

### 7.2.1. Стационарные уровни концентрации субстрата

Рассмотрим аналитическое решение уравнения (7.23) с целью определения зависимостей стационарных уровней субстрата, биомассы и продукта от параметров роста культуры и нахождения  $D_c$ .

Это уравнение можно представить в виде квадратичного уравнения

$$\frac{D}{K_i} S_{ст}^2 + (D - \mu_m) S_{ст} + D K_s = 0, \quad (7.27)$$

решение которого имеет вид

$$S_{ст,1,2} = \frac{K_i}{2D} (\mu_m - D) \pm \sqrt{\left[ \frac{K_i (\mu_m - D)}{2D} \right]^2 - K_i K_s}. \quad (7.28)$$

По физическому смыслу  $S_{ст}$  представляет собой положительную действительную величину. Из уравнения (7.28) следует, что два положительных корня уравнение (7.20) может иметь лишь при  $\mu_m > D$ . Это первое ограничение по скорости разбавления. Для того чтобы корни уравнения (7.27) были действительны, необходимо выполнение неравенства

$$\left[ \frac{K_i (\mu_m - D)}{2D} \right]^2 \geq K_i K_s. \quad (7.29)$$

Решение (7.29) приводит к выражению

$$\mu_m \geq D(1 + 2\sqrt{K_s/K_i}) \quad (7.30)$$

или

$$D \leq \frac{\mu_m}{1 + 2\sqrt{K_s/K_i}}. \quad (7.31)$$

Значение

$$D = D_c = \frac{\mu_m}{1 + 2\sqrt{K_s/K_i}} \quad (7.32)$$

можно считать критической скоростью разбавления, при которой и ниже которой возможно наблюдение стационарного состояния в ферментере.

К этому же выводу приводит расчет координат максимума зависимости удельной скорости роста культур микроорганизмов от концентрации субстрата. Дифференцирование функции (4.73) и приравнение нулю  $d\mu(S)/dS$  приводит к следующему значению концентрации субстрата  $S_m$ , при которой функция  $\mu(S)$  имеет максимум:

$$S_m = \sqrt{K_s K_i}. \quad (7.34)$$

Подстановка (7.33) в (4.73) дает значение максимума функции  $\mu$ :

$$\mu_{\max} = \frac{\mu_m}{1 + 2\sqrt{K_s/K_i}}. \quad (7.34)$$

Как видно из рис. 7.7, это соответствует такой критической скорости разбавления, при которой в системе устанавливается единственное стационарное состояние по субстрату, биомассе и продукту ферментативного превращения.

● Таким образом, для процесса с ингибированием избытком субстрата критическая скорость разбавления существенно ниже максимальной скорости роста популяции и зависит от отношения  $K_s/K_i$ . Если  $K_i$  очень велика, то  $D_c$  приближается к  $\mu_m$ . Это формально соответствует случаю с отсутствием ингибирования избытком субстрата роста популяции микроорганизмов.

Уравнение (7.28) можно представить в виде безразмерной функции  $S_{\text{кр.1,2}}/K_i$ , содержащей лишь два безразмерных параметра:  $\mu_m/D$  и  $K_s/K_i$ , т. е.

$$\frac{S_{\text{кр.1,2}}}{K_i} = \frac{\mu_m/D - 1}{2} \pm \sqrt{\left(\frac{\mu_m/D - 1}{2}\right)^2 - \frac{K_s}{K_i}}. \quad (7.35)$$

Представляет интерес анализ зависимости стационарных уровней концентрации субстрата от скорости разбавления (или от отношения  $\mu_m/D$ ) и от отношения  $K_s/K_i$ .

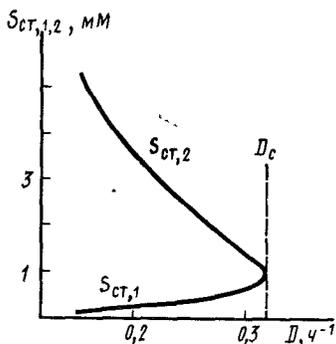


Рис. 7.8. Стационарные состояния субстрата в хемостате с ингибированием процесса избытком субстрата в зависимости от скорости разбавления: расчет по уравнению (7.29);  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_i = K_s = 1 \text{ mM}$

$4(K_s/K_i)/(\mu_m D - 1)^2$ . Условие  $4(K_s/K_i)/(\mu_m D - 1)^2 \ll 1$  строго соответствует условию  $\mu_m \gg D(1 + 2\sqrt{K_s K_i})$  или в соответствии с (7.32) условию  $D \ll D_c$ . Следовательно, при скорости разбавления существенно меньше критической иррациональная функция (7.36) может быть разложена в степенной ряд. Если воспользоваться первым членом разложения, то будем иметь

$$\frac{S_{ст,1}}{K_i} \approx \frac{D(K_s/K_i)}{\mu_m}, \quad (7.37)$$

$$\frac{S_{ст,2}}{K_i} \approx \frac{\mu_m}{D}. \quad (7.38)$$

Таким образом, при очень малых скоростях разбавления стационарные концентрации субстрата даются простейшими выражениями

$$S_{ст,1} \approx \frac{DK_s}{\mu_m}; \quad (7.39)$$

$$S_{ст,2} \approx \frac{\mu_m K_i}{D}. \quad (7.40)$$

Видно, что при данных значениях  $\mu_m$  и  $D$  первый стационарный уровень определяется константой сродства субстрата  $K_s$ , второй — константой ингибирования избытком субстрата  $K_i$ . При уменьшении скорости разбавления увеличивается концентрационный «зазор» между стационарными уровнями субстрата (рис. 7.8), при  $D \rightarrow 0$   $S_{ст,1} \rightarrow 0$ ,  $S_{ст,2} \rightarrow \infty$ .

При  $D = D_c$  в системе имеет место одно стационарное состояние, в котором  $S_{ст,1} = S_{ст,2} = \sqrt{K_s/K_i}$  (рис. 7.7). В области  $D < D_c$  стационарные состояния концентрации субстрата «расщепляются» на два уровня. Уравнение (7.35) можно представить в виде

$$\frac{S_{ст,1,2}}{K_i} = \frac{\mu_m/D - 1}{2} \pm \frac{\mu_m/D - 1}{2} \times \sqrt{1 - \frac{4K_s/K_i}{(\mu_m/D - 1)^2}}. \quad (7.36)$$

При  $4(K_s/K_i)/(\mu_m/D - 1)^2 \ll 1$  иррациональное выражение в уравнении (7.36) может быть разложено в быстро сходящийся ряд относительно

$4(K_s/K_i)/(\mu_m/D - 1)^2 \ll 1$  строго соответствует условию  $\mu_m \gg D(1 + 2\sqrt{K_s K_i})$  или в соответствии с (7.32) условию  $D \ll D_c$ . Следовательно, при скорости разбавления существенно меньше критической иррациональная функция (7.36) может быть разложена в степенной ряд. Если воспользоваться первым членом разложения, то будем иметь

$$\frac{S_{ст,1}}{K_i} \approx \frac{D(K_s/K_i)}{\mu_m}, \quad (7.37)$$

$$\frac{S_{ст,2}}{K_i} \approx \frac{\mu_m}{D}. \quad (7.38)$$

Таким образом, при очень малых скоростях разбавления стационарные концентрации субстрата даются простейшими выражениями

$$S_{ст,1} \approx \frac{DK_s}{\mu_m}; \quad (7.39)$$

$$S_{ст,2} \approx \frac{\mu_m K_i}{D}. \quad (7.40)$$

Видно, что при данных значениях  $\mu_m$  и  $D$  первый стационарный уровень определяется константой сродства субстрата  $K_s$ , второй — константой ингибирования избытком субстрата  $K_i$ . При уменьшении скорости разбавления увеличивается концентрационный «зазор» между стационарными уровнями субстрата (рис. 7.8), при  $D \rightarrow 0$   $S_{ст,1} \rightarrow 0$ ,  $S_{ст,2} \rightarrow \infty$ .

## 7.2.2. Стационарные уровни концентрации биомассы и продукта ферментации

На основе выражения (7.28) для стационарных уровней концентраций субстрата с использованием уравнения (7.12) могут быть найдены стационарные уровни концентрации биомассы:

$$M_{\text{ст}, 1, 2} = Y_s (S_0 - S_{\text{ст}, 1, 2}) \quad (7.41)$$

или

$$M_{\text{ст}, 1, 2} = Y_s \left[ S_0 - \frac{K_i}{2D} (\mu_m - D) \pm \sqrt{\left[ \frac{K_i (\mu_m - D)}{2D} \right]^2 - K_s K_i} \right]. \quad (7.42)$$

Рассмотрим зависимости стационарной концентрации биомассы от параметров процесса с использованием известных приближений. При  $D_c > D$  стационарного состояния по концентрации биомассы не существует. Если  $D = D_c$ , то имеет место одно стационарное состояние, в котором

$$M_{\text{ст}} = \left[ S_0 - \frac{K_i (\mu_m - D_c)}{2D_c} \right] Y_s. \quad (7.43)$$

В этом режиме стационарная концентрация биомассы линейно зависит от начальной концентрации вводимого субстрата. Если в уравнение (7.43) подставить значение  $D_c$  в соответствии с уравнением (7.32), то будем иметь

$$M_{\text{ст}} = \left[ S_0 - \sqrt{K_s K_i} \right] Y_s. \quad (7.44)$$

Стационарная концентрация биомассы в точке  $D = D_c$  уменьшается с ростом константы сродства субстрата и константы ингибирования процесса избытком субстрата. При этом стационарная концентрация биомассы не зависит от максимальной скорости роста микроорганизма.

При уменьшении скорости разбавления в режиме  $D < D_c$  концентрация биомассы может иметь одно из двух стационарных значений, которые даются иррациональными функциями (7.42). Однако в режиме  $D \ll D_c$  при учете соотношений (7.39) — (7.40) имеем

$$M_{\text{ст}, 1} = \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m} \right) Y_s; \quad (7.45)$$

$$M_{\text{ст}, 2} = \left( S_0 - \frac{\mu_m K_i}{D} \right) Y_s. \quad (7.46)$$

Первый стационарный уровень тем выше, чем выше максимальная удельная скорость роста культуры и чем ниже скорость разбавления. Для второго уровня характерно

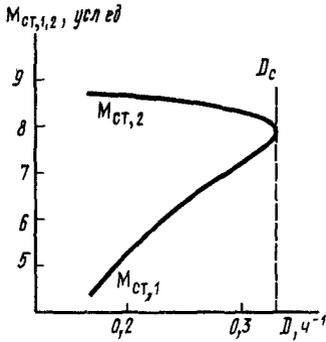


Рис. 7.9. Стационарные состояния в хемостате для культуры, ингибируемой избытком субстрата:

$$M_{1,2} = Y_s(S_0 - S_{ст,1,2}), \quad Y_s = 1 \text{ усл. ед.}, \\ S_0 = 10 \text{ ммМ}; \quad D_c = 0,334 \text{ ч}^{-1}$$

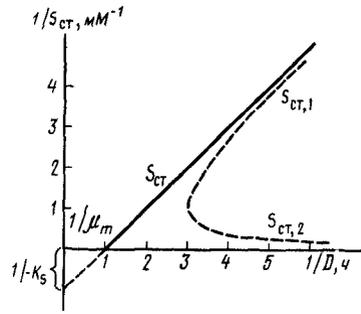


Рис. 7.10. Стационарные состояния в хемостате в случае несложного процесса ( $S_{ст,1}$ ) и в случае ингибирования избытком субстрата  $S_{ст,1}$  и  $S_{ст,2}$  в обратных координатах

обратное: чем выше скорость разбавления и чем ниже максимальная скорость роста микроорганизма, тем выше значение стационарной концентрации биомассы. При уменьшении скорости разбавления  $D \rightarrow 0$ ,  $M_{ст,1} \rightarrow Y_s S_0$ ,  $M_{ст,2} \rightarrow -\infty$  (при  $\frac{\mu_m K_i}{D} = S_0$  стационарная концентрация биомассы равна нулю) (рис. 7.9).

Концентрация продукта ферментационного превращения в стационарном режиме линейно связана с концентрацией биомассы (7.14):

$$P_{ст,1,2} = \frac{Y_p}{Y_s} \left[ S_0 - \frac{K_i}{2D} (\mu_m - D) \mp \sqrt{\left[ \frac{K_i (\mu_m - D)}{2D} \right]^2 - K_s K_i} \right]. \quad (7.47)$$

В режиме  $D = D_c$  имеется одно стационарное состояние концентрации продукта:

$$P_{ст} = \frac{Y_p}{Y_s} [S_0 - \sqrt{K_s K_i}]. \quad (7.48)$$

При  $D \ll D_c$  наблюдается два стационарных состояния с концентрациями:

$$P_{ст,1} = \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m} \right) \frac{Y_p}{Y_s}; \quad (7.49)$$

$$P_{ст,2} = \left( S_0 - \frac{\mu_m K_s}{D} \right) \frac{Y_p}{Y_s}. \quad (7.50)$$

● Таким образом, наиболее важной особенностью развития процесса в хемостате для микроорганизма с ингибированием роста избытком субстрата является возможность образовывать два различных стационарных состояния по концентрациям субстрата, биомассы и ферментативных продуктов. Множественность стационарных состояний не ординарное явление в химической и биологической кинетике. Системы с ингибированием субстратом в открытом режиме — один из классических примеров такого рода систем, в которых могут иметь место несколько стационарных состояний. Для ферментативных реакций кинетические закономерности процессов в открытых системах с ингибированием избытком субстрата достаточно подробно рассмотрены в литературе (см., например, Березин И. В., Варфоломеев С. Д., 1979). Для такого рода систем наблюдается ряд весьма интересных особенностей в кинетическом поведении, например гистерезисные зависимости скорости реакции от скорости потока в реакторе.

Система может оказаться в одном из двух устойчивых стационарных состояний. Ответ на вопрос, в каком из двух таких состояний окажется система, достаточно сложен в теоретическом плане и зависит от предыстории системы. Только экспериментально можно ответить на этот вопрос. Как следует из уравнений (7.39), (7.40); (7.45), (7.46) и рис. 7.8, 7.9, увеличение скорости разбавления для системы, находящейся в состоянии 1, приводит к уменьшению концентрации субстрата и соответственно к росту концентрации биомассы или продукта реакции. В то же время увеличение скорости потока для системы, находящейся в состоянии 2, должно приводить к увеличению стационарного уровня субстрата и соответственно к уменьшению стационарного уровня биомассы или продукта. Это может служить экспериментальным критерием в выборе «ветви», на которой находится система.

Как идентифицировать эффект ингибирования субстратом в каждом конкретном случае, отличить данный механизм от механизма неосложненного роста? Качественным указанием на то, что в системе имеет место ингибирование субстратом, может служить гистерезисное поведение системы: при переходе от одной скорости разбавления к другой и обратно система может не вернуться к исходным значениям по концентрации компонентов процесса. Отклонения могут достигать больших значений.

Количественные оценки зависимости стационарных концентраций компонентов от скорости разбавления для случая ингибирования избытком субстрата существенно отличаются от случая неосложненного роста (рис. 7.10). Как следует из рисунка, для неосложненного роста зависимость  $1/S_{ст}$  от  $1/D$  представляет собой прямую, отсекающую на осях значения  $1/\mu_m$  и  $-1/K_s$ . Данные для роста культуры с ингибированием в процессе реакции не должны линеаризоваться в обратных координатах. При этом если система функционирует, находясь

на первой «ветви» стационарных концентраций (значения  $S_{cr2}$ ), то увеличение скорости разбавления должно приводить к уменьшению стационарной концентрации субстрата. Это кардинально отличает два обсуждаемых механизма роста.

Определение кинетических параметров роста культуры из данных по непрерывному культивированию микроорганизма в условиях ингибирования субстратом в общем виде в силу множественности стационарных состояний и иррациональности основных уравнений представляет определенные сложности. В качестве методического приема при определении параметров можно рекомендовать изучение стационарных уровней системы в условиях малых скоростей разбавления в режиме  $D \ll D_c$ . В этих условиях при использовании уравнений (7.39), (7.40) и (7.45), (7.46) могут быть найдены числовые значения параметров  $K_s/\mu_m$  и  $\mu_m K_i$ .

Для полного анализа и определения всех параметров процесса уместным представляется изучение кинетических кривых роста микроорганизмов при различных начальных концентрациях субстрата в режиме периодического культивирования (см. гл. 2, 4).

### 7.3. ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОДУКТОМ

Рассмотрим закономерности культивирования микроорганизмов в открытой проточной системе с учетом эффектов ингибирования образующихся продуктов для двух основных механизмов ингибирования: конкурентного и неконкурентного.

Система уравнений, описывающая кинетику процесса в режиме хемостата в том случае, если микроорганизм «чувствует» присутствие продукта, имеет вид

$$\frac{dM}{dt} = \mu M - D M; \quad (7.51)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \mu M / Y_s; \quad (7.52)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu M}{Y_p} - D P. \quad (7.53)$$

Удельная скорость роста как функция концентрации субстрата и продукта реакции будет иметь вид

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s \left(1 + \frac{P}{K_i}\right) + S} \quad (\text{конкурентное ингибирование}); \quad (7.54)$$

$$\mu = \frac{\mu_m S}{\left(1 + \frac{P}{K_i}\right) (K_s + S)} \quad (\text{неконкурентное ингибирование}). \quad (7.56)$$

### 7.3.1. Конкурентное ингибирование продуктом

В стационарном состоянии в условиях  $dM/dt=0$ ,  $dS/dt=0$ ,  $dP/dt=0$  система уравнений (7.51)—(7.53) с учетом (7.54) может быть представлена в виде

$$\frac{\mu_m S_{cr}}{K_s \left(1 + \frac{P_{cr}}{K_i}\right) + S_{cr}} = D; \quad (7.56)$$

$$D(S_0 - S_{cr}) = \frac{\mu_m S_{cr} M_{cr}}{K_s \left(1 + \frac{P_{cr}}{K_i}\right) + S_{cr}} \frac{1}{Y_s}; \quad (7.57)$$

$$\frac{1}{Y_p} \frac{\mu_m S_{cr} M_{cr}}{K_s \left(1 + \frac{P_{cr}}{K_i}\right) + S_{cr}} = D P_{cr}. \quad (7.58)$$

Как и во всех рассмотренных ранее случаях, стационарная удельная скорость роста микроорганизма задается системе скоростью разбавления  $\mu(S, P) = D$ . Из стехиометрических соотношений следует

$$P_{cr} = \frac{M_{cr}}{Y_p} = (S_0 - S_{cr}) \frac{Y_s}{Y_p}. \quad (7.59)$$

Подстановка в (7.56) значения  $P_{cr}$ , выраженного по уравнению (7.59), приводит к выражению

$$\frac{\mu_m S_{cr}}{K_s \left[1 + \frac{Y_s}{Y_p K_i} (S_0 - S_{cr})\right] + S_{cr}} = D \quad (7.60)$$

Это уравнение может быть решено относительно  $S_{cr}$ :

$$S_{cr} = \frac{K_s \left(1 + \frac{S_0 Y_s}{K_i Y_p}\right)}{\left(\frac{\mu_m}{D} - 1\right) + \frac{K_s Y_p}{K_i Y_p}}. \quad (7.61)$$

Уравнение (7.61) описывает зависимость стационарной концентрации субстрата от концентрации вводимого субстрата, скорости разбавления, кинетических параметров роста культуры  $\mu_m$  и  $K_s$ , константы равновесия ингибирования продуктом.

▲ Следует подчеркнуть важную особенность ферментационного процесса с ингибированием продуктом — стационарный уровень концентрации субстрата является функцией начальной его концентрации. Это отличает процесс с ингибированием продуктом от процесса с неосложненным ростом [см. (7.10)].

По физическому смыслу стационарная концентрация субстрата — величина, лежащая в диапазоне от нуля до  $S_0$ ;  $S_0 \geq S_{cr} \geq 0$ . Сопоставление этого неравенства с уравнением (7.62) позволяет выявить некоторые ограничивающие условия, в рамках которых возможно образование стационарного состояния для системы с конкурентным ингибированием продуктом.

Поскольку стационарная концентрация субстрата в ферментере не может превышать значения  $S_0$ , можно записать

$$S_0 \geq \frac{K_s \left( 1 + \frac{S_0 Y_s}{K_i Y_p} \right)}{\frac{\mu_m}{D} - 1 + \frac{K_s Y_p}{K_i Y_p}}. \quad (7.62)$$

Из этого неравенства следует

$$D \leq \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}. \quad (7.63)$$

Таким образом, существует критическая скорость разбавления, выше которой в системе невозможно стационарное состояние:

$$D_c = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} = \mu(S_0). \quad (7.64)$$

Следовательно, критическая скорость разбавления для системы с конкурентным ингибированием продуктом та же, что и для неосложненного процесса.

▲ Необходимо отметить одну особенность уравнения (7.61). При  $D = D_c$  стационарная концентрация субстрата равна  $S_0$ ;  $S_{cr}(D = D_c) = S_0$  вне зависимости от остальных параметров, входящих в это уравнение.

Принципиально важную роль в уравнении (7.62) играет безразмерный параметр  $Y_s K_s / (Y_p K_i)$  (рис. 7.11). По физическому смыслу  $\mu(S, P)$  определена в интервале  $S_0 \geq S \geq 0$ ,  $\frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} \geq \mu(S, P) \geq 0$ . На рисунке первая кривая соответствует функции, для которой  $Y_s K_s / (Y_p K_i) = 0$ . При этом условии уравнение (7.54) трансформируется к виду

$$\mu(S, P) = \frac{\mu_m S}{K_s + S},$$

т. е. в этом режиме эффектами ингибирования можно полностью пренебречь.

На рис. 7.11 прямая, параллельная оси, соответствует  $D = 0.2$ . Точки пересечения этой прямой с кривыми  $\mu(S, P)$  соответствуют решениям уравнения (7.11), т. е. при различных значениях параметра  $Y_s K_s / (Y_p K_i)$  они равны стационарным значениям концентраций субстрата. Видно, что при неизменных

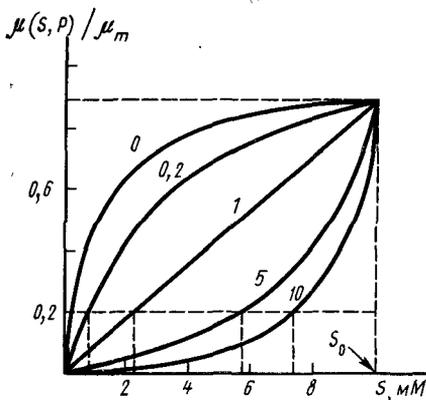


Рис. 7.11. Зависимость удельной скорости роста микроорганизмов в режиме хемостата от концентрации субстрата для случая с конкурентным ингибированием продуктом при различных значениях параметра  $Y_s K_s / (Y_p K_i)$  (цифры на кривых) ( $K_s = 1$  мМ;  $S_0 = 10$  мМ)

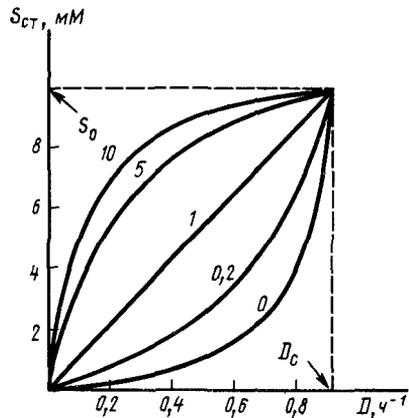


Рис. 7.12. Зависимость стационарной концентрации субстрата от скорости разбавления для системы с конкурентным ингибированием продуктом при различных значениях параметра  $Y_s K_s / (Y_p K_i)$  (цифры на кривых) ( $K_s = 1$  мМ;  $\mu_m = 1$  ч<sup>-1</sup>)

значениях параметров  $\mu_m$  и  $K_s$  стационарная концентрация субстрата тем выше, чем больше параметр  $Y_s K_s / (Y_p K_i)$ , т. е. чем сильнее ингибирование продуктом (рис. 7.12). Высокие значения  $Y_s K_s / (Y_p K_i)$  при данной скорости разбавления приводят к тому, что  $S_{ст} \rightarrow S_0$ . Это соответствует условиям низкой конверсии субстрата в биомассу и соответственно низким стационарным концентрациям биомассы.

Стационарные концентрации биомассы и продукта ферментационного превращения можно вычислить на основе  $S_{ст}$  по уравнениям (7.57) и (7.58):

$$M_{ст} = \frac{\frac{\mu_m}{D} - 1 - \frac{K_s}{S_0}}{\frac{\mu_m}{D} - 1 + \frac{Y_s K_s}{Y_p K_i}} Y_s S_0; \quad (7.65)$$

$$P_{ст} = \frac{Y_s}{Y_p} S_0 \left[ \frac{\frac{\mu_m}{D} - \left(1 - \frac{K_s}{S_0}\right)}{\frac{\mu_m}{D} - 1 + \frac{Y_s K_s}{Y_p K_i}} \right]. \quad (7.66)$$

Полезно рассмотреть ряд частных случаев.

1. *Константа ингибирования продуктом относительно велика* (слабое ингибирование продуктом). Это соответствует условию  $Y_s K_s / (Y_p K_i) \ll 1$  или  $Y_s K_s / (Y_p K_i) \ll K_s / S_0$ . В этом режиме имеем

$$S_{\text{ст}} = \frac{K_s}{\mu_m/D - 1}; \quad M_{\text{ст}} = \left( S_0 - \frac{K_s D}{\mu_m - D} \right) Y_s; \\ P_{\text{ст}} = S_0 \left( 1 - \frac{K_s / S_0}{\mu_m / D - 1} \right) \frac{Y_s}{Y_p}. \quad (7.67)$$

Уравнения (7.67) характеризуют протекание процесса, не осложненного ингибированием продуктом; в кинетике процесса ингибирование практически не проявляется.

2. *Константа ингибирования продуктом очень мала* (сильное эффективное ингибирование продуктом), режим  $Y_s K_s / (Y_p K_i) \gg 1$ ,  $Y_s K_s / (Y_p K_i) \gg K_s / S_0$ . При этих условиях стационарные концентрации компонентов будут даны уравнениями

$$S_{\text{ст}} = \frac{Y_s K_s S_0}{\frac{Y_p K_i}{D} + \frac{Y_s K_s}{Y_p K_i}}; \quad M_{\text{ст}} = Y_s S_0 \left( \frac{\mu_m / D - 1}{\frac{\mu_m}{D} + \frac{Y_s K_s}{Y_p}} \right); \\ P_{\text{ст}} = \frac{Y_s}{Y_p} S_0 \left( \frac{\mu_m / D - 1}{\frac{\mu_m}{D} + \frac{Y_s K_s}{Y_p K_i}} \right). \quad (7.68)$$

Если режим работы хемостата таков, что  $Y_s K_s / (Y_p K_i) \gg \frac{\mu_m}{D}$ , т. е. культивирование ведется при достаточно высоких скоростях разбавления, то из уравнений (7.68) следует:

$$S_{\text{ст}} \cong S_0; \quad M_{\text{ст}} \cong 0; \quad P_{\text{ст}} \cong 0.$$

Культура «вымывается» из ферментера.

В этом режиме, для того чтобы наблюдать процесс роста, необходимо работать при весьма малых скоростях разбавления, так чтобы член  $\mu_m / D$  вносил заметный вклад в уравнения роста.

3. *Культивирование при критической скорости разбавления:*

$$D = D_c = \frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0}.$$

Из уравнений (7.68) следует:

$$S_{\text{ст}} = S_0; \quad M_{\text{ст}} = 0; \quad P_{\text{ст}} = 0.$$

Наблюдать рост культуры в этом режиме практически невозможно.

Для того чтобы идентифицировать механизм и определить параметры культуры, необходимо провести изучение стационарных уровней субстрата, продукта или биомассы в зависимости от начальных концентраций субстрата и вариации скоростей разбавления.

**Стационарная концентрация субстрата.** Уравнение (7.61) можно преобразовать к виду

$$S_{\text{ст}} = \frac{(K_s + \alpha S_0)D}{\mu_m + (\alpha - 1)D}, \quad (7.69)$$

где  $\alpha = \frac{Y_s K_s}{Y_p K_i}$  — безразмерный параметр, характеризующий относительную эффективность ингибирования продуктом.

Из уравнения (7.69) видно, что  $S_{\text{ст}}$  линейно зависит от  $S_0$  и гиперболически от  $D$ . Его можно записать в форме

$$S_{\text{ст}} = \frac{K_s}{\mu_m/D - 1 + \alpha} + \frac{\alpha}{\mu_m/D - 1 + \alpha} S_0. \quad (7.70)$$

Если процесс исследуется при данной постоянной скорости разбавления, но при различных значениях  $S_0$ , то стационарная концентрация субстрата как функция  $S_0$  характеризуется линейной зависимостью, при этом параметры прямой даны следующими функциями:

$$a = \frac{K_s}{\mu_m/D - 1 + \alpha}; \quad (7.71)$$

$$\text{tg } \varphi = \frac{\alpha}{\mu_m/D - 1 + \alpha}. \quad (7.72)$$

Если  $\alpha = 0$  (ингибирование продуктом отсутствует), то стационарная концентрация субстрата не зависит от  $S_0$  ( $\text{tg } \varphi = 0$ ). Это соответствует кинетике неосложненного роста. Для определения параметров  $\mu_m$ ,  $K_s$  и  $\alpha$  необходимо знать значения  $a$  и  $\text{tg } \varphi$  хотя бы при двух различных скоростях разбавления. Если проведено полное исследование и известны  $a$  и  $\text{tg } \varphi$  при различных  $D$ , то можно воспользоваться уравнениями

$$\frac{1}{a} = \frac{\mu_m}{K_s} \left( \frac{1}{D} \right) - \frac{1 - \alpha}{K_s}, \quad (7.73)$$

$$\frac{1}{\text{tg } \varphi} = \frac{\mu_m}{\alpha} \left( \frac{1}{D} \right) - \frac{1 - \alpha}{\alpha}. \quad (7.74)$$

Параметры этих прямых позволяют определить значения  $\alpha$ ,  $\mu_m$  и  $K_s$ .

Исследование стационарного уровня субстрата в хемостате можно провести при различных скоростях разбавления

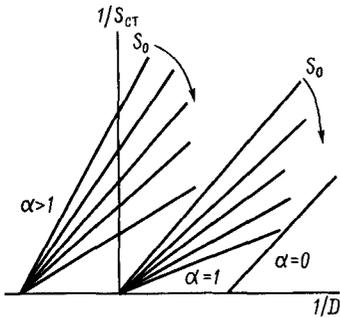


Рис. 7.13. Зависимости стационарной концентрации субстрата от скорости разбавления в обратных координатах для системы с конкурентным ингибированием продуктом при различных значениях  $\alpha = Y_s K_s / (Y_p K_i)$

в режиме двух или нескольких концентраций вводимого субстрата. Для этого уравнение (7.70) можно преобразовать к виду

$$\frac{1}{S_{ст}} = \frac{\mu_m}{K_s + \alpha S_0} \frac{1}{D} + \frac{\alpha - 1}{K_s + \alpha S_0}. \quad (7.75)$$

Экспериментальные данные при конкурентном ингибировании продуктом должны линеаризоваться в координатах этого уравнения, при этом параметры прямой равны

$$a = \frac{\alpha - 1}{K_s + \alpha S_0}; \quad (7.76)$$

$$\operatorname{tg} \varphi = \frac{\mu_m}{K_s + \alpha S_0}. \quad (7.77)$$

Прямая  $1/S_{ст}$  от  $1/D$  пересекает ось абсцисс в точке (это получается из условия  $1/S_{ст} = 0$ ):

$$\left(\frac{1}{D}\right)_n = \frac{1 - \alpha}{\mu_m}. \quad (7.78)$$

При этом справедливы следующие условия (рис. 7.13)

$\alpha = 0$   $(1/D)_n = 1/\mu_m$  (кинетика неосложненного роста);

$\alpha = 1$   $(1/D)_n = 0$  (слабое ингибирование продуктом);

$\alpha > 1$   $(1/D)_n < 0$  (сильное ингибирование продуктом).

Точки пересечений прямой  $1/S_{ст}$  от  $1/D$  с осью абсцисс не зависят от концентрации субстрата  $S_0$ , что также следует из уравнения (7.78). Таким образом,  $1/S_{ст}$  от  $1/D$ , полученные при различных значениях  $S_0$ , пересекаются в одной точке. Из уравнений (7.76)—(7.77) следует, что тангенсы углов наклона прямых и отрезки, отсекаемые прямыми на оси ординат, связаны с концентрацией вводимого субстрата уравнениями

$$\frac{1}{a} = \frac{\alpha}{\alpha - 1} \frac{1}{S_0} + \frac{K_s}{\alpha - 1}; \quad (7.79)$$

$$\operatorname{tg} \varphi = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{\alpha}{\mu_m} \frac{1}{S_0}. \quad (7.80)$$

Эти анаморфозы позволяют определить искомые параметры  $K_s$ ,  $\mu_m$  и  $\alpha$ .

**Стационарный уровень биомассы.** Уравнение (7.65) можно записать в виде

$$M_{ст} = Y_s \frac{\mu_m/D - 1}{\mu_m/D - 1 + \alpha} S_0 - Y_s \frac{K_s}{\mu_m/D - 1 + \alpha}. \quad (7.81)$$

Таким образом, зависимость стационарного уровня биомассы от концентрации раствора вводимого субстрата при данной скорости разбавления должна представлять собой прямую линию со следующими параметрами:

$$a = Y_s \frac{K_s}{\mu_m/D - 1 + \alpha}; \quad (7.82)$$

$$\operatorname{tg} \varphi = Y_s \frac{\mu_m/D - 1}{\mu_m/D - 1 + \alpha}. \quad (7.83)$$

Прямая  $M_{ст}$  от  $S_0$  пересекает ось абсцисс в точке

$$S_n = \frac{K_s}{\mu_m/D - 1}, \quad (7.84)$$

которая не зависит от  $\alpha$  и экономического коэффициента  $Y_s$ , а определяется лишь скоростью разбавления и параметрами роста культуры. Если зависимость  $M_{ст}$  от  $S_0$  исследована по крайней мере при двух различных скоростях разбавления, то по уравнению (7.84) можно найти  $K_s$  и  $\mu_m$ . В более общем виде при серии определений  $S_n$  при различных скоростях разбавления целесообразно воспользоваться анаморфозой

$$\frac{1}{S_n} = \frac{\mu_m}{K_s} \frac{1}{D} - \frac{1}{K_s}. \quad (7.85)$$

Из рис. 7.14 видно, что при  $\alpha=0$  (кинетика неосложненного роста) зависимости  $M_{ст}$  от  $S_0$  при различных скоростях разбавления будут представлены серией параллельных прямых. Непараллельность прямых усиливается при увеличении  $\alpha$  (относительном увеличении эффективности ингибирования продуктом).

Для определения  $Y_s$  и  $\alpha$  при найденных независимо параметрах  $\mu_m$  и  $K_s$  можно воспользоваться уравнениями (7.82) и (7.83). Например, уравнение (7.82) преобразуется в форму

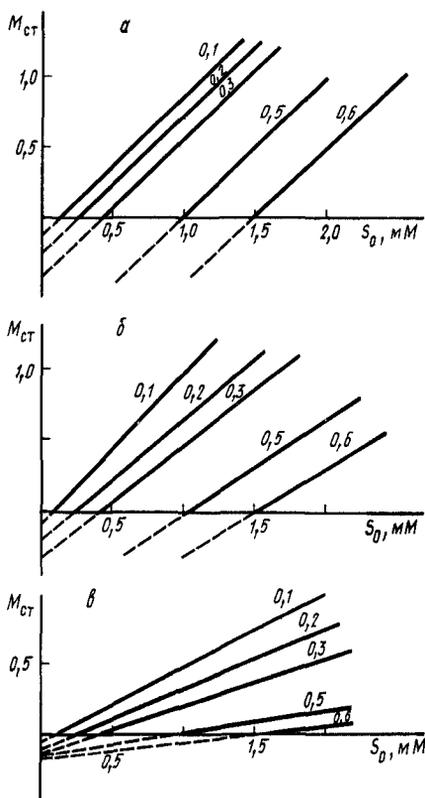


Рис. 7.14. Зависимость стационарной концентрации биомассы от  $S_0$  для системы с конкурентным ингибированием продуктом при различных  $\alpha$ :  
 $a - \alpha=0$ ;  $б - \alpha=0,5$ ;  $в - \alpha=5,0$ ; скорости разбавления даны цифрами на прямых

$$\frac{1}{a} = \frac{\mu_m}{Y_s K_s} \frac{1}{D} + \frac{\alpha - 1}{Y_s K_s}. \quad (7.86)$$

Из отрезка, отсекаемого на оси ординат, и тангенса угла наклона определяются параметры  $Y_s$  и значение  $\alpha$ .

### 7.3.2. Некоконкурентное ингибирование продуктом

Основная система уравнений, описывающая кинетическое поведение системы с некоконкурентным ингибированием продуктом в режиме хемостата, имеет вид

$$\mu(S_{\text{ст}}, P_{\text{ст}}) = D; \quad (7.87)$$

$$Y_s D(S_0 - S_{\text{ст}}) = \mu(S_{\text{ст}}, P_{\text{ст}}) M_{\text{ст}}; \quad (7.88)$$

$$\frac{1}{Y_p} \mu(S_{\text{ст}}, P_{\text{ст}}) = D P_{\text{ст}}, \quad (7.89)$$

где

$$\mu(S_{\text{ст}}, P_{\text{ст}}) = \frac{\mu_m S_{\text{ст}}}{\left(1 + \frac{P_{\text{ст}}}{K_i}\right)(K_s + S_{\text{ст}})}. \quad (7.90)$$

Подстановка значения  $P_{\text{ст}}$ , выраженного через стационарную концентрацию субстрата (7.59), в уравнение (7.90) приводит к функции

$$\mu(S_{\text{ст}}, P_{\text{ст}}) = \frac{\mu_m S_{\text{ст}}}{\left[1 + \frac{Y_s}{Y_p K_i}(S_0 - S_{\text{ст}})\right](K_s + S_{\text{ст}})}. \quad (7.91)$$

В соответствии с (7.87) имеем

$$\frac{\mu_m}{D} S_{\text{ст}} = (K_s + S_{\text{ст}}) \left[1 + \frac{Y_s}{Y_p K_i}(S_0 - S_{\text{ст}})\right]. \quad (7.92)$$

Это уравнение может быть решено относительно стационарной концентрации субстрата. Оно представляет собой квадратное уравнение относительно  $S_{\text{ст}}$ :

$$S_{\text{ст}}^2 + S_{\text{ст}} \left[ \frac{(\mu_m - 1) Y_p K_i}{Y_s} + K_s - S_0 \right] - K_s \left( S_0 + \frac{Y_p K_i}{Y_s} \right) = 0. \quad (7.93)$$

Решение этого уравнения имеет вид

$$S_{\text{ст}} = \frac{S_0 - K_s \left( \frac{\mu_m - 1}{D} \right) \frac{Y_p K_i}{Y_s}}{2} + \sqrt{\frac{\left[ \left( \frac{\mu_m - 1}{D} \right) \frac{Y_p K_i}{Y_s} - S_0 + K_s \right]^2}{4} + K_s \left( S_0 + \frac{Y_p K_i}{Y_s} \right)}. \quad (7.94)$$

Из двух корней уравнения (7.93) физический смысл имеет лишь корень с положительной иррациональной частью, поскольку лишь в этом случае  $S_{ст}$  положительно.

Если ввести обозначение  $Y_s K_s / (Y_p K_i) = \alpha$ , то уравнение (7.94) можно преобразовать к виду

$$S_{ст} = \frac{K_s}{2} \left\{ \left[ \frac{1 - \mu_m/D}{\alpha} - 1 + \frac{S_0}{K_s} \right] + \sqrt{\left[ 1 - \frac{S_0}{K_s} - \frac{1 - \mu_m/D}{\alpha} \right]^2 + 4 \left( \frac{S_0}{K_s} + \frac{1}{\alpha} \right)} \right\}. \quad (7.95)$$

Рассмотрим два важных частных случая.

1. *Относительно слабое ингибирование продуктом:*  $\alpha \ll 1 \rightarrow 0$ . В этом режиме (7.95) приобретает вид

$$\begin{aligned} S_{ст} &= \frac{K_s}{2} \left\{ \frac{1 - \mu_m/D}{\alpha} + \sqrt{\left[ \frac{\mu_m}{D\alpha} - \frac{1}{\alpha} \right]^2 + 4 \frac{1}{\alpha}} \right\} = \\ &= \frac{K_s}{2} \left\{ \frac{1 - \mu_m/D}{\alpha} + \frac{\mu_m/D - 1}{\alpha} \sqrt{1 + \frac{4\alpha}{[\mu_m/D - 1]^2}} \right\}. \end{aligned} \quad (7.96)$$

Видно, что при  $\alpha \rightarrow 0$  значение  $4\alpha/(\mu_m/D - 1)^2 \ll 1$ , при этом условии иррациональная часть уравнения (7.96) может быть разложена в быстрорасходящийся ряд относительно  $4\alpha/(\mu_m/D - 1)^2$ :

$$\sqrt{1 + \frac{4\alpha}{(\mu_m/D - 1)^2}} = 1 + \frac{4\alpha}{2(\mu_m/D - 1)^2} + \frac{1}{4} \left[ \frac{4\alpha}{(\mu_m/D - 1)^2} \right]^2 + \dots$$

Если воспользоваться первыми двумя членами разложения, то имеем

$$S_{ст} = \frac{K_s}{\mu_m/D - 1}. \quad (7.97)$$

Это уравнение соответствует кинетике неосложненного роста.

2. *Сильное ингибирование продуктом:*  $\alpha \gg 1$ . В этом режиме из (7.96) имеем

$$S_{ст} = \frac{K_s}{2} \left[ \frac{S_0}{K_s} - 1 + \sqrt{\left( 1 - \frac{S_0}{K_s} \right)^2 + 4 \frac{S_0}{K_s}} \right]. \quad (7.98)$$

Иррациональная часть этого уравнения равна  $1 + S_0/K_s$ , поэтому

$$S_{ст} = S_0. \quad (7.99)$$

Стационарная концентрация субстрата соответствует начальной концентрации, вводимой в ферментер, концентрация биомассы равна нулю, стационарного роста культуры нет.

Как видно из уравнения (7.95), точное описание кинетики роста культуры микроорганизмов в хемостате в условиях неконкурентного ингибирования продуктом содержит громоздкую иррациональную функцию, в силу чего рассмотрение

решения и сопоставление с ним экспериментальных данных весьма неудобно. Для определения параметров роста культуры воспользуемся достаточно точным приближенным решением. Если процесс проводится в режиме, когда

$$\gamma = \frac{4(S_0/K_s + 1/\alpha)}{[(1 + \mu_m/\alpha D) - (S_0/K_s + 1/\alpha)]^2} \ll 1, \quad (7.100)$$

то иррациональная часть уравнения (7.89) может быть разложена в быстросходящийся ряд относительно параметра  $\gamma$ . Неравенство (7.100) хорошо выполнимо в условиях

$$1 + \mu_m/(\alpha D) \gg S_0/K_s - 1/\alpha. \quad (7.101)$$

Это неравенство можно преобразовать к виду

$$D \ll \frac{\mu_m}{\alpha \frac{S_0}{K_s} + 1 - \alpha}. \quad (7.102)$$

Из (7.102) следует, что чем больше концентрация субстрата, тем меньше должна быть скорость разбавления, для которой справедливо такое неравенство, т. е.  $\gamma \ll 1$ .

