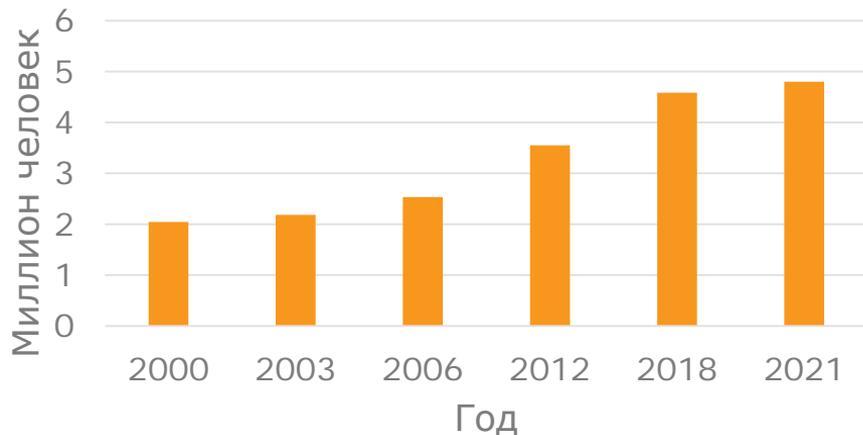


# Результаты применения математического моделирования при подборе условий культивирования дрожжевого штамма-продуцента проинсулина



Зухра Хасаншина  
Руководитель лаборатории генной инженерии и ферментации  
R&D центр ГЕРОФАРМ

# Сахарный диабет



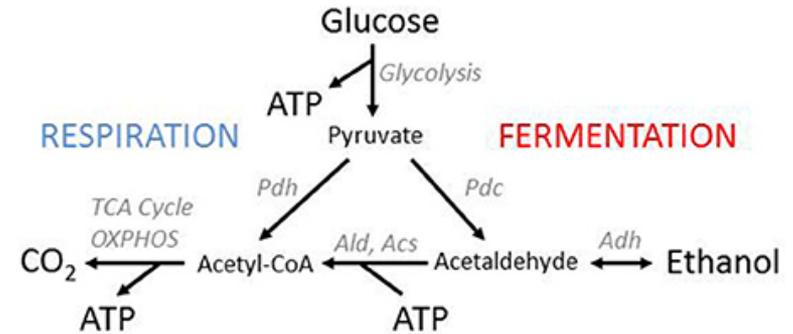
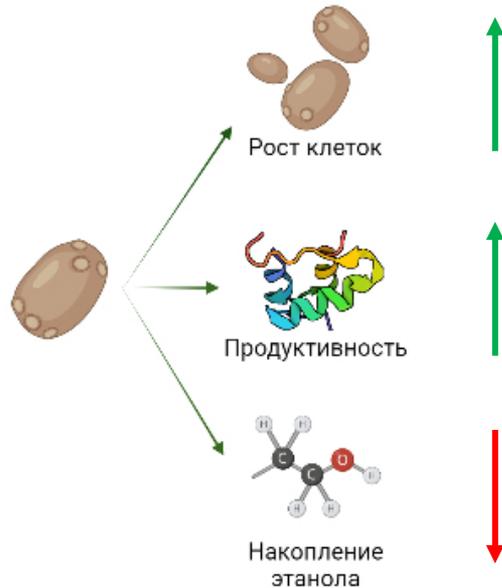
С 2000 года численность пациентов с сахарным диабетом в РФ выросла в 2,4 раза – с 2,043 млн до 4,8 млн человек

