

УДК 531/534: [57+61]

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОМЕХАНИКИ ПРОЦЕССА БИОТРАНСФОРМАЦИИ БЕТУЛИНА НЕРАСТУЩИМИ КЛЕТКАМИ *RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS* ИЭГМ 66

И.Б. Ившина^{1,2,3}, Е.В. Тарасова¹, М.А. Осипенко³,
Ю.И. Няшин³, В.В. Гришко⁴, А.А. Горбунов⁴

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 614081, Пермь, ул. Голева, 13, e-mail: ivshina@iegm.ru

² Кафедра микробиологии и иммунологии Пермского государственного национального исследовательского университета, Россия, 614900, Пермь, ул. Букирева, 15, e-mail: ivshina@iegm.ru

³ Кафедра теоретической механики Пермского национального исследовательского политехнического университета, Россия, 614990, Пермь, Комсомольский проспект, 29, e-mail: oma@theormech.pstu.ac.ru

⁴ Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 614013, Пермь, ул. Акад. Королева, 3, e-mail: grishko@aport.ru

Аннотация. Тритерпеноиды – класс природных соединений ациклической или полициклической структуры, широко представленных в растительном мире. Типичный представитель данного класса – пентациклический тритерпеноид бетулин – относится к наиболее значимым источникам фармакологически активных соединений. Синтез новых производных бетулина осуществляется как химическими, так и биокаталитическими методами. Перспективным интермедиатом в синтезе пропитуолиновых и противовирусных агентов является 3-оксобетулин, продукт направленной окислительной биотрансформации бетулина актинобактериями рода *Rhodococcus*. В настоящей работе проведено экспериментальное исследование процесса биотрансформации бетулина в 3-оксобетулин нерастущими клетками родококков. Подобраны условия процесса биотрансформации бетулина, при которых выход целевого продукта составляет свыше 50%. Исследована динамика образования 3-оксобетулина в процессе биотрансформации бетулина в условиях использования различных концентраций субстрата. На основе экспериментальных данных определены кинетические закономерности процесса биотрансформации в зависимости от уровня pH, концентрации используемой биомассы и концентрации вносимого субстрата. Проведено феноменологическое рассмотрение биомеханики процесса биотрансформации бетулина, которая определяется механикой движения клеток родококков и окружающей их жидкости с субстратом. При использовании различных вариантов метода наименьших квадратов разработан методологический подход к математическому моделированию и определены кинетические константы процесса окислительной биоконверсии бетулина. Проведено сравнение экспериментальных данных с результатами разработанной теоретической модели. Выбор оптимальных значений параметров процесса биотрансформации бетулина иллюстрируется моделью поверхности отклика. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшей оптимизации процесса биокаталитического синтеза 3-оксобетулина.

© Ившина И.Б., Тарасова Е.В., Осипенко М.А., Няшин Ю.И., Гришко В.В., Горбунов А.А., 2013

Ившина Ирина Борисовна, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН, завлабораторией алканотрофных микроорганизмов, профессор кафедры микробиологии и иммунологии, профессор кафедры теоретической механики, Пермь

Тарасова Екатерина Владимировна, аспирант института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь

Осипенко Михаил Анатольевич, к.ф.-м.н., доцент кафедры теоретической механики, Пермь

Няшин Юрий Иванович, д.т.н., профессор, завкафедрой теоретической механики, Пермь

Гришко Виктория Викторовна, к.х.н., завлабораторией биологически активных соединений, Пермь

Горбунов Алексей Аркадьевич, к.х.н., с.н.с. лаборатории синтеза активных реагентов, Пермь

Ключевые слова: бетулин, 3-оксобетулин, биомеханика, биотрансформация, *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 66, поверхность отклика, метод наименьших квадратов.

ВВЕДЕНИЕ

Тритерпеноиды – класс природных соединений ациклической или полициклической структуры, широко представленных в растительном мире. Среди пентациклических тритерпеноидов лупанового ряда интерес представляет бетулин, содержание которого во внешнем слое коры березы достигает до 40%. В настоящее время бетулин широко используется в качестве стартового вещества в синтезе биологически активных соединений (для получения противоопухолевых и противовирусных агентов в частности) [5, 15]. Синтез фармакологически значимых производных бетулина осуществляется преимущественно с использованием химических методов. В последние годы появились публикации о возможности микробиологической трансформации бетулина и его производных с использованием некоторых представителей бактерий и грибов. Для описанных процессов биотрансформации бетулина характерны высокая продолжительность (до 10 дней), низкий уровень конверсии (не более 30%) при использовании невысоких (менее 0,5 г/л) концентраций исходного субстрата [10, 12, 14]. В связи с этим актуален поиск биокатализаторов, обеспечивающих более эффективную трансформацию бетулина.

Ранее на основе биоресурсов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, номер во Всемирной федерации коллекций культур #768, www.iegmr.ru/iegmcollection) авторами был исследован процесс биотрансформации бетулина с использованием актинобактерий рода *Rhodococcus* [3]. Показано, что основным продуктом биокаталитического окисления бетулина (0,5 г/л) с использованием интактных клеток родококков является 3-оксобетулин – перспективный интермедиат для получения биологически активных соединений [13]. Среди исследованных культур родококков отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 66, обладающий наибольшей бетулинтрансформирующей активностью и катализирующий образование до 70%-ного 3-оксобетулина в течение 10 суток. Применение нерастущих клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 66 для биотрансформации бетулина позволило сократить продолжительность бактериального синтеза 3-оксобетулина до 2 суток, при этом уровень образования целевого продукта достигал 40%.