В режиме (7.100) или (7.102) стационарная концентрация субстрата может быть представлена уравнением

$$S_{cr} \cong \frac{K_s(S_0 K_s + 1/\alpha)}{\left(\frac{\mu_m}{\alpha D} + 1\right) - \left(\frac{S_0}{K_s} + \frac{1}{\alpha}\right)}. \quad (7.103)$$

Это уравнение следует из (7.95) при разложении иррационального члена в ряд относительно  $\gamma$  и использования первых двух членов разложения.

Так как уравнение (7.103) справедливо лишь при условии (7.101), то оно может быть записано в более простой форме:

$$S_{cr} \cong \frac{K_s + \alpha S_0}{(\mu_m/D - 1) + (\alpha + 1)}. \quad (7.104)$$

● Уравнение (7.104) очень похоже на уравнение (7.69), описывающее кинетику с конкурентным ингибированием продуктом. Таким образом, для определения параметров роста культуры микроорганизма в условиях неконкурентного ингибирования продуктом можно воспользоваться теми методами и подходами, которые рассмотрены выше для механизма конкурентного ингибирования продуктом. Однако необходимо иметь в виду, что для случая неконкурентного ингибирования уравнение (7.104) имеет приближенный характер и тем точнее описывает решение, чем ниже скорость разбавления и ниже концентрация вводимого субстрата [см. (7.101)].

### 7.3.3. Ингибирование ионами водорода

При культивировании микроорганизмов весьма часто реализуется ситуация, когда продуктом ферментационного превращения являются органические кислоты, например уксусная или молочная кислоты, которые смещают рН в область низких значений и тем самым изменяют скорость роста культуры. Если ингибирование ионами водорода достаточно сильное, то без специальных приемов вообще невозможно реализовать рост культуры в режиме хемостата.

Проиллюстрируем это на простом примере. Допустим, скорость роста культуры контролируется ионогенной группой с  $pK \sim 7,0$ . Это означает, что константа ингибирования  $H^+$  роста культуры  $K_i = 10^{-7}$  М. Из предыдущего раздела следует, что стационарные концентрации субстрата и биомассы в режиме хемостата определяются безразмерным параметром  $\alpha = Y_s K_s / (Y_p K_i)$ . Если принять  $K_s \sim 10^{-3}$  М (наиболее типичное значение для лимитирующего субстрата — источника углерода) и  $Y_s / Y_p \approx 1$ , то при  $S_0$ , соизмеримых с  $K_s$ , из уравнения (7.104) следует, что  $S_{ст} / S_0 = 0,999$ . Это говорит о том, что субстрат в хемостате практически не конвертируется, роста культуры не происходит.

Для предотвращения ингибированности кислотным продуктом можно, например, в ферментер с постоянной скоростью  $v_0$  подавать нейтрализующий кислоту раствор щелочи определенной концентрации. Рассмотрим стационарную кинетику роста культуры с учетом этого дополнительного процесса.

Кинетику роста культуры описывает система уравнений

$$\frac{dM}{dt} = \mu(S, H^+)M - DM; \quad (7.105)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu(S, H^+)M}{Y_s}; \quad (7.106)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dH^+}{dt} = \frac{\mu(S, H^+)M}{Y_p} - DH^+ - v_0. \quad (7.107)$$

Добавочный член  $v_0$  в (7.107) представляет собой молярную скорость ввода в ферментер нейтрализующего раствора\*

$$v_0 = dOH^+ / dt. \quad (7.108)$$

Зависимость удельной скорости роста культуры от концентрации ионов водорода можно представить в виде

$$\mu(S, H^+) = \frac{\mu_m S}{f(H^+)(K_i + S)} \quad (\text{неконкурентное ингибирование}), \quad (7.109)$$

\* Ограничение на  $v_0$  накладывается исходя из условия  $\frac{dP}{dt} \geq 0$ .

где функция  $f(H^+)$  для различных случаев может иметь различный вид. Например, если имеет место сигмоидальная зависимость скорости роста от концентрации ионов водорода

$$f(H^+) = 1 + \frac{H^+}{K_1}, \quad (7.110)$$

при колоколообразной

$$f(H^+) = 1 + \frac{H^+}{K_1} + \frac{K_2}{H^+}. \quad (7.111)$$

В стационарном режиме при  $dM/dt=0$ ,  $dS/dt=0$  и  $dH^+/dt=0$  имеем

$$\mu(S_{\text{cr}}, H_{\text{cr}}^+) = D; \quad (7.112)$$

$$M_{\text{cr}} = (S_0 - S_{\text{cr}}) Y_s; \quad (7.113)$$

$$H^+ = \frac{1}{Y} \frac{DM_{\text{cr}} - v_0}{D} = \frac{Y_s}{Y_p} (S_0 - S_{\text{cr}}) - \frac{v_0}{D}. \quad (7.114)$$

Если рассмотреть простейший случай и предположить, что протон является конкурентным ингибитором роста культуры, то

$$\frac{\mu_m S_{\text{cr}}}{\left(1 + \frac{H_{\text{cr}}^+}{K_1}\right) K_s + S_{\text{cr}}} = D. \quad (7.115)$$

При подстановке в это уравнение значения  $H^+$ , найденного по уравнению (7.114), получим

$$\frac{\mu_m S_{\text{cr}}}{K_s \left[1 + \frac{(Y_s/Y_p)(S_0 - S_{\text{cr}}) - v_0/D}{K_1}\right] + S_{\text{cr}}} = D, \quad (7.116)$$

откуда следует

$$S_{\text{cr}} = \frac{K_s + \frac{Y_s K_s}{Y_p K_1} S_0 - \frac{v_0 K_s}{D K_1}}{\frac{\mu_m}{D} + \frac{Y_s K_s}{Y_p K_1} - 1}. \quad (7.117)$$

Если принять введенное ранее обозначение  $\alpha = \frac{K_s Y_s}{K_1 Y_p}$ , то уравнение (7.117) можно записать в виде

$$S_{\text{cr}} = \frac{K_s + \alpha S_0 - \frac{v_0 K_s}{D}}{\mu_m/D - 1 + \alpha}. \quad (7.118)$$

В отличие от рассмотренного ранее уравнения для случая ингибирования без процесса нейтрализации уравнение (7.118)

содержит в числителе дополнительный член  $\left(-\frac{v_0}{D} \frac{K_s}{K_i}\right)$ . Этот член приводит к тому, что при прочих равных условиях при нейтрализации кислого продукта стационарная концентрация субстрата ниже и соответственно концентрация биомассы выше, чем для процесса без нейтрализации.

В режиме нейтрализации кислоты концентрация биомассы будет представлена уравнением

$$M_{\text{ст}} = Y_s \frac{S_0 (\mu_m - D) - K_s D + v_0 \frac{K_s}{K_i}}{\mu + (\alpha - 1) D}. \quad (7.119)$$

Дополнительный прирост биомассы при нейтрализации кислотного продукта имеет вид

$$\Delta M_{\text{ст}} = Y_s \frac{v_0 \frac{K_s}{K_i}}{\mu_m + (\alpha - 1) D}. \quad (7.120)$$

Из этого уравнения видно, что прирост биомассы при нейтрализации кислотного продукта тем выше, чем выше скорость подачи нейтрализующего агента. Прирост биомассы уменьшается с ростом скорости разбавления.

При проведении процесса с нейтрализацией кислотного компонента накладываются дополнительные ограничения на скорость разбавления. Из уравнения (7.120) следует, что при  $\frac{\mu_m}{D} > 1$ , для того чтобы значение  $S_{\text{ст}}$  было положительным, т. е. чтобы величина имела физический смысл, необходимо соблюдение неравенства

$$K_s + \alpha S_0 > \frac{v_0}{D} \frac{K_s}{K_i}. \quad (7.121)$$

Это неравенство будет хорошо выполняться при высоких концентрациях субстрата или при высоких скоростях протока. Критическая скорость разбавления, которая вычисляется на основе равенства нулю числителя уравнения (7.120), имеет вид

$$D_c = \frac{v_0}{K_i \left(1 + \alpha \frac{S_0}{K_s}\right)}. \quad (7.122)$$

Ниже этой величины стационарного роста культуры в хемостате происходить не будет.

● Таким образом, в режиме ингибирования ионами водорода при нейтрализации кислотного продукта скорость разбавления имеет ограничение как сверху, так и снизу:

$$\frac{\mu_m S_0}{K_s + S_0} > D > \frac{v_0}{K_i \left(1 + \alpha \frac{S_0}{K_s}\right)}. \quad (7.123)$$

Для определения параметров роста культуры в обсуждаемом режиме необходимо провести исследование стационарных уровней субстрата и биомассы при различных концентрациях вводимого субстрата и различных скоростях разбавления.

Зависимость стационарной концентрации субстрата как функции концентрации вводимого субстрата следующая:

$$S_{ст} = \frac{\alpha D}{\mu_m + (\alpha - 1)D} S_0 + \frac{K_s D - v_0 \frac{K_s}{K_i}}{\mu_m + (\alpha - 1)D}. \quad (7.124)$$

Тангенс угла наклона этой зависимости как функции скорости разбавления определяется максимальной скоростью роста организма и  $\alpha$ :

$$\operatorname{tg} \varphi = \frac{\alpha D}{\mu_m + (\alpha - 1)D}. \quad (7.125)$$

В обратных координатах имеем

$$\frac{1}{\operatorname{tg} \varphi} = \frac{\mu_m}{\alpha} \frac{1}{D} + \frac{\alpha - 1}{\alpha}. \quad (7.126)$$

Эта зависимость позволяет определить значения  $\alpha$  и  $\mu_m$  (или отношение  $\mu_m/\alpha$  при  $\alpha \gg 1$ ).

Отрезок, отсекаемый линейной зависимостью  $S_{ст}$  от  $S_0$  на оси ординат, равен

$$a = \frac{K_s D - v_0 \frac{K_s}{K_i}}{\mu_m + (\alpha - 1)D}. \quad (7.127)$$

Если известны значения  $\mu_m$ ,  $\alpha$ ,  $v_0$ , то из зависимости  $a$  от  $D$  могут быть найдены  $K_s$  и  $K_i$ .

Аналогичное рассмотрение может быть проведено для определения параметров роста микроорганизмов из зависимости стационарного уровня биомассы от начальной концентрации субстрата и скорости разбавления.

**!** Культивирование микроорганизмов в проточном режиме имеет ряд принципиальных преимуществ по сравнению с периодическим культивированием. Эти преимущества обеспечивают широкое распространение методов проточного культивирования для решения как исследовательских, так и прикладных задач. Основные преимущества связаны

с интенсификацией процесса, возможностями осуществить непрерывное культивирование, автоматическим кондиционированием среды, стабилизацией развития клеток в определенной фазе роста. Принципиальной особенностью хемостатного культивирования является управление скоростью роста популяции с помощью скорости разбавления. Увеличение скорости разбавления автоматически ведет к установлению в системе новой удельной скорости роста популяции и новых стационарных уровней субстрата, биомассы, продуктов ферментации. Однако следует помнить о принципиальном ограничении, накладываемом на скорость разбавления. При определенной вводимой в ферментер концентрации субстрата она не может быть больше максимальной удельной скорости роста микроорганизма в данных условиях. При скорости разбавления выше критической культура микроорганизмов будет «вымываться» из ферментера.

Уравнения, описывающие рост популяции в режиме хемостата, наиболее просты. Для определения параметров роста, таких, как удельная максимальная скорость роста и константа сродства к субстрату, необходимо исследовать поведение системы при различных скоростях разбавления или различных начальных концентрациях субстрата и использовать уравнения, которые следуют из изложенной теории хемостатного роста. Соответствие экспериментальных данных уравнениям для случая неосложненного роста является доказательством того, что рост популяции протекает в условиях отсутствия осложняющих эффектов. Если наблюдаются существенные отклонения от уравнений «идеального» роста, то необходимо провести идентификацию осложняющего эффекта. Это может быть как ингибирование избытком субстрата, так и ингибирование продуктом культивации микроорганизма.

Для дискриминации различных осложняющих эффектов в табл. 7.1 приведены основные уравнения, описывающие кинетические закономерности роста клеточных популяций в случае неосложненного роста и при сильном ингибировании субстратом или продуктом.

Из таблицы видно, что закономерности роста для указанных случаев существенно различаются. Рис. 7.15 и 7.16 схематично иллюстрируют многообразие зависимостей, которые могут наблюдаться экспериментально. В случае неосложненного роста стационарная концентрация субстрата должна сильно возрастать с ростом скорости разбавления, в то время как при сильном ингибировании субстратом она может как линейно расти, так и сильно падать. При ингибировании продуктом стационарная концентрация субстрата должна расти с ростом скорости разбавления по гиперболическому закону. Из табл. 7.1 и рис. 7.15, б видно, что при неосложненном росте и при ингибировании субстратом стационарная концентрация в ферментере не зависит от вводимости в ферментер его concentra-

**Кинетические закономерности роста популяции микроорганизмов  
при неосложненном росте и сильном ингибировании  
субстратом или продуктом**

Механизм процесса	Стационарная концентрация субстрата	Стационарная концентрация биомассы	Стационарная концентрация продукта
Неосложненный рост	$S_{ст} = \frac{DK_s}{\mu_m - D}$	$M_{ст} = \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m - D} \right) Y_s$	$P_{ст} = \frac{Y_p}{Y_s} \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m - D} \right)$
Ингибирование субстратом	$S_{ст,1} = \frac{DK_s}{\mu_m}$ $(D \ll D_c)$	$M_{ст,1} = \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m} \right) Y_s$	$P_{ст,1} = \left( S_0 - \frac{DK_s}{\mu_m} \right) \frac{Y_p}{Y_s}$
Ингибирование продуктом	$S_{ст,2} = \frac{\mu_m K_i}{D}$	$M_{ст,2} = \left( S_0 - \frac{\mu_m K_i}{D} \right) Y_s$	$P_{ст,2} = \left( S_0 - \frac{\mu_m K_i}{D} \right) \frac{Y_p}{Y_s}$
	$S_{ст} = \frac{\alpha S_0 D}{\mu_m + \alpha D}$	$M_{ст} = Y_s S_0 \frac{\mu_m - D}{\mu_m + \alpha D}$	$P_{ст} = \frac{Y_p}{Y_s} S_0 \frac{\mu_m - D}{\mu_m + \alpha D}$

ции. Напротив, в случае ингибирования продуктом должна наблюдаться линейная зависимость между стационарной концентрацией субстрата в ферментере и в питающем его растворе. Совершенно различны закономерности изменения в ферментере биомассы при изменении скорости разбавления (рис. 7.16). На основании качественного сопоставления экспериментальных данных с теоретическими, представленными на рис. 7.15 и 7.16, можно идентифицировать условия роста популяции, определить в последующем параметры процесса и найти наиболее оптимальные условия его проведения.

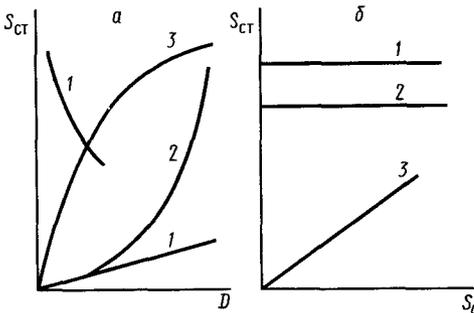


Рис. 7.15. Зависимость стационарной концентрации субстрата от скорости разбавления (а) и начальной концентрации субстрата (б) в режимах неосложненного роста (2), при ингибировании избытком субстрата (1) и продуктом (3)

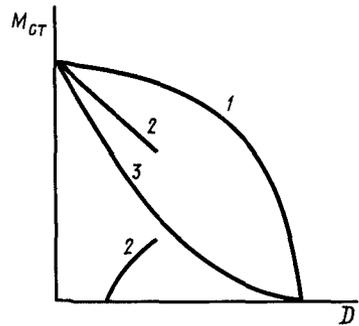


Рис. 7.16. Зависимость стационарного уровня биомассы от скорости разбавления для неосложненного роста (1) и для роста в режиме ингибирования избытком субстрата (2) и продуктом (3)

## ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ РОСТА МИКРОБНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭВМ

Методы математического моделирования с использованием вычислительных машин все шире применяются для познания механизмов, лежащих в основе роста и развития микробных популяций. С одной стороны, эти подходы обеспечивают возможность фундаментального изучения динамики процессов с учетом всей совокупности эффектов, усложняющих рост популяции, с другой — позволяют вести обоснованный поиск технологических режимов, тонкого управления микробиологическим процессом.

Имеется уже много работ по математическому моделированию микробиологических процессов, начиная от моделей накопления биомассы, а также других продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и кончая моделями, учитывающими возрастную структуру популяции, автоселекцию и адаптацию микробных сообществ (Ю. Р. Малашенко и др., 1980; В. В. Бирюков, М. В. Кантере, 1985).

Математические модели микробиологической кинетики, о которых пойдет речь, представляют собой математические описания, дающие возможность получить зависимость скорости микробиологических превращений субстратов, а также скорости роста биомассы от концентраций субстратов и клеток. Для кинетической микробиологической модели основными элементами являются субстраты и микроорганизмы, участвующие в процессе, а также стадии превращения этих субстратов в продукты, основными законами — законы химической кинетики и ферментативного катализа.

Любая постановка задачи по динамике роста и развития микробных популяций начинается с формулировки гипотезы исследователя и построения кинетической схемы изучаемого процесса. При этом исследователь конкретизирует конечные продукты, начальные субстраты, а также ферменты и другие внутриклеточные регуляторы, влияющие на кинетику микробного синтеза. Затем записываются уравнения, представляющие собой математическую модель процесса. Центральным моментом построения уравнений динамики является выделение ключевых реакций, скорость которых ограничивает интенсивность накопления целевого продукта.

При построении модели необходимо учитывать различные ограничивающие факторы и требования. Предположим, реакция осуществляется в закрытой системе. Тогда к кинетическим

характеристикам предъявляются требования: 1) общая масса системы не меняется (закон сохранения массы); 2) отрицательные концентрации не могут существовать; 3) скорость реакции является непрерывной функцией концентраций реагентов. Математически это означает, что функция изменения концентрации во времени не должна иметь разрывов.

Таким образом, исследователь при решении каждой конкретной задачи по управляемому биосинтезу популяций микроорганизмов проходит следующие этапы: гипотеза исследователя → логическая модель (кинетическая схема процесса) → математическая модель процесса → интегрирование системы уравнений → идентификация модели (дискриминация механизмов) → проверка адекватности модели → использование математической модели для прогнозирования и управления процессом.

Необходимость использования ЭВМ в анализе закономерностей микробного роста определяется главным образом возможностями ЭВМ провести численное интегрирование систем дифференциальных уравнений, описывающих развитие во времени микробного процесса. Большая группа кинетических задач может найти кинетическое описание и решение лишь при использовании современной электронно-вычислительной машины.

Остановимся на двух понятиях, которые сформулированы и решаются в рамках кинетического моделирования,—это так называемые прямая и обратная кинетические задачи.

*Прямая кинетическая задача* — это расчет состава многокомпонентной реагирующей смеси и скоростей реакции на основе заданной кинетической модели с известными или предполагаемыми параметрами. Надежность решения прямой задачи зависит от того, находятся ли в нашем распоряжении достоверные значения параметров, полученные из теоретических соображений или из специальных экспериментов.

*Обратная кинетическая задача* — восстановление на основе экспериментальных данных вида кинетической модели и ее параметров. Универсального метода решения обратной задачи не существует. Ее решение чаще всего находят, перебирая серию прямых задач. При этом математической обработке предшествует качественный анализ экспериментальных данных, цель которого — резко сократить число рассматриваемых гипотез (Г. С. Яблонский, С. И. Сливак, 1977).

## 8.1. ЧИСЛЕННОЕ ИНТЕГРИРОВАНИЕ УРАВНЕНИЯ СКОРОСТИ РОСТА МИКРОБНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Кинетические закономерности роста микробной культуры в большинстве случаев достаточно сложны. Механизмы развития систем, включающие стадии автокаталитического уве-

личения концентраций катализаторов, как правило, характеризуются кинетическими кривыми сложного характера, требующими весьма изощренного и тонкого анализа. Выше были рассмотрены аналитические приближения к изучению кинетики роста популяции и идентификации механизма роста. Развитые подходы, основанные на интегральных формах скорости роста культуры, дают в большинстве случаев достаточно надежную информацию о механизме процесса и позволяют определить наиболее важные параметры, входящие в уравнение скорости.

С точки зрения экспериментатора существенным недостатком использования интегральных уравнений роста является применение достаточно громоздких функций определяемых переменных. Проводя изучение процесса роста популяции, экспериментатор на опыте измеряет изменение во времени таких переменных, как плотность культуры, концентрация исходного субстрата, концентрация промежуточных или конечных продуктов. Теоретическое рассмотрение процесса роста в рамках интегральных уравнений не дает явной связи между этими переменными и временем. Интегрирование уравнений скорости роста во всех случаях, за исключением начального приближения (экспоненциальной фазы роста), приводит к неявным функциям.

Можно думать, что различные механизмы развития процесса (например, процессы с ингибированием продуктом или субстратом) должны характеризоваться некоторыми особенностями кривой роста, которые выявляются при визуальном анализе получаемой кинетической кривой. Для этого необходимо иметь типичные теоретические кинетические кривые роста для процессов, протекающих по различным механизмам. Такую возможность обеспечивает численное интегрирование уравнений скорости роста популяции. Интегрирование может быть проведено с любой точностью, существенно превышающей точность экспериментального исследования, и могут быть получены численные явные функции, связывающие экспериментально определяемые величины со временем.

Преимущества подхода, основанного на кинетическом моделировании с помощью вычислительной машины, становятся особенно очевидны при изучении динамики сложных микробных процессов, таких, например, как процессы в смешанных и симбиотрофных культурах. Для подобного рода систем аналитическое интегрирование уравнений скорости становится невозможным.

Рассмотрим кинетические закономерности роста микробных популяций при периодическом культивировании в рамках приближения, основанного на численном интегрировании уравнений скорости.

### 8.1.1. Уравнение скорости роста в безразмерных переменных

Для анализа кинетики процесса иногда полезно перейти к безразмерным относительным переменным

$$s = S/S_0; \quad m = \frac{M}{M_\infty - N_0}; \quad p = P/P_\infty; \quad \tau = \mu_m t, \quad (8.1)$$

где  $M_\infty$  — предельное количество биомассы и продукта, образующихся при бесконечно большом времени протекания процесса. Важно отметить, что  $M_\infty$  связана с начальными концентрациями субстрата и биомассы соотношением

$$M_\infty = Y_s S_0 + N_0. \quad (8.2)$$

Переменные (8.1) позволяют анализировать кинетику процесса в безразмерных величинах, при этом значения  $\tau$  для всего развития процесса лежат в диапазоне от 1 до 0, значения  $m$  — от  $N_0/(M_\infty - N_0)$  до  $1 + N_0/(M_\infty - N_0)$ . Время в указанных безразмерных переменных измеряется отрезком времени, в течение которого в режиме максимальной удельной скорости роста концентрация биомассы увеличивается в  $e$  раз (при  $\tau=1$  абсолютное время равно  $1/\mu_m$ ).

Дифференциальное уравнение (1.1) с учетом (1.3) и безразмерных переменных (8.1) может быть записано так:

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{K_s/S_0 + s}. \quad (8.3)$$

Дифференциальное уравнение скорости расхода субстрата при  $Y_s=1$  имеет такой же вид:

$$\frac{ds}{d\tau} = -\frac{ms}{K_s/S_0 + s}. \quad (8.4)$$

Видно, что форма уравнения скорости и вид кинетической кривой как интегральной формы дифференциального уравнения определяются лишь одним безразмерным параметром  $K_s/S_0$ . Уравнения (8.3) и (8.4) были проинтегрированы с помощью ЭВМ (решение прямой задачи) (рис. 8.1). Из рисунка видно, что при прочих равных условиях скорость процесса сильно зависит от количества введенного инокулята. Так, при переходе от посева с 1%-ной культурой от максимально возможной плотности к посеву с 20%-ной культурой время, в течение которого расходуется половина субстрата, уменьшается от 6,2 до 2,1 ед.т.

Другим важным фактором, влияющим на динамику системы, является концентрация субстрата, точнее, безразмерное отношение  $K_s/S_0$  (рис. 8.2). Как видно из рисунка, форма кривой и время, в течение которого конвертируется 50%

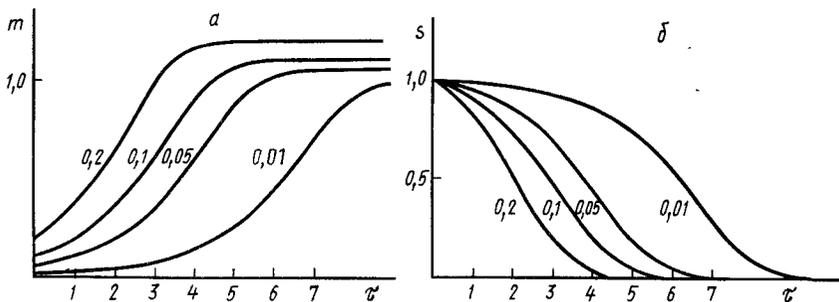


Рис. 8.1. Зависимость от времени концентрации биомассы (а) и исходного субстрата (б) для систем с различным количеством введенного инокулята ( $N_0/(M_\infty - N_0)$ ) (цифры на кривых); кривые отражают численное интегрирование уравнений (8.3) и (8.4) при значении параметра  $K_s/S_0 = 0,5$

субстрата ( $\tau_{50}$ ), зависят от этого отношения. При переходе от  $K_s/S_0 = 2$  к  $K_s/S_0 = 0,1$   $\tau_{50}$  меняется от 6,2 до 2 ед.т.

Расчеты показывают, что существует линейная зависимость между  $\tau_{50}$  и  $K_s/S_0$ . Ее можно представить теоретико-эмпирическим уравнением, которое следует из данных, приведенных на рис. 8.2:

$$\tau_{50} \approx 1,8 + 2,3(K_s/S_0). \quad (8.5)$$

При большой концентрации субстрата, существенно превышающей константу  $K_s$  ( $S_0 \gg K_s$ ), время полупревращения субстрата выходит на предельный уровень, приблизительно равный 1,8 ед.т. Таким образом, если известна  $\mu_m$ , то предельно возможное время полупревращения субстрата  $t_{50}$  в условиях его насыщающих концентраций может быть оценено по простейшему уравнению

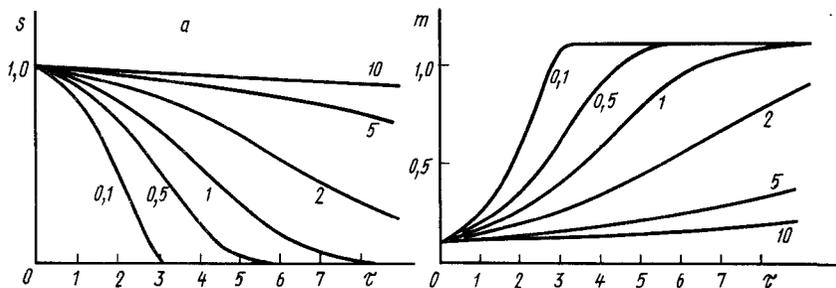


Рис. 8.2. Зависимость от времени концентрации исходного субстрата (а) и биомассы (б) для систем с различными значениями параметра  $K_s/S_0$  (цифры на кривых); кривые соответствуют численному решению уравнений (8.3), (8.4) при использовании параметра  $N_0/(M_\infty - N_0) = 0,1$

$$t_{50} \approx 1,8/\mu_m. \quad (8.6)$$

Эта оценка справедлива, когда количество инокулята около 10%. Как было показано,  $\tau_{50}$  также зависит от количества изначально введенных в систему клеток (см. рис. 8.1).

### 8.1.2. Метод двойного зеркального отражения

Из данных, приведенных на рис. 8.2, следует, что кинетические кривые роста культуры в условиях  $K_s/S_0 \gg 1$  и  $K_s/S_0 \ll 1$  существенно различаются по форме кинетической кривой. Для определения условий проведения эксперимента (выяснения области соотношения  $K_s/S_0$ ) предлагается следующая достаточно простая процедура. Кинетическая кривая роста при  $\tau = \tau_{50}$  разбивается с помощью осей  $1-1'$  и  $2-2'$  на четыре квадранта (рис. 8.3), и двумя последовательными зеркальными отражениями часть кинетической кривой, лежащей в III квадранте, проецируется в первый квадрант.

Графически двойное зеркальное отражение можно получить, если разность единица минус ордината точек кривой, лежащих в III квадранте (заштрихованная область), отложить в I квадранте, взяв за нулевой отсчет времени  $\tau = \tau_{50}$ , и двигаться в обратном направлении.

Кинетическая кривая роста в условиях  $K_s \gg S_0$  практически симметрична. Двойное зеркальное отражение верхней части

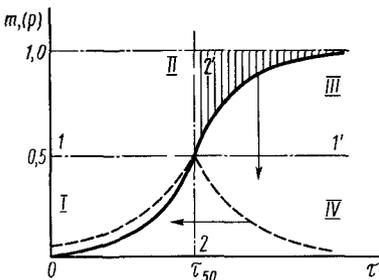


Рис. 8.3. Графическая иллюстрация метода двойного зеркального отражения при анализе полной кинетической кривой роста популяции микроорганизмов

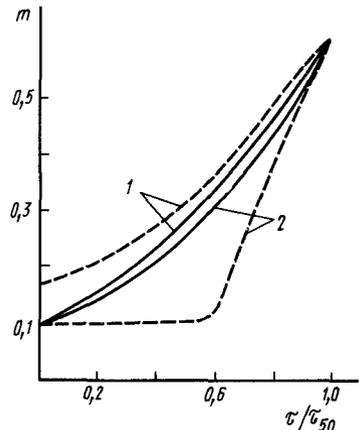


Рис. 8.4. Двойное зеркальное отражение кинетической кривой роста популяции в режиме  $S_0 \ll K_s$  (кривые 1) и в режиме  $S_0 \gg K_s$  (кривые 2): сплошные линии — нижний участок кривой роста; пунктирные — верхний

кривой должно либо совпадать с начальным участком кривой, либо лежать несколько выше (рис. 8.4, кривые 1). В условиях  $S_0 \gg K_s$  отражение верхнего участка кинетической кривой ляжет существенно ниже начального участка (кривые 2).

● Таким образом, можно на основе качественного анализа вида кривой определить, в каком режиме протекает процесс: в условиях  $S_0 \gg K_s$  (режим максимальной скорости роста) или в условиях  $S_0 \ll K_s$  (режим первого порядка по концентрации субстрата).

Приведем пример анализа режима протекания процесса, воспользовавшись для этого данными рис. 3.5 (рис. 8.5). Видно, что верхняя и нижняя части кривой практически совпадают, кривая почти симметрична. Очевидно, что рост культуры ведётся в режиме, когда концентрация субстрата существенно ниже  $K_s$ . Данные, приведенные в § 3.3, блестяще подтверждают этот вывод.

Для практического использования обсуждаемого метода существенно выполнение следующих условий: 1) при построении кинетической кривой должен быть исключен период индукции; 2) выводы будут однозначны, если для данной культуры показано, что механизм роста не включает стадии ингибирования избытком субстрата или ингибирования продуктом. В последних двух случаях метод двойного зеркального отражения может приводить к близким зависимостям, но другим качественным выводам.

**Ингибирование субстратом.** Уравнение скорости роста культуры с ингибированием избытком субстрата в безразмерных переменных имеет вид

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{\frac{K_s}{S_0} + s \left( 1 + \frac{S_0}{K_i} s \right)}. \quad (8.7)$$

Видно, что в отличие от процесса без ингибирования субстратом здесь кинетика роста определяется двумя безразмерными параметрами:  $K_s/S_0$  и  $S_0/K_i$  (рис. 8.6). Из рисунка видно, что ингибирование субстратом приводит к появлению несимметричности на кривой роста культуры. Особенно это хорошо обнаруживается при использовании метода двойного

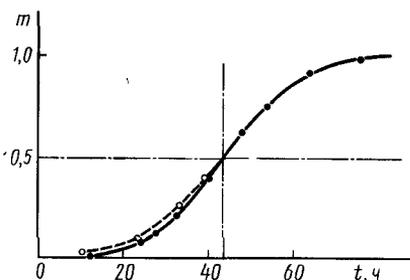


Рис. 8.5. Данные рис. 3.5, а в координатах (8.1) и двойное зеркальное отражение верхней половины кривой (пунктир)

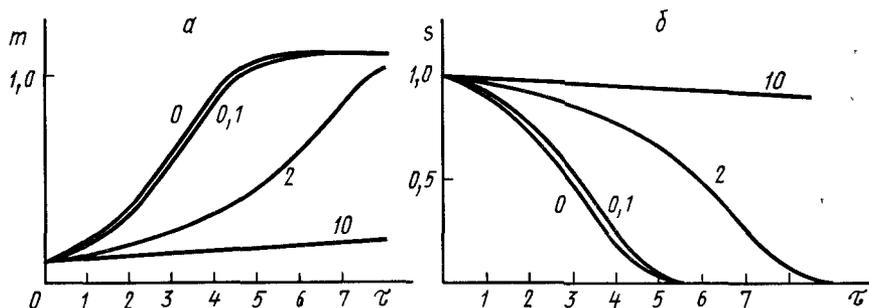


Рис. 8.6. Кинетические кривые роста микроорганизмов (а) и расход лимитирующего субстрата (б) для случая с ингибированием избытком субстрата: численное решение уравнения (8.7); цифры на кривых — параметры  $S_0/K_i$ ;  $K_s/S_0=0,5$ ;  $N_0/(M_\infty - N_0)=0,1$

зеркального отражения (рис. 8.7). Верхний участок кинетической кривой для случаев ингибирования субстратом, отраженный в I квадранте, располагается существенно ниже, чем нижний участок, что является характерной особенностью данного процесса.

**Ингибирование продуктом.** Уравнения скорости роста культуры при ингибировании образующимся продуктом в безразмерных переменных (8.1) имеют вид

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{(1 + P_\infty/K_i)(K_s/S_0 + s)} \quad (\text{неконкурентное ингибирование}); \quad (8.8)$$

$$\frac{dm}{d\tau} = \frac{ms}{K_s/S_0(1 + P_\infty/K_i P) + s} \quad (\text{конкурентное ингибирование}), \quad (8.9)$$

где  $P$  — предельное количество продукта.

Видно, что кинетика роста управляется также двумя безразмерными параметрами:  $K_s/S_0$  и  $P_\infty/K_i$  (рис. 8.8). После небольшого, почти недетектируемого периода экспоненциального роста развитие культуры переходит в режим почти постоянной скорости, наблюдается длинный, близкий к линейному участок накопления биомассы или продукта.

Характерной особенностью процесса с ингибированием продуктом является специфический вид кинетической кривой при двойном зеркальном отражении верхнего участка кривой (см. рис. 8.7). Видно, что кривая существенно несимметрична, при этом отражаемая ветвь лежит заметно выше начального участка.

● Таким образом, кинетические кривые роста микроорганизмов для различных механизмов протекания процесса имеют различную форму. Визуализацию различий удобно проводить с использованием метода двойного зеркального отражения.

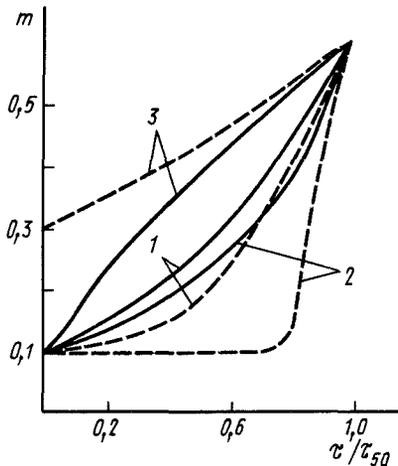


Рис 8.7. Графическая иллюстрация метода двойного зеркального отражения для системы с неосложненным ростом (1), с ингибированием избытком субстрата (2) и продуктом (3): сплошные линии — нижний участок кривой роста, пунктирные — верхний

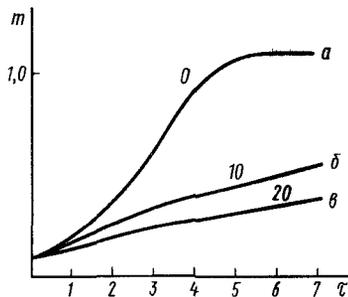


Рис 8.8. Кинетические кривые роста популяции при ингибировании продуктом:

численное решение уравнений (8.8) и (8.9),  $P_{\infty}/K_s$  — цифры на кривых,  $N_0/(M_{\infty} - N_0) = 0,1$ ,  $K_s/S_0 = 0,5$ ,  $a$  — неосложненный рост,  $\delta$  — конкурентное и  $\delta$  — неконкурентное ингибирование

Достаточно легко идентифицируются процессы с ингибированием продуктом и процессы, протекающие в режиме первого порядка по лимитирующему субстрату ( $S_0 \ll K_s$ ) (см. рис. 8.4 и 8.7). Кинетические кривые в условиях  $S_0 \gg K_s$  и при ингибировании избытком субстрата имеют близкие формы, их идентификация на основе одной кинетической кривой не всегда может быть сделана. Для дискриминации этих механизмов могут быть применены другие методы, например исследование развития культуры в экспоненциальной фазе при различных начальных концентрациях лимитирующего субстрата (см. гл. 2).

## 8.2. РОСТ КУЛЬТУРЫ ПРИ НАЛИЧИИ ПРОЦЕССА ЛИЗИСА КЛЕТОК

Уравнение скорости роста культуры при наличии лизиса клеток имеет вид

$$\frac{dM}{dt} = \frac{\mu_m MS}{K_s + S} - \lambda' M, \quad (8.10)$$

где  $\lambda'$  — константа, характеризующая скорость лизиса, или гибели, клеток.

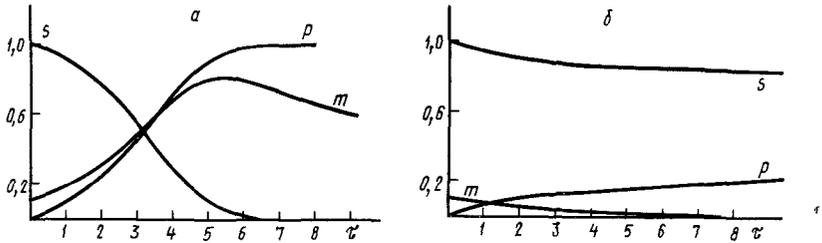


Рис. 8.9. Кинетические кривые роста микроорганизмов ( $m$ ), накопления продукта ( $p$ ) и расхода субстрата ( $s$ ) с учетом лизиса клеток при различных параметрах  $\lambda=0,1$  (а),  $1,0$  (б): решение уравнений (8.11) при  $K_s/S_0=0,5$

Если перейти к безразмерным переменным [см. (8.1)] при условии  $Y_s=Y_p=1$ , то скорости роста культуры, расхода субстрата и образования продукта будут равны

$$\begin{aligned} \frac{dm}{d\tau} &= \frac{ms}{K_s/S_0+s} - \lambda m; \\ \frac{ds}{d\tau} &= -\frac{ms}{K_s/S_0+s}; \quad \frac{dp}{d\tau} = \frac{ms}{K_s/S_0+s}, \end{aligned} \quad (8.11)$$

где  $\lambda = \frac{\lambda'}{\mu_m}$ .

В отличие от процесса в отсутствие лизиса клеток в обсуждаемом случае кинетика роста определяется двумя безразмерными параметрами:  $K_s/S_0$  и  $\lambda$  (рис. 8.9). Из рисунка видно, что лизис клеток приводит к появлению несимметричности на кривых расхода  $s$  и образования  $p$ , а также, что очень важно, к прохождению через максимум кривой роста культуры, причем с увеличением  $\lambda$  эти процессы усиливаются (кривые расхода  $s$  и образования  $p$  становятся все несимметричнее, а максимумы кривой роста  $m$  понижаются). При значениях  $\lambda$ , близких или превышающих единицу, наблюдается отмирание культуры (рис. 8.9, б). Условие отмирания культуры имеет вид

$$\lambda \geq \frac{s}{K_s/S_0+s}. \quad (8.12)$$

● Кинетические кривые роста культуры с участием стадии лизиса клеток сравнительно легко идентифицируются из-за наличия характерного максимума или ниспадающей ветви на кривых роста культуры. В этих же условиях концентрация продукта достигает насыщения и не изменяется во времени.

Совершенно аналогично кинетическое описание процесса, когда в популяции появляются клетки, не способные к делению

(см. гл. 3, § 5). В этом случае число жизнеспособных клеток проходит через максимум, а общее число клеток выходит на предельный уровень с насыщением. Такого рода механизм может быть причиной ограничения роста микробной популяции.

### 8.3. КИНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ПЛАЗМИД В РАСТУЩЕЙ ПОПУЛЯЦИИ *E. COLI*

Развитие генно-инженерных подходов (Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук, 1984) поднимает комплекс вопросов, связанных с изучением и прогнозированием временных закономерностей экспрессии гена. Для примера рассмотрим кинетику роста популяции *E. coli* (штамм PR13), содержащей плазмиду рММ 243 на среде с добавкой антибиотика ампициллина (рис. 8.10). Плазмида несла ген  $\beta$ -лактамазы, обеспечивающей рост бактерий в этой среде. Ранее было показано, что штамм *E. coli* без плазмиды не обладает  $\beta$ -лактамазной активностью и не способен расти в данной среде.

Из рис. 8.10 видно, что рост общего числа клеток в популяции существенно опережает рост плазмиды и экспрессию  $\beta$ -лактамазы, при этом нормированные кинетические кривые роста плазмиды и фермента по форме примерно совпадают. Это опережение проявляется на начальном периоде (3—5 ч) развития процесса в экспоненциальной фазе. В дальнейшем количество числа плазмид и активность  $\beta$ -лактамазы в расчете на клетку выходят на исходный уровень.

Кинетическая кривая роста общего числа клеток имеет типичный вид, включающий экспоненциальную фазу с замедлением роста. Совершенно по-другому выглядит популяционная кривая изменения числа жизнеспособных клеток, проходящая через максимум (рис. 8.11).