**1 из 11 взрослых**  
страдает  
сахарным диабетом



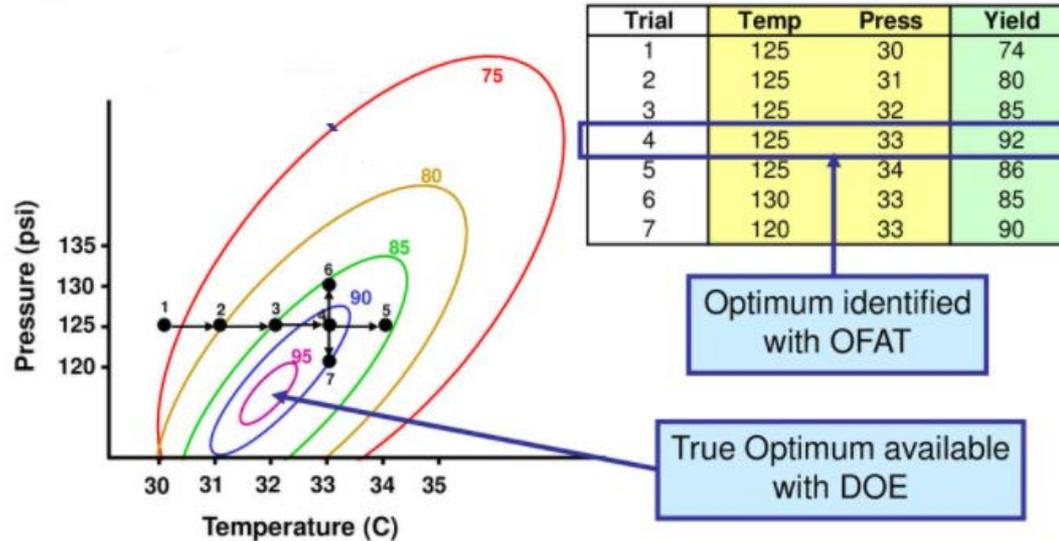
# Дрожжевая система экспрессии

*S. cerevisiae* - модельные дрожжи, которые применялись в качестве основного хозяина для производства фармацевтических препаратов.



# One factor at a time vs Design of experiments

Выход= f (температура; давление)



**DOE превосходит OFAT, поскольку позволяет сэкономить время и не проводить несколько экспериментов.**

# Этапы разработки условий культивирования

1

## Скрининг компонентов питательных сред и стартовых условий культивирования

- Основные компоненты среды – дрожжевой экстракт, пептон
- Условия культивирования – температура, pH
- Вспомогательные вещества

2

## Оптимизация компонентов питательных сред и стартовых условий культивирования

3

## Оптимизация стартовых условий в биореакторе: аэрация, концентрация посевного материала, концентрация глюкозы

# Скрининг факторов

## Скрининг условий культивирования 1 этап

| №  | С Глю, г/л | С ДЭ, г/л | С ПРП, г/л | С Био, мкг/л | С Ино, мг/л | Тем, °C | pH |
|----|------------|-----------|------------|--------------|-------------|---------|----|
| 1  | 10         | 0,5       | 1          | 400          | 2           | 20      | 4  |
| 2  | 60         | 0,5       | 1          | 400          | 200         | 20      | 8  |
| 3  | 10         | 20        | 1          | 400          | 200         | 35      | 4  |
| 4  | 60         | 20        | 1          | 400          | 2           | 35      | 8  |
| 5  | 10         | 0,5       | 30         | 400          | 200         | 35      | 8  |
| 6  | 60         | 0,5       | 30         | 400          | 2           | 35      | 4  |
| 7  | 10         | 20        | 30         | 400          | 2           | 20      | 8  |
| 8  | 60         | 20        | 30         | 400          | 200         | 20      | 4  |
| 9  | 10         | 0,5       | 1          | 2000         | 2           | 35      | 8  |
| 10 | 60         | 0,5       | 1          | 2000         | 200         | 35      | 4  |
| 11 | 10         | 20        | 1          | 2000         | 200         | 20      | 8  |
| 12 | 60         | 20        | 1          | 2000         | 2           | 20      | 4  |
| 13 | 10         | 0,5       | 30         | 2000         | 200         | 20      | 4  |
| 14 | 60         | 0,5       | 30         | 2000         | 2           | 20      | 8  |
| 15 | 10         | 20        | 30         | 2000         | 2           | 35      | 4  |
| 16 | 60         | 20        | 30         | 2000         | 200         | 35      | 8  |
| 17 | 35         | 10        | 15         | 1200         | 100         | 28      | 6  |
| 18 | 35         | 10        | 15         | 1200         | 100         | 28      | 6  |
| 19 | 35         | 10        | 15         | 1200         | 100         | 28      | 6  |