В настоящей работе представлены экспериментальные данные, обсуждены биомеханические аспекты и предложены подходы к математическому моделированию процесса биотрансформации бетулина нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 66. На основе разработанных математических моделей проведена обработка полученных данных и представлены рекомендации по выбору оптимальных параметров процесса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коллекционный штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 66, наиболее активный в отношении бетулина [3]. Для получения нерастущих клеток родококки предварительно выращивали в мясопептонном бульоне в течение 48 ч. Полученную биомассу осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин и трижды промывали фосфатно-щелочным буферным раствором (рН 7; 1,36 г KH_2PO_4 и 0,4 г NaOH в 100 мл дистиллированной воды). Отмытые клетки ресуспендировали в 100 мл буфера (рН 6, 7, 8 или 9) и доводили $\text{OD}_{600\text{ нм}}$ клеточной суспензии до значений 1,6, 2,2 или 2,8. Бетулин (0,1, 0,25 или 0,5 г/л) вносили в виде раствора в диметилсульфоксиде. Эксперименты по биотрасформации бетулина

нерастущими клетками родококков проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл, закрепленных на платформе орбитального шейкера (160 об/мин), при температуре 28°C в нестерильных условиях в течение 24–96 ч. Продукты биоконверсии экстрагировали с помощью этилацетата. Качественный состав продуктов биотрансформации анализировали методом тонкослойной хроматографии. Концентрации веществ определяли методом газовой хроматографии с помощью хромато-масс-спектрометра *Agilent 6890N/5975B* с использованием колонки *HP-5 ms* (30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм). Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Математическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием компьютерных программ *Excel 2000* и *Statistica* (версия 6.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕДЕННЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Первый этап построения математической модели процесса биотрансформации бетулина включал сбор и обработку эмпирических данных о влиянии на процесс таких факторов, как рН буферного раствора, концентрация биомассы и концентрация субстрата.

В качестве наиболее значимого параметра процесса биотрансформации с участием растущих клеток микроорганизмов, как правило, рассматривается концентрация клеточной биомассы. Для большинства биокаталитических процессов характерна линейная зависимость между выходом целевого продукта и концентрацией используемой клеточной биомассы (с учетом массопереноса субстрата) [6, 17]. Как видно из табл. 1, максимальный (50,2%) уровень содержания 3-оксобетулина в среде биотрансформации регистрируется при использовании клеточной суспензии с оптической плотностью 2,2. Дальнейшее повышение концентрации клеточной биомассы до $OD_{600\text{ нм}}$ 2,8 приводит к снижению степени биоконверсии бетулина. Наблюдаемый эффект может быть обусловлен ограничениями процесса массопереноса [6] или лимитированием процессов транспорта субстрата [17] при концентрации клеточной биомассы $OD_{600\text{ нм}}$ более 2,2.

Таблица 1

Влияние уровня рН буфера и концентрации биомассы на выход 3-оксобетулина, %

Уровень рН	Концентрация биомассы, $OD_{600\text{ нм}}$		
	1,6	2,2	2,8
6	24,8	41,2	Нет данных
7	29,9	45,9	Нет данных
8	34,8	50,2	39,8
9	Нет данных	49,9	39,2

Таблица 2

Динамика образования 3-оксобетулина при внесении различных концентраций бетулина, %

Концентрация субстрата, г/л	Время, ч				
	3	24	48	72	96
0,10	29,8	49,8	51,2	51,9	52,0
0,25	28,7	50,2	50,3	51,3	51,9
0,50	32,6	49,3	50,2	50,6	51,8

Процесс бактериального синтеза 3-оксобетулина заключается в одностадийном региоселективном окислении вторичной гидроксильной группы бетулина и, возможно, катализируется ферментом дегидрогеназой. Окислительная активность ферментов зависит от уровня рН, который определяет степень ионизации функциональных групп и конформацию активного центра фермента. При исследовании влияния рН буферного раствора на процесс биотрансформации бетулина (0,5 г/л) обнаружено, что наиболее высокая степень образования 3-оксобетулина достигается в условиях щелочной реакции среды, при этом в условиях рН 8 и 9 выход целевого продукта отличается незначительно – 50,2 и 49,9 % соответственно. Полученные результаты подтверждаются литературными данными, свидетельствующими о наибольшей активности очищенных препаратов дегидрогеназ родококков в условиях щелочной среды [8, 9, 11].

Динамика образования 3-оксобетулина при использовании различных (0,1, 0,25, 0,5 г/л) концентраций бетулина соответствует кинетической кривой взаимодействия фермента и продукта. Накопление 3-оксобетулина на начальном этапе биотрансформации (от 0 до 24 ч) имеет экспоненциальный характер. При этом степень образования целевого продукта не зависит от концентрации используемого субстрата и составляет около 50% (табл. 2). В последующие часы (от 24 до 96 ч) уровень содержания 3-оксобетулина остается практически неизменным.