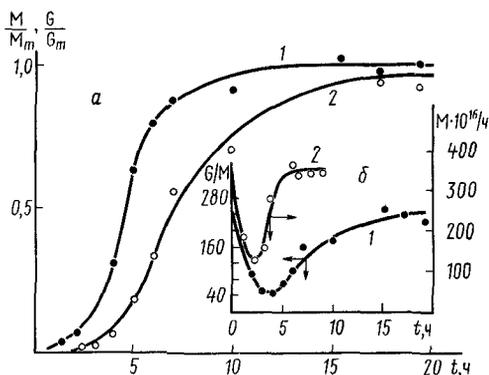


Рис. 8.10. Кинетические кривые накопления клеток  $M$  (1) и ДНК плазмиды  $G$  (2), нормированные на предельные значения:  $M_m = 4 \cdot 10^9$  клеток/мл,  $G_m = 8,8 \cdot 10^{-10}$  мкг ДНК на клетку (а); кинетика изменения числа плазмид (1) и активности  $\beta$ -лактамазы (2) в расчете на клетку в процессе роста микробной популяции (б)

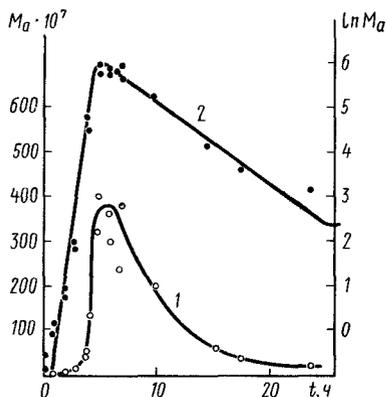


Рис. 8.11. Кинетика изменения количества клеток ( $M_a$ ), способных образовывать колонии на твердой среде в нормальных (кривая 1) и полулогарифмических координатах (кривая 2)

Рост жизнеспособных клеток существенно опережает рост плазмиды и фермента, в результате чего клетки в процессе роста популяции до определенного периода обгоняются ими (см. рис. 8.10). В дальнейшем замедление скорости роста популяции происходит быстрее, чем замедление скорости роста плазмиды, и кривые выходят на исходный уровень.

▲ Таким образом, поведение системы характеризуется двумя наиболее интересными особенностями.

1. Весьма необычными представляются обнаруженные закономерности развития популяции бактерий. Из данных рис. 8.10 и 8.11 видно, что наряду с процессами роста и деления клеток наблюдается активный процесс инактивации клеток. Этот процесс детально был проанализирован в гл. 3 (прогрессирующая некомпетентность).

2. Интересным представляется динамика роста ДНК плазмиды. Отставание процессов репликации плазмиды и «разбав-

Наибольший интерес и возможность количественной интерпретации представляет экспоненциальная фаза роста (первые 4—5 ч) (рис. 8.11). Возможным эффектом, осложняющим интерпретацию как в экспоненциальной фазе роста, так и на следующих этапах развития процесса, может быть существенное изменение рН среды в результате накопления органических кислот — продуктов метаболизма *E. coli*. Однако из рис. 8.12, а видно, что, в то время как рН среды в процессе роста меняется существенно (от 8 до 5,5), удельная скорость роста *E. coli* практически не зависит от рН среды (рис. 8.12, б).

● Итак, анализ кинетики роста *E. coli* в экспоненциальной фазе можно проводить, не опасаясь существенного влияния рН на кинетику процесса (рис. 8.13). В течение исследуемого времени экспериментальные данные достаточно хорошо описываются экспоненциальной функцией. Эффективные определяемые из эксперимента удельные скорости роста по различным переменным можно обозначить как  $\mu_a$  (рост жизнеспособных клеток),  $\mu_G$  (рост ДНК-плазмиды),  $\mu_E$  (рост активности  $\beta$ -лактамазы). Найденные значения параметров:  $\mu_a = 1,5 \text{ ч}^{-1}$ ;  $\mu_G = 0,8 \text{ ч}^{-1}$ ;  $\mu_E = 0,8 \text{ ч}^{-1}$ .

Рост жизнеспособных клеток существенно опережает рост плазмиды и фермента, в результате чего клетки в процессе роста популяции до определенного периода обгоняются ими (см. рис. 8.10). В дальнейшем замедление скорости роста популяции происходит быстрее, чем замедление скорости роста плазмиды, и кривые выходят на исходный уровень.

▲ Таким образом, поведение системы характеризуется двумя наиболее интересными особенностями.

1. Весьма необычными представляются обнаруженные закономерности развития популяции бактерий. Из данных рис. 8.10 и 8.11 видно, что наряду с процессами роста и деления клеток наблюдается активный процесс инактивации клеток. Этот процесс детально был проанализирован в гл. 3 (прогрессирующая некомпетентность).

2. Интересным представляется динамика роста ДНК плазмиды. Отставание процессов репликации плазмиды и «разбав-

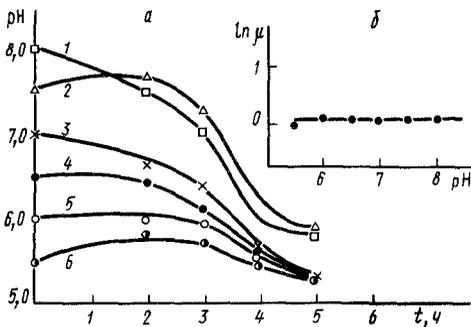


Рис. 8.12. pH-зависимости роста *E. coli*: *a*—изменения pH среды при культивировании *E. coli* на средах с различным начальным значением pH. 1—8,0, 2—7,5; 3—7,0; 4—6,5; 5—6,0, 6—5,5; *b*—зависимость удельной скорости роста от начального значения pH. Удельную скорость роста  $\mu$  определяли из линеаризации экспоненциального участка кривой роста популяции в полулогарифмических координатах (см. гл. 2)

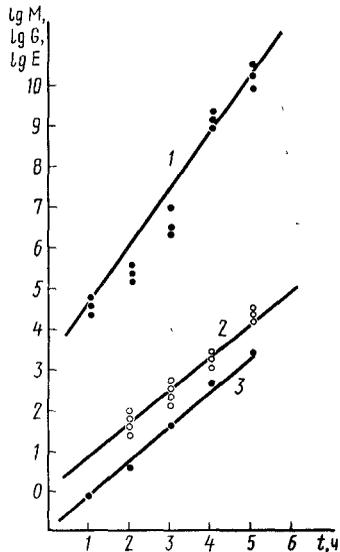


Рис. 8.13. Кинетика изменения числа жизнеспособных клеток  $M_a$  (1), ДНК плазмид G в расчете на объем суспензии клеток (2), активности  $\beta$ -лактамазы E (3) в экспоненциальной фазе роста популяции в полулогарифмических координатах

ление» плазмид в клетке представляются весьма важным феноменом, требующим анализа.

### 8.3.1. Кинетическая модель роста микробной популяции

Как уже отмечалось, анализ роста микробной популяции детально проведен в гл. 3 [уравнения (3.88)—(3.102)].

Сопоставление уравнений (3.97) и (3.102) с экспериментальными данными показывает, что кинетическая модель описывает их достаточно хорошо (см. рис. 8.11, кривая 2). Тангенс угла наклона левой ветви кривой дает значение  $\mu_{\text{набл}}$ , правой — константы скорости инактивации реплицирующей способности клеток  $\lambda$ . Из данных рис. 8.11 можно найти  $\mu_{\text{набл}} = (1,5 \pm 0,1) \text{ ч}^{-1}$ ,  $\lambda = (0,4 \pm 0,1) \text{ ч}^{-1}$  и соответственно из уравнения (3.100)  $\mu_a = 2 \text{ ч}^{-1}$ .

Проведем более подробный анализ кинетической модели с помощью численного интегрирования на ЭВМ системы уравнений (3.88)—(3.90), преобразовав ее к безразмерным переменным (8.1). В результате получим

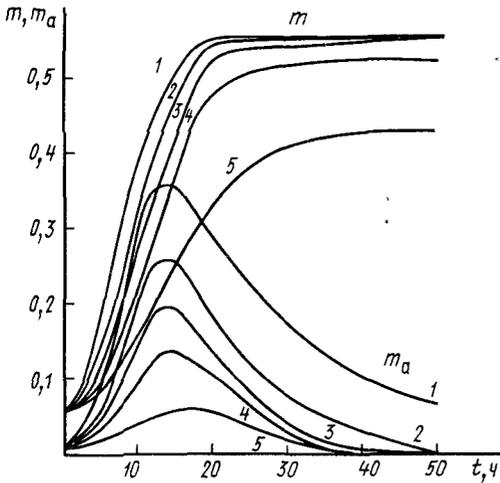


Рис. 8.14. Теоретические кривые роста микробной популяции с инактивацией реплицирующей способности клеток. Расчеты сделаны путем численного интегрирования системы уравнений (8.13) при  $K_s/S_0=2$ ;  $m_{a0}=0,01$ ;  $m_0=0,05$ ;  $Y_s=0,5$  и различных значениях  $\lambda/\mu_m$ :

1—0,0357; 2—0,714; 3—0,1071; 4—0,1428; 5—0,2142;  $m$ —общее число клеток;  $m_a$ —реплицирующие клетки

кривых экспериментальным данным (см. рис. 8.10, 8.11, 8.14).

● Таким образом рассмотренный рост *E. coli* характеризуется весьма важной особенностью: помимо деления клеток протекает достаточно интенсивная потеря ими способности к делению. Этот процесс является, по-видимому, определяющим в развитии популяции и ограничивает рост и предельную плотность культуры.

### 8.3.2. Кинетические закономерности роста числа плазмид

Важной закономерностью представляется «запаздывание» репликации плазмиды по сравнению с репликацией базовой ДНК и ростом клеток (см. рис. 8.10). Это приводит к «разбавлению» клеток по плазмиде и к появлению минимума на кинетической кривой изменения во времени числа плазмид на клетку. Анализ показывает, что наличие минимума объясняется различием в скоростях удвоения клеток и плазмиды. Проиллюстрируем это кинетическим расчетом.

Кривую роста популяции клеток  $M$  достаточно надежно можно аппроксимировать уравнением

$$\frac{M}{M_0} = \frac{e^{\mu t}}{1 + \frac{M_0}{M_m} e^{\mu t}} \quad (8.14)$$

$$\frac{dm_a}{dt} = \frac{m_a s}{K_s/S_0 + s} - \frac{\lambda}{M_m} m_a;$$

$$\frac{dm_i}{dt} = \frac{\lambda}{\mu_m} m_a \quad (8.13)$$

Принципиально важным параметром, определяющим свойства системы (8.13), является  $\lambda/\mu_m$  (рис. 8.14). Видно, что с ростом константы скорости инактивации реплицирующей способности уменьшается максимальная концентрация делящихся клеток, с увеличением максимальной удельной скорости эта величина увеличивается. Следовательно, наблюдается качественное соответствие теоретических

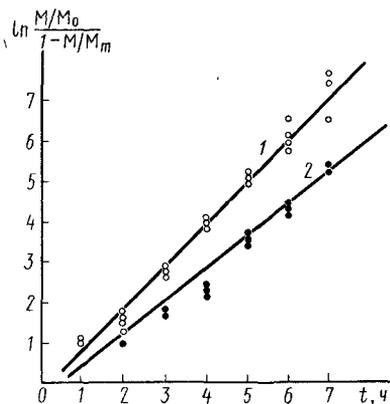


Рис. 8.15. Линеаризация данных по кинетике роста популяции (1) и ДНК плазмиды (2) в координатах уравнения (8.15):

в случае роста популяции  $M$  — концентрация клеток;  $M_0$  и  $M_m$  — начальная и предельная концентрации клеток; в случае роста ДНК плазмиды  $M$  — концентрация ДНК плазмиды;  $M_0$  и  $M_m$  соответственно начальная и предельная концентрации ДНК плазмиды

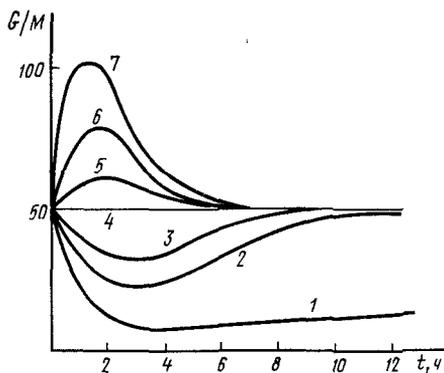


Рис. 8.16. Теоретический расчет по уравнению (8.17) кинетики изменения количества плазмид в одной клетке:  $G_0/M_0=50$ ;  $M_0/M_m=G_0/G_m=0,1$ ;  $\mu=1 \text{ ч}^{-1}$ ;  $\mu_G, \text{ ч}^{-1}$ : 1—0,1; 2—0,5; 3—0,7; 4—1,0; 5—1,2; 6—1,5; 7—2,0

Это уравнение логистической кривой, подробный анализ и условия применимости которого анализируется в гл. 3. Действительно, линеаризация данных рис. 8.10 в координатах уравнения, следующего из 3.10, т. е.

$$\mu t = \ln \frac{M/M_0}{1 - M/M_m}, \quad (8.15)$$

показывает его адекватность экспериментальным данным (рис. 8.15, прямая 1).

Рост концентрации плазмид также формально описывается уравнением (8.14), но с другим показателем  $\mu_G$  (рис. 8.15, прямая 2). Таким образом, можно записать

$$G = \frac{G_0 e^{\mu_G t}}{1 + (G_0/G_m) e^{\mu_G t}}, \quad (8.16)$$

где  $\mu_G$  — наблюдаемая удельная скорость роста плазмиды;  $G_0$ ,  $G_m$  — соответственно начальная и предельная концентрация плазмиды в системе.

Количество плазмид в расчете на клетку ( $G/M$ ), как следует из уравнений (8.14) и (8.16), можно представить функцией

$$n = \frac{G}{M} = \left( \frac{G_0}{M_0} \right) e^{\mu_G t - \mu t} \frac{1 + \frac{M_0}{M_m} e^{\mu t}}{1 + \frac{G_0}{G_m} e^{\mu_G t}}. \quad (8.17)$$

Вид функции зависит от соотношения скоростей роста плазмиды и клетки (рис. 8.16). Видно, что при  $\mu_G > \mu$  кривая имеет максимум, при  $\mu_G = \mu$  число плазмид на клетку не зависит от времени, при  $\mu_G < \mu$  наблюдается временное обеднение клеток плазмидой. Именно последний случай реализуется в эксперименте, представленном на рис. 8.10.

Для понимания основных закономерностей поведения системы полезно рассмотреть несколько частных случаев уравнения (8.17).

1. *Начальный участок кривой:* при  $t \rightarrow 0$   $\frac{M_0}{M_m} e^{\mu t} \ll 1$ ,

$$\frac{G_0}{G_m} e^{\mu_G t} \ll 1, \quad \frac{G}{M} = \frac{G_0}{M_0} e^{(\mu_G - \mu)t}.$$

На начальном участке отличается экспоненциальное уменьшение (при  $\mu_G < \mu$ ) или увеличение (при  $\mu_G > \mu$ ) плазмид в клетке.

2. *Большие времена процесса:*

$$\text{при } t \rightarrow \infty \quad \frac{M}{M_m} e^{\mu t} \gg 1, \quad \frac{G_0}{G_m} e^{\mu_G t} \gg 1,$$

$$G/M = G_m/M_m. \quad (8.19)$$

При этом важно отметить, что, поскольку посев культуры осуществляют используя «старые» клетки, инкубированные в большие периоды времени, справедливо равенство

$$G_0/M_0 = G_m/M_m. \quad (8.20)$$

3. *Скорость роста плазмиды существенно превышает скорость роста клеток:*  $\mu_G \gg \mu$ . В этом режиме имеет место уравнение

$$G/M = G_0/M_0 \frac{e^{\mu_G t}}{1 + \frac{G_0}{G_m} e^{\mu_G t}}. \quad (8.21)$$

Число плазмид на клетку увеличивается по логистической кривой с предельным значением.

$$(G/M)_{t \rightarrow \infty} = G_m/M_0. \quad (8.22)$$

4. *Скорость роста плазмиды существенно меньше скорости роста клеток:*  $\mu_G \ll \mu$ . В этих условиях уравнение (8.17) трансформируется к виду

$$G/M = \frac{G_0}{M_0} e^{-\mu t} + G_0/M_m, \quad (8.23)$$

т. е. количество плазмид на клетку экспоненциально падает, достигая максимального уровня  $G_0/M_m$ .

В пределе минимальным значением отношения  $G_0/M_m$  является единица — состояние системы, при котором на клетку приходится одна плазида.

▲ Для бактериальных систем с плазмидой характерны два режима работы: 1) ослабленный контроль, когда  $G_0/M_0 \gg 1$ ; 2) строгий, «жесткий» контроль, когда  $G_0/M_0 = 1$ . Проведенный кинетический анализ позволяет дать количественный критерий для этих режимов:

$$\begin{aligned} \mu_G &\ll \mu && \text{(строгий контроль);} \\ \mu_G &\sim \mu && \\ \mu_G &> \mu && \text{(ослабленный контроль).} \end{aligned} \quad (8.24)$$

Сопоставление теоретического уравнения (8.17) с экспериментом показывает, что обсуждаемая кинетическая модель и уравнение (8.17) достаточно хорошо описывают экспериментальные данные (см. рис. 8.10). В данном случае имеет место соотношение удельных скоростей роста  $\mu_G \sim \mu$ ,  $\mu_G < \mu$ , т. е. процесс характеризуется ослабленным контролем. По оценкам, на клетку в зависимости от фазы роста приходится 10—80 плазмид.

### 8.3.3. Кинетическая модель репликационных процессов в системе с плазмидой

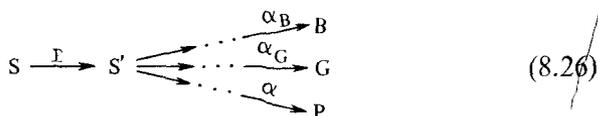
Как следует из предыдущего раздела, при росте микробной популяции наблюдается меньшая скорость роста числа плазмид по сравнению с ростом числа клеток. С помощью разработанной кинетической модели удалось количественно описать поведение такой системы во всем интервале времен протекания процесса.

Кинетический анализ роста популяции с плазмидной ДНК полезно детализировать, что возможно осуществить путем вычисления удельных скоростей роста базовой и плазмидной ДНК. Рассмотрим «микроскопический» подход к анализу кинетики роста популяции с плазмидой. Суть этого подхода заключается в вычислении времен репликации базовой ДНК и плазмиды с переходом на «популяционный» уровень при использовании уравнений

$$M = M_0 2^{t/\tau_B}; \quad G = G_0 2^{t/\tau_G}, \quad (8.25)$$

где  $\tau_B$  — время синтеза ДНК на матрице базовой ДНК;  $\tau_G$  — суммарное время синтеза ДНК на плазмидной ДНК. Основы используемого подхода изложены в гл. 1.

Кинетическую схему процесса можно представить в виде



где S—лимитирующий субстрат; S'—метаболит—продукт лимитирующего субстрата; B—базовая ДНК; G—плазмидная ДНК; P—продукт; E—лимитирующий фермент, характеризуемый кинетическими параметрами  $k_{кат}$  и  $K_s$ ;  $\alpha_B$  и  $\alpha_G$ —кинетические параметры, характеризующие скорости репликации базовой и плазмидной ДНК. Параметр  $\alpha$  описывает поток промежуточного метаболита по неспецифическому пути, не связанному с репликацией ДНК;  $\alpha_B$  и  $\alpha_G$  могут быть интерпретированы как кинетические характеристики синтеза отдельной связи в базовой и плазмидной ДНК соответственно. Исходя из данной кинетической схемы в каждой клетке кинетику роста цепи ДНК описывают следующие уравнения:

$$\frac{d\Delta B}{dt} = \alpha_B S'; \quad \frac{d\Delta G}{dt} = n \alpha_G S' \quad (8.27)$$

Уравнения (8.27) описывают скорости прироста ДНК на базовой и плазмидной матрице. Параметры  $\alpha_B$  и  $\alpha_G$  имеют эффективный характер, зависящий от свойств репликативного ферментного комплекса, при этом репликация базовой ДНК протекает «одноточечно», в случае плазмид одновременно может проходить  $n$  матриц. Динамика изменения концентрации промежуточного метаболита в клетке определяется уравнением

$$\frac{dS'}{dt} = \frac{k_{кат} ES}{K_s + S} - (\alpha_B + n \alpha_G + \alpha) S'. \quad (8.28)$$

Предполагается, что лимитирующий фермент E и белки репликационного комплекса синтезируются быстро, концентрация их в клетке постоянна и их синтез не определяет динамику репликационных процессов (последнее условие может в некоторых случаях не выполняться, это требует дополнительного рассмотрения, хотя модель может быть в принципе трансформирована и для описания этого случая).

В стационарном режиме по промежуточному метаболиту, когда скорость его синтеза уравновешивается скоростями потребления, имеем

$$S' = \frac{k_{кат} ES}{(K_s + S)(\alpha_B + n \alpha_G + \alpha)}. \quad (8.29)$$

Таким образом, скорость прироста цепи ДНК в репликационном процессе будет описываться уравнениями

$$\frac{d\Delta B}{dt} = \frac{\alpha_B k_{\text{кат}} ES}{(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)(K_s + S)}; \quad (8.30)$$

$$\frac{d\Delta G}{dt} = \frac{n\alpha_G k_{\text{кат}} ES}{(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)(K_s + S)}. \quad (8.31)$$

На начальном этапе развития процесса при постоянной  $S$  (небольшая глубина конверсии субстрата) интегрирование уравнений (8.30) и (8.31) при начальном условии  $t=0$ ,  $\Delta B=0$ ,  $\Delta G=0$  приводит к функциям

$$\Delta B = \frac{\alpha_B k_{\text{кат}} ES}{(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)(K_s + S)} t; \quad (8.32)$$

$$\Delta G = \frac{n\alpha_G k_{\text{кат}} ES}{(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)(K_s + S)} t. \quad (8.33)$$

Эти уравнения позволяют найти время, в течение которого заканчивается репликация цепи базовой ДНК ( $\tau_B$ ) или суммарной ДНК плазмид ( $\tau_G$ ). Если принять, что репликация базовой ДНК заканчивается синтезом цепи длиной  $m$ , а репликация суммарной ДНК плазмид — синтезом цепи суммарной длины  $l$ , то при  $t=\tau_B$ ,  $\Delta B=m$ ;  $t=\tau_G$ ,  $\Delta G=l$  имеем

$$m = \frac{\alpha_B k_{\text{кат}} ES}{(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)(K_s + S)} \tau_B; \quad (8.34)$$

$$l = \frac{n\alpha_G k_{\text{кат}} ES}{(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)(K_s + S)} \tau_G. \quad (8.35)$$

Соответственно

$$\tau_B = \frac{K_s + S}{k_{\text{кат}} ES} \frac{m(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)}{\alpha_B}; \quad (8.36)$$

$$\tau_G = \frac{K_s + S}{k_{\text{кат}} ES} \frac{l(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)}{n\alpha_G}. \quad (8.37)$$

$\tau_B$  и  $\tau_G$  связаны с удельными скоростями роста в системе базовой ДНК и ДНК плазмид [см. (8.75)] следующими соотношениями:

$$\mu_a = \ln 2 / \tau_B; \quad \mu_G = \ln 2 / \tau_G. \quad (8.38)$$

Предполагается, что скорость роста клетки лимитирована репликационным процессом, соответственно уравнение скорости роста определяется  $\mu_a$ . Таким образом, уравнение удельной скорости роста, как следует из развитой модели, будет иметь вид

$$\mu_a = \frac{\ln 2 k_{\text{кат}} ES}{K_s + S} \frac{\alpha_B}{m(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)}; \quad (8.39)$$

$$\mu_G = \frac{\ln 2 k_{\text{кат}} ES}{K_s + S} \frac{n\alpha_G}{l(\alpha_B + n\alpha_G + \alpha)}. \quad (8.40)$$

Уравнения (8.39), (8.40) отражают фундаментальное свойство кинетики роста микроорганизмов — *зависимость удельной скорости роста от концентрации субстрата* (см. гл. 1). При насыщающих концентрациях субстрата имеем

$$\mu_{a, m} = \frac{k_{кат} E \ln 2}{m} \frac{\alpha_B}{\alpha_B + n \alpha_B + \alpha}; \quad (8.41)$$

$$\mu_{G, m} = \frac{k_{кат} E \ln 2}{l} \frac{n \alpha_G}{\alpha_B + n \alpha_G + \alpha}. \quad (8.42)$$

Эти уравнения задают максимальную скорость роста данной культуры и максимальную скорость репликации плазмид. Видно, что величины определяются эффективностью действия лимитирующего фермента, кинетическими характеристиками репликативного процесса и базовой и плазмидной ДНК.

#### 8.4. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ФОТОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Фототрофные микроорганизмы составляют широкий круг микробиологических объектов, культивирование которых сопряжено с решением ряда специфических задач. Особенностью роста фотосинтезирующих культур является зависимость скорости роста от интенсивности, спектрального состава света, формы и геометрии культиватора. Проблемы описания роста фотосинтезирующих микроорганизмов, вопросы управления их биосинтезом изложены в ряде монографий и сборников (В. Н. Белянин, Ф. Я. Сидько, А. П. Трешкеншу, 1980; И. А. Терсков, 1982; В. Н. Белянин, 1984).

##### 8.4.1. Зависимость скорости фотосинтеза от интенсивности света в плотностатном режиме

Одним из способов выращивания популяции фотосинтезирующих микроорганизмов в проточном режиме состоит в том, что в системе автоматически поддерживается постоянная оптическая плотность суспензии на длинах волн светособирающего пигмента, в результате чего обеспечивается достаточно эффективное поглощение светового потока. Это так называемый *плотностатный режим*. Закономерности, проявляемые при росте культуры в этом режиме, аналогичны наблюдаемым для систем в отсутствие роста. Рассмотрим особенности биохимических превращений, происходящих при освещении фотосинтезирующего аппарата микроскопических водорослей и фототрофных бактерий.

Первичный фотохимический акт фотосинтеза заключается в разделении зарядов в реакционном центре. Этот процесс представляет собой окисление фотовозбужденной молекулы

хлорофилла с переносом электрона на первичный акцептор. Миграция электронного возбуждения в светособирающей антенне с эффективностью, близкой к 100%, приводит к возбуждению молекулы пигмента реакционного центра, за которым следует первичное разделение зарядов в реакционных центрах фотосинтеза. Квантовый выход этого процесса близок к единице. Например, квантовая эффективность фотоокисления бактериохлорофилла в реакционных центрах пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum* равна  $1,02 \pm 0,04$ . Константа скорости разделения зарядов весьма высока и превышает  $10^{11} \text{ с}^{-1}$ . В то же время процесс рекомбинации возникшей пары электрон — дырка сравнительно медленный и характеризуется константой скорости  $\sim 10^3 \text{ с}^{-1}$ . Непрерывный циклический характер процесса в стационарном режиме обеспечивается достаточно быстрым каталитическим восстановлением окисленной формы пигмента реакционного центра, осуществляемого с помощью таких переносчиков электронов, как цитохром. У пурпурных и зеленых бактерий при фотосинтезе в роли первичных доноров электронов выступают различного рода неорганические соединения серы,  $\text{H}_2$  или органические соединения. В растительном фотосинтезе, в фотосинтезе с участием водорослей и цианобактерий такую роль выполняет вода.

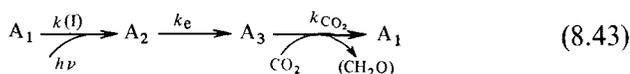
Детальное экспериментальное исследование фотосинтеза у высших растений и водорослей показало, что механизм переноса электронов от воды включает по крайней мере две фотохимические стадии, проходящие в разных фотосистемах. Две фотосистемы (фотосистема I и фотосистема II) различаются по спектрам действия и механизму функционирования. Каждая фотосистема представляет собой структурно организованную единицу, включающую молекулы пигментов антенны, реакционный центр с фотохимически активным пигментом и необходимый набор переносчиков электрона. Результатом поглощения энергии света является окисление пигмента реакционного центра и перенос электрона против термодинамического потенциала на первичный акцептор фотосистемы II.

Предполагается, что окисленная форма пигмента в реакционном центре фотосистемы II представляет собой достаточно сильный окислитель, способный в результате ряда каталитических превращений окислять воду с образованием молекулярного кислорода.

Транспорт электронов в фотосистеме I приводит к образованию соединений, обладающих низкими окислительно-восстановительными потенциалами. В электронно-транспортную цепь фотосистемы I входит ферредоксин-НАДФ-редуктаза. Функция ее заключается в каталитическом восстановлении НАДФ, который используется на последующих темновых стадиях для восстановления  $\text{CO}_2$  до углеводов.

Таким образом, согласно изложенным представлениям, освещение фотосинтезирующего аппарата, локализованного в биологических мембранах растений и водорослей, приводит к возникновению непрерывного потока электронов. На первичных стадиях фотосинтеза фотосинтетический аппарат работает как двукратный «электронный» насос, осуществляющий перенос электронов от воды против термодинамического потенциала на соединения, близкие по электрохимическому потенциалу к водородному электрону. Согласно Z-схеме фотосинтеза, на перенос одного электрона в фотосинтезирующем аппарате затрачивается два кванта света.

Рассмотрим простейшую кинетическую модель, включающую основные стадии описанных молекулярных превращений в обсуждаемом механизме (С. Д. Варфоломеев, 1985). В первом, достаточно грубом, приближении состояние фотосинтетической единицы можно представить в виде кинетической схемы



где  $I$  — интенсивность поглощенного света.

Состояние  $A_1$  характеризуется способностью поглощать квант (кванты) света с первичным разделением зарядов. Интенсивность этого процесса может быть охарактеризована константой скорости, частотой реакции  $k(I)$ , которая зависит от интенсивности света. Состояние с разделенными зарядами  $A_2$  претерпевает трансформацию с переносом электронов в электрон-транспортной цепи. Самая медленная лимитирующая стадия этого процесса может быть представлена константой скорости первого порядка  $k_e$ . Наконец, цикл электронного транспорта завершается переносом электронов на  $CO_2$  с восстановлением этого акцептора до углевода и (или) других органических веществ. В первом приближении этот процесс, зависящий от концентрации  $CO_2$ , должен быть охарактеризован лимитирующей константой скорости второго порядка  $k_{CO_2}$ .

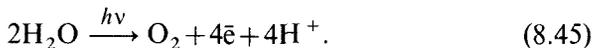
В зависимости от условий проведения процесса и от соотношения констант скоростей отдельных стадий кинетика реакции, производительность систем и эффективность преобразования энергии будут определяться той или иной стадией из представленных на схеме (8.43).

Коэффициент преобразования энергии при фотосинтезе можно определить как отношение скорости (потока) образования продукта (прироста запасенной химической энергии) к потоку поглощенной энергии:

$$\eta = \eta_1 \eta_2 \eta_3 \frac{I_p}{I}, \quad (8.44)$$

где  $j_p$  — поток образования продукта. При этом необходимо учесть, что фотосинтезирующий аппарат в силу спектральных свойств пигментов способен поглощать солнечную энергию не по всему спектру (коэффициент  $\eta_1$ ). Например, пигменты, участвующие в фотосинтезе растений, поглощают около половины солнечной энергии ( $\eta_1 \sim 0,45$ ) (Л. Н. Белл, 1980).

Необходимо принять во внимание двухквантовый характер переноса электрона (коэффициент  $\eta_2$ ). Уравнение фотосинтеза для процессов с участием двух фотосистем может быть представлено в виде



Квантовый расход для реакции (8.45), равный  $8,7 \pm 2,6$ , согласуется с условием переноса электрона по двухквантовой схеме и характеризует эффективность первичных стадий фотосинтеза.

У зеленых растений пороговая длина волны, для которой энергетическая эффективность максимальна, равна 780 нм. Максимальное значение  $\eta_2$  при освещении их светом с такой длиной волны, обладающей энергией в расчете на один квант 171 кДж, по аккумуляции внутренней энергии равно 41,8%, по аккумуляции свободной энергии — 34,7% (использованы значения термодинамических параметров окисления водорода:  $\Delta\text{H}^\circ = 568,2$  Дж/моль,  $\Delta\text{G}^\circ = -475,2$  кДж/моль). Поскольку энергия одного кванта в пределах фотосинтетически активной радиации изменяется в 1,8 раза, это может несколько уменьшать значение  $\eta_2$ .

Коэффициент  $\eta_3$  характеризует отражательную и светорассеивающую способность и для большинства фотосинтезирующих систем равен 0,8—0,9.

В соответствии с кинетической схемой (8.43) наблюдаемый на опыте поток образования продукта фотосинтетической реакции в стационарном режиме должен быть представлен уравнением

$$j_p = \frac{k(I)A_0}{1 + \frac{k(I)}{k_e} + \frac{k(I)}{k_{\text{CO}_2}\text{CO}_2}}, \quad (8.46)$$

где  $A_0$  — общая концентрация фотосинтетических единиц на единицу поверхности.

В отличие от обычных химических реакций, скорость которых представляет собой изменение количества молей вещества в единице объема за единицу времени, в данном случае удобно оперировать потоком вещества — изменением количества вещества в единицу времени, отнесенным к единице поверхности освещаемого реактора.

Уравнение (8.46) соответствует стационарной скорости накопления продукта (например, биомассы или молекулярного кислорода) без учета процесса поддержания жизнедеятельности системы, который связан с расходом аккумулированной в системе энергии, например через дыхание. Очевидно, что в первом приближении скорость этого процесса пропорциональна общему количеству биомассы в системе (числу клеток, числу реакционных центров и т. п.). Коэффициент пропорциональности задан величиной  $\beta$ , которая имеет смысл константы скорости первого порядка и может отражать константу лимитирующей стадии поглощения энергии, например лимитирующую константу скорости какого-то элементарного процесса в механизме дыхания:

$$j_p = \frac{k(I)A_0}{1 + \frac{k(I)}{k_e} + \frac{k(I)}{k_{CO_2}CO_2}} - \beta A_0. \quad (8.47)$$

▲ Из уравнения (8.47) следует весьма важное свойство фотосинтезирующих систем — зависимость потоков образования продуктов фотосинтеза (кислорода или биомассы) от интенсивности света или от концентрации конечного акцептора электронов ( $CO_2$ ) представляет собой функцию с «насыщением».

Действительно, при высоких концентрациях  $CO_2$

$$j_p \underset{CO_2 \rightarrow \infty}{=} \frac{k_e k(I)}{k_e + k(I)} A_0 - \beta A_0, \quad (8.48)$$

при высоких интенсивностях поглощаемого света

$$j \underset{I \rightarrow \infty}{=} \frac{k_{CO_2} k_e CO_2}{k_{CO_2} CO_2 + k_e} A_0 - \beta A_0. \quad (8.49)$$

Предполагается, что  $k(I)$  увеличивается с ростом интенсивности поглощаемого системой света. Соответственно при использовании «насыщающих» интенсивностей и концентраций  $CO_2$  продуктивность системы определяется разностью между скоростями лимитирующей стадии электронного транспорта ( $k_e$ ) и лимитирующей стадии поглощения энергии ( $\beta$ ):

$$j \underset{CO_2 \rightarrow \infty}{I \rightarrow \infty} = (k_e - \beta) A_0. \quad (8.50)$$

Большое число экспериментальных работ, выполненных по исследованию зависимости продуктивности фотосинтеза от интенсивности света и концентрации  $CO_2$ , подтверждает этот вывод.

Другое важное свойство, которое следует из рассмотренной кинетической модели, заключается в том, что коэффициент

преобразования энергии при фотосинтезе является функцией интенсивности поглощаемого света и должен существенно уменьшаться при высоких его интенсивностях. Физическая сущность этого эффекта связана с тем, что при высоких интенсивностях света начинают лимитировать «темновые» стадии процесса, например белковый электронный транспорт, при этом дальнейшее увеличение потока подводимой энергии не увеличивает продуктивности фотосинтеза.

При насыщающих концентрациях  $\text{CO}_2$  ( $k_{\text{CO}_2}\text{CO}_2 \gg k(I)$ ) в соответствии с (8.44) и (8.46) коэффициент полезного действия системы будет соответствовать уравнению

$$\eta = \eta_1 \eta_2 \eta_3 \left( \frac{k(I)k_e A_0}{(k(I) + k_e)I} - \frac{\beta A_0}{I} \right). \quad (8.51)$$

$A_0$  можно задать через оптическую плотность, при которой достаточно эффективно поглощается свет. При единице оптической плотности  $A_0 = (n\text{Ex})^{-1}$ , где  $n$  — число молекул хлорофилла на один реакционный центр;  $\text{Ex}$  — его коэффициент экстинкции.

Функция  $k(I)$  в зависимости от механизма первичных процессов может иметь различный вид. Рассмотрим простейший случай. Эффективная константа скорости поглощения света системой, имеющая размерность обратного времени (константа скорости первого порядка), является линейной функцией интенсивности поглощаемого света

$$k(I) = \alpha I,$$

где  $\alpha$  — коэффициент пропорциональности.

В этом случае константа скорости поглощения определяется числом молекул пигмента и его коэффициентом экстинкции:

$$k(I) = n\text{Ex}I, \quad (8.52)$$

где  $k(I)$  имеет размерность обратного времени.

Из соотношений (8.51) и (8.52) следует, что зависимость эффективности преобразования энергии от интенсивности света определяется отношением  $k_e/n\text{Ex}$ :

$$\frac{\eta}{\eta_1 \eta_2 \eta_3} = \frac{1}{1 + \frac{\beta}{k_e} I} - \frac{\beta}{\alpha I}.$$

Видно, что зависимость эффективности преобразования энергии фотосинтезирующей системой определяется двумя параметрами: отношением  $k_e/\alpha$  и безразмерным отношением  $k_e/\beta$ . В зависимости от размерности представленных величин значение  $k_e/\alpha$  имеет характер интенсивности, выраженной либо в энергетических, либо в молекулярных единицах.

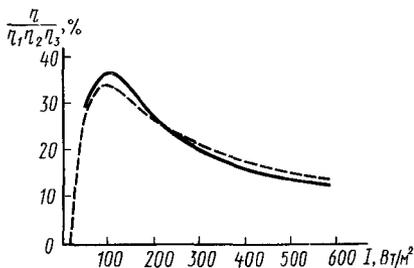


Рис 8.17. Зависимость коэффициента преобразования энергии от интенсивности поглощенного света для хлопчатобельных:

непрерывная линия — экспериментальные данные (В. Н. Белянин и др., 1980), пунктирная линия — теоретический расчет по уравнению (8.54) с использованием параметров  $k_e/\alpha = 120 \text{ Вт/м}^2$ ,  $k_e/\beta = 6$

▲ Сопоставление уравнения (8.54) с экспериментальными данными показывает, что обсуждаемая модель достаточно хорошо описывает экспериментально наблюдаемые зависимости коэффициента преобразования энергии фотосинтезирующими системами от интенсивности поглощаемого света (рис. 8.17).

▲ Кинетическое моделирование процесса позволяет проследить влияние различных факторов на поведение системы и наметить пути повышения эффективности преобразования энергии. Зависимость  $\eta/(\eta_1\eta_2\eta_3)$  от интенсивности света имеет две характерные точки.

1. Существует пороговая интенсивность света  $I_{\text{п}}$ , ниже которой в системе энергии не запасается [ $\eta/(\eta_1\eta_2\eta_3) \leq 0$ ]:

$$I_{\text{п}} = \frac{k_e}{\alpha} \frac{1}{k_e \beta - 1}. \quad (8.53)$$

Значение этой пороговой интенсивности также определяется только параметрами  $k_e/\alpha$  и  $k_e/\beta$  (рис. 8.18, а).

2. Зависимость коэффициента преобразования энергии от интенсивности света представляет собой функцию с максимумом, которая задается уравнением (рис. 8.18, б)

$$[\eta/(\eta_1\eta_2\eta_3)]_{\text{макс}} = \frac{(k_e/\beta - 1)^2}{(k_e/\beta + \sqrt{k_e/\beta})^2}, \quad (8.54)$$

а значение интенсивности, при которой наблюдается экстремум, имеет вид (рис. 8.18, в)

$$I_{\text{макс}} = k_e/\alpha \frac{1 + \sqrt{k_e/\beta}}{k_e/\beta - 1}. \quad (8.55)$$

Для определения порядка  $k_e/\alpha$  можно принять число молекул пигмента на реакционный центр  $\sim 10^2$ , «средний» коэффициент экстинкции  $E_x = 10^4 \text{ М} \cdot \text{см}^{-1}$ , значение  $k_e \sim 50 \text{ с}^{-1}$  (см. гл. 1). Последняя величина получена путем статистического анализа констант скорости лимитирующих стадий в ферментативном катализе. Если принять значение «среднего» кванта фотосинтетически активной радиации  $\sim 210 \text{ кДж/моль}$ , то  $k_e/\alpha = 100 \text{ Вт/м}^2$ .

Интересно отметить, что максимальное значение коэффициента преобразования энергии определяется только отношением лимитирующих констант скорости переноса электрона в фотосинтетической электрон-транспортной цепи и в системе использования энергии.

С ростом  $k_e/\beta$  существенно увеличивается максимальное значение коэффициента преобразования энергии и происходит сдвиг максимума в сторону более низкой интенсивности света (рис. 8.19, а). Система адаптируется к высоким интенсивностям света с увеличением параметра  $k_c/\alpha$  (рис. 8.19, б). Для повышения коэффициента преобразования энергии при высокой интенсивности света необходимо увеличение как  $k_c/\alpha$ , так и  $k_e/\beta$  (рис. 8.19, в).

При условии (8.52) уравнение (8.47) приобретает вид

$$j_p = \frac{\alpha I A_0}{1 + \frac{\alpha I}{k_e} + \frac{\alpha I}{k_{CO_2} CO_2}} - \beta A_0 \quad (8.56)$$

или

$$\frac{A_0}{j_p + \beta A_0} = \frac{1}{\alpha I} + \frac{1}{k_e} - \frac{1}{k_{CO_2} CO_2}. \quad (8.57)$$

Зависимость переменной  $1/(j_p + \beta A_0)$  от  $1/CO_2$  при различных интенсивностях света должна быть представлена серией параллельных непересекающихся прямых. Соответственно серией параллельных прямых должна описываться зависимость  $1/(j_p + \beta A_0)$  от  $1/I$  при различных концентрациях субстрата.

Зависимости типа (8.56), (8.57) хорошо описывают экспериментальные данные (рис. 8.20).

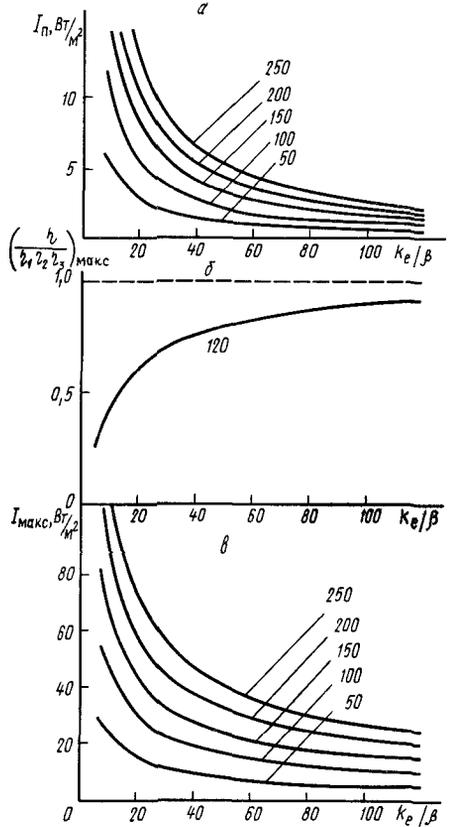


Рис. 8.18. Зависимость максимальной эффективности (а), интенсивности максимума (б) и пороговой энергетической интенсивности света (в) для фотосинтезирующей системы от отношения  $k_e/\beta$  при различных значениях параметра  $k_c/\alpha$  (цифры на кривых)

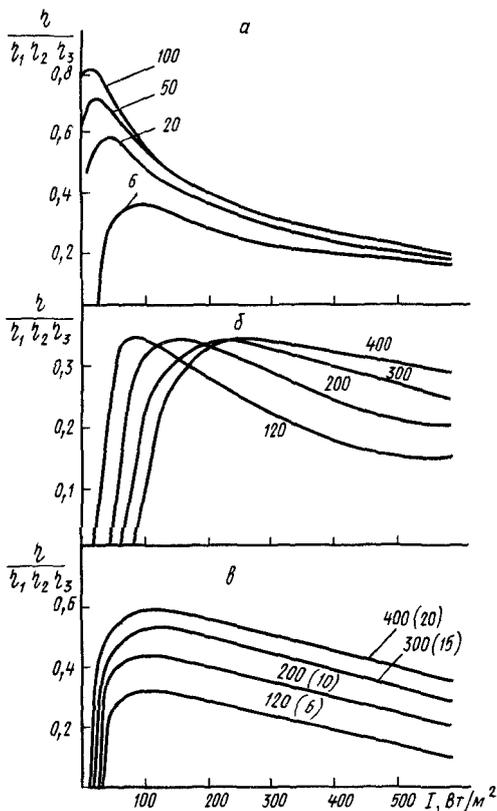


Рис. 8.19. Зависимость коэффициента преобразования энергии  $\eta$  ( $\eta_1, \eta_2, \eta_3$ ) от интенсивности поглощаемого света  $I$ :

*a* — при различных значениях  $k_c/\beta$  (цифры на кривых),  $k_c/\alpha = 120$  Вт/м<sup>2</sup>; *б* — при различных значениях  $k_c/\alpha$  (цифры на кривых),  $k_c/\beta = 6$ , *в* — при различных значениях  $k_c/\alpha$  (цифры на кривых) и  $k_c/\beta$  (цифры в скобках)

биомассы. Такая производительность должна иметь место для данного штамма хлореллы при проведении процесса в условиях насыщающих интенсивностей света и концентрации  $\text{CO}_2$ . Эта предельно высокая величина, значение которой лимитировано скоростями электронного транспорта по фотосинтетической цепи.