Дизайн дробный факторный

Отклики

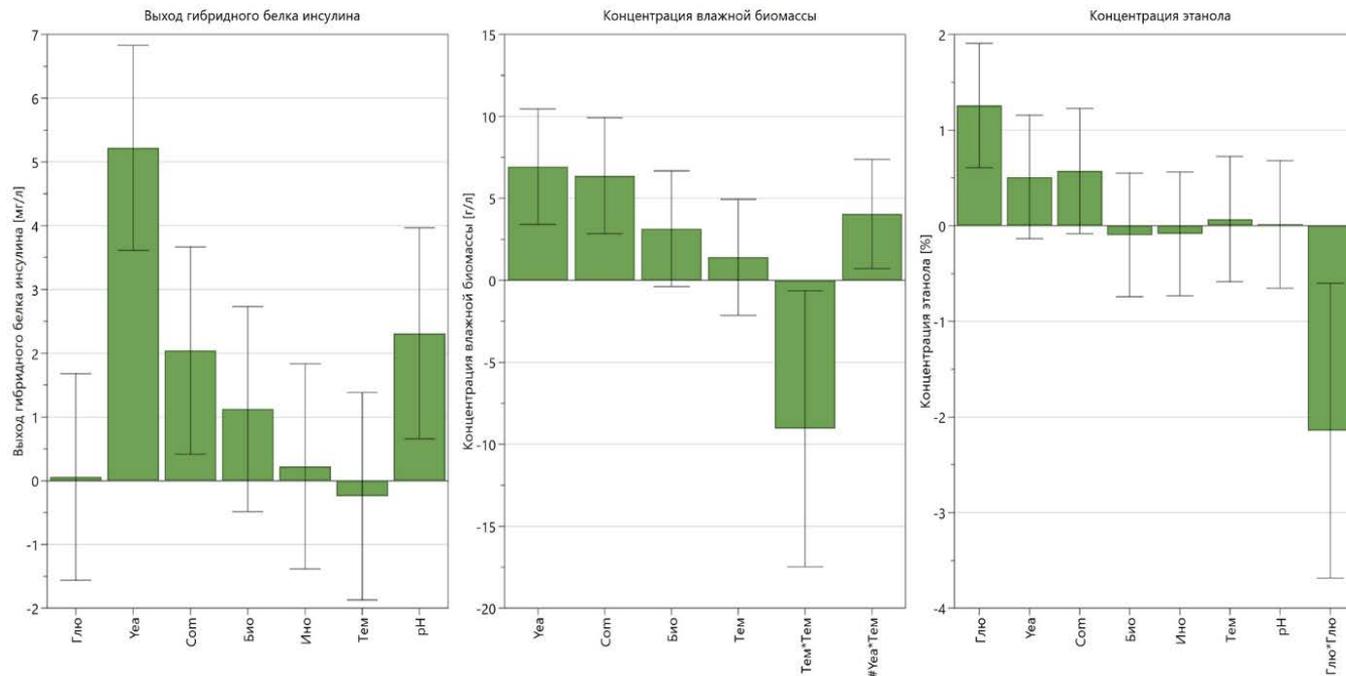
- Продуктивность, мг/л
- Накопление биомассы, г/л
- Накопление этанола, %

Критерии приемлемости модели

- $R^2 > 0,5$
- $Q^2 > 0,4$

# Скрининг факторов

На данном этапе построили модели и выбрали факторы, влияющие на исследованные отклики



# Оптимизация этап I

| №  | С ДЭ, г/л | С ПРП, г/л | Тем, °С | pH |
|----|-----------|------------|---------|----|
| 1  | 0,5       | 1          | 20      | 4  |
| 2  | 20        | 1          | 20      | 4  |
| 3  | 0,5       | 30         | 20      | 4  |
| 4  | 20        | 1          | 35      | 4  |
| 5  | 0,5       | 30         | 35      | 4  |
| 6  | 20        | 30         | 35      | 4  |
| 7  | 0,5       | 1          | 20      | 8  |
| 8  | 0,5       | 30         | 20      | 8  |
| 9  | 20        | 30         | 20      | 8  |
| 10 | 0,5       | 1          | 35      | 8  |
| 11 | 20        | 1          | 35      | 8  |
| 12 | 20        | 30         | 35      | 8  |
| 13 | 0,5       | 15,5       | 28      | 6  |
| 14 | 20        | 15,5       | 28      | 6  |
| 15 | 10,25     | 1          | 28      | 6  |
| 16 | 10,25     | 30         | 28      | 6  |
| 17 | 10,25     | 15,5       | 20      | 6  |
| 18 | 10,25     | 15,5       | 35      | 6  |
| 19 | 10,25     | 15,5       | 28      | 4  |
| 20 | 10,25     | 15,5       | 28      | 8  |
| 21 | 10,25     | 15,5       | 28      | 6  |
| 22 | 10,25     | 15,5       | 28      | 6  |
| 23 | 10,25     | 15,5       | 28      | 6  |
| 24 | 10,25     | 15,5       | 28      | 6  |