БИОМЕХАНИКА ПРОЦЕССА БИОТРАНСФОРМАЦИИ БЕТУЛИНА

Биомеханические аспекты биотрансформации бетулина определяются механикой движения клеток родококков и окружающей их жидкости с субстратом (бетулином) в колбах Эрленмейера, закрепленных на платформе орбитального шейкера. Характер этого движения оказывает влияние на уровень окислительной биоконверсии бетулина. Влияние может быть прямым (изменение степени взаимодействия клеток с субстратом) или опосредованным (изменение характеристик аэробного дыхания клеток при перемешивании жидкости). Далее нами рассмотрено только прямое влияние, для количественного описания которого использованы феноменологические представления, предложенные в [1].

Предполагается, что в системе отсчета, связанной с колбой, молекулы субстрата и бактериальные клетки образуют идеальные псевдогазы. Пусть u – средняя скорость движения частиц псевдогазов, $y(t)$ – зависимость процента выхода 3-оксобетулина от времени. С механической точки зрения интенсивность реакции биотрансформации и, следовательно, скорость $dy(t)/dt$ изменения $y(t)$ определяются частотой ν столкновений молекул субстрата и клеток. Будем считать, что скорость пропорциональна частоте столкновений: $dy(t)/dt = k\nu$, где k – некоторый коэффициент. За бесконечно малый промежуток времени dt с клеткой столкнется половина молекул субстрата, находящихся в окружающем клетку слое жидкости толщиной $u dt$ (вторая половина движется в противоположном направлении), следовательно, с данной клеткой столкнутся $S n_s(t) u dt / 2$ молекул субстрата, где S – площадь поверхности клетки, $n_s(t)$ – концентрация молекул субстрата. Так как $y(t) = C_1(n_s(0) - n_s(t))$, где C_1 – некоторый калибровочный коэффициент, то $y(0) = 0$ и $dy(t)/dt = (a_1 - y(t))/a_2$, где $a_1 = C_1 n_s(0)$, $a_2 = 2C_1 / (kSu)$. Решением полученного дифференциального уравнения является экспоненциальная функция

$$y(t) = a_1 (1 - \exp(-t/a_2)). \quad (1)$$

Рассмотрим теперь влияние концентрации биомассы n_b на максимальный выход у 3-оксобетулина. С одной стороны, уменьшение n_b приводит к уменьшению y , поэтому можно считать, что при малых n_b y пропорционален n_b . С другой стороны, чрезмерное увеличение n_b также приводит к уменьшению y за счет ограничения процесса массопереноса. Поэтому можно считать, что y пропорционален вероятности w того, что длина свободного пробега L клетки как частицы псевдогаза больше некоторого критического значения L_c . Поскольку $w = \exp(-L_c/L_m)$, где L_m – средняя длина свободного пробега, $L_m = 1/(n_b s)$; s – эффективное поперечное сечение соударения [4], то $y = C_2 n_b \exp(-L_c s n_b)$, где C_2 – некоторый коэффициент. Зависимость $y(n_b)$ имеет максимум. Представим эту зависимость в окрестности максимума приближенно в виде $y = C_3 + C_4 n_b + C_5 n_b^2$, где коэффициенты C_3, C_4, C_5 выражаются через C_2, L_c, s .

Максимальный выход 3-оксобетулина зависит также от уровня рН буфера, следовательно, коэффициенты C_3, C_4, C_5 в последнем равенстве зависят, вообще говоря, от этого уровня. Данная зависимость механическими закономерностями не определяется, поэтому учтем ее феноменологически. Для сохранения квадратичного характера функции y будем считать, что C_3 зависит от уровня рН квадратично, C_4 – линейно, а C_5 не зависит вообще. Обозначая через x_1 концентрацию биомассы, через x_2 – рН буфера, окончательно получим

$$y = c_1 x_1^2 + c_2 x_2^2 + c_3 x_1 x_2 + c_4 x_1 + c_5 x_2 + c_6, \quad (2)$$

где $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_6$ – некоторые параметры. Для отыскания этих параметров, а также параметров a_1, a_2 в соотношении (1) необходимо рассмотреть нижеследующую задачу.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ ФОРМУЛИРОВКА И МЕТОД РЕШЕНИЯ ЗАДАЧИ ВЫЧИСЛЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ ПРОЦЕССА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ИЗМЕРЕНИЙ

Для обработки экспериментальных данных использовали модификацию метода наименьших квадратов [2, 7]. При этом зависимость исследуемой величины от параметров не предполагалась линейной, а закон распределения ошибок не предполагался нормальным. По сути, рассматривалась задача вычисления параметров по результатам косвенных измерений. Для решения задачи необходимо сформулировать математическую модель рассматриваемого процесса. Обычно предполагается, что процесс характеризуется параметром A и двумя переменными величинами X и Y , связанными линейным соотношением

$$Y = AX. \quad (3)$$

Ниже рассмотрена более общая ситуация, когда имеется несколько параметров A_1, \dots, A_K (K – число параметров; набор параметров обозначим \vec{A}), и они связаны с величинами X и Y соотношением (вообще говоря, нелинейным)

$$Y = F(\vec{A}, X), \quad (4)$$

где F – известная функция.