▲ Важной особенностью фотосинтеза является уменьшение эффективности преобразования энергии при высоких интенсивностях света. Солнечная активность по фотосинтетически активной радиации составляет около 400 Вт/м<sup>2</sup>. Из рис. 8.17 видно, что фотосинтез в этих условиях «работает» с пониженной эффективностью.

Уравнение (8.57) можно представить в виде

$$\frac{1}{j_p + j_{\text{дых}}} = \frac{1}{\alpha A_0 I} + \frac{1}{j_m} + \frac{1}{k_{\text{CO}_2} A_0 \text{CO}_2}, \quad (8.58)$$

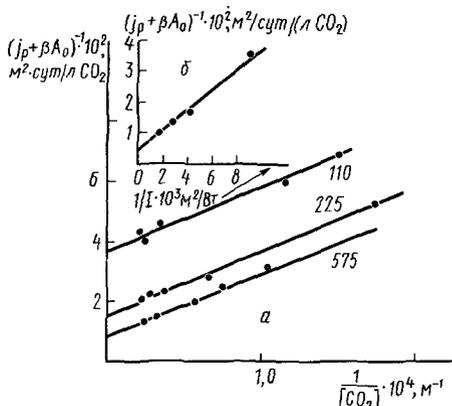
где  $j_{\text{дых}} = \beta A_0$ ;  $j_m = k_c A_0$  характеризует максимальную скорость (поток поглощения субстрата или поток накопления продукта) при насыщающих интенсивностях света и концентрациях  $\text{CO}_2$ . Соответственно отрезки, отсекаемые прямыми (рис. 8.20, *a*) на оси ординат, могут быть описаны уравнением

$$\left( \frac{1}{j_p + j_{\text{дых}}} \right)_{\text{CO}_2 \rightarrow \infty} = \frac{1}{\alpha A_0 I} + \frac{1}{j_m}. \quad (8.59)$$

Данные рис. 8.20, *a* в координатах уравнения (8.59) приведены на рис. 8.20, *б*. Из них следует  $j_m = 10$  л  $\text{CO}_2/(\text{м}^2 \cdot \text{сут})$  или  $\sim 300$  г/(\text{м}^2 \cdot \text{сут}) сухой

Рис. 8.20. Зависимость продуктивности культуры *Chlorella sp. K* (30° C) от концентрации CO<sub>2</sub> в координатах уравнения (8.57) (В. Е. Семененко и др., 1966):

цифры на прямых соответствуют интенсивности поглощаемого света (Вт/м<sup>2</sup>);  $a$  — зависимость  $(j_p + \beta A_0)^{-1} \cdot 10^2$  от интенсивности света ( $b$ )



▲ Из проведенного анализа вытекают следующие основные пути повышения эффективности фотосинтеза при высоких интенсивностях света.

1. *Регуляция фотосинтетической антенны, т. е. количества светособирающих пигментов.* Значение интенсивности света, при которой эффективность преобразования энергии падает в два раза, обратно пропорционально числу молекул пигмента в реакционном центре. По-видимому, с помощью методов селекции, генетики и геной инженерии можно создать системы, с одной стороны, достаточно эффективно поглощающие свет, с другой — обогащенные реакционными центрами по отношению к пигменту.

2. *Увеличение скорости электрон-транспортных процессов.* Эффективность фотосинтеза можно повысить, если увеличить скорость лимитирующей стадии электронного транспорта ( $k_e$ ). На данный параметр системы можно влиять косвенным путем. Например, использование микроорганизмов приводит к повышению температуры протекания процесса, что должно за счет увеличения  $k_e$  заметным образом повысить эффективность преобразования световой энергии при высоких интенсивностях света.

Повышение температуры в рамках диапазона, приемлемого для микроорганизма, действительно приводит к увеличению КПД фотосинтеза или потока продукта.

При анализе роста фотосинтезирующих микроорганизмов экспериментатор сталкивается с проблемой определения энергетической доли света, поглощенной такой системой. Разные фотосинтезирующие объекты имеют свой характерный спектр поглощения. Кроме того, любой источник света имеет специфическое распределение энергии излучения по длинам волн. Для определения интенсивности света, поглощаемого системой, в качестве первого приближения

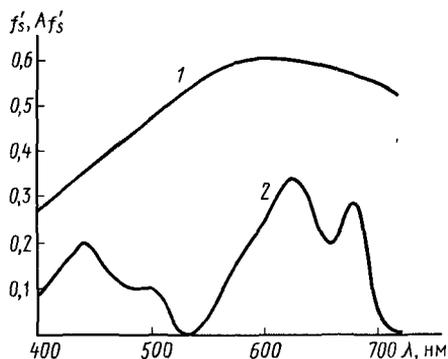


Рис. 8.21. К определению энергетической интенсивности светового потока поглощаемого культурой цианобактерий *A. nidulans* [см. (8.60)]

где  $I_0$  — суммарная интенсивность по всему спектру.

На рис. 8.21 приведены найденные из экспериментальных данных значения функции  $f'_s$  (кривая 1) и  $A(f'_s)$  (кривая 2) для культуры *A. nidulans*. Численное интегрирование этих функций дает значения интенсивности поглощенной энергии, приведенные в качестве переменной на рис. 8.22. Отрицательные

можно рекомендовать следующую процедуру (Л. Н. Белл, 1980). Снимаются спектр поглощения исследуемой культуры  $A(\lambda)$  и относительный (нормированный) спектр источника света  $f'_s(\lambda)$ . В этом случае интенсивность поглощенной энергии можно вычислить по формуле

$$I = I_0 \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} A(\lambda) f'_s(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} f'_s(\lambda) d\lambda}, \quad (8.60)$$

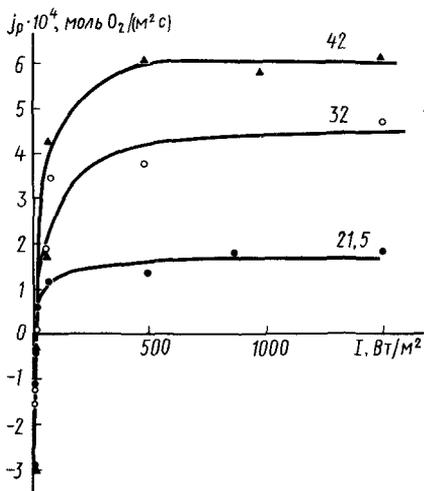


Рис. 8.22. Зависимости потоков образования кислорода цианобактерией *Anacystis nidulans* от интенсивности поглощаемого света при различных температурах (°С; цифры на кривых)

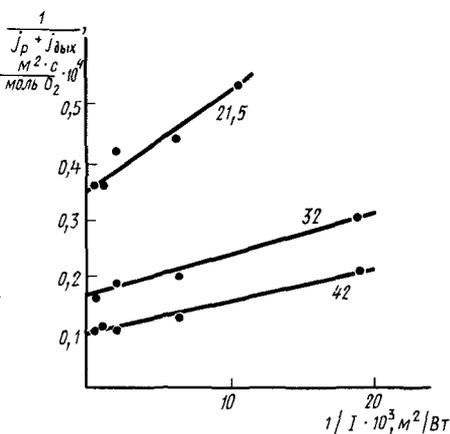


Рис. 8.23. Зависимости потока продукта от интенсивности поглощенного света для *A. nidulans* в координатах уравнения (8.57) при различных температурах (°С; цифры на прямых)

значения потоков образования продукта лежат в области интенсивностей света, для которых скорость фотосинтеза ниже скорости дыхания. Экспериментальные данные рис. 8.21 достаточно хорошо линейризуются в координатах уравнения (8.57) (рис. 8.23).

● Коэффициент преобразования энергии (функции интенсивности поглощенного света), как следует из изложенной выше теории, имеет экстремальный характер, что прекрасно подтверждается на практике (рис. 8.24). Более высоким коэффициентом полезного действия при высоких интенсивностях света фотосинтетическая система обладает при повышенной температуре.

В табл. 8.1 приведены характеристики культуры *A. nidulans*, рассчитанные на основе приведенных экспериментальных зависимостей.

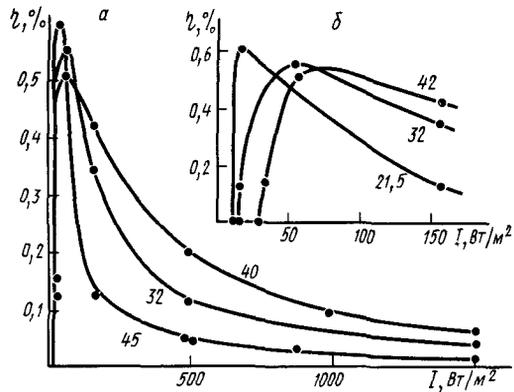


Рис. 8.24. Коэффициент преобразования световой энергии как функция интенсивности поглощаемого света при различных температурах (°C; цифры на кривых) (а); начальный участок кривых 8.26, а (б)

Характеристики продуктивности культуры *A. nidulans* при различных температурах

Таблица 8.1

Температура, С	$J_m \cdot 10^4$ , моль $O_2/(M^2 \cdot c)$	$J_{\text{Лич}} \cdot 10^4$ , моль $O_2/(M^2 \cdot c)$	$\eta_{\text{макс}}$ , %	$I_{\text{макс}}$ , Вт/М <sup>2</sup>	$I_{p2}$ , Вт/М <sup>2</sup>
21	2,9	1,0	0,6	15	10
32	5,9	1,5	0,55	50	15
42	10,0	3,1	0,55	70	25

### 8.4.2. Периодическое культивирование фотосинтезирующих микроорганизмов

Рост чистых культур фототрофных микроорганизмов в периодическом режиме описывается кинетическими кривыми, которые по своему общему виду близки к кривым роста хемотрофных микроорганизмов. Специфика роста фототрофов заключается в том, что основной энергетический фактор — интенсивность поглощаемой световой энергии — является переменной величиной, изменение во времени которой задается

изменением оптической плотности. По мере развития культуры возрастает степень поглощения световой энергии, на конечном этапе развития процесса оптическая плотность достигает такой величины, при которой полное поглощение света происходит в тонком слое на поверхности сосуда культиватора; в результате основной объем системы лишается лимитирующего источника энергии, вследствие чего рост прекращается.

Уравнение скорости роста, по аналогии с уравнением (8.10), может быть представлено в виде (В. Н. Белянин и др., 1980)

$$\mu = \frac{\mu_m I}{K_1 + I} - \mu_0, \quad (8.61)$$

где  $\mu_m$  — максимальная скорость роста;  $K_1$  — эффективная константа;  $I$  — интенсивность поглощаемой световой энергии;  $\mu_0$  — скорость расхода биомассы за счет процессов метаболизма (скорость «темнового» дыхания клеток). При этом необходимо иметь в виду, что в общем случае  $I$  является функцией времени.

В монографии В. Н. Белянина с соавторами (1980) рассмотрено решение уравнения кинетики роста фотосинтезирующей популяции с учетом линейного приближения, справедливого при небольших оптических плотностях системы. Полученное уравнение роста имеет вид

$$M = \frac{M_m}{1 + \frac{M_m - N_0}{N_0} e^{-\mu t}}, \quad (8.62)$$

где

$$\mu = \frac{\mu_m I_0}{K_1 + I_0} - \mu_0; \quad (8.63)$$

$I_0$  — интенсивность энергии падающего светового потока.

Уравнение (8.62) представляет собой уравнение логистической кривой, свойства которого детально рассмотрены в гл. 3. В ряде случаев логистические кривые достаточно хорошо описывают динамику развития фотосинтезирующей популяции клеток.

В общем виде анализ кинетики роста фотосинтезирующей культуры при периодическом культивировании требует интегрирования уравнения скорости с использованием ЭВМ. Рассмотрим свойства модели роста, изложенной в работе Фрелиха с сотр. (1984). В процессе роста популяции фотосинтезирующих микроорганизмов переменными величинами являются концентрация пигмента  $Ch$ , общее количество биомассы  $M_t$ , концентрация лимитирующего субстрата  $S$ , концентрация углевода  $H$ , концентрация резервного вещества  $R$ , накапливаемого клетками в качестве питательного и энергетического резервного компонента (например, полимера углеводного характера или другого продукта). В качестве переменной можно также выделить

«активную» биомассу  $M$ , представляющую собой общую биомассу за вычетом биомассы хлорофилла, углевода, резервного вещества  $R$ .

Скорость роста популяции контролируется по крайней мере тремя факторами: 1) концентрацией лимитирующего субстрата  $S$  (для фототрофных микроорганизмов это может быть, например,  $CO_2$  или фосфат); 2) интенсивностью поглощаемого системой света  $I$ ; 3) относительной внутриклеточной концентрацией углевода  $H/M$ .

Накопление лабильного углевода  $H$  зависит в конечном итоге от поглощенного света; образующийся углевод расходуется в ряде параллельно протекающих процессов, включающих синтез хлорофилла  $Ch$ , биомассы  $M$ , резервного вещества  $R$ , а также продуктов  $P$  темнового дыхания:



$$\frac{dH}{dt} = Q(I) Ch - \alpha_1 v_{Ch} - \alpha_2 v_M - v_R - \mu_0 M, \quad (8.65)$$

где  $Q(I)$  — параметр, характеризующий скорость фотосинтетической реакции (предполагается, что скорость образования углевода — первичного стабилизированного продукта фотосинтеза — линейно зависит от концентрации хлорофилла в системе);  $v_{Ch}$  — скорость синтеза хлорофилла;  $v_M$  — скорость синтеза биомассы;  $v_R$  — скорость синтеза резервного вещества;  $\mu_0$  — удельная скорость использования углевода в энергетическом обеспечении;  $\alpha_1, \alpha_2$  — соответствующие стехиометрические коэффициенты.

Параметр  $Q(I)$ , характеризующий квантовую эффективность образования  $H$ , зависит от интенсивности поглощаемого света, геометрии реакционного сосуда, эффекта ингибирования фотосинтетического процесса продуктом реакции  $H$ . Величина  $Q(I)$  с учетом пространственного фактора может быть представлена в виде

$$Q(I) = \left( \frac{Q}{1 + \frac{H/M}{K_i}} \right) \frac{1}{V} \int_0^V \frac{I}{K_i + I} dV; \quad (8.66)$$

$$Q(I) = \left( \frac{Q_m}{1 + \frac{H/M}{K_i}} \right) \frac{1}{V} \int_0^V \frac{I}{K_i + I + I^2/K_u} dV, \quad (8.67)$$

где  $Q_m$  — максимальная скорость фотосинтетической реакции;  $V$  — объем системы;  $K_i$  — константа ингибирования фотосинте-

тического процесса углеводом;  $K_{ii}$  — константа фотоингибирования. Уравнение (8.67) включает член  $I^2 K_{ii}$ , характеризующий фотоингибирование процесса высокими интенсивностями света, т. е. оно аналогично уравнению скорости с ингибированием избытком субстрата.

Остальные члены, входящие в уравнение (8.65) как функции основных переменных, могут быть записаны в виде

$$v_{Ch} = \frac{d(Ch/M)}{dt} = \mu_m^{Ch} \left( \frac{1}{1 + \frac{H/M}{K_{Ch}}} \right) M, \quad (8.68)$$

где  $\mu_m^{Ch}$  — максимальная скорость синтеза хлорофилла на единицу биомассы;  $K_{Ch}$  — константа ингибирования синтеза большими количествами углевода. В уравнении (8.68) учитываются экспериментально наблюдаемые эффекты ингибирования синтеза хлорофилла высокими концентрациями углевода:

$$v_m = \frac{dM}{dt} = \mu M; \quad (8.69)$$

$$\mu = \mu_m^M \left( \frac{H/M}{K_H + N/M} \right) \left( \frac{S}{K_S + S} \right), \quad (8.70)$$

где  $\mu_m^M$  — максимальная удельная скорость синтеза биомассы;  $K_H$  — субстратная константа по эндогенному углеводу;  $K_S$  — субстратная константа по лимитирующему субстрату. Предполагается, что рост биомассы является по крайней мере двухсубстратным процессом, скорость которого определяется концентрацией как внутриклеточного углевода, так и лимитирующего субстрата (это уравнение, по-видимому, не совсем адекватно отражает реальность, поскольку  $H$  и  $S$ , вероятно, немультплицирующие субстраты, конвертируемые двумя различными ферментными системами, см. гл. 2; однако эта неточность не вносит существенных искажений в изложенное ниже):

$$v_R = \frac{dR}{dt} = \mu_{RS} \left( \frac{H/M}{K_{RS} + H/M} \right) \left( \frac{1}{1 + \frac{R/M}{K_{RI}}} \right) M - \frac{\mu_{RD} R}{1 + \frac{H/M}{K_{RD}}}, \quad (8.71)$$

где  $\mu_{RS}$  — максимальная скорость синтеза резервного вещества  $R$ ;  $\mu_{RD}$  — максимальная скорость его деградации;  $K_{RS}$  — субстратная константа по внутриклеточному углеводу. Предполагается, что скорость синтеза  $R$  может ингибироваться продуктом, скорость деградации — углеводом  $H$ . Соответствующие константы ингибирования заданы  $K_{RI}$  и  $K_{RD}$ .

Система уравнений (8.63) — (8.71) основана на известных особенностях биохимии и физиологии фототрофных организ-

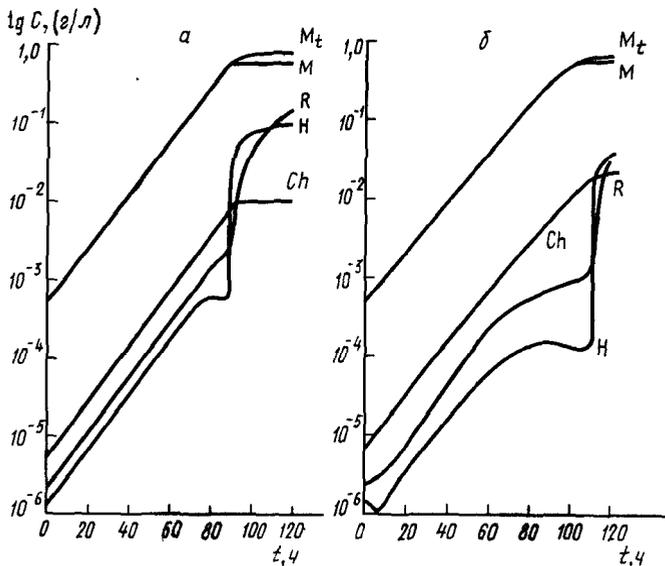


Рис. 8.25. Данные численного интегрирования системы уравнений (8.65)—(8.73) в полулогарифмических координатах (В. Т. Fröhlich et al., 1983): при  $S_0=0,01$  г/л глубина культиватора 20 см. Данные рис. 8.27, а получены при  $I_0=115,4$  Вт/м<sup>2</sup>; рис. 8.27, б—23,08 Вт/м<sup>2</sup>

мов. Параметры  $\mu_m^M$ ,  $K_H$ ,  $K_S$ ,  $Q_m$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\mu_0$ ,  $\mu_m^{Ch}$ ,  $\mu_{RD}$ ,  $\mu_{RS}$  и другие оценены из различных экспериментальных данных.

В качестве модельного иллюстративного расчета в работе анализируются закономерности роста микроорганизма в плоском фотосинтетическом реакторе с перемешиванием, глубина которого задана переменной  $z$ . В этом случае интенсивность поглощаемого света, входящая в уравнения (8.66), (8.67), может быть задана в соответствии с законом Ламберта—Бера простейшим уравнением

$$I = I_0 e^{-\varepsilon z}, \quad (8.72)$$

где  $\varepsilon$ —эффективный коэффициент поглощения светособирающих пигментов клеток. Коэффициент поглощения  $\varepsilon$  линейно связан с концентрацией в системе светособирающего пигмента (хлорофилла):

$$\varepsilon = k_{Ch} Ch. \quad (8.73)$$

Решение системы уравнений (8.65)—(8.73) на ЭВМ дает возможность представить развитие во времени всех основных переменных (рис. 8.25). При высоких интенсивностях света (рис. 8.25, а) культура растет экспоненциально довольно большой период времени (85 ч), затем на ограниченном временном диапа-

зоне рост прекращается за счет истощения субстрата S (например, фосфата). В течение всего периода экспоненциального роста состав биомассы постоянен (прямые участки кривых рис. 8.24, а параллельны). В процессе «старения» популяции при переходе в стационарную фазу должен достаточно быстро изменяться состав биомассы — возможно резкое увеличение относительного содержания лабильного углевода и резервного вещества R.

В случае низких интенсивностей света (рис. 8.25, б) заметно уменьшается скорость роста, состав биомассы изменяется во времени, при этом отклонения от экспоненциального роста наблюдаются существенно раньше. По форме кинетическая кривая роста приближается к логической кривой.

● Итак, состав биомассы, полученной при разной плотности световых потоков, достаточно сильно различается: при низких интенсивностях света концентрация хлорофилла существенно выше, а концентрация углевода и резервного вещества R существенно ниже, чем для микроорганизма, культивируемого при высоких плотностях энергии света.

### 8.4.3. Фотосинтезирующая культура в режиме хемостата

Рассмотрим закономерности роста фототрофного организма при непрерывном культивировании в режиме хемостата. В проточной системе в стационарном режиме скорости изменения компонентов процесса будут заданы следующими уравнениями [см. базовые уравнения (8.65) — (8.73)]:

$$\frac{dH}{dt} = Q(I) Ch - \alpha_1 v_{Ch} - \alpha_2 v_m - v_R - \mu_0 M - DH = 0; \quad (8.74)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{1}{Y_s} \mu H = 0; \quad (8.75)$$

$$\frac{d(Ch/M)}{dt} = \mu_m^{Ch} \left( \frac{1}{1 + \frac{H/M}{K_{Ch}}} \right) M - D \frac{Ch}{M} = 0; \quad (8.76)$$

$$\frac{dM}{dt} = \mu_m^M \left( \frac{H/M}{K_H + H/M} \right) \left( \frac{S}{K_s + S} \right) M - DM = 0; \quad (8.77)$$

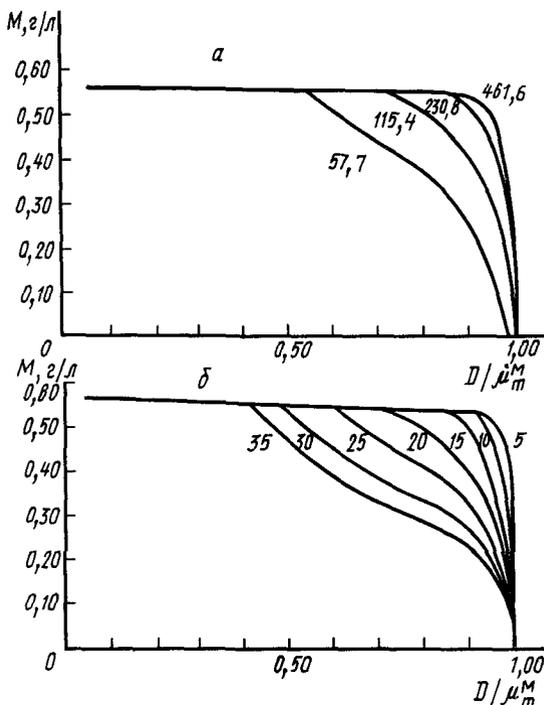
$$\frac{dR}{dt} = \mu_{RS} \left( \frac{H/M}{K_{RS} + H/M} \right) \left( \frac{1}{1 + \frac{R/H}{K_{R1}}} \right) M - \frac{\mu_{RD} R}{1 + \frac{H/M}{K_{RD}}} - DR = 0; \quad (8.78)$$

$$M_t = M + Ch + R + H. \quad (8.79)$$

Светозависимой стадией процесса является синтез углерода H, при этом функцию  $Q(I)$  выразим в виде уравнения (8.67). Как и в случае хемотрофной культуры, популяция клеток «вымыва-

Рис. 8.26. Расчетные данные зависимости концентраций активной биомассы от относительной скорости разбавления в проточной культуре при различных интенсивностях падающего света (а) и различной глубине культивации (б) (В. Т. Fröhlich et al., 1983);

интенсивности падающего света и глубина культивации даны цифрами на кривых соответственно в  $\text{Вт/м}^2$  и см;  $S_0 = 0,01 \text{ г/л}$ ;  $L = 20 \text{ см}$  (а);  $I_0 = 115,4 \text{ Вт/м}^2$  (б)



ется» при приближении скорости разбавления к  $\mu_m^M$  (рис. 8.26). Концентрация «активной» биомассы существенно уменьшается при больших скоростях разбавления, с уменьшением интенсивности падающего света и с увеличением глубины культивации.

В отличие от концентрации биомассы эта зависимость концентрации хлорофилла имеет максимум при относительно невысоких скоростях разбавления, при этом значение максимума растет с увеличением глубины культивации (рис. 8.27).

Принципиально важной характеристикой при функционировании непрерывной системы выращивания микроводорослей и фототрофных бактерий является продуктивность системы по биомассе, хлорофиллу, резервному веществу. Продуктивность системы (или поток вещества) в случае фототрофов лучше всего измерять в количестве вещества, получаемого с единицы освещаемой поверхности в единицу времени, например  $\text{г/(ч} \cdot \text{м}^2)$ . Для проточно-плоского ферментера продуктивность системы по активной биомассе при низких скоростях разбавления линейно увеличивается с ростом скорости разбавления и глубины культивации (рис. 8.28, а). При относительно высоких скоростях разбавления продуктивность по биомассе достигает максимального значения, которое очень

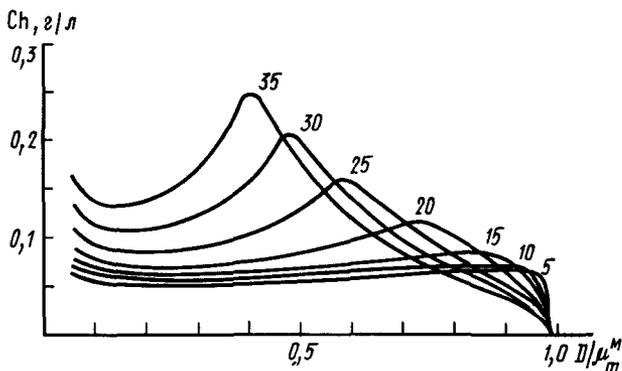


Рис. 8.27. Расчетные данные зависимости концентрации хлорофилла от относительной скорости разбавления и глубины культивации (цифры на кривых) (В. Т. Fröhlich et al., 1983):  
 $S_0 = 0,001$  г/л,  $I_0 = 115,4$  Вт/м<sup>2</sup>

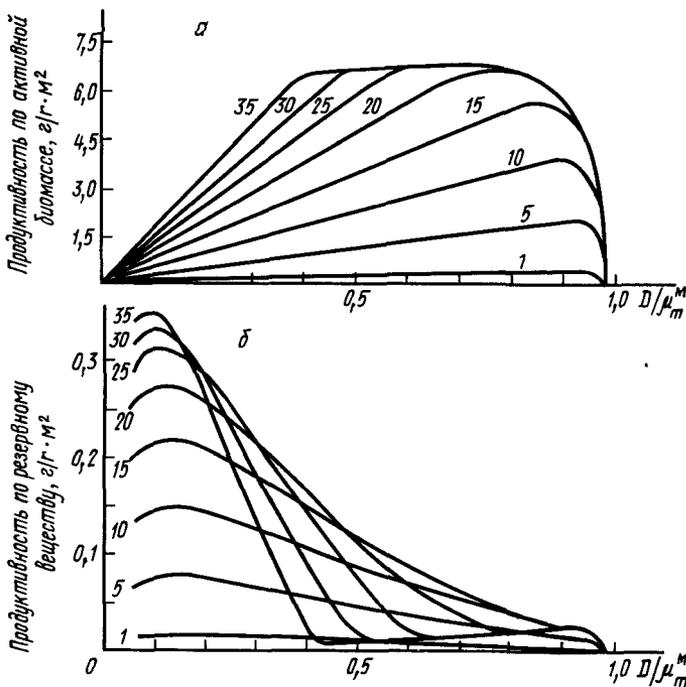


Рис. 8.28. Расчетные данные зависимости продуктивности системы по биомассе (а) и резервному веществу (б) от относительной скорости разбавления и глубины культивации (цифры на кривых, см) (В. Т. Fröhlich et al., 1983):  
 $S_0 = 0,1$  г/л,  $I_0 = 115,4$  Вт/м<sup>2</sup>

часто поддерживается на постоянном уровне в большом интервале глубин и скоростей разбавления.

Совершенно другая картина наблюдается для продуктивности по резервному веществу (продукту ферментации) (рис. 8.28, б). Продуктивность системы низка при высоких скоростях разбавления и малых глубинах ферментера. Максимум продуктивности системы по R приходится на диапазон (0,1—0,2) D/μ<sub>m</sub><sup>M</sup>, при этом он также сильно зависит от глубины культивации. При небольших глубинах (1—20 см) эта зависимость практически линейна.

● Численный рост кинетики роста фототрофного микроорганизма в режиме периодического и непрерывного культивирования дает возможность объяснить многие аспекты его физиологического поведения, а также позволяет дать полезные рекомендации по оптимизации его роста и метаболизма.

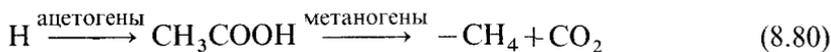
## 8.5. СИМБИОТИЧЕСКИЕ АССОЦИИЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Интересные и сложные закономерности характеризуют рост микроорганизмов в смешанных культурах и микробных ассоциациях. Эта область в последнее время привлекает большое внимание, поскольку природные популяции микроорганизмов в подавляющем большинстве случаев представляют собой симбиотические ассоциации, смешанные культуры или культуры микроорганизмов, находящихся в конкурентной борьбе за какой-либо фактор, ограничивающий рост популяций. Решение ряда вопросов промышленной микробиологии также связано с изучением и использованием не монокультур, а ассоциаций микроорганизмов.

Общие вопросы анализа роста популяций в смешанных культурах рассмотрены в монографии Н. С. Печуркина (1978), где основное внимание обращено на классификацию взаимодействий популяций и описание их роста в проточных системах. Изучены закономерности роста культур, конкурирующих за один субстрат, типы взаимодействий микробных культур друг с другом, развитие смеси популяций на сложных субстратах. Выделяют по крайней мере шесть типов взаимодействия микроорганизмов—от симбиоза муталистического типа, при котором рост каждой из культур стимулируется ростом другой культуры, и до строго антагонистического взаимодействия, при котором развитие одной культуры блокирует развитие другой. В монографии рассмотрены также закономерности развития популяций разных трофических уровней, включая «классическую» систему «хищник—жертва» (см. также В. Вольтера, 1931) и систему «паразит—хозяин».

Ниже с использованием ЭВМ анализируются закономерности развития симбиотических ассоциаций в режиме

периодического культивирования. Симбиотические ассоциации, по-видимому, представляют собой наиболее распространенный и «отшлифованный» эволюцией тип взаимодействия микробных популяций. Наиболее классическим примером в этом плане может служить микробная ассоциация образования метана анаэробными бактериями. Метаногенез углевода (Н) в упрощенном варианте можно представить в виде двухстадийного процесса:



Развитие второй популяции невозможно в отсутствие первой стадии процесса, поскольку ацетат является одним из лимитирующих субстратов для метаногенных бактерий. В то же время ацетогенные микроорганизмы ингибируются ацетатом за счет изменения рН среды. Таким образом, развитие метаногенной популяции, в свою очередь, положительно влияет на рост бактерий, осуществляющих первую стадию процесса.

Рассмотрим закономерности симбиотических процессов на примере некоторых модельных систем.

### 8.5.1. Ассоциация двух микроорганизмов

Представим себе микробную ассоциацию, состоящую из двух микроорганизмов  $M_1$  и  $M_2$ , использующую для своего роста некий субстрат  $S_1$ , причем рост организма  $M_1$  происходит с потреблением субстрата  $S_1$  и образованием продукта  $S_2$ . Продукт  $S_2$ , в свою очередь, служит субстратом для роста организма  $M_2$ . В результате роста организма  $M_2$  образуется конечный продукт  $P$ . Обсуждаемый процесс можно представить в виде системы дифференциальных уравнений:

$$\frac{dM_1}{dt} = \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1}, \quad (8.81)$$

$$\frac{dM_2}{dt} = \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2},$$

$$\frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{s_1}} \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1},$$

$$\frac{dS_2}{dt} = \frac{1}{Y_{p_1}} \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1} - \frac{1}{Y_{s_2}} \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2},$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{p_2}} \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2},$$

где  $K_1$  и  $K_2$  — константы сродства субстратов  $S_1$  и  $S_2$  к микроорганизмам  $M_1$  и  $M_2$  соответственно;  $\mu_1$  и  $\mu_2$  — максимальные скорости роста микроорганизмов  $M_1$  и  $M_2$ ;  $Y_{s_1}$

и  $Y_{p_1}$  — экономические коэффициенты, позволяющие выражать концентрации  $S_1$ ,  $S_2$  и  $M_1$ , а  $Y_{s_2}$  и  $Y_{p_2}$  — концентрации  $S_2$ ,  $P$  и  $M_2$  в одних единицах.

Для анализа кинетики процесса полезно систему уравнений привести к безразмерным относительным переменным:

$$s_1 = \frac{S_1}{S_{1,0}}; \quad s_2 = \frac{S_2}{S_{1,0}}; \quad p = \frac{P}{P_\infty};$$

$$\tau = \mu_1 t; \quad m_1 = \frac{M_1}{M_{1,\infty} - N_{1,0}}; \quad m_2 = \frac{M_2}{M_{2,\infty} - N_{2,0}},$$
(8.82)

где  $M_{1,\infty}$ ,  $M_{2,\infty}$ ,  $P_\infty$  — предельное количество биомассы  $M_1$ ,  $M_2$  и продукта  $P$ , образующихся при бесконечно большом времени процесса.

Переменные (8.82) позволяют анализировать кинетику процесса в безразмерных величинах, при этом значения  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $p$  лежат в диапазоне от 0 до 1, значения  $m_1$  — от  $\frac{N_{1,0}}{M_{1,\infty} - N_{1,0}}$

до  $1 + \frac{N_{1,0}}{M_{1,\infty} - N_{1,0}}$ , значения  $m_2$  — от  $\frac{N_{2,0}}{M_{2,\infty} - N_{2,0}}$  до  $1 + \frac{N_{2,0}}{M_{2,\infty} - N_{2,0}}$ .

Время в указанных безразмерных переменных измеряется отрезком, на протяжении которого в режиме максимальной скорости концентрация биомассы  $M_1$  увеличивается в  $e$  раз.

Система дифференциальных уравнений (8.81) в безразмерных координатах выглядит следующим образом (для упрощения анализа все экономические коэффициенты приняты равными единице):

$$\frac{dm_1}{d\tau} = \frac{s_1 m_1}{K_1/S_{1,0} + s_1}; \quad \frac{dm_2}{d\tau} = \frac{\mu_2/(\mu_1 s_2 m_2)}{K_2/S_{1,0} + s_2}; \quad \frac{ds_1}{d\tau} = -\frac{s_1 m_1}{K_1/S_{1,0} + s_1};$$

$$\frac{ds_2}{d\tau} = \frac{\mu_2/(\mu_1 s_2 m_2)}{K_2/S_{1,0} + s_2}; \quad \frac{dp}{d\tau} = \frac{\mu_2/(\mu_1 s_2 m_2)}{K_2/S_{1,0} + s_2}.$$
(8.83)

Из этих уравнений видно, что процессом управляют и определяют вид кинетических кривых три безразмерных параметра:  $K_1/S_{1,0}$ ,  $K_2/S_{1,0}$  и  $\mu_2/\mu_1$ . Первые два параметра, характеризующие отношения констант сродства микроорганизма с лимитирующими субстратами к начальным концентрациям лимитирующих субстратов, оказывают существенное влияние на ход процесса. Они изменяют как форму кинетической кривой, так и время, в течение которого конвертируется 50% лимитирующего субстрата (см. гл. 8, § 1).

На влиянии третьего параметра — отношения максимальных скоростей роста микроорганизмов  $M_1$  и  $M_2$  — остановимся более подробно (рис. 8.29). Из рисунка видно, что наблюдаются закономерное падение концентрации исходного субстрата  $S_1$ , рост культур  $M_1$  и  $M_2$ , накопление конечного продукта  $P$  и характерный кинетический максимум для промежуточного

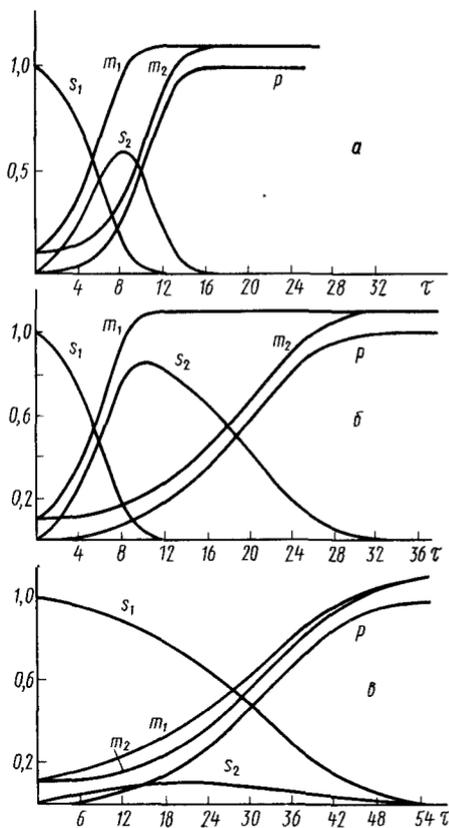


Рис. 8.29 Численное интегрирование системы (8.82) при  $\mu_1/\mu_2$ , равном 1 (а); 2,5 (б); 0,2 (в):

$$K_1/S_{1,0} = K_2/S_{1,0} = 0,5, \quad m_{1,0} = m_{2,0} = 0,1$$

расхода и роста  $M_1$ , понижение максимума по  $S_2$  (рис. 8.29, в). При  $\mu_1 \ll \mu_2$  субстрат  $S_2$  практически не детектируется в системе и наблюдается слияние кривых роста микроорганизмов  $M_1$  и  $M_2$ , при этом вторая стадия процесса становится слабо заметной, весь процесс лимитируется скоростью первой стадии. В таких ситуациях часто оказывается невозможным определение кинетических параметров второй стадии.

● Таким образом, при изучении симбиотических ассоциаций, состоящих из двух микроорганизмов, в зависимости от соотношения максимальных удельных скоростей роста возможны три предельных случая протекания процесса.

1.  $\mu_1 \approx \mu_2$  — рост обоих микроорганизмов происходит последовательно — обе стадии процесса проявляются достаточно

продукта  $S_2$ . Наличие этого максимума при росте микробных ассоциаций является весьма строгим свидетельством в пользу того, что для исследуемой культуры характерен симбиотический тип взаимодействий микроорганизмов (рис. 8.29, а).

При уменьшении максимальной скорости роста второго микроорганизма (увеличение отношения  $\mu_1/\mu_2$ ) происходит относительное замедление роста  $M_2$  и соответственно повышение максимума на кинетической кривой для  $S_2$  (рис. 8.29, б). Весь процесс распадается практически на две независимые стадии: сначала быстрый рост  $M_1$  и быстрое накопление  $S_2$ , а затем медленное расхождение  $S_2$  и такой же медленный рост  $M_2$  и  $P$ . Процесс образования продукта лимитирует низкая скорость второй стадии.

При относительном увеличении максимальной удельной скорости роста второго микроорганизма наблюдается замедление

четко, что дает возможность определить все кинетические параметры системы.

2.  $\mu_1 \gg \mu_2$  — процесс распадается как бы на две независимые стадии: быстрое развитие микроорганизма  $M_1$  и медленное и длительное развитие микроорганизма  $M_2$ , который и лимитирует образование конечного продукта  $P$ . Здесь также возможно определить все кинетические характеристики процесса.

3.  $\mu_1 \ll \mu_2$  — процесс как бы сжимается в одну стадию, кривые роста микроорганизмов  $M_1$  и  $M_2$  практически совпадают, почти отсутствует промежуточный продукт  $S_2$ , скорость образования  $P$  лимитируется скоростью первой стадии. Можно определить только кинетические характеристики медленной первой стадии. Кинетика накопления продукта, несмотря на то что он образуется в результате роста второго микроорганизма, определяется кинетикой роста первой культуры.