## Оптимизация условий культивирования I этап

Дизайн Reduced Central Composite Face

$$Y_{CCF} = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i X_i + \sum_{i < j}^3 a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 a_{ii} X_i^2,$$

Отклики

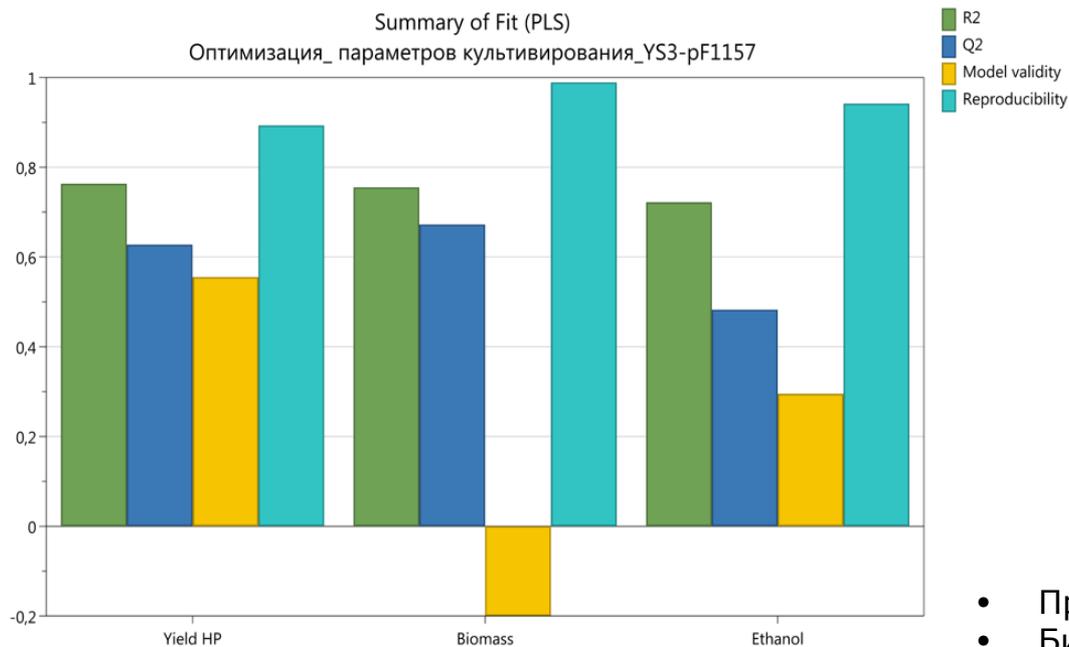
- Продуктивность, мг/л
- Накопление биомассы, г/л
- Накопление этанола, %

Критерии приемлемости модели

- $R^2 > 0,7$
- $Q^2 > 0,6$

# Оптимизация этап I

## Характеристика моделей для каждого отклика



- Продуктивность:  $R^2 = 0,76$ ,  $Q^2 = 0,63$ ;
- Биомасса:  $R^2 = 0,73$ ,  $Q^2 = 0,65$ ;
- Этанол:  $R^2 = 0,71$ ,  $Q^2 = 0,61$ .