Далее следует сформулировать математическую модель процесса измерения величин, характеризующих явление. В частном случае (3) параметр A и в общем случае (4) параметры \vec{A} для непосредственного измерения недоступны. Экспериментатор придает величине X ряд значений X_1, \dots, X_N ; эти значения считаются известными точно; N – число экспериментальных точек. Будем считать, что соответствующие величины Y_1, \dots, Y_N измеряются с несистематическими неизвестными либо одинаковыми абсолютными, либо одинаковыми относительными ошибками. Иначе говоря, имеются независимые случайные величины y_1, \dots, y_N (весь набор обозначим \vec{y}), плотности которых неизвестны, но отличаются только сдвигом; при этом $\mathbf{M}y_n = Y_n$, где \mathbf{M} – взятие среднего значения.

Таким образом, известны (непосредственно измерены): величины X_1, \dots, X_N (неслучайные) и величины \vec{y} (случайные); неизвестны: параметры \vec{A} (неслучайные) и величины Y_1, \dots, Y_N (неслучайные).

Далее следует обеспечить точную математическую постановку (в рамках сформулированных моделей) задачи вычисления параметров явления по результатам измерений. Обратимся к частному случаю (3). В нестрогой постановке задача состоит в том, чтобы вычислить A по измеренным \vec{y} . Уточним эту постановку. Прежде всего, достоверное вычисление A принципиально невозможно, так как величины \vec{y} , содержащие информацию об A , – случайные (имея в распоряжении только случайные величины, ничего нельзя найти точно). Поэтому можно пытаться указать только отрезок $\Omega(\vec{y})$ (рис. 1), на котором лежит A (отрезок зависит от \vec{y} – вычисляется по измеренным \vec{y} – и поэтому является случайным). Но если требовать, чтобы значение A обязательно лежало на некотором Ω , то Ω расширяется до всей прямой (и никакой информации об A получить не удастся). Действительно, \vec{y} теоретически могут сколь угодно сильно отклоняться от средних значений (практически трудно указать достаточно узкие интервалы, за пределы которых \vec{y} заведомо не выходят), следовательно, и найденная по \vec{y} оценка A может быть сколь угодно сильно ошибочна. Поэтому можно пытаться искать отрезок, на котором A лежит лишь с заданной вероятностью $0 < p < 1$. Но это невозможно, так как плотности \vec{y} неизвестны; без использования этих плотностей нельзя подсчитать вероятность попадания A на построенный отрезок и убедиться, что она равна p . Если $N \rightarrow \infty$, то эту вероятность можно подсчитать с погрешностью $O(1/N)$. После изложенных рассуждений окончательно приходим к следующей задаче:

Задача 1: при заданном $0 < p < 1$ найти на числовой оси отрезок $\Omega(\vec{y})$, на котором A лежит с вероятностью $p + O(1/N)$.

Отрезок определяется центром a и полушириной Δ (см. рис. 1); их требуется найти, причем a и Δ зависят от \vec{y} и поэтому являются случайными.

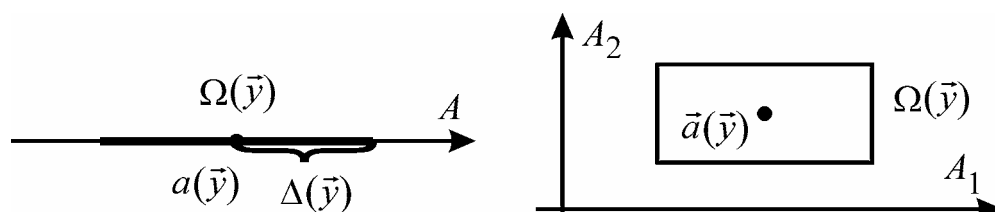


Рис. 1. Область определения параметров с заданной вероятностью

Решение задачи 1 не обязательно единственно, поэтому можно усложнять постановку, вводя критерий сравнения решений и ставя целью найти лучшее (в некотором классе) решение. Далее рассматривается только одно решение (основанное на идеях метода наименьших квадратов). Заметим также, что в задачу 1 можно включить нахождение аналогичного отрезка для (неизвестной) дисперсии случайных величин \bar{y} .

В общем случае (4) набор параметров есть K -мерный вектор, поэтому следует искать область в K -мерном пространстве. Соответствующее обобщение задачи 1 имеет следующий вид:

Задача 2: при заданном $0 < p < 1$ найти в K -мерном пространстве область $\Omega(\bar{y})$, в которой \bar{A} лежит с вероятностью $p + O(1/N)$.

Рассмотрим кратко ход решения сформулированных задач. Метод решения состоит в том, что сначала из эвристических соображений находятся выражения для $a(\bar{y})$ и $\Delta(\bar{y})$, а затем строится доказательство того, что эти выражения действительно дают решение (точнее, одно из решений с учетом сделанных выше замечаний о единственности).

Центром $a(\bar{y})$ отрезка следует выбрать величину, которая в качестве предположительного значения параметра A наилучшим образом соответствует измеренным \bar{y} . Согласно (эвристическому) методу наименьших квадратов

$$a(\bar{y}) - \text{точка минимума функции } S(a) = \sum_{n=1}^N (y_n - a X_n)^2. \quad (5)$$

В частном случае (3)

$$a(\bar{y}) = \frac{\sum_{n=1}^N X_n y_n}{\sum_{n=1}^N X_n^2}$$

(если не все $X_n = 0$, что будем предполагать). Кроме того,

$$S_{\min}(\bar{y}) = S(a(\bar{y})) = \sum_{n=1}^N (y_n - a(\bar{y}) X_n)^2, \quad G = S''(a(\bar{y})) = 2 \sum_{n=1}^N X_n^2. \quad (6)$$

В данном случае G не зависит от \bar{y} . Нетрудно убедиться, что $\mathbf{M}a(\bar{y}) = A$, $\mathbf{D}a(\bar{y}) = 2\mathbf{M}S_{\min}(\bar{y}) / ((N-1)G)$, где \mathbf{D} – взятие дисперсии (в последней формуле $N > 1$, что будем предполагать). Величина $\mathbf{D}a(\bar{y})$ остается неизвестной, так как $\mathbf{M}S_{\min}(\bar{y})$ содержит неизвестные дисперсии \bar{y} (ввиду квадратичности $S_{\min}(\bar{y})$).