### 8.5.2. Ассоциация трех микроорганизмов

Представим себе симбиотическую ассоциацию, включающую три микроорганизма. При этом трофические связи между этими организмами следующие: исходный субстрат  $S_1$  является субстратом для организма  $M_1$ , в результате роста которого образуется вещество  $S_2$ , являющееся исходным субстратом для организма  $M_2$ . Растущий организм  $M_2$  выделяет вещество  $S_3$ , которое потребляется при росте организма  $M_3$ , и в результате образуется конечный продукт  $P$ . Эти процессы можно описать системой дифференциальных уравнений:

$$\begin{aligned} \frac{dM_1}{dt} &= \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1}, \quad \frac{dM_2}{dt} = \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2}, \\ \frac{dM_3}{dt} &= \frac{\mu_3 S_3 M_3}{K_3 + S_3}, \quad \frac{dS_1}{dt} = -\frac{1}{Y_{s_1}} \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1}, \\ \frac{dS_2}{dt} &= \frac{1}{Y_{p_1}} \frac{\mu_1 S_1 M_1}{K_1 + S_1} - \frac{1}{Y_{s_2}} \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2}, \\ \frac{dS_3}{dt} &= \frac{1}{Y_{p_2}} \frac{\mu_2 S_2 M_2}{K_2 + S_2} - \frac{1}{Y_{s_3}} \frac{\mu_3 S_3 M_3}{K_3 + S_3}, \\ \frac{dP}{dt} &= \frac{1}{Y_{p_3}} \frac{\mu_3 S_3 M_3}{K_3 + S_3}. \end{aligned} \quad (8.84)$$

По аналогии с предыдущим разделом,  $\mu_1, \mu_2, \mu_3$  — максимальные удельные скорости роста;  $K_1, K_2, K_3$  — константы сродства субстратов;  $Y_{s_1}, Y_{s_2}, Y_{s_3}, Y_{p_1}, Y_{p_2}, Y_{p_3}$  — экономические коэффициенты для выражения в одних единицах концентраций субстратов, продуктов и микроорганизмов. Приведем систему (8.84) к безразмерным переменным:

$$\begin{aligned}
 s_1 &= \frac{S_1}{S_{1,0}}; & s_2 &= \frac{S_2}{S_{1,0}}; & s_3 &= \frac{S_3}{S_{1,0}}; \\
 p &= \frac{P}{P_\infty}; & m_1 &= \frac{M_1}{M_{1,\infty} - N_{1,0}}; & & \\
 m_2 &= \frac{M_2}{M_{2,\infty} - N_{2,0}}; & m_3 &= \frac{M_3}{M_{3,\infty} - N_{3,0}}; & & \\
 \tau &= \mu_1 t.
 \end{aligned}
 \tag{8.85}$$

В этом случае система уравнений в безразмерных переменных будет иметь следующий вид (для упрощения анализа все экономические коэффициенты также приняты равными единице):

$$\begin{aligned}
 \frac{dm_1}{d\tau} &= \frac{s_1 m_1}{K_1/S_{1,0} + s_1}, & \frac{dm_2}{d\tau} &= \frac{\mu_2/(\mu_1 s_2 m_2)}{K_2/S_{1,0} + s_2}, & \frac{dm_3}{d\tau} &= \frac{\mu_3/(\mu_1 s_3 m_3)}{K_3/S_{1,0} + s_3}, \\
 \frac{ds_1}{d\tau} &= \frac{s_1 m_1}{K_1/S_{1,0} + s_1}, & & & & \\
 \frac{ds_2}{d\tau} &= \frac{s_1 m_1}{K_1/S_{1,0} + s_1} - \frac{\mu_2/(\mu_1 s_2 m_2)}{K_2/S_{1,0} + s_2}, & & & & \\
 \frac{ds_3}{d\tau} &= \frac{\mu_2/(\mu_1 s_2 m_2)}{K_2/S_{1,0} + s_2} - \frac{\mu_3/(\mu_1 s_3 m_3)}{K_3/S_{1,0} + s_3}, & dp/d\tau &= \frac{\mu_3/(\mu_1 s_3 m_3)}{K_3/S_{1,0} + s_3}.
 \end{aligned}
 \tag{8.86}$$

Как видно, этой системой управляют пять параметров:  $K_1/S_{1,0}$ ;  $K_2/S_{1,0}$ ;  $K_3/S_{1,0}$ ;  $\mu_2/\mu_1$ ;  $\mu_3/\mu_1$ . Первые три параметра, как и в ранее разобранных вариантах, отражают влияние концентраций лимитирующих субстратов, а два последних — соотношения удельных скоростей роста культур. Проварьируем последние два параметра и проследим за изменением вида кинетических кривых (рис. 8.30).

1.  $\mu_2/\mu_1 = \mu_3/\mu_1 = 1$ . Это случай, когда максимальные удельные скорости роста всех трех микроорганизмов примерно совпадают (рис. 8.30, а). Видно, что развитие всех трех микроорганизмов идет последовательно, кривые роста похожи друг на друга, за исключением начальной фазы процесса. Наблюдается довольно быстрое падение концентрации  $S_1$  и существуют характерные максимумы по промежуточным продуктам  $S_2$  и  $S_3$ .

2.  $\mu_2/\mu_1 = 1$ ,  $\mu_3/\mu_1 = 5$  (или  $\mu_3 \gg \mu_1 = \mu_2$ ) — условия относительно быстрой последней стадии (рис. 8.30, б). Видно, что в условиях быстрой третьей стадии практически исчезает максимум по  $S_3$ , а кривые роста микроорганизмов  $M_2$  и  $M_3$  практически совпадают, вторая стадия процесса как бы сливается с третьей, хотя и определяет накопление продукта  $P$ .

3.  $\mu_2/\mu_1 = 5$ ;  $\mu_3/\mu_1 = 1$  (или  $\mu_2 \gg \mu_1 = \mu_3$ ) — условия относительно быстрой второй стадии (рис. 8.30, в). Здесь ситуация другая: практически исчезает промежуточный субстрат  $S_2$ , кривые роста  $m_1$  и  $m_2$  близки, при этом быстрая вторая

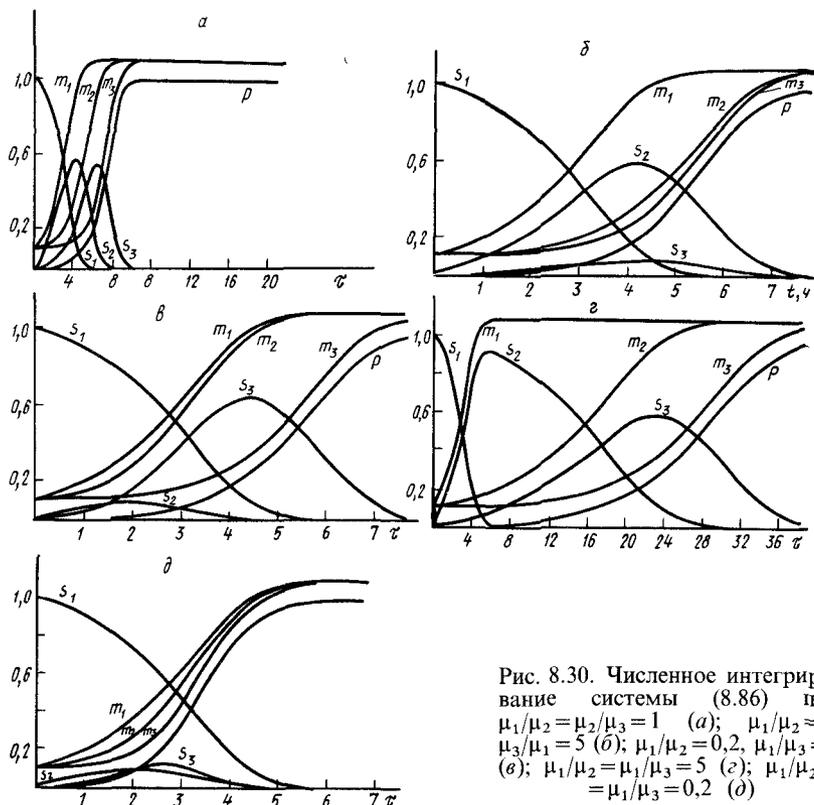


Рис. 8.30. Численное интегрирование системы (8.86) при  $\mu_1/\mu_2 = \mu_2/\mu_3 = 1$  (а);  $\mu_1/\mu_2 = 1$ ,  $\mu_3/\mu_1 = 5$  (б);  $\mu_1/\mu_2 = 0,2$ ,  $\mu_1/\mu_3 = 1$  (в);  $\mu_1/\mu_2 = \mu_1/\mu_3 = 5$  (г);  $\mu_1/\mu_2 = \mu_1/\mu_3 = 0,2$  (д)

стадия как бы растворяется в медленной первой и определение ее кинетических параметров становится затруднительным.

4.  $\mu_2/\mu_1 = 0,2$ ,  $\mu_3/\mu_1 = 0,2$  (или  $\mu_1 \gg \mu_2 = \mu_3$ ) — условия относительно быстрой первой стадии (рис. 8.30, в). Вид кинетических кривых напоминает картину первого случая, за исключением более быстрого роста первого организма. По истечении некоторого времени система работает как ассоциация двух микроорганизмов.

5.  $\mu_2/\mu_1 = \mu_3/\mu_1 = 5$  (или  $\mu_1 \ll \mu_2 = \mu_3$ ) — условие замедленной первой стадии (рис. 8.30, д). Обращает на себя внимание практически полное отсутствие  $S_2$  и  $S_3$ , а также слияние трех кинетических кривых роста организмов:  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ . Кинетика роста  $m_2$  и  $m_3$  практически не проявляется — все лимитирует первая стадия. Из такого вида кинетических кривых возможно определение кинетических параметров только лимитирующей стадии, т. е. первой.

● Таким образом, если экспериментально достаточно подробно исследованы зависимости от времени концентраций

исходных, промежуточных субстратов и продуктов ферментации, получены кинетические кривые роста отдельных микроорганизмов, то можно на основе качественного совпадения экспериментальных зависимостей с одной из теоретических, представленных на рис. 8.29—8.30, идентифицировать лимитирующую стадию развития симбиотической ассоциации. Более строгий количественный подход основан на моделировании роста микробной ассоциации с помощью решения прямой задачи и определении кинетических параметров роста при решении обратной. Рассмотрим особенности и возможности этого подхода на примере анализа закономерностей роста метангенерирующей микробной ассоциации.

### 8.5.3. Симбиотическая метангенерирующая ассоциация

Анаэробный процесс образования метана из различного рода органических материалов представляет собой сложный многоступенчатый процесс, на разных этапах которого принимают участие микроорганизмы различной природы. Первый этап биodeградации часто бывает связан с гидролизом высокомолекулярных соединений (полисахаридов, белков, жиров и т. д.) до соответствующих олиго- и мономеров, которые на последующих этапах конвертируются в органические кислоты и спирты, молекулярный водород и диоксид углерода. Затем органические кислоты и спирты превращаются в ацетат, водород и  $\text{CO}_2$ , из которых в дальнейшем и образуется метан. Микробиологическое образование метана—широко распространенный, устойчиво протекающий в анаэробных условиях процесс, имеющий в настоящее время промышленное значение.

Задача количественного описания метаногенеза осложняется тем, что пока имеются весьма ограниченные сведения о природе и свойствах микроорганизмов, входящих в состав метангенерирующего консорциума. В обсуждаемом случае количественная картина метаногенеза реконструировалась на основе исследования динамики образования и расхода исходного субстрата, промежуточных и конечных продуктов процесса (С. В. Калюжный, С. Д. Варфоломеев и др., 1985, 1986).

На рис. 8.31, *a* приведена типичная картина, наблюдаемая при анаэробной конверсии глюкозы под действием микробной ассоциации, известной как *Methanobacillus kuznetsovii*. Видно, что в реакционной среде помимо конечных продуктов—диоксида углерода и метана—накапливается еще целый ряд промежуточных соединений—молекулярный водород, уксусная кислота, этанол. В незначительных количествах в смеси обнаруживаются также пропиловый спирт, пропионовая и масляная кислоты. Однако накопление этих компонентов проходит в незначительной степени, не вносящей заметного вклада в материальный баланс по углероду.

Установим, как соблюдается в процессе роста ассоциации баланс по углероду и существуют ли в заметных количествах другие продукты реакции, не детектируемые в условиях проведения эксперимента (рис. 8.31, б). Из рисунка видно, что в течение всего времени развития процесса отношение суммарной концентрации детектируемых продуктов к начальной концентрации глюкозы близко к единице и слабо снижается в ходе процесса. Дефицит углеродного баланса к концу процесса ( $t \sim 200$  ч) составляет 6%. Этот дефицит образуется за счет накопления биомассы; при этом можно утверждать, что в пределах точности микробиологического эксперимента ( $\sim 10\%$ ) в метаболизме ассоциации отсутствуют другие, не детектируемые углеродные соединения, выделяемые микроорганизмами в культуральную среду или в газовую фазу.

Для изучения неметаногенной стадии процесса было использовано то свойство системы, что при низких значениях pH ( $\text{pH} < 5,5$ ) метангенерирующие бактерии ассоциации не развиваются, в то время как конверсия глюкозы проходит весьма активно (рис. 8.32). В течение первых 80 ч процесса наблюдается хорошо выраженное экспоненциальное накопление продуктов предметаногенного разложения глюкозы — этанола, ацетата,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ . При этом отличается симбатность в накоплении ацетата и этилового спирта, а также водорода и  $\text{CO}_2$ . Эти метаболиты и являются первичными продуктами анаэробной конверсии глюкозы данной ассоциацией.

Исследование стехиометрических соотношений образования этанола и ацетата,  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$  показывает, что мольные количества образующихся веществ примерно находятся в отношении 1:1:2:2, т. е. этанол и ацетат образуются в эквивалентном количестве, в два раза меньшем, чем  $\text{H}_2$  и  $\text{CO}_2$ . Это следует как из данных по материальному балансу (рис. 8.33), так и из данных по кинетике накопления продуктов в экспоненциальной фазе роста культуры (рис. 8.34). Найденные удельные скорости роста (метаболические коэффициенты) по различным продуктам имеют значения:  $q_{\text{H}_2} = (0,045 \pm 0,007) \text{ ч}^{-1}$ ;  $q_{\text{CO}_2} = \pm 0,003 \text{ ч}^{-1}$ ;

$q_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}} = (0,032 \pm 0,003) \text{ ч}^{-1}$ ;  $q_{\text{CH}_3\text{COOH}} = (0,028 \pm 0,003) \text{ ч}^{-1}$ .

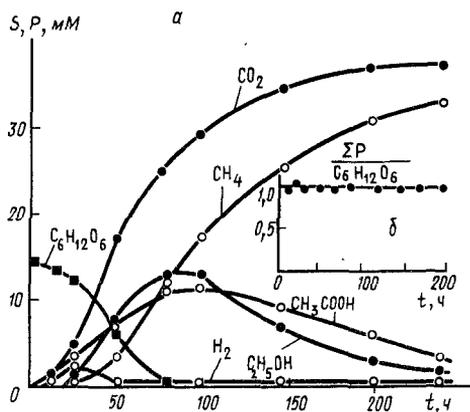


Рис. 8.31. Динамика анаэробного разложения глюкозы метаногенной ассоциацией бактерий ( $\text{pH}=7,0$ ; 16,5 М глюкозы; 60 С) (а) и зависимость от времени отношения суммарной концентрации детектируемых продуктов к начальной концентрации глюкозы (б)

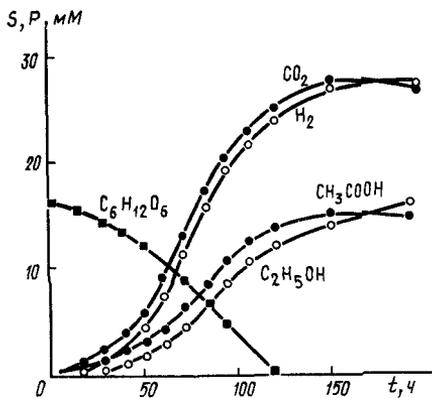


Рис. 8.32. Динамика анаэробного разложения глюкозы метаногенной ассоциацией бактерий (рН 5,3; 16,5 мМ глюкозы; 60° С)

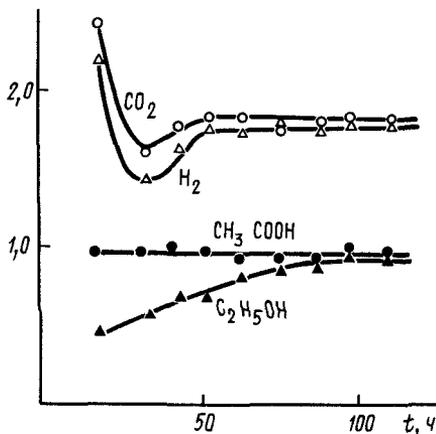


Рис. 8.33. Зависимости от времени отношений количества образовавшихся продуктов к количеству прореагировавшей глюкозы при культивировании метаногенной ассоциации бактерий в режиме низких значений рН (условия те же, что и на рис. 8.32)

Исходя из вышеизложенного, можно утверждать, что разложение глюкозы под действием исследуемой ассоциации происходит в соответствии с уравнением

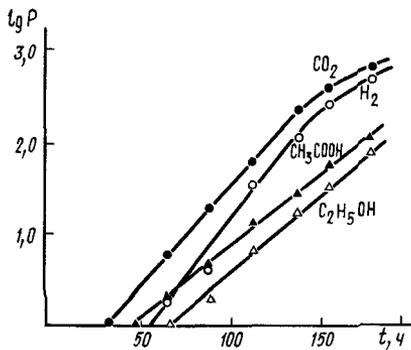
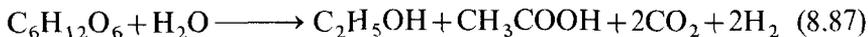
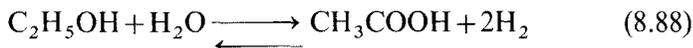


Рис. 8.34. Кинетика накопления продуктов анаэробного разложения глюкозы метаногенной ассоциацией бактерий при низких значениях рН в экспоненциальной фазе в полулогарифмических координатах (условия те же, что и на рис. 8.32)

Процесс осуществляется, по-видимому, одним микроорганизмом. Реакция (8.87) является одной из базовых химических реакций для данной системы, она известна как путь Эмбдена — Майергофа и широко представлена в метаболизме анаэробных микроорганизмов (Г. Готтшалк, 1982).

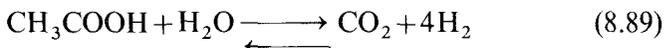
Как видно из рис. 8.31, накопление в среде этилового спирта и уксусной кислоты проходит через максимум. Это характерный признак действия симбиотической ассоциации, в которой продукт метаболизма одной культуры является субстратом для другой

(см. рис. 8.29, 8.30). Для подтверждения наличия в данной ассоциации микроорганизмов, способных потреблять ацетат, этанол и  $\text{CO}_2$ , были проведены опыты по выращиванию исследуемой ассоциации на этих продуктах в качестве субстратов. Действительно, микробная ассоциация способна конвертировать в метан этанол и уксусную кислоту, а также диоксид углерода в присутствии молекулярного водорода. На рис. 8.35 приведены кинетические кривые конверсии этанола в метан и  $\text{CO}_2$ , при этом в качестве промежуточного продукта выступает уксусная кислота и в очень небольших количествах образуется молекулярный водород. Это позволяет записать базовую химическую реакцию



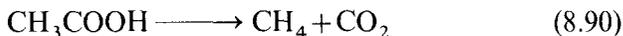
за которой следует стадия метанообразования. Термодинамические условия протекания процесса обеспечиваются последующими реакциями утилизации водорода и уксусной кислоты.

Процесс метанообразования из уксусной кислоты проходит еще менее интенсивно (рис. 8.36, а), чем в случае с этиловым спиртом. При этом наблюдается образование  $\text{CO}_2$ , а также небольших количеств этанола и водорода. Этиловый спирт синтезируется, по-видимому, в ходе обратной реакции (8.88). Конверсию ацетата с образованием  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$  можно объяснить протеканием реакции



Этот процесс термодинамически невыгоден ( $\Delta G_{\text{pH } 7,0}^\circ = 94,9$  кДж/моль), равновесие смещено влево, реакция может проходить лишь при низких парциальных давлениях водорода ( $< 100$  Па). Протекание процесса (8.89) в симбиотической микробной ассоциации было показано методом изотопного анализа.

Конверсия ацетата в метан может осуществляться в соответствии с простейшей базовой реакцией



При этом  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  должны образовываться в стехиометрических количествах. Однако образование диоксида углерода

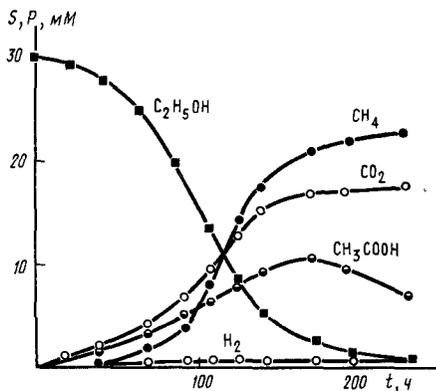


Рис. 8.35. Динамика анаэробного разложения этанола метаногенной ассоциацией бактерий (pH 7,0; 30 мМ этанола; 60° С)

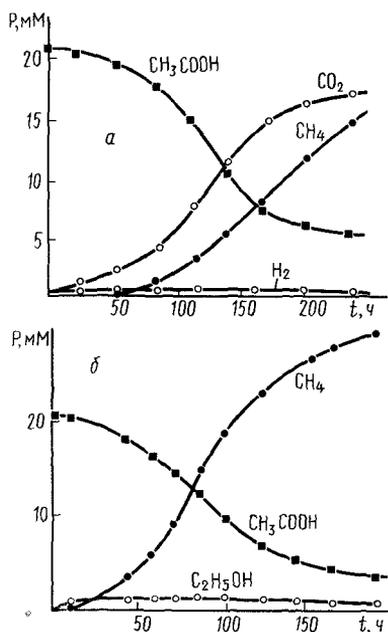
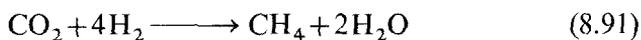


Рис. 8.36. Динамика анаэробного разложения уксусной кислоты метаногенной ассоциацией бактерий в атмосфере аргона (а) и молекулярного водорода (б) (рН 7,0; ацетат 21,0 мМ; 60° С)

детектируемых количеств диоксида углерода, так как происходит его быстрое восстановление водородом (рис. 8.36, б):



Протекание этого процесса было подтверждено непосредственной конверсией  $\text{CO}_2$  в метан в атмосфере водорода под действием данной микробной ассоциации. В системе наблюдается также промежуточное образование ацетата и этанола по реакции (8.88) и (8.89) (рис. 8.37).

Результаты проведенного количественного анализа суммирует такая схема:

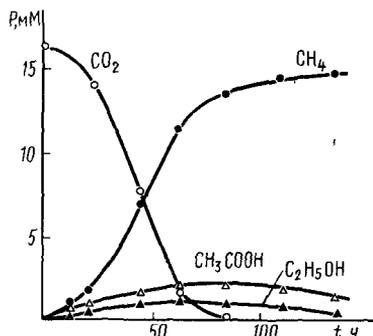
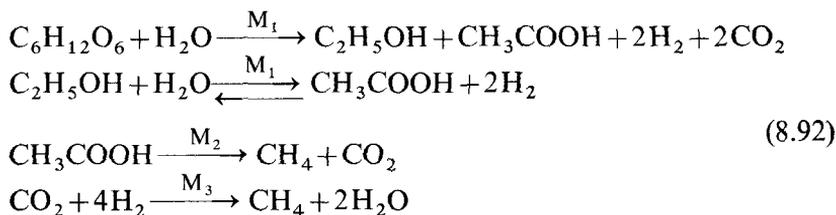


Рис. 8.37. Динамика конверсии диоксида углерода под действием метаногенной ассоциации бактерий (рН 7,0; 60° С)

существенно опережает образование метана (рис. 8.36, а). По-видимому, в данном случае кинетически более быстрым является процесс по стадии (8.89) с дальнейшим восстановлением  $\text{CO}_2$  до метана водородом.

Образование метана из ацетата в атмосфере водорода существенно интенсифицируется, и не наблюдается накопление

На первой стадии процесса происходит разложение глюкозы по пути Эмбдена—Майергофа, сопровождаемое ростом неметаногенного микроорганизма  $M_1$ ; вторая реакция осуществляется ферментными системами микроорганизма  $M_1$ ; две последующие реакции являются метангенирующими, причем осуществляются двумя независимыми метаногенными бактериями  $M_2$  и  $M_3$  ( $M_2$ —ацетатиспользующий метаноген с медленной метангенерацией;  $M_3$ —водород, использующий организм с быстрой метангенерацией). Этот вывод согласуется с данным числом микробиологического эксперимента.

Реакцию типа (8.89) при конверсии глюкозы можно исключить из рассмотрения на основе термодинамических соображений.

Были проведены исследования зависимостей скорости метанобразования от pH и концентрации глюкозы как исходного субстрата. Полученные данные позволили количественно описать развитие метаногенного процесса во всем диапазоне времен, во всей совокупности переменных. В процессе эволюции метаногенной ассоциации при периодическом культивировании изменение во времени претерпевают по крайней мере десять переменных: концентрации ключевых субстратов, метаболитов и продуктов (глюкоза—G, этанол—Et, ацетат—Ac,  $CO_2$ ,  $H_2$ ,  $CH_4$ ), концентрации ключевых микроорганизмов ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ), концентрации ионов водорода  $H^+$ . Соответственно кинетику процесса в целом должна описывать система десяти дифференциальных (алгебраических) уравнений. Кинетической схеме (8.92) можно сопоставить единственную систему уравнений.

Рост микроорганизмов происходит в соответствии с базовыми химическими реакциями (8.87), (8.80) и (8.81), поэтому для микроорганизмов  $M_1$ ,  $M_2$  и  $M_3$  можно записать уравнения роста:

$$\frac{dM_1}{dt} = Y_1 W_1; \quad \frac{dM_2}{dt} = Y_2 W_3; \quad \frac{dM_3}{dt} = Y_3 W_4, \quad (8.93)$$

где  $Y_1, Y_2, Y_3$ —соответствующие экономические коэффициенты;  $W_1, W_3, W_4$  заданы уравнениями

$$W_1 = \frac{q_1 G M_1}{(K_1 + G) \left( 1 + \frac{H^+}{K_{a,1}} + \frac{K_{b,1}}{H^+} \right)} \quad (8.94)$$

( $q_1 = \mu_1/Y_1$ —удельная максимальная скорость потребления глюкозы;  $K_1$ —константа сродства к глюкозе;  $K_{a,1}, K_{b,1}$ —константы ионизации ионогенных групп, определяющих pH-зависимость скорости роста первого микроорганизма);

$$W_3 = \frac{q_3 \text{Ac} M_2}{(K_3 + \text{Ac}) \left( 1 + \frac{H^+}{K_{a,2}} + \frac{K_{b,2}}{H^+} \right)} \quad (8.95)$$

( $q_3 = \mu_2/Y_2$  — удельная максимальная скорость потребления ацетата при росте метангенерирующего микроорганизма  $M_2$  на ацетате;  $K_3$  — соответствующая константа сродства;  $K_{a,2}$ ,  $K_{b,2}$  — константа ионизации ионогенных групп, определяющих рН-зависимость скорости роста микроорганизма  $M_2$ );

$$W_4 = \frac{q_4 H_2 CO_2 M_3}{(K_4 + K_5 H_2 + K_6 CO_2 + H_2 CO_2)(1 + H^+ / K_{a,3} + K_{b,3} H^+)} \quad (8.96)$$

(рост микроорганизма  $M_3$  имеет бисубстратный характер; рН-зависимость — колоколообразна;  $q_4 = \mu_3/Y_3$  — удельная максимальная скорость потребления  $CO_2$  и  $H_2$  при их насыщающих концентрациях;  $K_4$ ,  $K_5$ ,  $K_6$  — соответствующие константы сродства;  $K_{a,3}$ ,  $K_{b,3}$  — константы ионизации). [Более строго, по-видимому, для уравнения роста необходимо использовать уравнение с немультиплицированными субстратами (см. гл. 2), однако это не вносит существенных искажений в кинетическое описание процесса.]

Соответственно для основных компонентов процесса можно записать:

$$\frac{dG}{dt} = -W_1; \quad (8.97)$$

$$\frac{dEt}{dt} = W_1(1 - Y_1) - W_2, \quad (8.98)$$

где

$$W_2 = \frac{q_2 Et M_1}{K_2 + Et} \quad (8.99)$$

(конверсия этилового спирта осуществляется ферментными системами микроорганизма  $M_1$ ;  $q_2$  и  $K_2$  — соответствующие кинетические параметры);

$$\frac{dAc}{dt} = W_1(1 - Y_1) + W_2 - W_3; \quad (8.100)$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = 2W_1(1 - Y_1) + W_3(1 - Y_2) - W_4; \quad (8.101)$$

$$\frac{dH_2}{dt} = 2W_1(1 - Y_1) + 2W_2 - 4W_4; \quad (8.102)$$

$$\frac{dCH_4}{dt} = W_3(1 - Y_2) + W_4(1 - Y_3). \quad (8.103)$$

Наибольшие сложности представляет количественная оценка изменения во времени концентрации ионов водорода, поскольку процесс протекает в буферной среде (в экспериментах использовался фосфатный буфер 0,1 М). Изменения концентрации ионов водорода связаны с изменением концентрации уксусной кислоты, а также с содержанием в среде буферного компонента. Можно показать, что изменение  $H^+$  во времени происходит в соответствии с уравнением

$$H^+(t) = f[Ac(t)] = A/2 + \sqrt{A^2/4 + B}, \quad (8.104)$$

где

$$A = \frac{K_{Ac}(C_{\phi} + Ac - C_{Me}) + K_{\phi}(2C_{\phi} - C_{Me})}{C_{Me} - C_{\phi}},$$

$$B = \frac{K_{Ac}K_{\phi}(2C_{\phi} - C_{Me} + C_{Ac})}{C_{Me} - C_{\phi}}$$

( $K_{Ac}$  — константа диссоциации уксусной кислоты;  $K_{\phi}$  — константа диссоциации иона  $H_2PO_4^-$ ;  $C_{\phi}$  — общая концентрация фосфата в растворе;  $C_{Me}$  — общая концентрация противоиона в буферном растворе). Уравнение (8.104) достаточно надежно описывает экспериментальные данные по изменению рН в буферных растворах при различных концентрациях уксусной кислоты.

Система уравнений (8.93)—(8.104) была решена относительно всех переменных, и было показано, что полученные решения описывают характерные особенности конверсии глюкозы метаногенной ассоциацией: экспериментальные зависимости во времени изменения концентраций  $Ac$ ,  $Et$ ,  $H_2$ , опережающий рост в системе  $CO_2$ , периоды индукции в образовании продуктов. Решение системы проводили при нескольких наборах значений констант, область которых оценивали из независимого эксперимента или принимали априори. Таким образом, была доказана адекватность модели (8.93)—(8.104) реальному эксперименту.

Наконец, для того чтобы получить полную информацию об исследуемом процессе, необходимо решить обратную задачу — на основании проведенных кинетических измерений определить числовые значения независимых параметров, описывающих кинетические кривые в пределах точности их измерений. Сложность задачи состоит в наличии большого числа неизвестных параметров процесса (в случае конверсии глюкозы их 19) и в неопределенности начальных условий по концентрациям микроорганизмов. При поиске такого количества параметров неизбежно приходится сталкиваться с их внутренней коррелированностью, что приводит к неоднозначности решения обратной задачи (С. И. Спивак, 1980). Предстояло найти не только набор параметров, хорошо описывающих экспериментальные кривые, но и попытаться оценить чувствительность модели к каждой из констант.

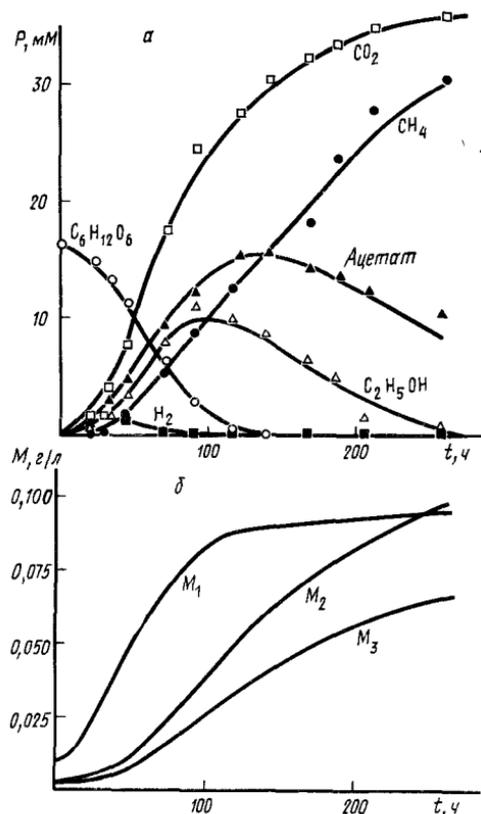


Рис. 8.38. Сравнение расчета с экспериментом при кинетическом моделировании аэробного разложения глюкозы метаногенной ассоциацией бактерий (сплошные линии — теоретические кривые; точки — экспериментальные данные; условия те же, что и на рис. 8.39) (а) и теоретические кривые роста микроорганизмов  $M_1$ ,  $M_2$  и  $M_3$  метаногенной ассоциации бактерий (б)

Поиск параметров проводился на ЭВМ путем минимизации критерия соответствия расчета эксперименту по всему пулу экспериментальных данных. В качестве критерия использовалась функция

$$F = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (X_i^p - X_i^e)^2, \quad (8.105)$$

где  $n$  — число экспериментов;  $m$  — число измерений в каждом эксперименте;  $X_i^p$  — расчетные значения концентрации вещества  $X_i$ ;  $X_i^e$  — экспериментальная концентрация вещества  $X_i$ .

В результате расчета были найдены значения констант, удовлетворительно описывающие экспериментальные изменения концентраций глюкозы, этанола, ацетата,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$  и  $\text{CH}_4$  при различных значениях начальной концентрации глюкозы и pH (рис. 8.38). Значения параметров, соответствующие теоретическим кривым рис. 8.38, а, приведены в табл. 8.2. Не все константы,

помещенные в таблицу, имеют функциональную значимость. Чувствительность модели к параметру определяли путем исключения его из модели, приравнивая параметр к нулю. Затем находили решение системы с определением функции качества (8.105). Эта процедура позволила установить, какой из параметров вносит существенный вклад в качество описания эксперимента, а каким параметром можно пренебречь.

Оказалось, что каждая из констант, характеризующая максимальную удельную скорость потребления субстратов  $q_1$ ,  $q_2$ ,  $q_3$ ,  $q_4$ , оказывает существенное влияние на качество описания эксперимента и исключение из них приводит к рез-

Таблица 8.2

Параметры роста микроорганизмов симбиотической ассоциации, наиболее качественно описывающие динамику процесса

Параметр	Числовые значения	Параметр	Числовые значения
$q_1, \text{ч}^{-1}$	0,713	$\text{p}K_{a,1}$	5,03
$q_2, \text{мМ}$	0,178	$\text{p}K_{b,1}$	8,3
$q_3, \text{мМ}$	0,332	$\text{p}K_{a,2}$	5,8
$q_4, \text{мМ}$	2,05	$\text{p}K_{b,2}$	7,4
$K_1, \text{мМ}$	49,4	$\text{p}K_{a,3}$	5,0
$K_2, \text{мМ}$	36,6	$\text{p}K_{b,3}$	8,2
$K_3, \text{мМ}$	16,3	$Y_1, \text{г/г}$	0,064
$K_4, \text{мМ}$	19,9	$Y_2, \text{г/г}$	0,149
$K_5, \text{мМ}$	—	$Y_3, \text{г/г}$	0,074
$K_6, \text{мМ}$	12,4		

кому увеличению квадрата суммы отклонений теоретических значений от экспериментальных. Аналогично, большой вклад в качество описания вносят константы ионизации ионогенных групп, определяющие рН-зависимость процесса  $K_{a,1}, K_{b,1}, K_{a,2}, K_{b,2}, K_{a,3}, K_{b,3}$ . В то же время константа сродства к субстрату  $K_5$  вносит значительно меньший вклад в описание процесса по сравнению с константами  $K_1, K_2, K_4, K_6$ . Так, изменение константы  $K_5$  до нуля приводит к различию в критерии  $F$  в 0,2%. При этом описание находится в пределах погрешности эксперимента ( $\leq 10\%$ ). Следовательно, константу  $K_5$ , по имеющимся данным, идентифицировать нельзя и при построении модели ею можно пренебречь. В противоположность этому изменение констант  $K_1, K_2, K_3, K_4$  и  $K_6$  до нуля приводит к изменению в критерии на 20—30%, что превышает ошибку эксперимента и указывает на определенную роль этих констант в описании экспериментальных данных.

Таким образом, без ущерба для качества описания уравнение (8.96) можно записать в виде

$$W = \frac{q_4 M_3 \cdot \text{H}_2 \cdot \text{CO}_2}{(K_1 + K_6 \text{CO}_2 + \text{H}_2 \cdot \text{CO}_2) \left( 1 + \frac{\text{H}^+}{K_{a,3}} + \frac{K_{b,3}}{\text{H}^+} \right)} \quad (8.106)$$

Представляет интерес сравнение кинетических параметров роста, полученных из данных кинетического поведения симбиотической ассоциации, с данными по параметрам роста ряда чистых культур, найденных в независимом эксперименте. Такое сравнение дано в табл. 8.3. Найденные параметры роста метаногенных микроорганизмов в исследуемой ассоциации близки к параметрам роста некоторых чистых метангенерирующих культур.

## Кинетические параметры роста некоторых метаногенных культур (Калюжный С. В. и др., 1986)

	Субстрат	$\mu_m, \text{ч}^{-1}$	$K_s, \text{мМ, \%}$	$Y, \frac{\text{г клеток}}{\text{г CH}_4}$	Литература
<i>Methanobacillus bar-keri</i> (штамм 227)	$\text{CH}_3\text{COOH}$	0,021	5	0,12—0,21	Taylor, 1982
<i>Methanosarcina</i> sp. TM	$\text{CH}_3\text{COOH}$	0,058	4,5	0,1—0,12	Taylor, 1982
$M_2$ симбиотической ассоциации	$\text{CH}_3\text{COOH}$	0,049	16,3	0,149	Калюжный, 1985
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	0,49— —0,59	0,1% $\text{H}_2$ 1,5% $\text{CO}_2$	0,1—0,19	Schönheit, 1980
	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	0,14— —0,23	—	0,04—0,1	Taylor, 1982
$M_3$ симбиотической ассоциации	$\text{H}_2/\text{CO}_2$	0,16	1,25% $\text{H}_2$ 12,4% $\text{CO}_2$	0,074	Калюжный, 1985

Примечание. При составлении таблицы для некоторых значений  $K_s$  и  $Y$  сделан перерасчет в универсальные единицы измерения.

Полное кинетическое моделирование процесса с использованием ЭВМ дает весьма интересную дополнительную информацию. Так, например, можно рассчитать динамику роста отдельных микроорганизмов, входящих в метаногенную ассоциацию, опираясь на экспериментальное исследование динамики образования продуктов или расхода субстратов. Решение системы уравнений (8.93)—(8.104) при использовании параметров процессов, наиболее качественно описывающих экспериментальные данные, дает кинетические кривые роста микроорганизмов  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  (рис. 8.38, б). Таким образом, кинетическое моделирование дает информацию, которую трудно или невозможно получить с помощью других методов.

! На нескольких примерах были рассмотрены возможности и особенности исследования процессов роста микроорганизмов с помощью кинетических моделей, анализируемых с применением современной компьютерной техники. Построение и анализ такого рода моделей становятся все более и более актуальными. Рост популяций микроорганизмов сопряжен с изменением в системе многих переменных, что приводит исследователя к необходимости анализировать системы дифференциальных уравнений большой размерности. Адекватный анализ такого рода задач может быть сделан лишь с использованием современной вычислительной техники. Аналитические решения задач роста микробных популяций являются зачастую лишь грубыми приближениями. Чем ближе

кинетическая модель к реальному процессу, тем более необходим компьютерный уровень ее анализа.

При изучении закономерностей роста клеточных популяций на основе численного интегрирования уравнений скорости роста можно получить в явном виде связь между количеством клеток, концентрацией субстрата или продукта с временем протекания процесса при различных режимах. Первичную диагностику условий роста культуры (неосложненный рост, рост с ингибированием продуктом или субстратом) можно привести на основе анализа формы кинетической кривой; изменение во времени количества биомассы или низкомолекулярных продуктов—с помощью, например, метода «двойного зеркального отражения».

Принципиально важны и интересны кинетические задачи с учетом лизиса клеток или инактивации их ряда ключевых систем в процессе роста микроорганизмов. Процессы этого рода ведут к ограничению роста клеточной популяции. Такие случаи очень часты в микробной кинетике и составляют специфический предмет исследования в кинетике роста животных клеток в культуре ткани.

Большая группа вопросов может быть решена с помощью компьютерного анализа при изучении процессов культивирования фототрофных микроорганизмов. В этом случае помимо «классических» переменных микробного роста, таких, как число клеток, концентрация субстратов, продуктов, pH, необходимо учитывать изменение во времени интенсивности поглощаемого света как основного «питающего» систему реагента. Компьютерные модели в ряде случаев роста достаточно адекватно описывают поведение популяций фототрофных микроорганизмов.

Большой вклад в понимание процессов, происходящих в микробных ассоциациях, вносят методы кинетического моделирования на ЭВМ.

В данной главе рассмотрены закономерности роста симбиотрофных микробных ассоциаций на примере ассоциаций, состоящих из двух и трех микроорганизмов. В зависимости от того, какой из микроорганизмов лимитирует процесс, кинетическая картина развития ассоциации может быть различной. Если какой-либо из микроорганизмов в последовательности их роста является строго лимитирующим, то кинетика роста последующих микроорганизмов почти строго определяется кинетикой развития лимитирующего. Подходы и методы анализа, характерные для исследования микробных ассоциаций, проиллюстрированы изучением метангенерирующей микробной ассоциации. Важно подчеркнуть, что кинетическое моделирование с использованием ЭВМ позволяет работать с весьма информационно емкими задачами, решение которых трудно

или невозможно осуществить другими средствами. В качестве примера рассмотрен подход, позволяющий «реконструировать» динамику роста отдельных микроорганизмов в ассоциации на основе изучения динамики образования продуктов и расхода субстратов без детального микробиологического изучения и характеристики микроорганизмов. Из решения кинетической задачи можно получить и числовые параметры отдельных микроорганизмов ассоциации.

В связи с ростом возможностей и доступностью ЭВМ в исследовательской практике, совершенствованием методов общения исследователя с компьютером можно думать, что использование ЭВМ в микробиологических исследованиях получит все большее распространение.

## ГЛАВА 9

### ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Изучение кинетики микробиологических процессов предполагает использование количественных методов измерения ряда изменяющихся во времени переменных. Важно отметить, что никакое измерение не может быть выполнено абсолютно точно, его результат всегда содержит некоторую погрешность. В задачу измерений входит не только нахождение самой величины, но также и оценка допущенной при измерении погрешности. Часто стараются произвести измерения с наибольшей точностью, т. е. сделать погрешность измерения по возможности малой. Однако надо иметь в виду, что чем точнее мы хотим измерить, тем труднее это сделать, поэтому не следует превышать ту точность, которая необходима для решения поставленной задачи.

● Таким образом, можно сделать важный вывод: мало получить тот или иной результат—необходимо правильно оценить точность и надежность экспериментальных данных.

#### 9.1. ТИПЫ ПОГРЕШНОСТЕЙ ИЗМЕРЕНИЙ

Погрешности измерений принято подразделять на систематические, случайные и грубые (или промахи).

*Систематические погрешности* вызываются факторами, действующими одинаковым образом при выполнении измерений одним и тем же методом с помощью одного и того же измерительного прибора. Во всех таких измерениях систематические погрешности одинаковы. В некоторых случаях они могут совершенно исказить результат измерений, однако всегда существует принципиальная возможность изучить систематические погрешности и полностью исключить их влияние путем изменения условий эксперимента либо введения соответствующих поправок.

В зависимости от наличия априорных сведений о природе в размере систематических погрешностей их можно разделить на следующие группы.

1. Погрешности известного происхождения, которые могут быть точно определены.