# Оптимизация этап I

## Продуктивность

$$Y_1 = 8,91 + 1,74 \times X_1 + 2,54 \times X_2 + 0,84 \times X_3 - 0,98 \times X_4 \\ - 2,27 \times X_3^2 - 0,60 \times X_3 \times X_4$$

## Биомасса

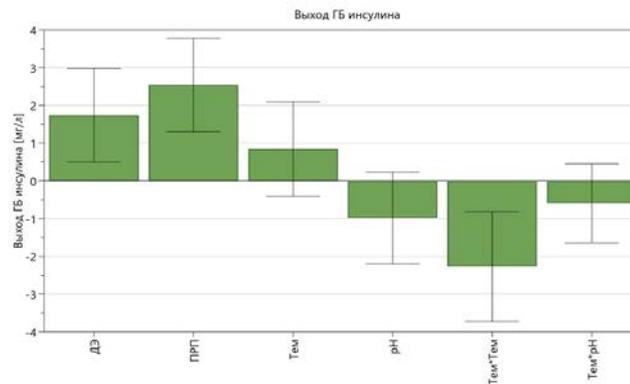
$$Y_2 = 21,65 + 4,52 \times X_1 + 7,34 \times X_2 + 4,95 \times X_3 - 4,70 \times X_4 \\ - 2,77 \times X_3 \times X_4$$

## Этанол

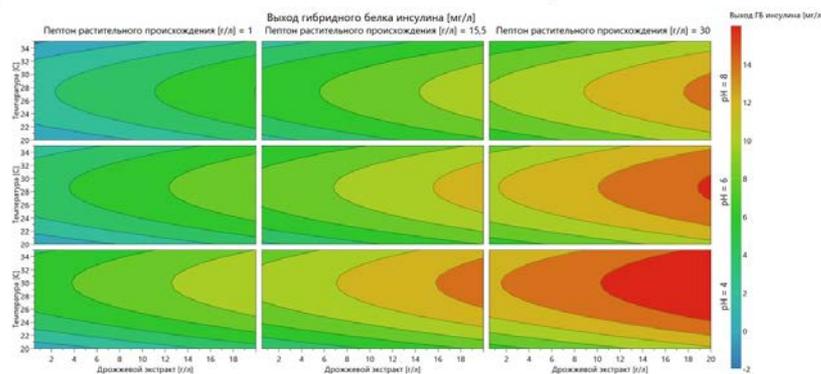
$$Y_3 = 0,81 + 0,15 \times X_1 + 0,15 \times X_2 - 0,22 \times X_3 - 0,09 \times X_4 \\ - 0,10 \times X_1 \times X_2 - 0,09 \times X_3 \times X_2$$

- X1 – концентрация дрожжевого экстракта;
- X2 – концентрация пептона;
- X3 – температура;
- X4 – pH.