Перейдем к выбору подходящего выражения для полуширины $\Delta(\bar{y})$ отрезка. Заметим, что $a(\bar{y})$ – сумма большого числа случайных величин. Известно [16], что такая сумма имеет приближенно нормальную плотность. Тогда можно приближенно найти вероятность p того, что $|a(\bar{y}) - \mathbf{M}a(\bar{y})| \leq \gamma \sqrt{\mathbf{D}a(\bar{y})}$, где $\gamma > 0$ – заданное число:

$$p = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\gamma}^{\gamma} \exp(-\tau^2/2) d\tau. \quad (7)$$

Тем самым искомая полуширина равна $\gamma\sqrt{\mathbf{D}a(\bar{y})}$, так как p – это вероятность того, что A лежит на отрезке с центром $a(\bar{y})$ и данной полушириной. Как было упомянуто выше, $\mathbf{D}a(\bar{y})$ неизвестна, поэтому последний шаг решения задачи 1 состоит в замене величины $\mathbf{D}a(\bar{y})$ приближенно равной величиной $2S_{\min}(\bar{y})/((N-1)G)$. Окончательно приходим к выражению

$$\Delta(\bar{y}) = \gamma\sqrt{2S_{\min}(\bar{y})/((N-1)G)}$$

для полуширины; γ находится из уравнения (7) (в котором p по условию задачи 1 задано).

На этом заканчивается эвристическая часть решения задачи 1. Далее можно доказать следующее утверждение: отрезок

$$\Omega(\bar{y}) : |A - a(\bar{y})| \leq \Delta(\bar{y}) \tag{8}$$

дает решение задачи 1. Доказательство этого утверждения является громоздким и поэтому здесь не приводится. Сделаем только несколько замечаний к утверждению. Все упомянутые приближения приводят, в строгой формулировке утверждения, к погрешности $O(1/N)$ в вероятности p . При увеличении N увеличивается набор X_1, \dots, X_N . Вышеупомянутое утверждение можно доказать только при (естественном) ограничении на структуру этого увеличивающегося набора: точки X_n не должны накапливаться в окрестности значения $X = 0$, где значение $Y = AX$ не содержит информации об A . Можно доказать, что $\mathbf{M}\Delta(\bar{y}) = O(1/\sqrt{N})$. Этот порядок показывает, что построенный отрезок и, следовательно, погрешность, с которой найден параметр A , являются достаточно малыми.

Теперь обратимся к общему случаю (4). На основании аналогичных эвристических соображений можно выписать следующие формулы, обобщающие (5)–(8):

$a_k(\bar{y})$ ($1 \leq k \leq K$; обозначение – $\bar{a}(\bar{y})$) – точка минимума функции

$$S(\bar{a}) = \sum_{n=1}^N (y_n - F(\bar{a}, X_n))^2, \tag{9}$$

$$S_{\min}(\bar{y}) = \sum_{n=1}^N (y_n - F(\bar{a}(\bar{y}), X_n))^2, \quad G_{km}(\bar{y}) = \frac{\partial^2 S}{\partial a_k \partial a_m}(\bar{a}(\bar{y})), \quad 1 \leq m \leq K, \tag{10}$$

$$p = \sqrt{\frac{\det \tilde{G}(\bar{y})}{(2\pi)^K}} \int_{-\gamma}^{\gamma} d\tau_1 \dots \int_{-\gamma}^{\gamma} d\tau_K \exp\left(-\frac{1}{2} \sum_{k,m=1}^K \tilde{G}_{km}(\bar{y}) \tau_k \tau_m\right), \quad \tilde{G}_{km} = G_{km} \sqrt{(G^{-1})_{kk} (G^{-1})_{mm}}, \tag{11}$$

$\Omega(\bar{y})$ – прямоугольный параллелепипед (см. рис. 1, $N > K$):

$$|A_k - a_k(\bar{y})| \leq \gamma\sqrt{2S_{\min}(\bar{y})(G^{-1}(\bar{y}))_{kk}/(N-K)}, \quad 1 \leq k \leq K. \tag{12}$$

Заметим, что G_{km} (матрица Гессе) зависит от \bar{y} , а правая часть выражения для p в (11), в отличие от (7), зависит от G .