2. Погрешности, природа которых известна, но точное значение не установлено. К их числу относятся, например, погрешность измерительных приборов, когда известно не

точное значение погрешности прибора, а максимально возможное.

3. Погрешности, о существовании которых исследователь не подозревает, хотя величина их может быть очень значительна. Это самый опасный тип систематических погрешностей, и чаще всего он проявляется при сложных измерениях. Ошибка в измерениях может возникать, например, при определении концентрации клеток микроорганизма в растворе по оптической плотности раствора, измеряемой при 540 нм, если этот раствор кроме клеток содержит нерастворимые твердые вещества, также поглощающие свет при 540 нм.

Один из наиболее надежных способов убедиться в отсутствии таких погрешностей состоит в проведении измерений разными методами и при разных условиях. Совпадение полученных результатов служит известной, но не абсолютной гарантией их правильности.

*Случайные погрешности* обусловлены влиянием ряда причин, действие которых неодинаково в каждом опыте и не может быть учтено. В измерениях, выполненных одинаковым образом, случайные погрешности принимают различные значения. Чтобы проверить, оказывают ли случайные погрешности заметное влияние на результаты измерений, нужно несколько раз повторить измерения при одинаковых условиях опыта. Если каждый раз будут получаться несколько отличающиеся результаты, то можно сделать вывод, что данные отягощены случайными погрешностями. Характерным примером является измерение оптической плотности культуральной жидкости при 540 нм. Если измерение провести один раз, то погрешность за счет неоднородности жидкости следует рассматривать как систематическую. Но если провести несколько измерений одного и того же раствора, каждый раз перемешивая его и отбирая новую пробу, то погрешность становится случайной.

В результате измерений могут вкратиться и такие погрешности, которые обусловлены лишь невнимательностью экспериментатора (неверная запись показаний прибора, отход от общепринятой методики проведения эксперимента и т. д.). Это так называемые *грубые погрешности*, или промахи. Для устранения их необходимо соблюдать аккуратность и тщательность в работе и оформлении результатов. Во избежание таких погрешностей следует повторять измерения в несколько отличающихся условиях.

## 9.2. СВЯЗЬ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ И СЛУЧАЙНОЙ ПОГРЕШНОСТЕЙ

Как уже известно, систематическую погрешность можно перевести в случайную, организовав измерения таким образом, что постоянный фактор, влияющий на результат измерений,

в каждом из них будет действовать по-разному, а следовательно, результат его действия будет носить случайный характер. Этот прием превращения систематической погрешности в случайную называется *рандомизацией*. Он позволяет практически исключить многие неизвестные систематические погрешности и улучшить точность получаемых результатов.

Например, если при определении количества клеток в культуральной жидкости будем подсчитывать количество клеток в каком-то небольшом объеме жидкости, а затем помножим результат на отношение объемов культуральной жидкости и выбранного объема, то полученный общий урожай клеток может быть искажен систематической погрешностью, связанной с неоднородностью отбора пробы. Чтобы этого избежать, нужно отобрать несколько проб случайным образом и взять среднее этих проб. Таким путем систематическая погрешность, обусловленная неоднородностью отбора пробы, будет переведена в случайную.

Допустим, что все систематические погрешности учтены и есть уверенность в отсутствии каких-либо существенных и неизвестных источников систематических погрешностей. В этом случае результаты измерений все же не будут свободны от случайных погрешностей, правила вычисления которых будут даны ниже. Если случайная погрешность окажется меньше систематической, то нет смысла еще уменьшать случайную погрешность — все равно результаты измерений не станут от этого точнее. Для получения большей точности нужно искать пути к уменьшению систематической погрешности. Наоборот, если случайная погрешность больше систематической, то именно ее нужно уменьшить в первую очередь. Это можно сделать путем проведения не одного, а ряда измерений и взять среднее арифметическое из этого ряда; тогда случайная погрешность этого среднего будет меньше, чем ошибка единичного измерения.

### **9.3. СЛУЧАЙНЫЕ ПОГРЕШНОСТИ. НОРМАЛЬНЫЙ ЗАКОН РАСПРЕДЕЛЕНИЯ**

При измерениях физических величин в тех случаях, когда основную роль играют случайные погрешности, все оценки точности измерения можно сделать только с некоторой вероятностью, так как случайные погрешности образуются в результате совокупности ряда мелких неучитываемых причин, каждая из которых вносит незначительный вклад в общую погрешность, причем часть из них положительна, часть — отрицательна. Поэтому общая погрешность, образующаяся в результате сложения таких элементарных погрешностей, может

иметь различные значения, каждому из которых соответствует разная вероятность.

Для того чтобы выявить случайную погрешность, необходимо измерение повторить несколько раз. Если каждое измерение дает несколько отличные от других измерений результаты, то случайная погрешность играет существенную роль. Допустим, что истинное значение измеряемой величины есть  $\alpha$ ,  $ax = \alpha + \Delta x$  — результат измерения, отягощенный случайной погрешностью  $\Delta x$ , т. е. также некоторая случайная величина. Обычно принимают, что результаты измерений подчиняются *нормальному закону распределения*, или *распределению Гаусса*.

Этот закон основан на следующих предположениях: 1. Случайные погрешности  $\Delta x$  вызываются действием большого числа причин, каждая из которых приводит к малому по абсолютному значению элементарному отклонению  $+\varepsilon$  или  $-\varepsilon$ . 2. Одинаковые по абсолютному значению элементарные отклонения равновероятны. 3. Причины, вызывающие элементарные отклонения, действуют независимо.

Эти довольно естественные предположения приводят к закону распределения ошибок, который можно сформулировать так: *вероятность того, что случайная величина (например, результат измерения, отягченный случайной погрешностью) примет значение в пределах бесконечно малого интервала между  $x$  и  $x + dx$ , определяется как  $\varphi(x)dx$ , где  $\varphi(x)$  — некоторая функция, называемая плотностью вероятности*. Плотность вероятности нормального распределения выражается следующим образом:

$$\varphi(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x-\alpha^2}{2\sigma^2}}, \quad -\infty < x < +\infty, \quad (9.1)$$

где  $\alpha$  и  $\sigma^2$  — параметры распределения. Параметр  $\alpha$  — истинное значение измеряемой величины, он определяет расположение центра распределения на числовой оси. Параметр  $\sigma^2$  называют дисперсией, он служит мерой рассеяния случайной величины. Положительное значение квадратного корня из дисперсии  $\sigma$  называют *средним квадратическим отклонением*.

Плотность вероятности нормального распределения достигает максимума в точке  $\alpha$  (рис. 9.1, а). Наиболее вероятны значения  $x$ , близкие к  $\alpha$ : по мере удаления от  $\alpha$  значения  $x$  становятся все менее вероятными, иначе говоря, вероятность появления случайных погрешностей  $x - \alpha$  есть убывающая функция их величины. Одинаковые по абсолютному значению, но противоположные по знаку отклонения  $x$  от  $\alpha$  равновероятны. С уменьшением среднего квадратичного отклонения кривые нормального распределения становятся более крутыми, т. е. чем меньше  $\sigma$ , тем меньше вероятность появления больших

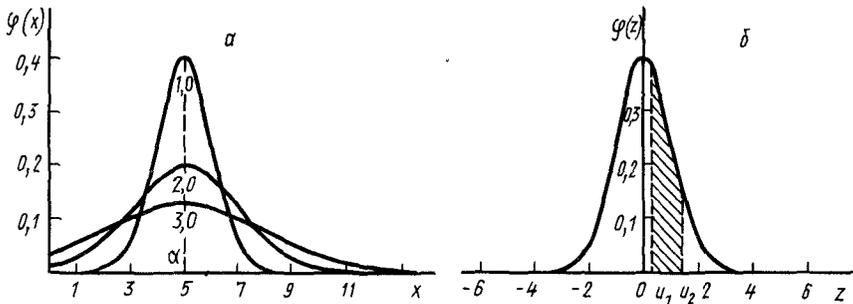


Рис. 9.1. Графики плотности вероятности нормального распределения при различных значениях  $\sigma$  (цифры на кривых) при  $\alpha=5,0$  (а) и плотности вероятности распределения нормированной случайной величины  $z$  (б)

по абсолютному значению случайных погрешностей (выше точность измерений).

Так как функция  $\varphi(x)$  зависит от двух параметров ( $\alpha$  и  $\sigma^2$ ), то каждой комбинации  $\alpha$  и  $\sigma$  соответствует своя кривая. Чтобы можно было строить функции нормального распределения для любых значений  $\alpha$  и  $\sigma^2$ , вместо случайной величины  $x$  вводят нормированную случайную величину  $z$ :

$$z = (x - \alpha) / \sigma. \quad (9.2)$$

Такое преобразование эквивалентно переносу начала координат в точку  $\alpha$  и переходу к масштабу, выраженному в долях  $\sigma$ , поэтому нормированная случайная величина  $z$  имеет  $\alpha_z = 0$  и  $\sigma_z = 1$ . Плотность вероятности нормированной случайной величины, распределенной по нормальному закону, равна

$$\varphi(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2}}.$$

Вероятность того, что случайная величина  $z$  попадает в интервал  $(u_1, u_2)$ , определяется как

$$p(u_1 < z < u_2) = \int_{u_1}^{u_2} \varphi(z) dz = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{u_1}^{u_2} e^{-\frac{z^2}{2}} dz. \quad (9.3)$$

Эта вероятность численно равна площади, которая ограничена кривой распределения и прямыми, проходящими через точки  $u_1, u_2$  параллельно оси ординат (рис. 9.1, б). Естественно, что вся площадь между гауссовой кривой и осью абсцисс равна единице, ибо появление какого угодно значения случайной величины в интервале от  $-\infty$  до  $+\infty$  есть достоверное событие, вероятность которого  $p=1$ . Аналитически это выглядит так:

$$p(-\infty < z < +\infty) = \int_{-\infty}^{+\infty} \varphi(z) dz = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{+\infty} e^{-\frac{z^2}{2}} dz = 1. \quad (9.4)$$

Таким образом, с помощью (9.4) можно легко рассчитать вероятность  $\gamma$  того, что случайная величина  $z$  не выйдет за пределы интервала  $(-u_\gamma, +u_\gamma)$ . Такие вычисления были проделаны, и их результаты сведены в табл. 9.1.

Таблица 9.1

Вероятность того, что нормированная случайная величина ( $\alpha_z=0, \sigma_z=1$ ), распределенная по нормальному закону, попадает в интервал  $(-u_\gamma, +u_\gamma)$

$$\left( \gamma = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-u_\gamma}^{u_\gamma} e^{-\frac{z^2}{2}} dz \right)$$

$u_\gamma$	$\gamma$	$u_\gamma$	$\gamma$	$u_\gamma$	$\gamma$
0	0	1,1	0,73	2,4	0,984
0,05	0,04	1,2	0,77	2,5	0,988
0,1	0,08	1,3	0,80	2,6	0,990
0,15	0,12	1,4	0,84	2,7	0,993
0,2	0,16	1,5	0,87	2,8	0,995
0,3	0,24	1,6	0,89	2,9	0,996
0,5	0,383	1,8	1,93	3,2	0,9986
0,6	0,45	1,9	0,94	3,4	0,9993
0,7	0,51	2,0	0,95	3,6	0,9997
0,8	0,57	2,1	0,964	3,8	0,99986
0,9	0,63	2,2	0,972	4,0	0,99993
1,0	0,683	2,3	0,978		

Как видно из табл. 9.1, вероятность того, что случайная величина  $x$  попадает в интервал  $(\alpha - \sigma, \alpha + \sigma)$ , составляет 68,3%. Это означает, что при достаточно большом числе измерений почти 2/3 результатов будут лежать в этом интервале. Вероятность попадания случайной величины в интервал  $(\alpha - 2\sigma, \alpha + 2\sigma)$  равна 95%, иными словами, примерно 5% результатов измерений выходит за пределы  $\alpha \pm 2\sigma$  и т. д.

Приведем еще один пример использования табл. 9.1. Пусть истинное значение оптической плотности культуральной жидкости при 540 нм  $D_{540} = 0,53$  ( $\alpha = 0,53$ ), а среднее квадратичное отклонение  $\sigma = 0,03$ . Определим границы такого симметричного интервала, чтобы при указанных значениях  $\alpha$  и  $\sigma$  вероятность попадания результата измерения в этот интервал была равна  $\gamma = 0,95$ . Из таблицы находим, что  $u_{0,95} = 2,0$ . Подставляя в (9.4) значения  $\alpha$ ,  $\sigma$ ,  $u_\gamma$  и  $\gamma$ , получим:

$$p(0,53 - 2 \cdot 0,03 < x < 0,53 + 2 \cdot 0,03) = 0,95;$$

$$p(0,47 < x < 0,59) = 0,95.$$

Итак, хотя нельзя заранее предсказать значение отдельного результата, отягощенного случайной погрешностью, но в данном случае можно утверждать, что с вероятностью 95% результат отдельного измерения должен попасть в интервал  $0,53 \pm 0,06$ .

#### 9.4. ГЕНЕРАЛЬНАЯ И ВЫБОРОЧНАЯ СОВОКУПНОСТЬ. РАСЧЕТ СРЕДНЕГО И ДИСПЕРСИИ ПО ВЫБОРОЧНЫМ ДАННЫМ

В разобранный выше примере параметры  $\alpha$  и  $\sigma$  предполагались известными, однако исследователь обычно не знает их истинных значений. Его задача как раз и состоит в том, чтобы по результатам выполненных измерений оценить значения  $\alpha$  и  $\sigma^2$ .

Представим, что при данных условиях выполнено бесконечно большое число измерений одной и той же величины. Полученную бесконечную гипотетическую совокупность результатов называют *генеральной совокупностью*.  $\alpha$  и  $\sigma^2$  — параметры генеральной совокупности, их точное значение можно было бы найти, зная лишь все элементы генеральной совокупности. Истинное значение измеряемой величины  $\alpha$ , называемое *генеральным средним*, равно

$$\alpha = \sum_{i=1}^{\infty} x_i \rho(x_i), \quad (9.5)$$

где  $\rho(x_i)$  — вероятность появления результата  $x_i$ . Параметр  $\sigma^2$  представляет собой *генеральную дисперсию*, которая определяется равенством

$$\sigma^2 = \sum_{i=1}^{\infty} (x_i - \alpha)^2 \rho(x_i). \quad (9.6)$$

Любую совокупность результатов измерений, выполненную при данных условиях опыта, принято рассматривать как случайную выборку из генеральной совокупности, т. е. как выборочную совокупность. (В экспериментальной практике опыты, результаты которых составляют выборочную совокупность, называют обычно *параллельными*.) Выборочная совокупность характеризуется значениями выборочных параметров, которые являются функциями величин, составляющих выборочную совокупность. Чтобы четко разграничить генеральные и выборочные параметры, для обозначения генеральных параметров используют греческие буквы, а выборочных — латинские. Выборочное среднее определяют как среднее арифметическое величины  $x$  из  $n$  результатов измерений:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i. \quad (9.7)$$

Выборочную дисперсию вычисляют по формуле

$$S_x^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}. \quad (9.8)$$

Знаменатель в выражении (9.8) характеризует *число степеней свободы* для выборочной дисперсии. Число степеней свободы  $f$  равно числу независимых измерений минус число дополнительных связей, налагаемых на экспериментальный материал в процессе его обработки. Так, на  $n$  независимых результатов измерений при расчете среднего арифметического накладывается одна связь вида (9.7), поэтому число степеней свободы при определении выборочной дисперсии  $f = n - 1$ .

Нередко для характеристики разброса (расстояния) данных указывают *относительную погрешность*, которая определяется как отношение соответствующей абсолютной погрешности к среднему значению измеряемой величины. Относительное выборочное квадратичное отклонение равно  $w_x = S_x / \bar{x}$ . Величина  $w_x$ , выраженная в процентах, носит название *коэффициента вариации*.

Для наглядности приведем пример вычисления различных выборочных параметров. В результате семи измерений концентрации метаболита в растворе получены следующие значения (мМ): 108, 120, 106, 117, 121, 110, 109. Произведем вычисления:

$$\bar{x} = \frac{108 + 120 + 106 + 117 + 121 + 110 + 109}{7} = 113;$$

$$S_x^2 = \frac{(108-113)^2 + (120-113)^2 + (106-113)^2 + (117-113)^2 + (121-113)^2 + (110-113)^2 + (109-113)^2}{7-1} = \frac{(25+49+49+16+64+9+16)}{6} = 38;$$

$$S_x = 6,2; \quad w_x = 0,055, \quad w_x = 5,5\%.$$

## 9.5. ЗАКОН СЛОЖЕНИЯ СЛУЧАЙНЫХ ПОГРЕШНОСТЕЙ

Пусть измеряемая величина  $A$  является суммой (или разностью) двух величин  $B$  и  $C$ , результаты измерений которых независимы. Тогда если  $S_A^2$ ,  $S_B^2$ ,  $S_C^2$  — дисперсии величин  $A$ ,  $B$ ,  $C$ , то можно доказать, что  $S_A^2 = S_B^2 + S_C^2$  или  $S_A = \sqrt{S_B^2 + S_C^2}$ .

Если  $A$  является суммой не двух, а большего числа слагаемых, то закон сложения погрешностей будет таким же, т. е. *средняя квадратичная погрешность суммы (или разности) нескольких величин равна корню квадратному из суммы дисперсий отдельных слагаемых*.

● Из закона сложения погрешностей следует два чрезвычайно важных вывода. Первый из них относится к роли каждой из погрешностей в общей погрешности результата. Он состоит в том, что *значение отдельных погрешностей очень быстро падает по мере их уменьшения*. Пусть  $B$  и  $C$  — два слагаемых, определенных со средними квадратичными погрешностями  $S_B$  и  $S_C$ , причем известно, что  $S_C$  в два раза меньше, чем  $S_B$ . Тогда погрешность суммы ( $A = B + C$ ) равна

$$S_A^2 = S_B^2 + S_C^2 = S_B^2 + \left(\frac{S_B}{2}\right)^2 = \frac{5}{4} S_B^2, \quad (9.9)$$

откуда  $S_A \approx 1,1 S_B$ .

Иначе говоря, общая погрешность возросла за счет меньшей погрешности всего на 10%, что обычно играет очень малую роль. Таким образом, если необходимо повысить точность измерений величины  $A$ , то нужно в первую очередь стремиться уменьшить ту погрешность измерения, которая больше, т. е. погрешность измерения величины  $B$ .

Следующий вывод, вытекающий из закона сложения погрешностей, относится к определению погрешности выборочного среднего. Пусть  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$  — результаты отдельных измерений, причем каждое из них характеризуется одной и той же дисперсией  $S^2$ . Образуем величину  $y$ , равную

$$y = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{x_1}{n} + \frac{x_2}{n} + \dots + \frac{x_n}{n}. \quad (9.10)$$

Дисперсия этой величины  $S_y$  в соответствии с законом сложения погрешностей определяется как

$$S_y^2 = \frac{S^2}{n^2} + \frac{S^2}{n^2} + \dots + \frac{S^2}{n^2} = \frac{nS^2}{n^2} = \frac{S^2}{n}. \quad (9.11)$$

Но  $y$ , по определению, — это среднее арифметическое  $\bar{x}$  из всех значений  $x$ , или выборочное среднее, поэтому можно написать

$$S_y = S_x = S/\sqrt{n}.$$

Таким образом, *средняя квадратичная погрешность выборочного среднего равна квадратичной погрешности отдельного результата, деленной на корень квадратный из числа измерений*.

● Это фундаментальный закон возрастания точности при росте числа измерений (разумеется, если точность результата полностью определяется случайной погрешностью). Из него следует, что при желании повысить точность измерений в два раза необходимо сделать вместо одного четыре измерения, а чтобы повысить точность в 10 раз, нужно увеличить число измерений в 100 раз и т. д.

При практической работе очень важно строго разграничивать применение средней квадратичной погрешности (выборочной дисперсии) отдельного измерения  $S_x$  и выборочной дисперсии среднего арифметического  $S_{\bar{x}}$ . Последняя применяется всегда, когда нужно оценить погрешность того числа, которое было получено в результате всех произведенных измерений. В тех случаях, когда нужно охарактеризовать точность применяемого способа измерений, следует применять величину  $S_x$ .

Поясним сказанное примером, который был приведен в предыдущем подразделе. Речь идет о результатах измерения концентрации некоторого метаболита. Напомним, что в этом случае  $\bar{x} = 113$ ,  $S_x = 6,2$ ,  $w_x = 5,5\%$ . Тогда

$$S_{\bar{x}} = \frac{S_x}{\sqrt{n}} = \frac{6,2}{\sqrt{7}} = \frac{6,2}{2,65} = 2,3; \quad w_{\bar{x}} = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}} \cdot 100\% = 2\%.$$

Таким образом, если описывается метод, которым производилось измерение, то указывают погрешность  $S_x$ , т. е. 5,5%, но если описывается точность полученного результата, то характеристикой этой точности будет величина  $S_{\bar{x}}$ , т. е. 2%.

## 9.6. ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ГЕНЕРАЛЬНОЙ СОВОКУПНОСТИ НА ОСНОВАНИИ ВЫБОРОЧНЫХ ДАННЫХ. МЕТОДЫ ИНТЕРВАЛЬНОГО ОЦЕНИВАНИЯ

При обработке результатов эксперимента необходимо всегда помнить о различии между генеральными и выборочными параметрами. *Генеральные параметры являются постоянными, характеризующими закон распределения результатов измерений, отягощенных случайными погрешностями, в то время как выборочные параметры суть случайные величины.* Поэтому имеют место лишь приближенные равенства

$$\alpha \approx \bar{x}, \quad \sigma^2 \approx S^2, \quad (9.12)$$

которые выполняются тем точнее, чем больше число проведенных измерений.

Величины  $\bar{x}$  и  $S^2$  представляют собой *точные оценки* генеральных параметров, однако приближенные равенства (9.12) не дают представления о точности, с которой установлены значения  $\alpha$  и  $\sigma^2$ . Поэтому при обработке экспериментальных данных обычно используются методы *интервального оценивания*, позволяющие рассчитывать границы интервала, внутри которого с заданной вероятностью может находиться значение генерального параметра. Ширина такого интервала (или половина его ширины) определяется точностью результата измерений, а вероятность того, что оцениваемый параметр будет лежать в пределах этого интервала, характеризует надежность оценки.

Введем основные понятия теории интервального оценивания. *Доверительным интервалом* неизвестного параметра  $\Theta$  называют такой числовой интервал  $(T_n, \bar{T}_n)$ , внутри которого с заранее установленной вероятностью  $\gamma$  (которую иногда называют доверительной вероятностью или коэффициентом надежности) может находиться истинное значение  $\Theta$ , так что

$$p(T_n < \Theta < \bar{T}_n) = \gamma. \quad (9.13)$$

Нижнюю  $T_n$  и верхнюю  $\bar{T}_n$  границы доверительного интервала называют *доверительными границами*. Величину  $p = 1 - \gamma$  называют *уровнем значимости*, который показывает, насколько часто при повторении выборки наше суждение о параметре  $\Theta$  будет оказываться ошибочным.

Задача нахождения доверительных интервалов рассматривалась в 9.3, правда, с той разницей, что там рассчитывали симметричный интервал, в который с вероятностью  $\gamma$  может попасть результат отдельного измерения  $x$ , если известны значения  $\alpha$  и  $\sigma$ , а теперь речь идет о построении интервала, который может накрыть значение  $\alpha$ , если в результате измерения получена величина  $x$  и известно значение  $\sigma$ . Доверительные границы определяются как функции от результатов  $n$  измерений, составляющих выборочную совокупность, и вследствие случайного характера выборки являются случайными величинами. Поэтому при многократном повторении серии измерений и положение, и ширина доверительных интервалов будут изменяться, однако в  $100\gamma\%$  случаев доверительные интервалы будут накрывать истинное значение оцениваемого параметра.

Приведем пример построения доверительных интервалов. В результате измерения концентрации метаболита в растворе получено значение 108 мМ. Из независимых данных известно, что погрешность используемого метода измерений определяется генеральной дисперсии  $\sigma = 6$ . Найдем доверительные интервалы для истинного значения концентрации метаболита в растворе, соответствующие наиболее общепотребимым 95%-ной и 99%-ной доверительным вероятностям.

Решая неравенства в (9.13) относительно  $\alpha$  (см. табл. 9.1), получим  $\gamma = p(x - u_\gamma \sigma < \alpha < x + u_\gamma \sigma)$ . Отсюда доверительные границы равны

$$\underline{T}_n = x - u_\gamma \sigma, \quad \bar{T}_n = x + u_\gamma \sigma.$$

Подставляя сюда значение  $u_{0,95} = 2$  из таблицы, имеем

$$\underline{T}_n = 108 - 2 \cdot 6 = 96; \quad \bar{T}_n = 108 + 2 \cdot 6 = 120.$$

Следовательно,  $96 < \alpha < 120$  ( $\gamma = 0,95$ ).

Соответственно  $u_{0,99} = 2,58$  и  $\underline{T}_n = 108 - 2,58 \cdot 6 = 92,52$ ;  $\bar{T}_n = 108 + 2,58 \cdot 6 = 123,48$ ;  $92,52 < \alpha < 123,48$  ( $\gamma = 0,99$ ).

Итак, чем больше  $\gamma$ , тем выше надежность оценки, но тем больше и ширина доверительного интервала, характеризующая погрешность оценивания. Таким образом, для характеристики величины случайной погрешности необходимо указать ширину доверительного интервала и доверительную вероятность. Указание одного только доверительного интервала лишено смысла, так как при этом неизвестно, сколь надежны полученные данные.

При построении доверительного интервала для  $\alpha$  на основании отдельного измерения исходили из того, что результат этого измерения взят из генеральной совокупности с нормальным законом распределения. Вообще говоря, чтобы найти доверительный интервал для генерального параметра исходя из какой-либо выборочной характеристики, нужно знать закон распределения этой характеристики.

Рассмотрим методы нахождения доверительных интервалов для генерального среднего на основании выборочного среднего. Чтобы построить доверительный интервал для  $\alpha$  исходя из  $\bar{x}$ , необходимо знать закон распределения средних арифметических. В зависимости от того, располагает ли исследователь знанием генеральной дисперсии  $\sigma$  или ему известна лишь ее выборочная оценка  $S^2$ , распределение значений  $\bar{x}$  подчиняется различным законам. Эти законы изучены для выборок из нормальных совокупностей, с которыми чаще всего приходится иметь дело на практике. Средние арифметические  $\bar{x}$  для выборок, содержащих  $n$  элементов, взятых из нормальной совокупности с параметрами  $\alpha$  и  $\sigma$ , также подчиняются нормальному распределению с тем же самым значением генерального среднего и генеральной дисперсии  $\sigma_{\bar{x}}^2$ , равной, как следует из предыдущего параграфа,

$$\sigma_{\bar{x}}^2 = \frac{\sigma^2}{n}. \quad (9.14)$$

Вводим вместо случайной величины  $\bar{x}$  нормированную случайную величину

$$\bar{z} = \frac{\bar{x} - \alpha}{\sigma_{\bar{x}}} = \frac{\bar{x} - \alpha}{\sigma/\sqrt{n}}. \quad (9.15)$$

Пользуясь табл. 9.1 нормального распределения, можно найти два таких числа —  $-u_\gamma$  и  $+u_\gamma$ , для которых выполняется условие

$$P\left(-u_\gamma < \frac{\bar{x} - \alpha}{\sigma/\sqrt{n}} < +u_\gamma\right) = \gamma, \quad (9.16)$$

откуда

$$\bar{x} - u_\gamma \frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \alpha < \bar{x} + u_\gamma \frac{\sigma}{\sqrt{n}}. \quad (9.17)$$

Таблица 9.2

Величины  $t_\gamma$  для различных значений доверительной вероятности  $\gamma$ 

Число степеней свободы $f$	Доверительная вероятность				Число степеней свободы $f$	Доверительная вероятность			
	0,9	0,95	0,99	0,999		0,9	0,95	0,99	0,999
1	6,314	12,706	63,657	636,619	14	1,761	2,145	2,977	4,140
2	2,920	4,303	9,925	31,598	15	1,753	2,131	2,947	4,073
3	2,353	3,182	5,841	12,941	16	1,746	2,120	2,921	4,015
4	2,132	2,776	4,604	8,610	17	1,740	2,110	2,898	3,965
5	2,015	2,571	4,032	6,859	18	1,734	2,101	2,878	3,922
6	1,943	2,447	3,707	5,959	19	1,729	2,093	2,861	3,883
7	1,895	2,365	3,499	5,405	20	1,725	2,086	2,845	3,850
8	1,860	2,306	3,355	5,041	30	1,697	2,042	2,750	3,646
9	1,833	2,262	3,250	4,781	40	1,684	2,021	2,704	3,551
10	1,812	2,228	3,169	4,578	60	1,671	2,000	2,660	3,460
11	1,796	2,201	3,106	4,437	120	1,658	1,980	2,617	3,373
12	1,782	2,179	3,055	4,318	$\infty$	1,645	1,960	2,576	3,291
13	1,771	2,160	3,012	4,221					

Так производится интервальное оценивание генерального среднего в том случае, когда известно значение генеральной дисперсии  $\sigma^2$ . На практике это реализуется, когда измерения проводятся с помощью уже хорошо исследованного метода, погрешность которого, а следовательно, и величина  $\sigma^2$  известны. Но часто погрешность метода приходится определять в процессе измерений. При этом можно определить только величину выборочной дисперсии  $S_n^2$ , соответствующую тому или иному, но обычно небольшому числу измерений  $n$ . В этом случае распределение среднего арифметического отличается от нормального особенно сильно, когда число измерений  $n$  мало. Это обусловлено появлением дополнительного источника неопределенности, связанного с нетождественностью величин  $\sigma^2$  и  $S_n^2$ . При построении доверительных интервалов исходят из так называемого *распределения Стьюдента* или *t-распределения*. Это распределение имеет случайная величина

$$t = \frac{\bar{x} - \alpha}{S_n / \sqrt{n}} \quad (9.18)$$

Распределение Стьюдента зависит только от числа степеней свободы  $f = n - 1$ , связанного с выборочной дисперсией  $S_n^2$ . Кривые распределения Стьюдента напоминают по форме кривые нормального распределения, но для малых значений  $f$  они значительно медленнее сближаются с осью абсцисс при  $|t| \rightarrow \infty$ . При  $f = \infty$  *t-распределение* совпадает с нормальным.

Вероятность того, что при доверительной вероятности  $\gamma$  случайная величина (9.18) попадает в симметричный интервал с доверительными границами  $(-t_\gamma, +t_\gamma)$ , определяется выражением

$$p\left(-t_\gamma < \frac{\bar{x} - \alpha}{S_n/\sqrt{n}} < +t_\gamma\right) = \gamma. \quad (9.19)$$

В табл. 9.2. для различных  $\gamma$  приведены  $t_\gamma$ , которые при данном  $f$  удовлетворяют соотношению (9.19).

Для интервального оценивания генерального среднего обычно пользуются следующим выражением, полученным из (9.19):

$$p\left(\bar{x} - t_\gamma \frac{S_n}{\sqrt{n}} < \alpha < \bar{x} + t_\gamma \frac{S_n}{\sqrt{n}}\right) = \gamma. \quad (9.20)$$

Величины  $t_\gamma \frac{S_n}{\sqrt{n}}$  и  $t_\gamma \frac{S_n}{\sqrt{n}}$  называют *доверительными погрешностями* среднего арифметического и обозначают символом  $\Delta\gamma$ . Таким образом, результат измерений следует записать в виде

$$\bar{x} \pm \Delta\gamma,$$

указывая при этом принятый уровень доверительной вероятности  $\gamma$ . Относительные погрешности  $\bar{x}$  обычно обозначают  $\sigma_\gamma$ .

Для иллюстрации рассмотренного материала приведем пример. Три последовательных измерения  $x$  оптической плотности культуральной жидкости дали результаты 0,53, 0,49, 0,60. Определим погрешность среднего арифметического при 95%-ной доверительной вероятности:

$$\begin{aligned} \bar{x} &= \frac{0,53 + 0,49 + 0,60}{3} = \frac{1,62}{3} = 0,54; \\ S^2 &= \frac{(0,53 - 0,54)^2 + (0,49 - 0,54)^2 + (0,60 - 0,54)^2}{2} = \\ &= \frac{1 \cdot 10^{-4} + 25 \cdot 10^{-4} + 36 \cdot 10^{-4}}{2} = 31 \cdot 10^{-4}; \\ S &\approx 5,6 \cdot 10^{-2}. \end{aligned}$$

$n = 3$   
 $f = 3$

Из табл. 9.2 находим для  $\gamma = 0,95$   $f = 2$ ,  $t_{0,95} = 4,30$ . Тогда

$$\Delta_{0,95} = t_{0,95} \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{4,3 \cdot 5,6 \cdot 10^{-2}}{3} = \frac{24,08 \cdot 10^{-2}}{1,73} \approx 0,14.$$

Для сравнения вычислим результат для нормального распределения ( $u_{0,95} = 1,96$ ):

$$\Delta_{0,95} = \frac{1,96 \cdot 5,6 \cdot 10^{-2}}{3} \approx 0,06.$$

Видно, что результат в случае применения нормального распределения получился бы заниженным.

## 9.7. НЕОБХОДИМОЕ ЧИСЛО ИЗМЕРЕНИЙ

Для уменьшения случайной погрешности результата могут быть использованы два пути: улучшение точности измерений, т. е. уменьшение величины  $S_x$ , и увеличение числа измерений, т. е. использование соотношения

$$S_{\bar{x}} = \frac{S_x}{\sqrt{n}}. \quad (9.21)$$

Остановимся на последнем приеме. Будем считать, что все возможности совершенствования техники измерений уже использованы, при этом систематическая погрешность измерений равна  $\delta$ . Ранее было отмечено, что уменьшать случайную погрешность целесообразно только до тех пор, пока общая погрешность измерений не будет полностью определяться систематической погрешностью. Для этого необходимо, чтобы доверительный интервал, определенный с выбранной доверительной вероятностью, был существенно меньше систематической погрешности, т. е.

$$\Delta_\gamma \leq \delta. \quad (9.22)$$

Какое соотношение величин  $\Delta_\gamma$  и  $\delta$  можно считать удовлетворяющим условию (9.22)? В кинетических исследованиях выражению «много больше» соответствует отношение сравниваемых величин 10 и больше, т. е. в том случае, когда  $\Delta_\gamma \leq \frac{\delta}{10}$ , условие (9.22) можно считать выполненным. Иногда можно удовлетвориться гораздо менее жестким требованием  $\Delta_\gamma \leq \frac{\delta}{3}$  или даже

$\Delta_\gamma \leq \frac{\delta}{2}$ . Доверительная вероятность  $\gamma$ , с какой в данном случае определяют доверительную погрешность  $\bar{x}$ , практически не превышает 0,95. Для оценки необходимого числа измерений было проведено множество вычислений при различных  $\gamma$  и различных соотношениях между  $\Delta_\gamma$  и  $\sigma$ . Результаты суммированы в табл. 9.3, в которой  $\Delta_\gamma$  выражено в долях выборочной дисперсии  $S_x$ . Приведем пример пользования этой таблицей.

Коэффициент вариации  $W$  для некоторого измерения составляет 2,5%; систематическая ошибка измерений  $\delta = 2\%$ . Сколько измерений нужно проделать, чтобы случайная ошибка практически не играла роли?

Зададимся минимальным условием  $\Delta_\gamma \leq \frac{\delta}{2}$  и доверительной вероятностью 95%. Так как все погрешности выражены в относительных единицах, то

$$\Delta_{\gamma_{\text{min}}} = \frac{\delta}{2} = 1\%; \quad \varepsilon = \frac{\Delta_\gamma}{S} = \frac{\Delta_{\gamma_{\text{min}}}}{W} = \frac{1}{2,5} = 0,4.$$

Таблица 9.3

Необходимое число измерений для получения случайной погрешности  $\varepsilon$  с доверительной вероятностью

$\varepsilon = \frac{\Delta_y}{S_x}$	$\gamma$					
	0,5	0,7	0,9	0,95	0,99	0,999
1,0	2	3	5	7	11	17
0,5	3	6	13	18	31	50
0,4	4	8	19	27	46	74
0,3	6	13	32	46	78	130
0,2	13	29	70	100	170	280
0,1	47	110	270	390	700	1100
0,05	180	430	1100	1500	2700	4300
0,01	450	1100	27000	38000	66000	110000

Из табл. 9.3 находим, что для  $\gamma=0,95$  и  $\varepsilon=0,4$  необходимое число измерений  $n=27$ .

Интересно знать, сколько нужно сделать измерений, если наложить еще менее жесткое требование, а именно: чтобы систематическая и случайная погрешности были примерно равны. В этом примере  $\varepsilon=0,8$  и при  $\gamma=0,95$  из той же таблицы экстраполяцией находим  $n \approx 12$ .

Из этих примеров можно сделать заключение, что увеличением числа измерений можно устранить влияние случайной погрешности на результат только в том случае, если выборочная дисперсия не более чем в несколько раз превосходит систематическую погрешность. Реально это возможно, если  $S_x \leq 5\delta$ . При больших значениях  $S(x)$  для существенного уменьшения роли случайной ошибки уже требуются сотни и тысячи измерений; как это видно из табл. 9.3. В таких случаях для уменьшения погрешности результата необходимо радикально менять методику измерений, с тем чтобы уменьшить случайную погрешность.

## 9.8. ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОМАХОВ

При проведении ряда одинаковых измерений, подверженных случайным погрешностям, могут встретиться измерения и с очень большими случайными погрешностями. Однако, как известно, большие погрешности имеют малую вероятность, и если среди результатов измерений встретится одно, имеющее резко отличное от других значение, то может появиться соблазн квалифицировать его как промах и не учитывать его как заведомо неверный. В такой операции всегда присутствует известная доля субъективизма. Для объективизации отбрасывания непоправившегося измерения необходимо ввести определенный количественный критерий, основанный на законах теории вероятности.

Если известно точное значение генеральной дисперсии  $\sigma$ , то вероятность появления значения, отклоняющегося от среднего арифметического  $\bar{x}$  более чем на  $3\sigma$ , равна 0,003 и все измерения, отличающиеся от  $\bar{x}$  на эту или большую величину, могут быть классифицированы как промахи и отброшены как очень маловероятные. При этом нужно помнить: существует очень малая вероятность того, что отброшенное число является не промахом, а естественным статистическим отклонением. Однако если такой маловероятный случай и произойдет, т. е. будет неправильно отброшен один из результатов измерений, то это практически не приведет к существенному ухудшению оценки результатов измерений.

Следует иметь в виду, что для совокупности измерений вероятность проявления измерения, отличающегося более чем на  $3\sigma$  от среднего значения, всегда больше 0,003, а вероятность  $\beta$  того, что ни один из результатов  $n$  измерений не будет отличаться от среднего более чем на  $3\sigma$ , не 0,997, а равна  $\beta = (1 - 0,003)^n$ . Если  $n$  не слишком большое, то  $\beta = (1 - 0,003)^n \approx 1 - 0,003n$ .

При 100 измерениях вероятность того, что хотя бы одно будет случайно отличаться от среднего более чем на  $3\sigma$ , составит около 30%. Обычно число производимых измерений не очень велико — сравнительно редко оно превышает 10—20. При этом точное значение неизвестно, поэтому отбрасывать измерения, отличающиеся от среднего более чем на  $3\sigma$ , нельзя.

Для оценки вероятностей  $\beta$  случайного появления выскакивающих значений в ряду  $n$  измерений (для  $n < 25$ ) на основании результатов, даваемых теорией вероятности, была составлена табл. 9.4. Для пользования этой таблицей необходимо вычислить  $\bar{x}$  из всех измерений, включая подозреваемое  $\bar{x}_k$ , которое кажется недопустимо большим или малым. Далее вычислить относительное отклонение этого измерения от среднего арифметического, выраженное в долях выборочной дисперсии:

$$v = \left| \frac{\bar{x} - x_k}{S_n} \right|. \quad (9.23)$$

Таблица 9.4

Оценка выскакивающих измерений в ряду измерений для вероятности

n	$\beta$				n	$\beta$			
	0,1	0,05	0,025	0,01		0,1	0,05	0,025	0,01
3	1,41	1,41	1,41	1,41	9	2,10	2,24	2,35	2,46
4	1,65	1,69	1,71	1,72	10	2,15	2,29	2,41	2,54
5	1,79	1,87	1,92	1,96	11	2,19	2,34	2,47	2,61
6	1,89	2,00	2,07	2,13	12	2,23	2,39	2,52	2,66
7	1,97	2,09	2,18	2,27	13	2,26	2,43	2,56	2,71
8	2,04	2,17	2,27	2,37	14	2,30	2,46	2,60	2,76

n	β				n	β			
	0,1	0,05	0,025	0,01		0,1	0,05	0,025	0,01
15	2,33	2,49	2,64	2,80	21	2,47	2,64	2,80	2,98
16	2,35	2,52	2,67	2,84	22	2,49	2,66	2,82	3,01
17	2,38	2,55	2,70	2,87	23	2,50	2,68	2,84	3,03
18	2,40	2,58	2,73	2,90	24	2,52	2,70	2,86	3,05
19	2,43	2,60	2,75	2,93	25	2,54	2,72	2,88	3,07
20	2,45	2,62	2,78	2,96					

По табл. 9.4 находим, какой вероятности  $\beta$  соответствует полученное значение  $v$ . Если вероятность  $\beta$  подозреваемого измерения  $< 0,01$ , то его следует отбросить; соответственно если  $\beta > 0,1$ , то подозреваемое измерение следует непременно оставить. При промежуточных значениях ( $0,1 > \beta > 0,01$ ) представляется одинаково правильным любое из этих действий. Проиллюстрируем сказанное примером. При проведении 10 измерений оптической плотности при 540 нм культуральной жидкости получены следующие значения: 0,62, 0,64, 0,59, 0,59, 0,63, 0,61, 0,49, 0,60, 0,63, 0,60. В ряду наблюдений вызывает подозрение седьмой результат. Можно ли его считать промахом? Итак,

$$\bar{x} = 0,60; S_{10} = 10^{-2} \sqrt{\frac{162}{9}} = 10^{-2} \sqrt{18} = 0,0324.$$

Для седьмого результата

$$v = \frac{0,60 - 0,49}{0,0324} = 3,4.$$

Из табл. 9.4 следует, что для  $v = 3,4$  и  $n = 10$   $\beta < 0,01$ . Таким образом, седьмой результат, наверняка, является промахом и его можно отбросить. Из оставшихся девяти измерений проведем подобную проверку для второго результата:

$$\bar{x} = 0,61; S_9 = 10^{-2} \sqrt{\frac{28}{8}} = 10^{-2} \sqrt{3,5} = 0,019;$$

$$v = \left| \frac{0,64 - 0,61}{0,019} \right| = 1,58.$$

Из табл. 9.4 видно, что для  $v = 1,58$  и  $n = 9$   $\beta > 0,1$  и второй результат следует непременно оставить.