A

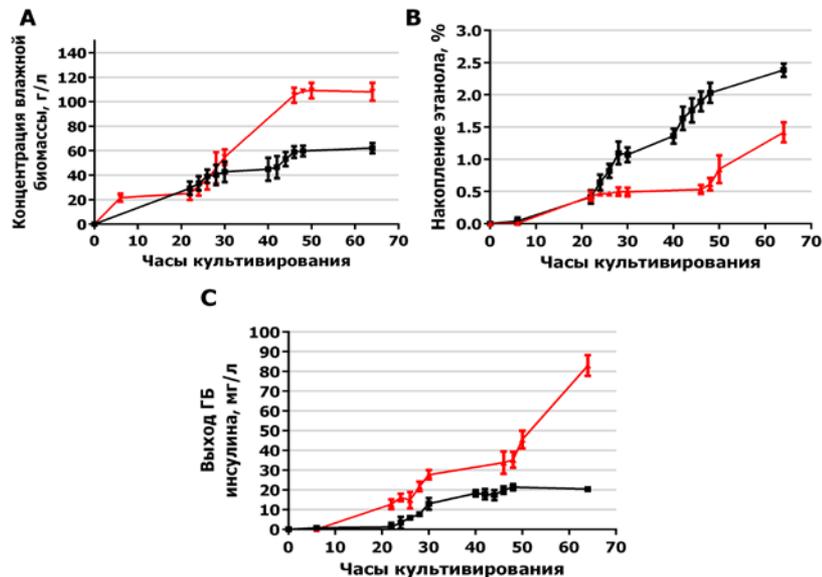


B



# Валидация

По результатам I этапа оптимизации была проведена валидация



**Биомасса**

60 г/л → 115 г/л

**Этанол**

2,5 % → 1,5 %

**Продуктивность**

20 мг/л → 80 мг/л

# Материалы и методы

| Exp No | Exp Name | Run Order | Incl/Excl | pO2 | Cglucose | temperature | ODstart |
|--------|----------|-----------|-----------|-----|----------|-------------|---------|
| 1      | N1       | 21        | Incl      | 30  | 0,5      | 25          | 0,1     |
| 2      | N2       | 14        | Incl      | 70  | 0,5      | 25          | 0,1     |
| 3      | N3       | 6         | Incl      | 30  | 3        | 25          | 0,1     |
| 4      | N4       | 1         | Incl      | 70  | 0,5      | 35          | 0,1     |
| 5      | N5       | 12        | Incl      | 30  | 3        | 35          | 0,1     |
| 6      | N6       | 9         | Incl      | 70  | 3        | 35          | 0,1     |
| 7      | N7       | 23        | Incl      | 30  | 0,5      | 25          | 5       |
| 8      | N8       | 10        | Incl      | 30  | 3        | 25          | 5       |
| 9      | N9       | 16        | Incl      | 70  | 3        | 25          | 5       |
| 10     | N10      | 15        | Incl      | 30  | 0,5      | 35          | 5       |
| 11     | N11      | 7         | Incl      | 70  | 0,5      | 35          | 5       |
| 12     | N12      | 22        | Incl      | 70  | 3        | 35          | 5       |
| 13     | N13      | 18        | Incl      | 30  | 1,75     | 30          | 2,55    |
| 14     | N14      | 8         | Incl      | 70  | 1,75     | 30          | 2,55    |
| 15     | N15      | 3         | Incl      | 50  | 0,5      | 30          | 2,55    |
| 16     | N16      | 11        | Incl      | 50  | 3        | 30          | 2,55    |
| 17     | N17      | 24        | Incl      | 50  | 1,75     | 25          | 2,55    |
| 18     | N18      | 4         | Incl      | 50  | 1,75     | 35          | 2,55    |
| 19     | N19      | 20        | Incl      | 50  | 1,75     | 30          | 0,1     |
| 20     | N20      | 13        | Incl      | 50  | 1,75     | 30          | 5       |
| 21     | N21      | 17        | Incl      | 50  | 1,75     | 30          | 2,55    |
| 22     | N22      | 19        | Incl      | 50  | 1,75     | 30          | 2,55    |
| 23     | N23      | 2         | Incl      | 50  | 1,75     | 30          | 2,55    |

Оптимизация условий  
культивирования II этап –  
подбор стартовых условий

Дизайн Reduced Central Composite  
Face

$$Y_{CCF} = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i X_i + \sum_{i < j}^3 a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^3 a_{ii} X_i^2,$$

Отклики

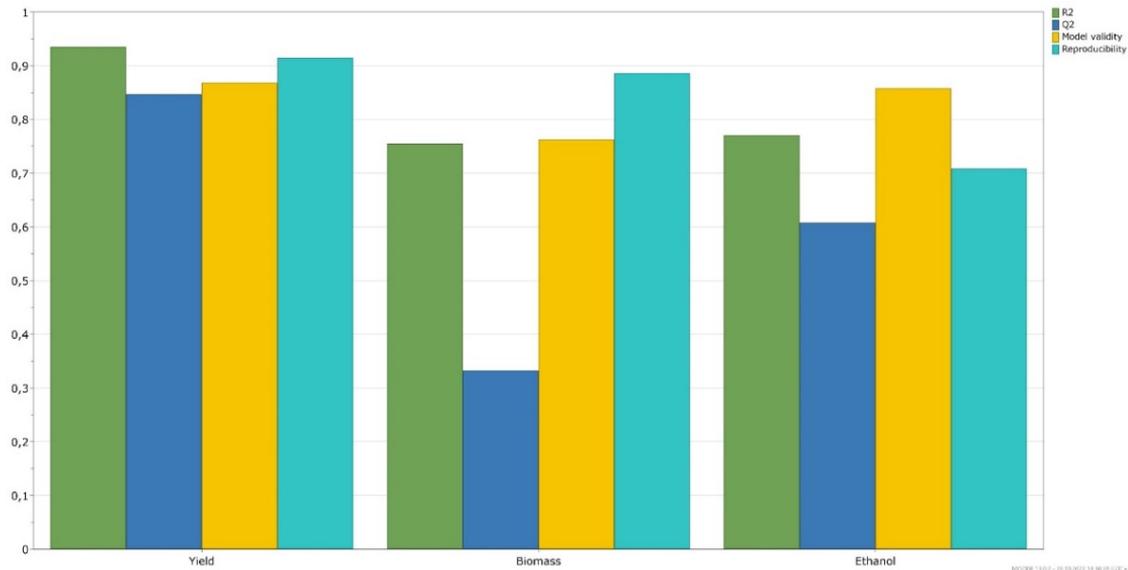
- Продуктивность, мг/л
- Накопление биомассы, г/л
- Накопление этанола, %