Можно доказать утверждение, аналогичное утверждению о решении задачи 1: прямоугольный параллелепипед (12) дает решение задачи 2. К этому утверждению следует сделать несколько замечаний. Можно доказать, что в рассматриваемом общем

случае (4) $M\vec{a}(\vec{y}) = \vec{A} + O(1/N)$, т.е. в отличие от частного случая (3) средние значения координат центра полученного случайного прямоугольного параллелепипеда не равны точно (неизвестным) значениям параметров. Этот факт есть следствие (вообще говоря) нелинейности функции F в соотношении (4). Аналогично утверждению о решении задачи 1 вышеупомянутое утверждение справедливо, если точки набора X_1, \dots, X_N не накапливаются в окрестности тех значений X , где производная F по какому-либо параметру A_k равна нулю (и, следовательно, значение $Y = F(\vec{A}, X)$ содержит мало информации об A_k).

При практических вычислениях по формулам (9)–(12) основная трудность состоит в нахождении точки минимума суммы квадратов (9). Обычно это можно сделать только численно, используя один из известных методов. В настоящей работе применялся модифицированный метод Ньютона, основанный на спектральном разложении матрицы Гессе [7].

ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

Математический анализ данных табл. 2 проводили в соответствии с соотношением (1). Параметры a_1, a_2 определяются концентрацией субстрата. Для их нахождения был использован подход, изложенный выше. В формулах (11)–(12) принято, что $\gamma = 1$, тогда полуширина отрезка, на котором лежит значение параметра,