## 9.9. ОЦЕНКА ТОЧНОСТИ РЕЗУЛЬТАТОВ КОСВЕННЫХ ИЗМЕРЕНИЙ

До сих пор речь шла о результатах *непосредственных*, или *прямых*, измерений, т. е. таких измерений, при которых непосредственно определяется интересующая величина. Но

в экспериментальной работе редко удается ограничиваться выполнением прямых измерений, чаще проводятся *косвенные* измерения, при которых подлежащая определению величина представляет собой некоторую функцию от непосредственно измеряемых величин, отягощенных случайными погрешностями. Например, при определении количества выделившегося газообразного продукта непосредственно измеряют его концентрацию в газовой фазе и объем газовой фазы. Для определения оптической плотности (при 540 нм культуральной жидкости) в определенной фазе роста непосредственно измеряют  $D_{540}$  исходного раствора с нарастающей культурой (холостой опыт, фон) и суммарную  $D_{540}$  культуральной жидкости, растущей культуры и фона. В подобных случаях возникает задача оценки погрешностей косвенных измерений.

Среднее арифметическое и погрешность результата косвенных измерений можно вычислить двояко. Во-первых, можно воспользоваться методами, применяемыми для оценки погрешностей непосредственных измерений. Предположим, необходимо найти значение  $y$ , связанное функциональной зависимостью с  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , которое определяется в результате прямых измерений:

$$y=f(x_1, x_2, \dots, x_n). \quad (9.24)$$

Пусть процедура измерений организована так, что каждому определяемому значению  $y_i$  отвечает совокупность измерений  $x_{1,i}, x_{2,i}, \dots, x_{k,i}$ . Тогда для каждого  $i$ -го измерения можно рассчитать  $y=f(x_{1,i}, x_{2,i}, \dots, x_{k,i})$  и обычными методами найти среднее арифметическое и погрешность результата косвенных измерений (9.7) — (9.8), а также рассчитать доверительные интервалы (9.17).

Другой путь расчета основан на использовании *закона накопления погрешностей*. В соответствии с этим законом среднее значение и выборочную дисперсию можно аппроксимировать выражениями

$$y=f(x_1, x_2, \dots, x_k)=g(\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_k); \quad (9.25)$$

$$S_y^2=S^2 f(x_1, x_2, \dots, x_k)=\left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 S_{x_1}^2+\left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2 S_{x_2}^2+\dots \\ \dots+\left(\frac{\partial y}{\partial x_k}\right)^2 S_{x_k}^2, \quad (9.26)$$

где  $S_{x_1}^2, S_{x_2}^2, \dots, S_{x_k}^2$  — выборочные дисперсии случайных значений  $x_1, x_2, \dots, x_k$ . Соотношение (9.26) сохраняет силу в тех случаях, когда вместо выборочных дисперсий в него подставляются генеральные дисперсии  $\sigma_{x_i}^2$ , или квадраты погрешностей, вычисленных при выбранном уровне доверительной вероятности  $\Delta \gamma^2(x_i)$ . Проиллюстрируем закон накопления погрешностей:

1. Пусть  $y = Ax + B$ , где  $A$  и  $B$  — параметры, тогда

$$\bar{y} = A\bar{x} + B; S_y^2 = \left[ \frac{\partial}{\partial x} (Ax + B) \right]^2 S_x^2 = A^2 S_x^2. \quad (9.27)$$

2. Если  $y = x_1 - x_2$ , то  $\bar{y} = \bar{x}_1 - \bar{x}_2$ ;

$$S_y^2 = \left[ \frac{\partial}{\partial x_1} (x_1 - x_2) \right]^2 S_{x_1}^2 + \left[ \frac{\partial}{\partial x_2} (x_1 - x_2) \right]^2 S_{x_2}^2 = S_{x_1}^2 + S_{x_2}^2. \quad (9.28)$$

3. Если  $y = x_1/x_2$ , то  $\bar{y} = \bar{x}_1/\bar{x}_2$ ;

$$S_y^2 = \left( \frac{\partial}{\partial x_1} \left( \frac{x_1}{x_2} \right) \right)^2 S_{x_1}^2 + \left( \frac{\partial}{\partial x_2} \left( \frac{x_1}{x_2} \right) \right)^2 S_{x_2}^2 = \frac{S_{x_1}^2}{x_2^2} + \frac{x_1^2}{x_2^4} S_{x_2}^2. \quad (9.29)$$

4. Если  $y = x_1, x_2$ , то  $y = \bar{x}_1 \bar{x}_2$ ;

$$S_y^2 = x_2^2 S_{x_1}^2 + x_1^2 S_{x_2}^2. \quad (9.30)$$

Можно показать, что если погрешности измерений малы по сравнению с измеряемой величиной, то оба способа дают практически тождественные результаты и поэтому безразлично, каким из них пользоваться. Здесь рекомендуется руководствоваться практическими удобствами расчета, а с этой точки зрения второй способ представляется менее трудоемким. Кроме того, если результаты измерений распределены по нормальному закону, то закон распределения значений  $y$ , вообще говоря, может быть отличен от нормального. Поэтому для определения доверительных интервалов лучше пользоваться вторым способом.

В заключение для иллюстрации обсуждаемого материала воспользуемся примером из предыдущего раздела. При проведении девяти измерений  $D_{540}$  культуральной жидкости получены следующие значения: 0,62, 0,64, 0,59, 0,59, 0,63, 0,61, 0,60, 0,63, 0,60. Оценим погрешность часто используемой в микробиологии величины  $\ln \bar{D}$ .

Итак,

$$\bar{D} = \frac{0,62 + 0,64 + 0,59 + 0,59 + 0,63 + 0,61 + 0,60 + 0,63 + 0,60}{9} = 0,612;$$

$$S_D = 0,019; S_{\bar{D}} = \frac{0,019}{\sqrt{9}} = 0,006; \ln D = \ln 0,612 = -0,491;$$

$$S_{\ln \bar{D}} = \frac{\partial}{\partial D} (\ln D) S_{\bar{D}} = \frac{1}{\bar{D}} S_{\bar{D}} = \frac{1}{0,612} 0,006 = 0,010.$$

## 9.10. ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ЛИНЕЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ МЕТОДАМИ РЕГРЕССИОННОГО АНАЛИЗА

Нередко возникают задачи, когда исследуемая величина меняется с изменением условий опыта и задача измерений состоит в нахождении параметров функциональной зависимости



$$\frac{\partial}{\partial a} \left[ \sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i^2) \right] = \sum_{i=1}^n 2(y_i - a - bx_i)(-1) = 0; \quad (9.34)$$

$$\frac{\partial}{\partial b} \left[ \sum_{i=1}^n (y_i - a - bx_i)^2 \right] = \sum_{i=1}^n 2(y_i - a - bx_i)(-x_i) = 0. \quad (9.35)$$

Выполняя несложные преобразования и упрощения, находим

$$\begin{aligned} \sum_{i=1}^n y_i - na - b \sum_{i=1}^n x_i &= 0; \\ \sum_{i=1}^n x_i y_i - a \sum_{i=1}^n x_i - b \sum_{i=1}^n x_i^2 &= 0. \end{aligned} \quad (9.36)$$

Отсюда можно определить наилучшие значения  $a$  и  $b$ . Решая систему уравнений (9.36) относительно  $a$  и  $b$ , приходим к следующим соотношениям:

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \sum_{i=1}^n x_i^2 - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2}; \quad (9.37)$$

$$b = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2}, \quad (9.38)$$

где  $n$  — число экспериментальных точек, каждой из которых соответствует эмпирическое значение  $y_i = f(x_i)$ .

Теория дает возможность вычислить также дисперсииклонения точек от прямой и дисперсию коэффициентов  $a$  и  $b$ .

Если подставить значения  $a$  и  $b$ , рассчитанные из (9.37) и (9.38), в (9.31), то можно найти значение  $\hat{y}$ , предсказываемое линейным уравнением, полученным по методу наименьших квадратов. Дисперсия, характеризующая рассеяние экспериментальных значений  $y_i$  относительно соответствующих точек на прямой  $\hat{y}_i$ , определяется выражением

$$S_0^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}, \quad (9.39)$$

а дисперсии коэффициентов регрессии — выражениями

$$S_a^2 = \frac{S_0^2 \sum_{i=1}^n x_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2}; \quad (9.40)$$

$$S_b^2 = \frac{S_{0n}^2}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2}. \quad (9.41)$$

Зная  $S_a^2$  и  $S_b^2$ , можно оценить погрешность значений  $a$  и  $b$  при доверительной вероятности  $\gamma$ :

$$\Delta_\gamma(a) = t_\gamma S_a; \quad (9.42)$$

$$\Delta_\gamma(b) = t_\gamma S_b, \quad (9.43)$$

где  $t_\gamma$  — доверительные границы распределения Стьюдента при числе степеней свободы  $f = m - 2$  (см. табл. 9.2).

● Как видно, вычисления по методу наименьших квадратов достаточно громоздки. Большим подспорьем в этом деле является реализация описанной вычислительной процедуры на электронно-вычислительной машине. В настоящее время существуют стандартные программы, позволяющие провести оценки параметров линейной регрессии по МНК в очень короткие сроки и с высокой степенью точности. Правила пользования этими программами просты и не могут представить особых трудностей для исследователей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная цель книги состоит в демонстрации того факта, что, *несмотря на кажущуюся сложность протекающих процессов, рост микробных популяций может быть интерпретирован на молекулярном уровне, экспериментально изучен и найдены уравнения, количественно описывающие рост микробных клеток.* Читатель, у которого хватило упорства довести изучение этого предмета до конца, должен быть уже убежден в эффективности и плодотворности развитого в книге биокинетического подхода.

Главное преимущество количественного подхода заключается в существенном расширении информации о свойствах системы при условии, что выявлены и записаны в виде уравнений основные закономерности, описывающие поведение системы. Если известны числовые значения параметров, входящих в уравнения, то можно количественно определить характеристики системы при любом произвольном времени процесса, значении рН, концентрации субстрата, ингибитора и т. п. *Уравнения в свернутой форме несут в высшей степени богатую информацию о свойствах системы.* Именно поэтому любая

отрасль науки стремится выйти на уровень математических обобщений. В микробиологии проделаны определенные шаги в этом направлении.

Другая важная особенность развитого в книге подхода — *использование биокинетики для изучения механизмов процессов*. Логика кинетического исследования включает стадию экспериментального изучения поведения системы во времени, стадию построения гипотез о механизме процесса и трансформации гипотез в кинетические схемы. Особенностью кинетики является однозначный переход от кинетической схемы к системе дифференциальных уравнений, описывающих динамику процесса. Построенная таким образом система дифференциальных уравнений имеет, как правило, единственное решение, которое исследователь может сопоставить с полученными экспериментальными данными. В руках исследователя оказывается метод, дающий критерий справедливости той или иной гипотезы о механизме процесса. Соответствие количественного решения с экспериментом является критерием истинности используемых представлений.

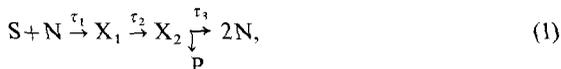
Молекулярно-биологические механизмы определяют направление и скорость роста микробных популяций. В данной книге сделана попытка *связать кинетику молекулярно-биологических процессов с макроскопической кинетикой роста и эволюции микробной популяции*. Читателю должно быть ясно, что в этой области главные решения еще впереди. Развитие исследований связано с созданием кинетических основ экспрессии гена — новой области, привлекающей в настоящее время активное внимание исследователей. Кинетические исследования помогут решить многие проблемы генетической и клеточной инженерии.

Используемые и развитые в книге подходы наиболее применимы к анализу роста микробных популяций. В последние годы активное развитие получают экспериментальные и теоретические исследования в области культивирования клеток животных и человека. Многие уравнения, проанализированные выше, пригодны и для анализа кинетики роста клеточных популяций в культуре ткани человека и животных. Однако как экспериментальная техника культивирования, так и кинетическое описание процесса в этом случае существенно сложнее, чем при микробном росте. Управление клеточными популяциями в культуре ткани осуществляется как на уровне влияния субстратов, так и на уровне рецепторно-ферментных систем, связанных с участием специфических факторов роста различной природы. По-видимому, ближайшие годы будут характеризоваться большим прогрессом в этом направлении.

## ЗАДАЧИ

### Глава I

**1.1.** В ходе исследования процесса клеточного деления удалось вычлнить и количественно описать несколько стадий:



где  $\tau_1, \tau_2, \tau_3$  — характеристические времена соответствующих стадий. Определить  $\mu, \mu_m$  и  $K_s$ , если при  $S_0 = 10$  г/л  $\tau_1 = 1$  ч,  $\tau_2 = 1,25$  ч,  $\tau_3 = 1,25$  ч.

**1.2.** Вывести выражение для зависимости концентрации продукта, образующегося на третьей стадии процесса (1), от времени и определить его концентрацию через 10 ч, если  $P_0 = 0$ , а  $N_0/Y_p = 0,1$  г/л.

**1.3.** В результате определения зависимости удельной скорости роста трех различных культур от концентрации лимитирующего субстрата были получены следующие экспериментальные данные:

$S_0, M$	$\mu, ч^{-1}$		
	культура № 1	культура № 2	культура № 3
$2 \cdot 10^{-4}$	0,058	0,076	0,170
$5 \cdot 10^{-4}$	0,116	0,194	0,345
$8 \cdot 10^{-4}$	0,163	0,290	0,435
$10^{-3}$	0,173	0,311	0,479
$2 \cdot 10^{-3}$	0,231	0,427	0,586
$4 \cdot 10^{-3}$	0,277	0,519	0,658
$8 \cdot 10^{-3}$	0,308	0,581	0,700
$10^{-2}$	0,315	0,595	0,709
$2 \cdot 10^{-2}$	0,330	0,625	0,727
$4 \cdot 10^{-2}$	0,338	0,641	0,737

Определить для каждой из трех культур, оказывает ли старение клеток влияние на механизм микробиологического роста, и найти количественные значения  $\mu_m, K_s$  и  $\lambda$ .

**1.4.** Воспользовавшись экспериментальными данными предыдущей задачи, определить пороговые минимальные концентрации субстрата, ниже которых рост всех трех культур невозможен.

**1.5.** Определить параметры уравнения Тейсера исходя из данных, представленных ниже:

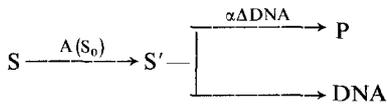
$S_0, mM$	$\mu, ч^{-1}$	$S_0, mM$	$\mu, ч^{-1}$
1	0,048	7	0,248
2	0,091	10	0,316
3	0,130	20	0,432
5	0,197	$\infty$	0,5

**1.6.** При исследовании удельной скорости роста культуры от концентрации лимитирующего субстрата были получены следующие данные:

$S_0$ , mM	0,1	0,5	1,0	2,0	5,0	10,0
$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	0,0125	0,0416	0,0588	0,0741	0,0877	0,0935

Из дополнительных исследований известно, что период развития клеток данной культуры состоит из двух фаз: индукционного периода  $\tau_a$  и периода клеточного деления (репликационного процесса)  $\tau_r$ . Определить  $\mu_m$ ,  $K_s$ , а также коэффициент распределения потоков ключевого метаболита, если  $\tau_a = 2$  ч,  $k_{кат} E/B = 1$  ч<sup>-1</sup>.

1.7. Вывести выражение для удельной скорости роста исходя из кинетической схемы, где ДНК-зависимой является стадия образования продукта



учитывая, что в начальный момент времени  $\Delta DNA = 0$ .

### Глава 2

2.1. При исследовании роста термофильной водородообразующей культуры были получены следующие экспериментальные данные (В. И. Скляр и др., 1986):

$t$ , ч	$D_{540}$	$t$ , ч	$D_{540}$
2	0,113	4	0,330
2,5	0,142	4,5	0,449
3	0,190	5	0,58
3,5	0,262		

Определить удельную скорость роста.

2.2. Определить  $\mu_m$  и  $K_s$  для роста термофильной водородообразующей культуры на глюкозе исходя из следующих данных (В. И. Скляр и др., 1986):

Концентрация глюкозы, mM	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	Концентрация глюкозы, mM	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>
1	0,23	10	0,49
3	0,38	12	0,5
5	0,43	14	0,51
7	0,47	17	0,54

2.3. Определить  $\mu_m$  и  $K_s$  для роста дрожжей *Candida utilis* на среде с этанолом и уксусной кислотой исходя из данных (Е. С. Никонова, 1984), представленных ниже:

Концентрация этанола, mM	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	Концентрация уксусной кислоты, mM	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>
1	0,2	1	0,14
3	0,3	2	0,217
5	0,333	4	0,283
7	0,37	7	0,3
9	0,383	10	0,31
11	0,4	14	0,31
14	0,4		

2.4. При исследовании pH-зависимости роста термофильной водородообразующей бактерии получены данные, приведенные ниже (В. И. Скляр и др., 1986):

pH	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	pH	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>
5,0	0,02	6,5	0,55
5,25	0,09	6,75	0,54
5,5	0,24	7,0	0,38
5,75	0,35	7,25	0,1
6,0	0,5	7,5	0,02
6,25	0,53		

Определить  $\mu_m$ ,  $pK_a$ ,  $pK_0$ ,  $tg\alpha$  и  $tg\beta$ , если  $S_0 \gg K_s$ .

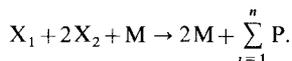
2.5. Определить константу неконкурентного ингибирования этанолом роста термофильной водородобразующей бактерии в условиях  $S_0 \gg K_s$ , используя исходящие данные (В. И. Скляр и др., 1986):

Концентрация этанола, mM	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>
0	0,55
15	0,46
31	0,38
46	0,27
126	0,14

2.6. Определить тип ингибирования роста  $\mu_m$ ,  $K_s$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $K_1$ , воспользовавшись следующими данными:

Концентрация субстрата, mM	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>			
	Концентрация ингибитора, mM			
	0	10	20	30
1	0,091	0,058	0,047	0,041
2	0,167	0,109	0,088	0,078
3	0,231	0,153	0,125	0,111
5	0,333	0,227	0,188	0,167
10	0,500	0,385	0,300	0,269
15	0,600	0,441	0,375	0,339
25	0,714	0,543	0,469	0,427

2.7. Двухсубстратный рост микробной культуры осуществляется в соответствии с уравнением



Пользуясь табличными данными, определить механизм роста и параметры  $\mu_m$ ,  $K_1$ ,  $K_2$ :

Концентрация $X_1$ , mM	Удельная скорость, ч <sup>-1</sup>				
	Концентрация $X_2$ , mM				
	5	10	15	20	30
1	0,043	0,083	0,120	0,154	0,214
2	0,077	0,143	0,300	0,250	0,333
3	0,109	0,188	0,257	0,316	0,409

Концентрация $X_1$ , мм	Удельная скорость, ч <sup>-1</sup>				
	Концентрация $X_2$ , мм				
	5	10	15	20	30
5	0,143	0,250	0,333	0,400	0,500
10	0,200	0,333	0,429	0,500	0,600
20	0,250	0,400	0,500	0,571	0,667
30	0,273	0,429	0,529	0,600	0,692

## Глава 3

3.1. Определить несколькими способами  $K_s$  и  $\mu_m$  для роста дрожжей *Candida utilis* на этаноле, если\*:

$t$ , ч	Концентрация клеток, г/л	Концентрация этанола, мм	$t$ , ч	Концентрация клеток, г/л	Концентрация этанола, мм
0	0,058	16,3	4,5	0,253	8,5
0,5	0,058	16,0	5	0,299	7,2
1	0,078	15,5	5,5	0,331	5,0
1,5	0,100	15,0	6	0,403	2,6
2	0,127	14,2	6,5	0,474	0,3
2,5	0,143	13,4	7,0	0,503	0,1
3	0,169	12,5	7,5	0,513	0,0
3,5	0,192	11,4	8,0	0,513	0,0
4	0,214	10,1			

3.2 Определить экономический коэффициент для роста дрожжей *Candida utilis* на среде с этанолом и на среде с уксусной кислотой по данным прироста биомассы и потребления субстратов (Е. С. Никонова и др., 1984):

Этанол		Уксусная кислота	
$M-N_0$ , г АСВ	$S_0-S$ , мм	$M-N_0$ , г АСВ	$S_0-S$ , мм
0,02	0,8	0,02	1,5
0,05	1,8	0,03	2,9
0,08	2,7	0,04	3,6
0,10	2,6	0,08	4,6
0,15	3,7	0,09	5,4
0,18	4,9	0,11	7,3
0,21	6,0	0,13	8,7
0,25	6,9	0,18	11,6
0,29	8,5	0,25	13,5
0,30	10,0	0,26	15,8
0,34	9,8	0,33	17,7
0,37	11,6		
0,40	13,4		

3.3. Скорость роста микроорганизма подчиняется уравнению Ферхюльста. Определить  $\mu$ , если  $M_m/N_0=100$ , а время, при котором концентрация биомассы достигает половины максимальной,  $\tau=30$  ч.

\* Данные приводятся по Е. С. Никоновой и др., 1984.

3.4. Определить предельное накопление биомассы, если  $N_0 = 0,01$  г/л,  $Y_s = 0,1$ ,  $S_0 = 10$  г/л.

3.5. Определить  $\mu_m$ ,  $K_s$  и  $Y_s$  для роста дрожжей *Candida diddenszii* на среде с глюкозой, используя следующие данные (А. Н. Шкидченко и др., 1985):

$t$ , ч	Концентрация клеток, г/л	Концентрация глюкозы, г/л	$t$ , ч	Концентрация клеток, г/л	Концентрация глюкозы, г/л
0	0,25	20,0	12	1,32	18,4
2	0,26	20,0	14	3,42	16,6
4	0,28	19,9	16	5,85	9,2
6	0,30	19,6	18	10,52	1,3
8	0,39	19,2	20	12,62	0,3
10	0,79	18,9			

#### Глава 4

4.1. Определить  $\mu_m$ ,  $K_{s, \text{эфф}}$  и  $K_{t, \text{эфф}}$  исходя из данных Никонова Е. С. и др., приведенных в таблице для роста дрожжей *Candida utilis* на среде с этанолом и на среде с уксусной кислотой для случая ингибирования роста избытком субстрата:

Концентрация этанола, мМ	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>	Концентрация уксусной кислоты, мМ	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>
1	0,2	1	0,14
3	0,3	3	0,22
5	0,33	5	0,28
7	0,37	8	0,30
9	0,39	11	0,31
11	0,40	15	0,30
14	0,40	20	0,31
22	0,38	26	0,31
30	0,39	60	0,28
100	0,34	100	0,25
187	0,33	200	0,21
260	0,30	400	0,10
353	0,28		
610	0,18		
780	0,14		

4.2. При исследовании роста культуры получены следующие экспериментальные данные при различных начальных концентрациях лимитирующего субстрата:

$S_0 = 1$ г/л		$S_0 = 3$ г/л		$S_0 = 5$ г/л	
$t$ , ч	$M$ , г/л	$t$ , ч	$M$ , г/л	$t$ , ч	$M$ , г/л
0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
0,85	0,013	1,28	0,02	1,15	0,02
1,33	0,015	2,03	0,03	2,30	0,04
2,30	0,02	3,00	0,05	3,24	0,07
3,74	0,03	3,41	0,08	3,83	0,10
4,85	0,04	4,37	0,10	4,53	0,15
5,79	0,05	4,75	0,12	5,03	0,20
7,48	0,07			5,46	0,25

$S_0 = 10$ г/л		$S_0 = 20$ г/л		$S_0 = 50$ г/л	
$t$ , ч	$M$ , г/л	$t$ , ч	$M$ , г/л	$t$ , ч	$M$ , г/л
0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,010
1,18	0,02	1,45	0,02	1,43	0,015
2,35	0,04	2,90	0,04	4,89	0,040
3,89	0,10	4,80	0,10	8,11	0,100
4,56	0,15	6,21	0,20	10,51	0,200
5,04	0,20	7,01	0,30	11,90	0,300
5,41	0,25	7,57	0,40	13,63	0,500
5,70	0,30			15,84	1,00
				17,04	1,500
				17,81	2,000

Видно, что рост данной культуры ингибируется избытком субстрата. Определить  $\mu_m$ ,  $K_s$ ,  $K_i$ , если  $Y_s = 0,1$ .

### Глава 5

5.1. При исследовании роста трех культур микроорганизмов получены следующие экспериментальные данные по ингибированию продуктом ферментации:

P, мм	$\mu$ , ч <sup>-1</sup>								
	$S_0 = 20$ мМ			$S_0 = 10$ мМ			$S_0 = 5$ мМ		
	культура № 1	культура № 2	культура № 3	культура № 1	культура № 2	культура № 3	культура № 1	культура № 2	культура № 3
0	0,667	1,000	0,800	0,500	0,750	0,600	0,333	0,500	0,400
1	0,625	0,834	0,706	0,455	0,626	0,546	0,294	0,417	0,376
3	0,556	0,626	0,571	0,385	0,470	0,462	0,238	0,312	0,334
5	0,500	0,500	0,480	0,333	0,375	0,400	0,200	0,250	0,300
7	0,455	0,417	0,414	0,294	0,312	0,353	0,172	0,209	0,272
10	0,400	0,333	0,343	0,250	0,250	0,300	0,143	0,167	0,240
15	0,333	0,250	0,266	0,200	0,188	0,240	0,111	0,125	0,200
20	0,286	0,200	0,218	0,167	0,150	0,200	0,091	0,100	0,172

Определить тип ингибирования продуктом, а также  $\mu_m$ ,  $K_s$  и  $K_p$  для каждой из культур.

5.2. При исследовании роста двух культур микроорганизмов, механизм роста которых включает ингибирование продуктом, были получены следующие экспериментальные данные при различных начальных концентрациях субстрата:

$S_0 = 1$ г/л				$S_0 = 5$ г/л			
Культура № 1		Культура № 2		Культура № 1		Культура № 2	
$t$ , ч	$M$ , г/л	$t$ , ч	$M$ , г/л	$t$ , ч	$M$ , г/л	$t$ , ч	$M$ , г/л
0,00	0,01	0,00	0,010	0,00	0,01	0,00	0,01
2,98	0,015	3,69	0,015	2,95	0,02	3,56	0,02
5,30	0,02	6,56	0,02	4,75	0,03	5,69	0,03
7,30	0,025	9,03	0,025	6,10	0,04	7,25	0,04
9,13	0,03	11,29	0,03	7,19	0,05	8,49	0,05
10,89	0,035	13,45	0,035	9,79	0,08	11,29	0,08
12,48	0,040	15,63	0,040	11,12	0,10	12,78	0,10
				12,41	0,12	14,14	0,12

$S_0 = 10 \text{ г/л}$  $S_0 = 25 \text{ г/л}$ 

Культура № 1		Культура № 2		Культура № 1		Культура № 2	
$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$						
0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
2,15	0,02	2,56	0,02	1,69	0,02	1,98	0,02
4,37	0,04	5,09	0,04	3,96	0,05	4,45	0,05
6,28	0,07	7,10	0,07	5,74	0,10	6,05	0,10
7,59	0,10	8,36	0,10	6,84	0,15	6,80	0,15
9,25	0,15	9,81	0,15	7,66	0,20	7,20	0,20
10,62	0,20	10,9	0,20	9,93	0,40	7,54	0,40
11,88	0,25	11,85	0,25	10,82	0,50	7,43	0,25

Определить тип ингибирования продуктом, а также  $\mu_m$ ,  $K_s$  и  $K_p$  для каждой из культур, если  $Y_s^1 = Y_s^2 = 0,05$ , а  $Y_p^1 = Y_p^2 = 0,1$ .

5.3. При исследовании роста четырех культур получены следующие экспериментальные данные при различных начальных концентрациях лимитирующего субстрата:

 $S_0 = 1 \text{ г/л}, P_0 = 0$ 

Культура № 1		Культура № 2		Культура № 3		Культура № 4	
$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$	$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$	$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$	$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$
0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
2,67	0,015	3,56	0,015	1,71	0,015	7,30	0,015
4,64	0,02	6,18	0,02	3,00	0,02	16,98	0,02
7,60	0,03	10,08	0,03	4,96	0,03	24,16	0,025
9,91	0,04	13,11	0,04	6,53	0,04	31,18	0,03
11,92	0,05	15,71	0,05	7,92	0,05	38,38	0,035
15,62	0,07	20,43	0,07	10,58	0,07	46,04	0,04
24,02	0,10	32,37	0,10	$\infty$	0,11	$\infty$	0,06
$\infty$	0,11	$\infty$	0,11	$P_\infty = 2 \text{ г/л}$		$P_\infty = 0,5 \text{ г/л}$	

 $S_0 = 5 \text{ г/л}, P_0 = 0$ 

Культура № 1		Культура № 2		Культура № 3		Культура № 4	
$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$	$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$	$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$	$t, \text{ ч}$	$M, \text{ г/л}$
0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01
1,41	0,02	2,58	0,02	1,26	0,02	3,56	0,02
2,83	0,04	5,17	0,04	2,56	0,04	5,69	0,03
4,02	0,07	7,29	0,07	3,68	0,07	7,25	0,04
4,80	0,10	8,66	0,10	4,45	0,10	8,51	0,05
5,74	0,15	11,45	0,20	6,25	0,20	12,98	0,10
6,46	0,20	13,30	0,30	7,77	0,30	16,81	0,15
7,64	0,30	$\infty$	0,51	$\infty$	0,51	$\infty$	0,26
$\infty$	0,51			$P_\infty = 10 \text{ г/л}$		$P_\infty = 2,5 \text{ г/л}$	

Выяснить механизм роста и определить соответствующие кинетические параметры для каждой из культур

### Глава 6

6.1. Определить период индукции  $\tau$  и удельную скорость роста исходя из следующих экспериментальных данных:

$t, \text{ ч}$ .....	0	2	4	6	8	10	12
$M, \text{ г/л}$ .....	0,020	0,021	0,022	0,033	0,090	0,244	0,662

6.2. При исследовании зависимости роста трех культур микроорганизмов от концентрации лимитирующего субстрата получены следующие данные:

Культура № 1			Культура № 2			Культура № 3		
$S_0, \text{ мМ}$	$\tau, \text{ ч}$	$\mu, \text{ ч}^{-1}$	$S_0, \text{ мМ}$	$\tau, \text{ ч}$	$\mu, \text{ ч}^{-1}$	$S_0, \text{ мМ}$	$\tau, \text{ ч}$	$\mu, \text{ ч}^{-1}$
1	9,5	0,045	1	3,6	0,167	1	8	0,038
5	8,1	0,167	5	2,5	0,500	5	8	0,160
9	7,1	0,237	9	2,2	0,643	10	8	0,267
15	6,1	0,300	15	2,1	0,750	15	8	0,343
25	5,0	0,357	25	2,0	0,833	50	8	0,571
100	2,4	0,454	100	1,8	0,952	100	8	0,667
700	1,5	0,476	200	1,8	0,976			

Определить природу периода индукции и найти числовые значения параметров, определяющих  $\tau$ .

### Глава 7

7.1. При хемостатном культивировании микробной популяции получены следующие экспериментальные данные по стационарным концентрациям субстрата и биомассы при различных скоростях разбавления и различных концентрациях вводимого в ферментер раствора субстрата:

$S_0=1 \text{ г/л}$				$S_0=5 \text{ г/л}$			$S_0=10 \text{ г/л}$			$S_0=20 \text{ г/л}$		
$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	
0,01	0,051	0,475	0,05	0,263	0,368	0,10	0,556	4,722	0,10	0,556	9,722	
0,03	1,155	0,423	0,10	0,556	2,222	0,20	1,250	4,375	0,30	2,143	8,929	
0,07	0,376	0,312	0,20	1,250	1,875	0,30	2,143	3,929	0,50	5,000	7,500	
0,10	0,556	0,212	0,30	2,143	1,429	0,50	5,000	2,500	0,60	7,500	6,250	
0,15	0,882	0,059	0,40	3,333	0,833	0,60	7,500	1,250	0,70	11,667	4,167	
0,16	0,952	0,024	0,45	4,091	0,455	0,65	9,286	0,358	0,75	15,000	2,500	

Найти  $Y_s$ ,  $K_s$  и  $\mu_m$ .

7.2. Хемостатное культивирование популяции микроорганизмов при концентрации вводимого в ферментер раствора субстрата, равной 25 г/л, проводили до достижения стационарных состояний при различных скоростях разбавления. Полученные данные приведены в таблице:

$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{ г/л}$
0,01	0,041	4,992	0,29	3,973	4,205
0,02	0,083	4,983	0,30	6,000	3,800
0,03	0,128	4,974	0,31	Стационарное состояние не наблюдается	
0,04	0,174	4,965			
0,05	0,223	4,955	0,30	6,000	3,800
0,10	0,504	4,899	0,29	9,061	3,188
0,15	0,875	4,825	0,25	15,708	1,858
0,20	1,407	4,719	0,23	19,261	1,148
0,25	2,292	4,542	0,21	23,313	0,337
				Вымывание культуры	

Выяснить механизм роста и определить кинетические параметры.

7.3. Выяснить механизм роста микробной популяции и определить кинетические параметры исходя из данных по стационарным концентрациям субстрата, биомассы и продукта при хемостатном культивировании.

$S_0 = 1 \text{ г/л}$				$S_0 = 5 \text{ г/л}$			
$D, \text{ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$D, \text{ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{г/л}$
0,02	0,124	0,088	0,438	0,02	0,224	0,478	2,389
0,05	0,309	0,069	0,346	0,05	0,556	0,444	2,222
0,08	0,490	0,051	0,255	0,10	1,098	0,390	1,951
0,10	0,690	0,031	0,155	0,20	2,143	0,286	1,429
0,13	0,787	0,021	0,107	0,40	4,091	0,091	0,455
0,16	0,962	0,004	0,019	0,45	4,551	0,045	0,285

$S_0 = 10 \text{ г/л}$				$S_0 = 25 \text{ г/л}$			
$D, \text{ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$D, \text{ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{г/л}$
0,02	0,348	0,965	4,826	0,02	0,721	2,428	12,139
0,05	0,864	0,914	4,586	0,05	1,790	2,321	11,665
0,10	1,707	0,829	4,146	0,10	3,537	2,146	10,732
0,30	4,884	0,512	2,558	0,30	10,116	1,488	7,442
0,50	7,778	0,222	1,111	0,50	16,111	0,889	7,444
0,60	9,130	0,087	0,435	0,70	21,596	0,340	1,702
0,65	9,785	0,022	0,108	0,80	24,167	0,083	0,417

7.4. Выяснить механизм роста микробной популяции и оценить кинетические параметры, воспользовавшись приведенными ниже данными по стационарным концентрациям субстрата, биомассы и продукта при хемостатном культивировании:

$S_0 = 1 \text{ г/л}$				$S_0 = 5 \text{ г/л}$			
$D, \text{ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$D, \text{ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{г/л}$
0,02	0,124	0,175	0,438	0,02	0,300	0,940	2,350
0,03	0,188	0,162	0,406	0,03	0,466	0,907	2,267
0,04	0,254	0,149	0,373	0,04	0,642	0,872	2,179
0,05	0,322	0,136	0,339	0,05	0,828	0,834	2,086
0,08	0,533	0,093	0,234	0,10	1,882	0,624	1,559
0,10	0,679	0,064	0,161	0,14	2,781	0,444	1,109
0,12	0,828	0,034	0,086	0,20	4,000	0,200	0,500
0,14	0,978	0,004	0,011	0,15	4,815	0,037	0,092

$S_0 = 10 \text{ г/л}$				$S_0 = 25 \text{ г/л}$			
$D, \text{ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$D, \text{ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{г/л}$
0,02	0,542	1,892	4,729	0,02	1,451	4,710	11,775
0,03	0,864	1,828	4,568	0,03	2,558	4,488	11,221
0,04	1,224	1,755	4,388	0,04	4,000	4,200	10,500
0,05	1,620	1,676	4,190	0,05	5,758	3,848	9,621
0,10	4,000	1,200	3,000	0,10	14,466	2,107	5,267

$S_0 = 10 \text{ г/л}$				$S_0 = 25 \text{ г/л}$			
$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$M_{\text{ст}}, \text{ г/л}$	$P_{\text{ст}}, \text{ г/л}$
0,14	5,879	0,824	2,061	0,14	18,539	1,292	3,230
0,20	8,00	0,400	1,000	0,20	21,926	0,615	1,537
0,25	9,211	0,157	0,394	0,25	23,580	0,284	0,710

7.5. При хемостатном культивировании одной из сахаролитических культур для нейтрализации образующейся кислоты в ферментер с постоянной скоростью 0,01 мМ/ч подавали раствор щелочи. Найти кинетические параметры роста, если  $Y_s/Y_p = 1$ . Экспериментальные данные приведены ниже:

$S_0 = 1 \text{ мМ}$		$S_0 = 5 \text{ мМ}$		$S_0 = 10 \text{ мМ}$		$S_0 = 25 \text{ мМ}$	
$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ мМ}$	$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ мМ}$	$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ мМ}$	$D, \text{ ч}^{-1}$	$S_{\text{ст}}, \text{ мМ}$
0,01	0,09	0,01	0,376	0,01	0,835	0,01	2,211
0,04	0,250	0,09	1,426	0,04	2,897	0,04	7,309
0,10	0,526	0,10	2,632	0,10	5,263	0,10	13,158
0,20	0,750						
0,30	0,865	0,30	4,108	0,30	8,162	0,30	20,324
0,40	0,935						
		0,50	4,618	0,50	9,164	0,50	22,800
		0,70	4,877	0,70	9,671	0,70	24,055

## Глава 8

8.1. Определитель, в каком из режимов (максимальной скорости роста или первого порядка по концентрации субстрата) протекает процесс роста микробных популяций, исходя из экспериментальных данных по измерению оптической плотности культуральной среды:

Культура № 1		Культура № 2	
$t, \text{ ч}$	$D_{540}, \text{ опт. ед.}$	$t, \text{ ч}$	$D_{540}, \text{ опт. ед.}$
0,00	0,2	0,00	0,2
8,68	0,4	7,70	0,4
14,32	0,6	12,30	0,6
18,82	0,8	15,60	0,8
22,81	1,0	18,21	1,0
26,64	1,2	20,40	1,2
30,57	1,4	22,32	1,4
34,91	1,6	24,08	1,6
40,26	1,8	25,78	1,8
48,35	2,0	27,63	2,0

8.2. Используя метод двойного зеркального отражения, определить механизм роста четырех культур (экспериментальные данные примера 5.3).

8.3. При исследовании роста микробной популяции получены следующие данные по общей концентрации клеток  $M$  и по количеству клеток  $M_a$ , способных к делению:

<i>t</i> , ч	<i>M</i> , г/л	<i>M<sub>a</sub></i> , г/л	<i>t</i> , ч	<i>M</i> , г/л	<i>M<sub>a</sub></i> , г/л
0	0,05	0,005	20	0,54	0,18
2	0,08	0,02	25	0,55	0,125
5	0,13	0,06	30	0,55	0,08
7	0,24	0,125	35	0,54	0,055
10	0,32	0,23	40	0,54	0,03
15	0,47	0,25			

Определить  $\mu_a$  и  $\lambda$ .

## Глава 9

**9.1.** Известно, что концентрация кислорода в воздухе составляет 20,9% по объему. Определить интервал, в который с 99%-ной вероятностью попадет результат единичного измерения концентрации кислорода в воздухе при использовании газохроматографического метода, погрешность измерения которого в данном случае определяется генеральной дисперсией  $\tau=1$ .

**9.2.** Рассчитать  $\bar{x}$ ,  $S_{\bar{x}}$ ,  $S_{\bar{x}}$ ,  $w_x$  и  $w_{\bar{x}}$  для подсчета числа клеток культуры *Anabaena variabilis* в камере Горяева, если при подсчете в 20 отдельных квадратиках были зафиксированы следующие результаты: 6, 10, 18, 6, 6, 8, 11, 9, 17, 16, 4, 5, 13, 6, 19, 9, 5, 8, 13, 11.

**9.3.** Интересующая концентрация *C* представляется собой разность двух измеряемых величин *A* и *F*. Вычислить дисперсию измерения этой концентрации, если  $S_A=4$ , а  $S_F=3$ .

**9.4.** В результате измерения концентраций  $\text{CH}_4$  и  $\text{CO}_2$  в газовой фазе реактора получены значения 70 и 25% по объему соответственно. Из независимых данных известно, что погрешности газохроматографического метода измерений определяются генеральными дисперсиями 3,5 и 1,25 соответственно. Определить доверительные интервалы для истинных значений концентраций  $\text{CH}_4$  и  $\text{CO}_2$ , соответствующие 93%-ной доверительной вероятности.

**9.5.** Определить абсолютную и относительную погрешность  $S_{\bar{x}}$  для примера 9.2. при 95%-ной доверительной вероятности.

**9.6.** Сколько нужно провести подсчетов числа клеток на отдельных квадратиках в камере Горяева, чтобы погрешность  $S_{\bar{x}}$  с доверительной вероятностью 95% не превышала 5%, если  $w=25\%$ ?

**9.7.** В результате измерения концентрации метанола в культуральной жидкости был получен ряд значений (мМ): 61, 57, 62, 51, 59, 58. Оценить, нет ли здесь «выскакивающих» измерений.

**9.8.** Количество образовавшегося метана за определенное время работы биогазового реактора определяют по формуле  $V_{\text{CH}_4}=V_{\text{г.ф}} C_{\text{CH}_4}$ , где  $V_{\text{CH}_4}$  — количество образовавшегося  $\text{CH}_4$ ;  $V_{\text{г.ф}}$  — объем газовой фазы;  $C_{\text{CH}_4}$  — концентрация  $\text{CH}_4$  в газовой фазе. Пять параллельных измерений дали следующие результаты:

$V_{\text{г.ф}}$ , мл, .....	510	505	518	521	503
$C_{\text{CH}_4}$ , %, .....	51,3	50,2	49,9	52,5	51,6

Определить выборочную дисперсию  $\bar{V}_{\text{CH}_4}$  и погрешность  $\bar{V}_{\text{CH}_4}$  при 95%-ной доверительной вероятности.

**9.9.** Определить  $\mu$ ,  $\ln D_0$ ,  $S_0$ , дисперсию  $\mu$  и  $\ln D_0$ , а также погрешность определения  $\mu$  и  $\ln D_0$  при 95%-ной доверительной вероятности исходя из экспериментальных данных по росту водородообразующей культуры на глюкозе (В. И. Скляр и др., 1986):

<i>t</i> , ч .....	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
$D_{540}$ .....	0,135	0,170	0,223	0,300	0,415	0,533	0,705

## ОТВЕТЫ И РЕШЕНИЯ

### Глава 1

1.1. Число выделенных промежуточных состояний клетки  $n=2$ . Для нахождения интересующих параметров необходимо применить формулы (1.93)—(1.95), учитывая уравнения связи между

$$k_1 \text{ и } \tau_i: k_1 S_0 = \frac{\ln 2}{\tau_1}; k_2 = \frac{\ln 2}{\tau_2}; k_3 = \frac{\ln 2}{\tau_3};$$

$$\mu = 0,198 \text{ ч}^{-1}; \mu_m = 0,277 \text{ ч}^{-1}; K_s = 4,0 \text{ г/л.}$$

1.2. Зависимость концентрации продукта от времени описывается выражением

$$\frac{dP}{dt} = \frac{k_3 X_2}{Y_p}$$

Из этого уравнения при  $P_0=0$  следует

$$P(t) = \frac{N_0}{Y_p} (e^{\mu t} - 1);$$

так как  $\mu$  уже определено в примере 1.1, то через 10 ч концентрация продукта будет

$$P_{10} = 0,624 \text{ г/л}$$

1.3. Для дискриминации механизма роста необходимо прежде всего экспериментальные данные представить в обратных координатах. В результате такой процедуры увидим, что зависимость  $1/\mu$  от  $1/S_0$  для культуры № 1 линейна, для культур № 2 и № 3 нелинейна; это означает, что старение клеток оказывает влияние на механизм роста только культур № 2 и № 3. Из линеаризации в обратных координатах экспериментальных данных для культуры № 1 находим  $\mu_m^1 = 0,347 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_s^1 = 10^{-3} \text{ м}$ .