Критерии приемлемости модели

- $R^2 > 0,7$
- $Q^2 > 0,6$

# Оптимизация этап II

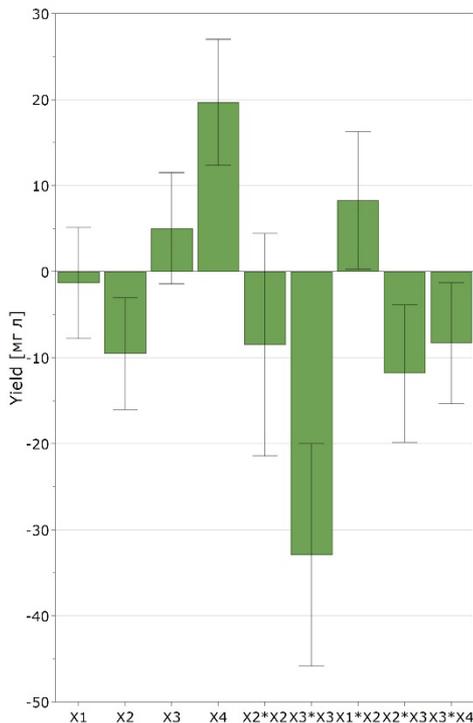
## Характеристика моделей для каждого отклика



- Продуктивность:  $R^2 = 0,94$ ,  $Q^2 = 0,85$ ;
- Биомасса:  $R^2 = 0,76$ ,  $Q^2 = 0,33$ ;
- Этанол:  $R^2 = 0,77$ ,  $Q^2 = 0,61$ .

# Оптимизация этап II

## Продуктивность



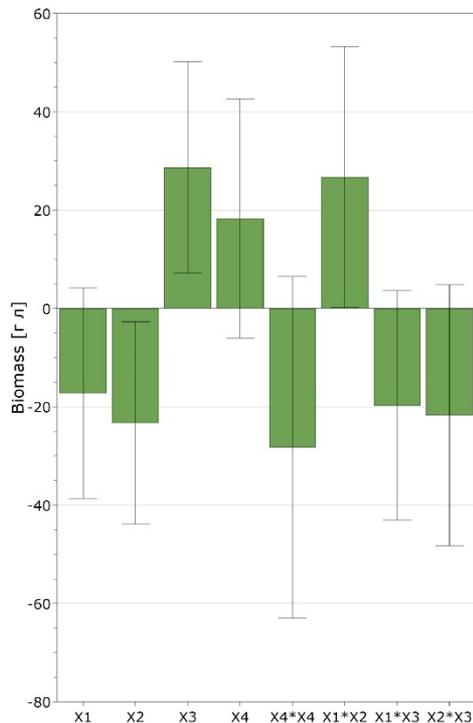
X1  
X2  
X3  
X4

| Yield       | Coeff. SC | Std. Err. | P           | Conf. int(±) |
|-------------|-----------|-----------|-------------|--------------|
| Constant    | 94,7886   | 4,04242   | 2,16163e-11 | 8,80764      |
| pO2         | -1,31539  | 2,96633   | 0,665337    | 6,46304      |
| Cglucose    | -9,551    | 2,98855   | 0,00769127  | 6,51145      |
| temperature | 5,03982   | 2,96633   | 0,11507     | 6,46304      |
| ODstart     | 19,6736   | 3,3635    | 7,84836e-05 | 7,3284       |
| X2*X2       | -8,49932  | 5,93265   | 0,177495    | 12,9261      |
| X3*X3       | -32,9143  | 5,93265   | 0,000126178 | 12,9261      |
| X1*X2       | 8,2717    | 3,66529   | 0,0434636   | 7,98594      |
| X2*X3       | -11,8427  | 3,66529   | 0,00720535  | 7,98594      |
| X3*X4       | -8,319    | 3,228     | 0,0242251   | 7,03317      |

$$Y_1 = 94,79 - 1,32 * X1 - 9,55 * X2 + 5,03 * X3 + 19,67 * X4 - 32,9 * X3^2 + 8,27 * X1 * X2 - 11,84 * X2 * X3 - 8,32 * X3 * X4$$