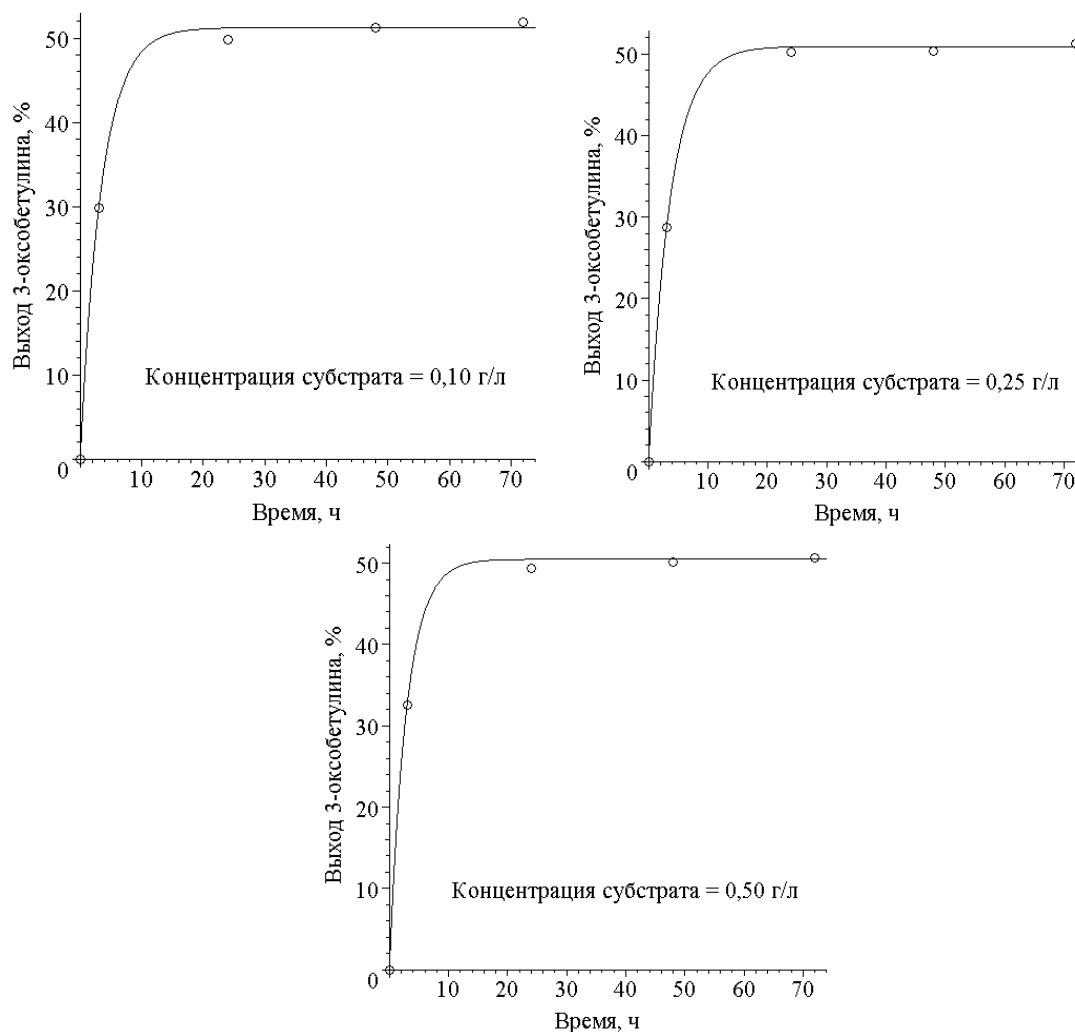


Рис. 2. Графики, построенные при обработке данных табл. 2

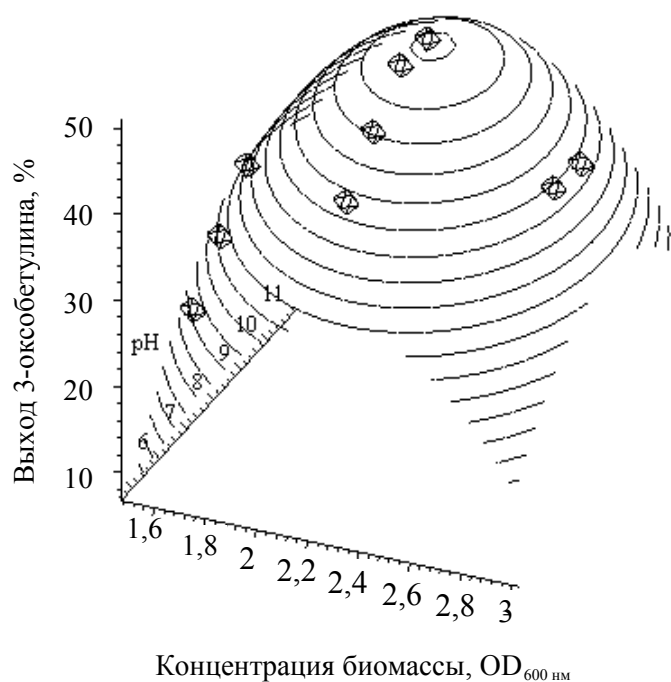


Рис. 3. Зависимость выхода 3-оксобетулина от рН буфера и концентрации биомассы

Таблица 3

Теоретические параметры (кинетические константы) процесса биотрансформации бетулина

Концентрация субстрата, г/л	a_1 , %	σ_1 , %	a_2 , ч	σ_2 , ч
0,10	51,2	0,43	3,45	0,17
0,25	50,9	0,35	3,62	0,14
0,50	50,5	0,45	2,89	0,15

есть оценка соответствующего среднеквадратичного отклонения, при этом вероятность $p = 0,4$. Полученные теоретические кривые (и экспериментальные точки) приведены на рис. 2. Из графиков видно хорошее соответствие экспериментальных данных и теоретических результатов, что подтверждает адекватность разработанной математической модели для описания процесса биотрансформации бетулина в условиях использования различных концентраций субстрата. Численные значения параметров a_1 , a_2 и их среднеквадратичных отклонений (σ) представлены в табл. 3. Максимальная приведенная погрешность составляет 0,45%.

Определение оптимальных значений уровня рН и концентрации клеточной биомассы проводили с учетом данных, представленных в табл. 1. Зависимость выхода целевого продукта от концентрации биомассы и рН буфера определяется соотношением (2).

Для нахождения параметров c_1 , c_2 , c_3 , c_4 , c_5 , c_6 применялся изложенный выше подход. В формулах (11)–(12) положено $\gamma = 2$, тогда вероятность $p = 0,3$. Полученная теоретическая поверхность (поверхность отклика [18]) и экспериментальные точки показаны на рис. 3. Численные значения параметров и их среднеквадратичных отклонений: $c_1 = -34,2\% / OD_{600 \text{ нм}}^2$, $c_2 = -1,12\% / \text{pH}^2$, $c_3 = -1,65\% / (\text{pH} \cdot OD_{600 \text{ нм}})$,

$c_4 = 168\% / \text{OD}_{600 \text{ нм}}$, $c_5 = 23,4\% / \text{pH}$, $c_6 = -241\%$, $\sigma_1 = 2,1\% / \text{OD}_{600 \text{ нм}}^2$,
 $\sigma_2 = 0,34\% / \text{pH}^2$, $\sigma_3 = 1,1\% / (\text{pH} \cdot \text{OD}_{600 \text{ нм}})$, $\sigma_4 = 6,5\% / \text{OD}_{600 \text{ нм}}$, $\sigma_5 = 4,0\% / \text{pH}$,
 $\sigma_6 = 16\%$. Применение данной математической модели позволяет определить оптимальные значения концентрации биомассы и pH буфера, при использовании которых достигается максимальный выход $y^{\max} = 50,2\%$ целевого продукта:
 $x_1^{\text{opt}} = 2,24 \text{ OD}_{600 \text{ нм}}$, $x_2^{\text{opt}} = 8,79 \text{ pH}$.

Выводы

В настоящей работе представлены результаты экспериментального исследования процесса биотрансформации бетулина в 3-оксобетулин нерастущими клетками *R. rhodochrous* ИЭГМ 66, разработан теоретический подход к математической обработке полученных данных. Представлены биомеханические аспекты процесса биотрансформации бетулина, связанные с характером взаимодействия бактериальных клеток и частиц субстрата. Построены математические модели, адекватно описывающие процесс биотрансформации бетулина в условиях использования буфера с различным уровнем pH, различных концентраций клеточной биомассы и исходного субстрата. Предложенный подход может быть эффективно применен при решении близких задач и использован для последующей оптимизации процесса биотрансформации бетулина на основе нерастущих бактериальных клеток.