Для культур № 2 и № 3 после представления экспериментальных данных в обратных координатах может быть сделана оценка  $K_s$  и  $\mu_m$  на основе использования асимптотической прямой, описываемой уравнением (1.196), которая является касательной к точке  $1/\mu_m$ . Оценка на основе этой прямой  $K_s$  позволяет перейти от  $S_0$  к  $\Phi$  [уравнение (1.197)] Значения  $\mu_m$  и  $\lambda$  определяются из уравнения (1.198):

$$\mu_m = 0,693 \text{ ч}^{-1}; K_s^2 = 10^{-3} \text{ М}; \lambda_2 = 0,1 \text{ ч}^{-1};$$

$$\mu_m = 0,8 \text{ ч}^{-1}; K_s^3 = 5 \cdot 10^{-4} \text{ М}; \lambda_3 = 0,15 \text{ ч}^{-1}.$$

1.4. Для нахождения  $S_{кр}$  необходимо воспользоваться формулой (1.193) с учетом того, что  $\frac{k_{кат} E}{B} = \mu_m / \ln 2$ ;

$$S'_{кр} = 0; S_{кр}^2 = 1,11 \cdot 10^{-4} \text{ М}; S_{кр}^3 = 7,5 \cdot 10^{-5} \text{ М}.$$

1.5. Так как при  $S \rightarrow \infty$   $\mu \rightarrow \mu_m$ , то  $\mu_m = 0,5 \text{ ч}^{-1}$  и уравнение Тейсиера (1.131) удобно представить в виде

$$1 - \frac{\mu}{\mu_m} = e^{-kS}.$$

Логарифмируя правую и левую часть этого уравнения, получаем

$$\ln \left( 1 - \frac{\mu}{\mu_m} \right) = -kS;$$

$$-\ln\left(1 - \frac{\mu}{\mu_m}\right) = kS.$$

Так как  $\mu_m$  уже известно, то можно построить график зависимости  $-\ln\left(1 - \frac{\mu}{\mu_m}\right)$  от  $S$ , по тангенсу наклона этого графика определить  $k$ :

$$k = 0,1 \text{ мМ}^{-1}.$$

1.6. Сначала из экспериментальных данных одним из методов линеаризации необходимо определить  $\mu_m$  и  $K_{s, \text{набл}}$ , которые соответственно равны  $0,1 \text{ ч}^{-1}$  и  $0,7 \text{ мМ}$ . Далее из выражения (1.154) получаем

$$\frac{\alpha_R}{\alpha + \alpha_R} = \frac{\mu_m}{k_{\text{кат}} E / [B(\ln 2 - \mu_m \tau_a)]} = 0,203.$$

Из выражения (1.155) находим

$$K_s = K_{s, \text{набл}} \left[ 1 + \tau_a \frac{k_{\text{кат}} E \alpha_R}{B(\alpha + \alpha_R)} \right] = 0,984 \text{ мМ}.$$

$$1.7. \frac{d\Delta\text{DNA}}{dt} = \alpha_R S';$$

$$\frac{dS'}{dt} = A(S_0) - (\alpha_R + \alpha \Delta\text{DNA}), \text{ где } A(S_0) = \frac{kS_0}{K_s + S_0}.$$

При условии  $\frac{dS'}{dt} = 0$

$$S' = \frac{A(S_0)}{\alpha_R + \alpha \Delta\text{DNA}};$$

$$\frac{d\Delta\text{DNA}}{dt} = \frac{\alpha_R A(S_0)}{\alpha_R + \alpha \Delta\text{DNA}};$$

$$(\alpha_R + \alpha \Delta\text{DNA}) d\Delta\text{DNA} = \alpha_R A(S_0) dt.$$

Интегрирование этого уравнения при условии  $t=0, \Delta\text{DNA}=0$  дает

$$\frac{\alpha}{2} \Delta\text{DNA}^2 + \alpha_R \Delta\text{DNA} - \alpha_R A(S_0) t = 0.$$

Решая квадратическое алгебраическое уравнение и отбрасывая отрицательный корень, получаем

$$\Delta\text{DNA} = -\frac{\alpha_R}{\alpha} + \sqrt{\frac{\alpha^2 R}{\alpha^2} + \frac{2\alpha_R}{\alpha} S_0 t}.$$

На основании этого уравнения рассчитываем время репликации при условии, что  $\Delta\text{DNA} = B$  при  $t = \tau$ :

$$\tau = \frac{B^2 \alpha}{2\alpha_R A(S_0)} + \frac{B}{A(S_0)};$$

$$\mu = \frac{\ln 2}{\tau} = \frac{2 \ln 2 \alpha_R A(S_0)}{B(B\alpha + 2\alpha_R)}.$$

Если  $\alpha_R \ll \alpha \Delta\text{DNA}$ , то

$$\tau = \frac{B^2 \alpha}{2\alpha_R A(S_0)}; \quad \mu = \frac{2 \ln 2 \alpha_R A(S_0)}{B^2 \alpha}.$$

## Глава 2

2.1. Построив зависимость  $\ln D$  от  $t$ , по тангенсу наклона прямой определяют  $\mu$ :  $\mu = 0,54 \text{ ч}^{-1}$ .

2.2. Воспользовавшись одной из линейных анаморфоз уравнения Моно (2.6) — (2.9), (2.12), находим  $\mu_m = 0,55 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_s = 1,4 \text{ мМ}$ .

2.3. Для этанола  $\mu_m = 0,5 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_s = 2,6 \text{ мМ}$ ; для уксусной кислоты  $\mu_m = 0,36 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_s = 1,8 \text{ мМ}$ .

2.4. Так как исследования pH-зависимости проводились в условиях  $S_0 \gg K_s$ , то удобно воспользоваться выражением (2.67). Построив график зависимости  $\lg \mu$  от pH, находим:  $\mu_m = 0,55 \text{ ч}^{-1}$ ,  $pK_a = 5,65$ ,  $pK_0 = 6,95$ ,  $\text{tg } \alpha = 2,2$ ,  $\text{tg } \beta = -2,6$ .

2.5. Воспользовавшись выражением (2.49) и представив экспериментальные данные в координатах Диксона ( $1/\mu$ , 1), находим  $K_1 = 79 \text{ мМ}$ .

2.6. Воспользовавшись одной из линейных анаморфоз уравнения Моно (2.6) — (2.9), (2.18), из экспериментальных данных в отсутствие ингибирования найдем  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_s = 10 \text{ мМ}$ . Для определения типа ингибирования табличные данные представили в виде графиков в обратных координатах ( $1/\mu$ ,  $1/S$ ). Тип ингибирования смешанный:  $\alpha = 2$ ;  $\beta = 0,5$ ;  $K_1 = 10 \text{ мМ}$ .

2.7. Представление табличных данных в координатах ( $1/\mu$ ,  $1/x_1$ ) при фиксированном  $x_2$  и ( $1/\mu$ ,  $1/x_2$ ) при фиксированном  $x_1$  позволяет сделать вывод, что наблюдается случай механизма с мультиплицирующими субстратами  $x_1$  и  $x_2$ . В то же время две молекулы  $x_2$  вступают во взаимодействие с несвязными формами ферментных систем растущего микроорганизма;  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_1 = 10 \text{ мМ}$ ,  $K_2 = 10 \text{ мМ}$ .

## Глава 3

3.1. Для решения задачи можно воспользоваться построением графиков в координатах уравнений (3.56), (3.57), (3.66), (3.72), (3.76), (3.83), используя данные по росту биомассы, либо в координатах уравнения (3.84), используя данные по истощению субстрата;  $\mu_m = 0,5 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 2,6 \text{ мМ}$ .

3.2. Построив график зависимости  $(M - N_0)$  от  $S_0 - S$ , по тангенсу угла наклона прямых определяют

$$Y_{C_2H_5OH} = 0,28 \frac{\text{г АСВ}}{\text{г субстрата}}; \quad Y_{CH_3COOH} = 0,69 \frac{\text{г АСВ}}{\text{г субстрата}}$$

3.3. Для решения задачи воспользуемся соотношением (3.12):

$$\mu = 0,154 \text{ ч}^{-1}.$$

3.4. Воспользовавшись уравнением (3.41), находим  $M_m = 1,01 \text{ г/л}$ .

3.5. Экономический коэффициент определяют аналогично описанному в примере 3.2;  $\mu_m$  и  $K_s$  определяют построением графиков в координатах уравнений (3.56), (3.57), (3.66), (3.72), (3.77), (3.83), (3.84);  $\mu_m = 0,86 \text{ ч}^{-1}$ ;

$$K_s = 12,5 \text{ г/л}; \quad Y_s = 0,57 \frac{\text{г АСВ}}{\text{г глюкозы}}$$

## Глава 4

4.1. В данном случае зависимость  $\mu$  от  $S$  описывается уравнением (4.57). Для нахождения параметров  $\mu_m$ ,  $K_{s, \text{эфф}}$  и  $K_{i, \text{эфф}}$  удобно воспользоваться уравнениями (4.59) для низких концентраций субстратов и (4.60) для высоких концентраций субстратов. Для этанола  $\mu_m = 0,5 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_{s, \text{эфф}} = 2,6 \text{ мМ}$ ,  $K_{i, \text{эфф}} = 290 \text{ мМ}$ ; для уксусной кислоты  $\mu_m = 0,36 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_{s, \text{эфф}} = 1,8 \text{ мМ}$ ,  $K_{i, \text{эфф}} = 220 \text{ мМ}$ .

4.2. Для нахождения интересующих параметров экспериментальные данные необходимо представить в координатах уравнения (4.79) (при этом  $M_m = Y_s S_0 + N_0$ ). Эта процедура позволяет найти параметры  $\mu$  и  $\Phi$  в зависимости от  $\hat{S}_0$ . Далее, используя уравнения (4.81) — (4.87), находят искомые параметры:  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ,  $K_s = 2 \text{ г/л}$ ,  $K_i = 20 \text{ г/л}$ .

5.1. Представив экспериментальные данные в обратных координатах ( $1/\mu$ ,  $1/S_0$ ), определяем, что тип ингибирования для культур № 1, № 2 и № 3 соответственно — конкурентный, неконкурентный и бесконкурентный. Из экспериментальных данных при  $P=0$ , находим:

$$\begin{aligned}\mu_m &= 1 \text{ ч}^{-1}; \quad K_s = 10 \text{ мМ (культура № 1),} \\ \mu_m &= 1,5 \text{ ч}^{-1}; \quad K_s = 10 \text{ мМ (культура № 2),} \\ \mu_m &= 1,2 \text{ ч}^{-1}, \quad K_s = 10 \text{ мМ (культура № 3).}\end{aligned}$$

Константы ингибирования продуктом можно вычислить несколькими способами, например представлением экспериментальных данных в координатах Диксона ( $1/\mu$ ,  $P$ ), откуда  $K_i^1 = K_i^2 = K_i^3 = 5 \text{ мМ}$ .

5.2. Прежде всего необходимо экспериментальные данные представить в координатах уравнения (5.119) с учетом того, что  $M_m = Y_s S_0 + N_0$ . Эта процедура позволяет найти параметры  $\mu$  и  $\Phi$  при различных начальных концентрациях  $S_0$ .

Для определения  $\mu_m$  и  $K_s$  полученные значения зависимости параметров  $\mu$  для обеих культур от  $S_0$  необходимо представить в координатах уравнения (2.6), откуда

$$\begin{aligned}\mu_m &= 0,5 \text{ ч}^{-1}; \quad K_s = 5 \text{ г/л (культура № 1),} \\ \mu_m &= 0,4 \text{ ч}^{-1}, \quad K_s = 5 \text{ г/л (культура № 2).}\end{aligned}$$

Для установления типа ингибирования экспериментальные данные необходимо представить в координатах уравнения (5.122). При этом для культуры № 1 наблюдается линейная зависимость, что говорит о конкурентном ингибировании продуктом, для культуры № 2 подобная линеаризация не наблюдается, что указывает на неконкурентный тип ингибирования продуктом.

Константы ингибирования определяются с помощью представления экспериментальных данных в координатах  $\Phi \frac{K_s + S_0}{K_s}$  от  $S_0$  [уравнение (5.122)] для

культуры № 1 и  $\Phi \frac{K_s + S_0}{K_s}$  от  $S_0(1 + S_0/K_s)$  [уравнение (5.123)] для культуры № 2. Из тангенса угла наклона соответствующих прямых находим  $K_i^1 = K_i^2 = 2 \text{ г/л}$ .

5.3. Как и в предыдущем примере, экспериментальные данные необходимо представить в координатах уравнения (5.119) и определить  $\mu$  и  $\Phi$  при различных начальных концентрациях  $S_0$ . Анализ зависимости  $\Phi$  от  $S_0$  для культуры № 1 показывает, что механизм роста этой культуры не осложнен какими-либо ингибирующими эффектами, а параметры  $K_s$  и  $\mu_m$  определяется из уравнений (3.86) и (3.87).

Для культуры № 2  $\Phi$  с увеличением  $S_0$  падает от положительных значений до отрицательных, а  $\mu$  проходит через максимум, что указывает на механизм роста этой культуры с ингибированным избытком субстрата. Параметры  $\mu_m$ ,  $K_s$  и  $K_i$  определяются из уравнений (4.81) — (4.87).

Для культуры № 3  $\Phi$  постоянно имеет положительное значение, а с увеличением  $S_0$  имеет тенденцию к слабому росту, при этом экспериментальные данные линеаризуются в координатах уравнения (5.123), что указывает на конкурентное ингибирование роста продуктом. Для определения экономических коэффициентов воспользуемся соотношениями

$$Y_s = \frac{M_\infty - N_0}{S_0}; \quad Y_p = \frac{M_\infty - N_0}{P_\infty}.$$

Параметры  $\mu_m$  и  $K_s$  находят из зависимости  $\mu$  от  $S_0$  с помощью уравнения (2.6), а  $K_i$  — из уравнения (5.122).

Для культуры № 4  $\Phi$  с увеличением  $S_0$ , так же как и в случае культуры

№ 3, слабо возрастает, но экспериментальные данные не линеаризуются в координатах уравнения (5.123), что указывает на неконкурентный характер ингибирования роста продуктом. Параметры  $Y_s$ ,  $Y_p$ ,  $K_s$  и  $\mu_m$  определяются так же, как и в случае культуры № 3, а  $K_i$  — из уравнения (5.123). Таким образом,  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 5 \text{ г/л}$ ;  $Y_s = 0,1$  (неосложненный рост, культура № 1),  $\mu_m = 0,5 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 3 \text{ г/л}$ ;  $Y_s = 0,1$ ;  $K_i = 20 \text{ г/л}$  (ингибирование избытком субстрата, культура № 2),  $\mu_m = 0,8 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 2 \text{ г/л}$ ;  $Y_s = 0,1$ ;  $Y_p = 0,05$ ;  $K_i = 3 \text{ г/л}$  (конкурентное ингибирование продуктом, культура № 3),  $\mu_m = 0,4 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 5 \text{ г/л}$ ;  $Y_s = 0,05$ ;  $Y_p = 0,1$ ;  $K_i = 1 \text{ г/л}$  (неконкурентное ингибирование продуктом, культура № 4).

## Глава 6

**6.1.** Экспериментальные данные необходимо представить в координатах  $\ln M$ ,  $t$ . Из тангенса угла наклона прямой находят  $\mu$ , из пересечения этой прямой с прямой  $\ln M = \ln N_0$  находят  $\tau$ :

$$\mu = 0,5 \text{ ч}^{-1}, \quad \tau = 5 \text{ ч.}$$

**6.2.** Из зависимости  $\tau$  от  $S_0$  видно, что для культуры № 1 природа лаг-периода связана с конверсией пресубстрата, для культуры № 2 — с адаптационными процессами в клетке, для культуры № 3 — с расходом ингибитора роста.

Для культуры № 1  $k_0$  определяется из уравнения (6.18), при этом  $K_s$  легко найти из зависимости  $\mu$  от  $S_0$ :

$$k_0 = \frac{K_s}{S_0 \tau_s} \ln \left( 1 + \frac{S_0}{K_s} \right) = 0,1 \text{ ч}^{-1}.$$

Для культуры № 2  $k_0$  находится линеаризацией экспериментальных данных в координатах уравнения (6.60):

$k_0 = 0,2 \text{ ч}^{-1}$ , при этом  $\tau_a(S_0 \rightarrow \infty) = 1,79 \text{ ч}$ .

Для культуры № 3 из уравнения (6.51) можно вычислить только комплекс параметров:

$$\frac{k_0 k_i}{I_0} = 0,125 \text{ ч}^{-1}.$$

## Глава 7

**7.1.**  $Y_s$  может быть найдено как тангенс угла зависимости  $M_{ст}$  от  $S_0$  (7.12) при одной и той же скорости разбавления,  $\mu_m$  и  $K_s$  — линеаризацией экспериментальных данных в координатах уравнений (7.15) — (7.16):

$$\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}, \quad K_s = 5 \text{ г/л}; \quad Y_s = 0,5.$$

**7.2.** Представив экспериментальные данные в координатах  $1/S_{ст}$  от  $1/D$ , можно увидеть, что они не линеаризуются в этих координатах. Это говорит о том, что механизм роста включает ингибирование избытком субстрата.

$Y_s$  определяется из уравнения (7.42). При малых скоростях разбавления ( $< 0,1 \text{ ч}^{-1}$ ) можно пренебречь ингибированием избытком субстрата и найти  $\mu_m$  и  $K_s$  с помощью уравнений (7.15) — (7.16). Для нахождения  $K_i$  наиболее простой способ заключается в использовании уравнения (7.33), при этом, как показывает анализ экспериментальных данных,  $D_c = 0,3 \text{ ч}^{-1}$ . Таким образом,  $\mu_m = 0,5 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 2 \text{ г/л}$ ;  $K_i = 18 \text{ г/л}$ ;  $Y_s = 0,2$ .

**7.3.** Так как стационарный уровень концентрации субстрата линейно зависит от начальной его концентрации, вводимой в ферментер даже при больших скоростях разбавления, то это указывает, что механизм роста микробной популяции включает конкурентное ингибирование продуктом.

Для определения кинетических параметров необходимо данные по зависимости  $S_{ст}$  от  $S_0$  при различных скоростях разбавления представить в координатах уравнения (7.71) и найти параметры  $a$  и  $\text{tg} \phi$ . Далее из зависимостей  $1/a$  от  $1/D$  [уравнение (7.74)] и  $1/\text{tg} \phi$  от  $1/D$  [уравнение (7.34)]

найти  $\mu_m$ ,  $K_s$  и  $\alpha$ . Экономические коэффициенты  $Y_s$  и  $Y_p$  вычисляются из соотношения (7.60), и, наконец,  $K_i$  определяется из уравнения (7.70).

Таким образом,  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 5 \text{ г/л}$ ;  $K_i = 2 \text{ г/л}$ ;  $Y_s = 0,1$ ;  $Y_p = 0,2$ .

Другой вариант нахождения кинетических параметров заключается в исследовании зависимостей (7.76)—(7.81) или (7.82)—(7.87).

7.4. Так как стационарный уровень концентрации субстрата зависит от начальной его концентрации, вводимой в ферментер, и эта зависимость при больших скоростях разбавления отклоняется от линейной, то это означает, что механизм роста данной микробной популяции включает неконкурентное ингибирование продуктом.

Для оценки кинетических параметров воспользуемся уравнением (7.108), которое справедливо при низких скоростях разбавления. Оно может быть записано в виде

$$\frac{1}{S_{cr}} = \frac{\mu_m}{K_s + \alpha S_0} \frac{1}{D} + \frac{\alpha}{K_s + \alpha S_0}.$$

При постоянном значении  $S_0$  это уравнение прямой с параметрами

$$a = \frac{\alpha}{K_s + \alpha S_0} \quad \text{и} \quad \text{tg} \varphi = \frac{\mu_m}{K_s + \alpha S_0}.$$

Если эти параметры определить при нескольких концентрациях  $S_0$ , то получим следующие линейные зависимости:

$$\frac{1}{a} = \frac{K_s}{\alpha} + S_0; \quad \frac{1}{\text{tg} \varphi} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{\alpha}{\mu_m} S_0.$$

Параметры этих двух прямых позволяют вычислить  $\mu_m$ ,  $K_s$  и  $\alpha$ .  $Y_s$  и  $Y_p$  находим, как и в предыдущем примере, из соотношений (7.60), и, наконец,  $K_i$  определяется из соотношения (7.70).

Таким образом,  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 4 \text{ г/л}$ ;  $K_i = 2 \text{ г/л}$ ;  $Y_s = 0,2$ ;  $Y_p = 0,4$ .

7.5. Для нахождения кинетических параметров необходимо при нескольких скоростях разбавления построить зависимости  $S_{cr}$  от  $S_0$  [уравнение (7.125)] и при каждом  $D$  определить  $a$  и  $\text{tg} \varphi$ . Далее, построив зависимости  $1/\text{tg} \varphi$  от  $1/D$  [уравнение (7.127)], вычислить  $\alpha$  и  $\mu_m$ . Так как  $Y_s/Y_p = 1$ , то  $K_s/K_i = \alpha$  и с помощью уравнения (7.128) можно найти  $K_s$  и  $K_i$ . Таким образом,  $\mu_m = 1 \text{ ч}^{-1}$ ;  $K_s = 1 \text{ мм}$ ;  $K_i = 0,1 \text{ мм}$ .

## Глава 8

8.1. Для диагностики режима протекания процесса роста культур № 1 и № 2 нужно построить кинетические кривые роста и провести двойное зеркальное отражение верхней половины кривой относительно точки  $\left( \tau_{50}, \frac{M_\infty - N_0}{2} \right)$ , в результате получим, что рост культуры № 1 протскает в режиме  $K_s \gg S_0$ , а культуры № 2 — в режиме  $S_0 \gg K_s$ .

8.2. Культура № 1 — неосложненный рост;  
культура № 2 — ингибирование избытком субстрата;  
культуры № 3 и № 4 — ингибирование продуктом.

8.3. Представив экспериментальные данные по концентрации клеток, способных к делению в полулогарифмических координатах, из левой ветви кривой найдем  $\mu_{набл}$ , из правой —  $\lambda$ . Соответственно

$$\mu_m = \mu_{набл} + \lambda = 0,55 \text{ ч}^{-1}, \quad \lambda = 0,1 \text{ ч}^{-1}.$$

## Глава 9

9.1. Так как известны истинное значение концентрации кислорода в воздухе и генеральная дисперсия, то для расчета воспользуемся табл. 9.1 для

нормального распределения. Из этой таблицы  $u_{0,99}=2,6$ ;

$$P(\mu - u_{0,99}\sigma < x < \mu + u_{0,99}\sigma) = 0,99;$$

$$P(18,3 < x < 23,5) = 0,99.$$

Таким образом, с 99%-ной вероятностью результат единичного измерения попадает в интервал 18,3—23,5% по объему.

9.2. Воспользовавшись формулами (9.7), (9.8), (9.21), находим.

$$\bar{x} = 10; S_x = 4,65; S_{\bar{x}} = 1,04; w_x = 46,5\%; w_{\bar{x}} = 10,4\%.$$

9.3. В соответствии с законом сложения погрешностей

$$S_c = \sqrt{S_A^2 + S_F^2} = 5.$$

9.4. Для  $\gamma = 0,93$   $u_\gamma = 1,8$ ; следовательно,

$$x - u_{0,93}\sigma < \mu < x + u_{0,93}\sigma; \quad 63,7 < \mu_{\text{сн}_4} < 76,3;$$

$$22,75 < \mu_{\text{CO}_2} < 27,25.$$

9.5. Так как неизвестна генеральная дисперсия, то для решения задачи необходимо воспользоваться распределением Стьюдента (см. табл. 9.2). Для  $\gamma = 0,95$  и  $f = 19$   $t = 2,093$ .

Исходя из (9.20) имеем

$$\Delta = t \frac{S_x}{\sqrt{n}} = 2,093 \frac{4,65}{\sqrt{20}} = 2,177.$$

Таким образом, абсолютная погрешность равна 2,177, относительная равна

$$\frac{\Delta}{\bar{x}} 100 = 21,77\%.$$

9.6.  $\varepsilon = \frac{\Delta_{\text{योग}}}{W} = \frac{5\%}{25\%} = 0,2$ . Из таблицы для  $\varepsilon = 0,2$  и  $\gamma = 0,95$  находим  $n = 100$ .

9.7. Вызывает подозрение четвертый результат. Определим для него  $v$  по уравнению (9.23):  $v = 1,795$ . При  $n = 6$   $\beta > 0,1$

Таким образом, четвертый результат следует безусловно оставить, впрочем, как и все остальные.

9.8.  $\bar{V}_{1,\phi} = 511,4$  мл;  $S_{V_{r,\phi}} = 7,89$  мл,  $S_{\bar{V}_{r,\phi}} = 3,53$  мл;

$$\bar{C}_{\text{сн}_4} = 51,1\%; S_{C_{\text{сн}_4}} = 1,09\%; S_{\bar{C}_{\text{сн}_4}} = 0,49\%.$$

В соответствии с (9.29)

$$\bar{V}_{\text{сн}_4} = \bar{V}_{r,\phi} \bar{C}_{\text{сн}_4} = 511,4 \cdot 0,511 \text{ мл} = 261,3 \text{ (мл)},$$

$$S_{\bar{V}_{\text{сн}_4}} = \sqrt{S_{\bar{V}_{r,\phi}}^2 \bar{C}_{\text{сн}_4}^2 + S_{\bar{C}_{\text{сн}_4}}^2 \bar{V}_{r,\phi}^2} = \sqrt{3,53^2 \cdot 0,511^2 + 0,0049^2 \cdot 511,4^2} = 3,09 \text{ мл}.$$

Так как  $\bar{V}_{\text{сн}_4}$  вряд ли подчиняется нормальному распределению, для нахождения погрешности воспользуемся распределением Стьюдента (табл. 9.2). Для  $\gamma = 0,95$  и  $f = 4$   $t = 2,776$ ,  $\Delta_{\bar{V}_{\text{сн}_4}} = 2,776 \cdot 3,09 \text{ мл} = 8,56 \text{ мл}$ .

9.9. Приведенные данные по кинетике роста бактерии описываются зависимостью  $\ln D = \ln D_0 + \mu t$ . Определение всех интересующих величин можно сделать по формулам (9.35)—(9.41) вручную или с использованием ЭВМ.

Преобразуем экспериментальные данные к виду

$y(\ln D)$ .....	-2,002	-1,772	-1,501	-1,204	-0,859	-0,629	-0,350
$x(t)$ .....	0	0,5	1,0	1,5	2,0	2,52, 5	3,0

и по указанным формулам определяем:

$$\ln D_0 = -2,033; \quad \mu = 0,562; \quad S_0 = 0,026; \quad S_{\ln D_0} = 0,18;$$

$$S_\mu = 0,010; \quad \Delta_{0,95}(\ln D_0) = 0,045; \quad \Delta_{0,95}(\mu) = 0,25.$$

## ЛИТЕРАТУРА

- Ашмарин И. П., Ключарев Л. А.* Ингибиторы синтеза белка.—Л.: Медицина, 1975. 207 с.
- Белл Л. Н.* Энергетика фотосинтезирующей растительной клетки.—М.: Наука, 1980. 334 с.
- Белянин В. Н.* Светозависимый рост низших фототрофов.—Новосибирск: Наука, 1984. 95 с.
- Белянин В. Н., Сидько Ф. Я., Тренкеншу А. П.* Энергетика фотосинтезирующей культуры микроводорослей.—Новосибирск: Наука, 1980. 134 с.
- Березин И. В., Варфоломеев С. Д.* Биокинетика.—М.: Наука, 1979. 310 с.
- Бирюков В. В., Кантере М. В.* Оптимизация периодических процессов культивирования микроорганизмов.—М.: Наука, 1985. 215 с.
- Варфоломеев С. Д.* Кинетические модели фотокаталитических процессов // Пути повышения эффективности преобразования солнечной энергии в природном фотосинтезе.—В кн.: Фотокаталитическое преобразование солнечной энергии.—Новосибирск: Наука, 1985. Ч. I. С. 119—143.
- Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В.* Кинетические методы в биохимических исследованиях.—М.: МГУ, 1982. 344 с.
- Вольтер В.* Математическая теория борьбы за существование.—М.: Наука, 1978. 286 с.
- Сб.: Вопросы управления биосинтезом низших растений.* Под ред. И. А. Терскова.—Новосибирск: Наука, 1982. 153 с.
- Готтшиалк Г.* Метаболизм бактерий.—М.: Мир, 1982. 310 с.
- Диксон М., Узбб Э.* Ферменты.—М.: Мир, 1986. 816 с.
- Заварзин Г. А.* Водородные бактерии и карбоксидобактерии.—М.: Наука, 1978. 205 с.
- Зейдель А. Н.* Элементарные оценки ошибок измерений.—Л.: Наука, 1968. 96 с.
- Иерусалимский Н. Д.* Принципы регулирования скорости роста микроорганизмов.—В кн.: Управляемый биосинтез.—М.: Наука, 1966. С. 5—19.
- Каложный С. В.* Кинетические закономерности образования метана биокаталитическими системами // Дисс. на соискание уч. ст. канд. хим. наук.—М.: МГУ, 1985. 205 с.
- Каложный С. В., Варфоломеев С. Д.* Биотехнология. 1986. Т. 2. № 1. С. 94—100; № 3. С. 70—77.
- Каложный С. В., Сивак С. И., Варфоломеев С. Д.* Биотехнология, 1986. Т. 2. № 5. С. 94—100.
- Корниш-Боуден Э.* Основы ферментативной кинетики.—М.: Мир, 1979. 280 с.
- Малашенко Ю. Р., Мучник Ф. В., Романовская В. А., Садовников Ю. С.* Математические модели и ЭВМ в микробиологической практике.—Киев: Наукова думка, 1980. 195 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984. С. 332—337.
- Параметрическое управление биосинтезом микроводорослей* / Под ред. И. А. Терскова.—Новосибирск: Наука, 1980. 120 с.
- Печуркин Н. С.* Популяционная микробиология.—Новосибирск: Наука, 1978. 277 с.
- Печуркин Н. С., Терсков И. А.* Анализ кинетики роста и эволюции микробных популяций.—Новосибирск: Наука, 1975. 215 с.
- Пёрт С. Дж.* Основы культивирования микроорганизмов и клеток.—М.: Мир, 1978. 331 с.
- Полторак О. М., Чухрай Е. С., Пряхин А.* Новые методы кинетического анализа трехпараметрических уравнений ферментативного катализа // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Химия. 1976. № 2. С. 152—160.

*Работнова И. Л., Позмогова И. Н.* Хемостатное культивирование и ингибирование роста микроорганизмов.—М.: Наука, 1979. 207 с.

*Семенов В. Е., Владимирова М. Г., Цылин Л. Н., Попова Н. А.* Зависимость продуктивности роста и интенсивности фотосинтеза от концентрации двуокси углерода в газовой смеси и аэрации культуры.—В кн.: Управляемый биосинтез.—М.: Наука, 1966. С. 128—137.

*Сивак С. И.* О неединственности решения задач восстановления констант химической кинетики и констант химических равновесий.—В кн.: Математические проблемы химической термодинамики.—Новосибирск: Наука, 1980. С. 63—82.

*Химическая и биологическая кинетика*.—М.: МГУ, 1983. 295 с.

*Чернавский Д. С., Иерусалимский Н. Д.* О принципе минимума в кинетике ферментативных реакций—В кн.: Управляемый биосинтез.—М.: Наука, 1966. С. 19—24.

*Яблонский Г. С., Сивак С. И.* Математические модели химической кинетики.—М.: Знание, 1977. 64 с.

*Fröhlich V. T., Webster I. A., Atai M. M., Shuler M. L.* Photobioreactors: models for interaction of light intensity, Reactor Design. and Algal Physiology. // *Bio-technology and Bioengineering Symp.*, 1984. N 13. P. 331—350.

*Monod J.* Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. Paris: Hermann and Cie, 1942. 241 p.

*Monod J.* The growth of bacterial cultures // *Ann. Rev. of Microbiol.*, 1949. V. 111. P. 371—394.

## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автокаталитический(ая) процесс** 9, 30, 50, 52, 57, 110, 112, 128, 153  
— реакция 9, 107  
— рост 12, 147  
**Автоселекция** 191  
**Активация роста** 66, 68  
**Амплификации коэффициент** 102, 105, 106  
**Анаморфоза** 54, 87, 93, 116, 120, 165, 180  
**Аутостабилизация роста** 162, 164
- Базовая реакция** 57, 167, 238, 239  
**Базовый определитель** 62  
**Биокинетика** 5, 272  
**Биосинтез** 5, 32, 44, 115, 210
- Вариации коэффициент** 256, 263  
**Время удвоения клеток** 31, 48, 49, 50, 51
- Гистерезисные явления** 173
- Дисперсия** 252, 257, 270  
— выборочная 256, 258, 261, 264, 267  
— генеральная 255, 265, 267  
**Доверительная(ый.е) вероятность** 259, 260, 261, 262, 263, 267  
— границы 259, 261  
— интервал 259, 260  
— погрешности 262
- Инактивация** 39, 51, 102, 106, 202, 247  
**Ингибирование роста** 66, 68  
— бесконкурентное 128, 130  
— неконкурентное 69, 70, 129, 130, 132, 138, 139, 142, 143, 144, 145, 174, 182, 183, 184, 185, 198  
— конкурентное 69, 125, 129, 130, 132, 136, 137, 138, 139, 142, 143, 144, 145, 174, 175, 176, 177, 180, 181, 184, 185, 198  
— продуктом 68, 81, 89, 98, 120, 122, 123, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 174, 175, 177, 178, 179, 182, 183, 189, 190, 193, 197, 198, 199, 247  
— смешанное 71, 132  
— субстратом 68, 81, 107, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 136, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 189, 190, 193, 197, 198, 199, 224, 247
- Ингибиторы необратимые** 67  
— обратимые 67, 123  
— по кинетическому механизму 66, 67  
— по «мишени» 66, 67
- Каталитический центр** 9  
**Квантовый расход** 213  
**Квантовая эффективность** 223  
**Константа диссоциации (ионизации)** 68, 73, 74, 77, 108, 112, 130, 131, 132, 242, 243, 245  
— ингибирования 69, 70, 77, 118, 120, 125, 138, 143, 170, 171, 178, 185, 223, 224  
— каталитическая 26, 51  
— равновесия 67, 108, 123, 134, 175  
— скорости 124, 147, 211, 212, 216, 217  
— второго порядка 26, 212  
— инактивации 42, 99, 102  
— первого порядка 11, 62, 214, 215  
— сродства субстрата к микроорганизму 8, 35, 39, 49, 51, 54, 58, 59, 73, 74, 77, 87, 94, 138, 162, 170, 171, 189, 230, 231, 233, 241, 242
- Контроль ослабленный** 207  
— строгий 207
- Координаты Диксона** 70  
— Лайнуивера—Бёрка (двойные обратные) 70, 71  
— полулогарифмические 52, 92, 147, 152, 157, 202, 203, 225
- Коэффициент преобразования энергии** 212, 215, 216, 217, 218, 219, 221

Ливис 8, 199, 247  
Лимитирующий(ая) источник энергии 222  
— стадия 9, 50, 212, 214, 216, 217, 219, 235, 236  
— субстрат 8, 9, 25, 30, 31, 32, 33, 44, 47, 48, 50, 61, 77, 81, 86, 98, 100, 103, 158, 185, 199, 208, 222, 223, 224, 230, 231, 234  
— фермент 25, 26, 33, 36, 39, 44, 51, 53, 67, 73, 74, 115, 208, 210  
Логистическая(ое) кривая 79, 80, 81, 84, 85, 86, 205, 206, 222  
— уравнение 79

Метаболические коэффициенты 237  
Метаногенная ассоциация микроорганизмов 230, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 244, 245, 246  
Метод двойного зеркального отражения 196, 197, 198, 199, 247  
— двойных обратных координат 54, 64, 65, 69  
— Диксона 69, 70  
— интервального оценивания 258  
— Корниш—Боуден 55  
— малого параметра 19, 22, 28, 50, 124, 128, 131, 134  
— наименьших квадратов 269, 270, 271  
— разностный 52, 77, 91, 94, 95, 106, 116, 117, 141  
— регрессионного анализа 268, 269  
Механизм — запрограммированный отказ 99, 101, 103, 104, 105, 106  
— пинг-понг 58, 59, 60, 64, 65, 77  
— прогрессирующая некомпетентность 99, 103, 104, 105, 106, 202  
— с немультиплицирующими субстратами 58, 59  
— с мультиплицирующими субстратами 58, 59, 60, 61  
— тройного комплекса 57, 60  
Микроводоросли 57, 210, 211, 212, 227  
Митов 36  
Михаэлиса комплекс 12  
— константа 26, 30, 33, 34, 49, 51  
Михаэлиса—Ментен уравнение 9, 26, 32, 37, 50, 53, 55  
Моно 5, 9, 47  
— уравнение 9, 11, 12, 18, 21, 30, 35, 41, 50, 51, 55, 77, 100, 116, 148, 152, 162  
— — интегральное 83

Период индукции (лаг-фаза) 7, 16, 35, 91, 92, 95, 147, 148, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 197, 243

Пермеаза 37  
Плазмиды 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210  
Плотностатный режим 210  
Плотность распределения 48  
Погрешности измерений 249  
— грубые (промахи) 249, 250, 264, 265  
— систематические 249, 250, 251, 263, 264  
— случайные 249, 250, 251, 252, 255, 257, 260, 263, 264, 269  
Пороговая длина волны 213  
Пороговая интенсивность света 216  
Пороговая минимальная концентрация субстрата 42, 51

Рандомизация 251  
Распределение Гаусса 252, 253  
— Стьюдента 261, 271  
Реакционный центр 210, 211, 219  
Регрессии коэффициенты 269, 270  
Репликация(и) 25, 26, 31, 32, 35, 39, 47, 48, 201  
— скорость 27, 34, 35, 47, 203

Светособирающая антенна 211  
Симбиотические ассоциации 229, 230, 232, 233, 236, 239, 246, 247  
Скалярная связность 63, 64  
Скорость разбавления 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 178, 179, 180, 181, 184, 187, 188, 189, 190, 227, 228, 229  
— критическая 163, 168, 169, 170, 175, 176, 177, 178, 187  
— роста удельная 8, 10, 25, 30, 31, 33, 37, 38, 41, 42, 46, 47, 50, 51, 53, 54, 55, 58, 62, 63, 64, 65, 69, 77, 80, 99, 107, 108, 110, 111, 113, 114, 115, 116, 118, 119, 120, 125, 126, 127, 129, 149, 152, 154, 156, 157, 158, 162, 167, 174, 175, 177, 189, 207, 209, 210  
— — максимальная 12, 24, 25, 30, 33, 36, 39, 46, 47, 49, 51, 54, 59, 66, 68, 73, 77, 87, 162, 169, 171, 173, 189, 204, 230, 232, 233, 234  
Среднее квадратическое отклонение 252

Тейсиера уравнение 30  
Теория графов 62  
Транскрипция(и) 25, 26

— скорость 27  
Трансляция(и) 25, 26  
— скорость 27

Уровень значимости 259

Фаза замедления роста 7, 78  
— линейного роста 7, 78, 126, 145  
— отмирания культуры 8  
— стационарная 8, 122  
— экспоненциального роста 7, 52, 53, 57, 61, 69, 76, 77, 78, 121, 126, 145, 147, 193, 199, 201, 202, 203, 226

Ферментативный катализ 5, 6, 216  
Ферхюльста уравнение 78, 85, 94  
Фотосинтез 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 218, 219, 221, 222, 223

Фотосинтезирующие микроорганизмы 210, 221, 226

Фотосинтетически активная радиация 213, 216, 218

Фотосистемы I и II 83, 84, 99, 100, 118, 119, 120, 211, 213

Хемостат 160, 162, 163, 167, 173, 174, 178, 179, 182, 183, 185, 189, 226

Хлорелла 216, 218, 219  
Хлорофилл 211, 215, 222, 224, 225, 226, 227, 228

Цианобактерии 57, 211, 220

Число оборотов фермента 49

Экономический коэффициент 81, 181, 231, 233, 241  
Экспоненциальное приближение 90

*Alcaligenes eutrophus* 91, 94, 95  
*Anacystis nidulans* 220, 221

*Bacillus megaterium* 76  
— *subtilis* 66  
— *thuringiensis* 143, 144

*Candida utilis* 75, 76

*Escherichia coli* 66, 70, 98, 105, 106, 201, 202, 203, 204

*Hyphomicrobium neptunium* 66

*Methanobacillus barkeri* 246  
*Methanobacillus kuzneceovii* 236  
*Methanobacterium thermoautotrophum* 53, 64, 65, 76, 143, 144, 246  
*Methanococcus maripaludis* 76  
*Methanobrevibacterium ruminantium* 52  
*Methanosarcina vacuolata* 96, 97

*Propionibacterium shermanii* 144  
*Pseudomonas aeruginosa* 157  
*Phodospirillum rubrum* 211

*Thermoanaerobium lactoethylicum* 158  
*Thiobacillus ferrooxidans* 166

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
Введение	5
Глава 1 Кинетические модели роста культур микроорганизмов	7
Глава 2 Экспоненциальная фаза роста культур микроорганизмов	52
Глава 3 Интегральная форма уравнения роста микробной популяции	78
Глава 4 Ингибирование роста популяции микроорганизмов избытком субстрата	107
Глава 5 Ингибирование роста популяции микроорганизмов продуктами ферментации	122
Глава 6 Периоды индукции на кинетических кривых роста микроорганизмов	147
Глава 7 Культивирование микроорганизмов в режиме хемостата	160
Глава 8 Исследование кинетики роста микробных популяций с использованием ЭВМ	191
Глава 9 Обработка результатов измерений в микробиологических исследованиях	249
Заключение	271
Задачи	273
Ответы и решения	284
Литература	291
Предметный указатель	293

*Учебное издание*

**Варфоломеев Сергей Дмитриевич**  
**Каложный Сергей Владимирович**

### **БИОТЕХНОЛОГИЯ** **КИНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ** **МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**

Редактор М М Пенкина Младшие редакторы Е В Бурова, Е И Попова  
Художник В Н Хомяков Художественный редактор Т А Коленкова Технический редактор Н А Битюкова Корректор Г И Кострикова

ИБ № 8180

№Изд № Е—575 Сдано в набор 24 08 89 Подп в печать 26 07 90 Т-12604 Формат 60×88<sup>1/16</sup> Бум офс № 2 Гарнитура таймс Печать офсетная Объем 18,13 усл печ л 18,13 усл кр-отт 16,87 уч изд л Тираж 11 000 экз Зак № 544 Цена 90 коп

Издательство «Высшая школа», 101430, Москва, ГСП-4, Неглинная ул, д 29/14

Отпечатано с диапозитивов Ордена Октябрьской Революции и ордена Трудового Красного Знамени МПО «Первая Образцовая типография» Государственного комитета СССР по печати 113054, Москва, Валовая, 28 в Московской типографии № 4 Госкомпечати СССР 129041, Москва, Б Переяславская ул, 46.