Благодарности

Исследования поддержаны грантами Министерства образования и науки РФ (ГК № 16.518.11.7069) и Российского фонда фундаментальных исследований и Министерства промышленности, инноваций и науки Пермского края (№ 11-04-96012-р_урал_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куюкина М.С., Ившина И.Б., Осипенко М.А., Няшин Ю.И., Тюленёва А.Н., Серебренникова М.К., Криворучко А.В. Кинетическая модель процесса иммобилизации бактериальных клеток на твердом носителе // Российский журнал биомеханики. – 2007. – Т. 11, № 2 (52). – С. 79–87.
2. Линник Ю.В. Метод наименьших квадратов и основы математико-статистической теории обработки наблюдений. – М.: Физматгиз, 1962. – 336 с.
3. Тарасова Е.В., Гришко В.В., Ившина И.Б. Биокаталитическое получение 3-оксобетулина – ключевого интермедиата в синтезе фармакологически активных соединений // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. – № 4/1 (38). – С. 203–205.
4. Яворский Б.М., Детлаф А.А. Справочник по физике. – М.: Наука, 1979. – 944 с.
5. Alakurti S., Mäkelä T., Koskimies S. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2006. – Vol. 29, No. 1. – P. 1–13.
6. Chen J., Zheng Y.-G., Shen Y.-C. Biotransformation of p-methoxyphenylacetonitrile into p-methoxyphenylacetic acid by resting cells of *Bacillus subtilis* // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2008. – Vol. 50. – P. 147–153.
7. Gill P.E., Murray W., Wright M.H. Practical optimization. – London: Academic Press, 1981. – 509 p.
8. Kim, Tae-Kang, Jun-ho Choi, In-Koo Rhee. Purification and characterization of a cyclohexanol dehydrogenase from *Rhodococcus sp.* TK6 // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2002. – Vol. 12, No. 1. – P. 39–45.
9. Krier F., Kreit J., Millière J.-B. Characterization of partially purified alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus sp.* strain GK1 // Letters in Applied Microbiology. – 1998. – Vol. 26. – P. 283–287.
10. Liu J., Fu M.L., Chen Q.H. Biotransformation optimization of betulin into betulinic acid production catalysed by cultured *Armillaria luteo-virens* Sacc ZJUQH100-6 cells // Journal of Applied Microbiology. – 2010. – Vol. 110, No. 1. – P. 90–97.

11. Ludwig B., Akundi A., Kendall K. A long-chain secondary alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* ATCC 4277 // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1995. – Vol. 61, No. 10. – P. 3729–3733.
12. Muffler K., Leipold D., Scheller M.-C. Biotransformation of triterpenes // *Process Biochemistry*. – 2011. – Vol. 46, No. 1. – P. 1–15.
13. Orlov A.V., Khazipova G.R., Komissarova N.G., Shitikova O.V., Spirikhin L.V., Yunusov M.S. Trofimov synthesis of betulin derivatives with 2,3-annulated pyrrole // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2011. – Vol. 46, No. 6. – P. 906–909.
14. Parra A., Rivas F., Garcia-Granados A., Martinez A. Microbial transformation of triterpenoids // *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. – 2009. – Vol. 6, No. 4. – P. 307–320.
15. Santos R.C., Salvador J.A.R., Marín S. Novel semisynthetic derivatives of betulin and betulinic acid with cytotoxic activity // *Bioorganic and Medical Chemistry*. – 2009. – Vol. 17, No. 17. – P. 6241–6250.
16. van der Waerden B.L. *Mathematische statistik*. – Berlin – Göttingen – Heidelberg: Springer-Verlag, 1957. – 435 p.
17. Wang Z., Zhao F., Chen D., Li D. Biotransformation of phytosterol to produce androsta-diene-dione by resting cells of *Mycobacterium* in cloud point system // *Process Biochemistry*. – 2006. – Vol. 41. – P. 557–561.
18. Yang S., Zhang H. Optimization of cholesterol oxidase production by *Brevibacterium sp.* employing response surface methodology // *African J. of Biotechnology*. – 2012. – Vol. 11 (33). – P. 8316–8322.

MATHEMATICAL MODELLING OF BIOMECHANICS OF THE BETULIN BIOTRANSFORMATION PROCESS BY RESTING CELLS OF *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS* ИЭГМ 66

I.B. Ivshina, E.V. Tarasova, M.A. Osipenko, Y.I. Nyashin, V.V. Grishko, A.A. Gorbunov (Perm, Russia)

Triterpenoids are a class of natural compounds of an acyclic or polycyclic structure widely distributed in the plant world. Pentacyclic triterpenoid betulin, a typical representative of this class, is the most significant source of pharmacologically active compounds. Synthesis of new betulin derivatives is performed by both chemical and biocatalytic methods. A perspective intermediate in the synthesis of antitumor and antiviral agents is 3-oxobetulin, a product of direct oxidative biotransformation of betulin by *Rhodococcus* actinobacteria. In this work, an experimental research on betulin biotransformation to 3-oxobetulin by rodococci resting cells was carried out. The conditions of betulin biotransformation allowing for over 50% 3-oxobetulin yield were selected. The dynamics of 3-oxobetulin production in the betulin biotransformation process using different substrate concentrations was studied. Based on the experimental data, the kinetics of biotransformation depending on pH values, biomass and substrate concentrations were investigated. The phenomenological consideration of biomechanics of the betulin biotransformation process was carried out. Biomechanics is determined by the mechanics of the *Rhodococcus* cell motion and the surrounding fluid plus substrate motion. Using different modifications of the least squares method, a methodological approach to mathematical modelling was developed and kinetic constants of the oxidative betulin bioconversion process were determined. The experimental data were compared with those of the elaborated theoretical model. Selection of optimal parameters for betulin biotransformation is illustrated by the response surface model. The obtained results could be used to further optimize the 3-oxobetulin biocatalytic synthesis.

Key words: betulin, 3-oxobetulin, biomechanics, biotransformation, *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 66, response surface methodology, least squares method.

Получено 26 октября 2012