# Оптимизация этап II

## Биомасса

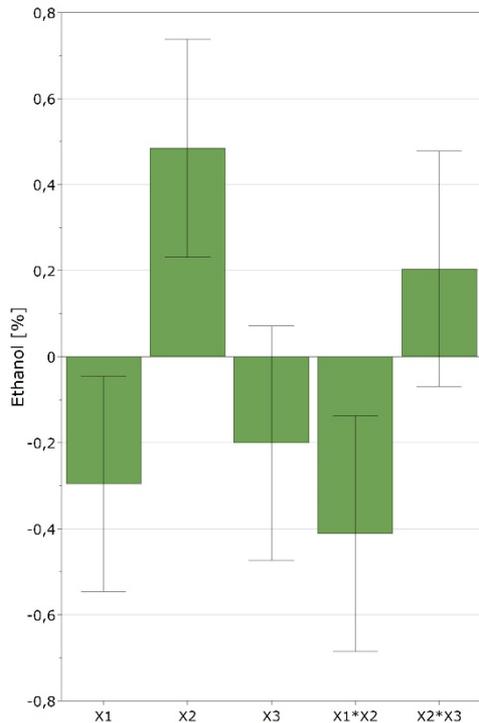


|    | Biomass     | Coeff. SC | Std. Err. | P           | Conf. int(±) |
|----|-------------|-----------|-----------|-------------|--------------|
|    | Constant    | 130,375   | 12,596    | 1,20462e-07 | 27,2119      |
| X1 | pO2         | -17,2     | 9,93583   | 0,10708     | 21,4651      |
| X2 | Cglucose    | -23,2857  | 9,52165   | 0,029458    | 20,5703      |
| X3 | temperature | 28,7      | 9,93583   | 0,0126839   | 21,4651      |
| X4 | ODstart     | 18,3      | 11,2662   | 0,128292    | 24,3391      |
|    | X4*X4       | -28,2961  | 16,0892   | 0,10213     | 34,7587      |
|    | X1*X2       | 26,725    | 12,277    | 0,0485161   | 26,5229      |
|    | X1*X3       | -19,7763  | 10,8123   | 0,0904158   | 23,3586      |
|    | X2*X3       | -21,725   | 12,277    | 0,100236    | 26,5229      |

$$Y_2 = 130,38 - 17,2 * X1 - 23,29 * X2 + 28,7 * X3 + 26,73 * X1 * X2$$

# Оптимизация этап II

## Этанол



X1  
X2  
X3

| Ethanol     | Coeff. SC | Std. Err. | P           | Conf. int(±) |
|-------------|-----------|-----------|-------------|--------------|
| Constant    | 0,973484  | 0,0927053 | 1,01761e-07 | 0,200278     |
| pO2         | -0,295823 | 0,115607  | 0,0237899   | 0,249754     |
| Cglucose    | 0,484683  | 0,117242  | 0,0011758   | 0,253286     |
| temperature | -0,201029 | 0,125971  | 0,134538    | 0,272144     |
| X1*X2       | -0,410978 | 0,126595  | 0,00637224  | 0,273492     |
| X2*X3       | 0,204022  | 0,126595  | 0,131047    | 0,273492     |

$$Y_3 = 0,97 - 0,30 * X1 + 0,48 * X2 - 0,41 * X1 * X2$$

# Результаты

Применяя DoE с первых этапов разработки условий культивирования продуктивность увеличена с 20 до 124 мг/л

66  
экспериментов



1

## Скрининг компонентов питательных сред

- 19 экспериментов
- 7 факторов

2

## Оптимизация I этап

- 24 эксперимента
- 4 фактора

3

## Оптимизация II этап

- 23 эксперимента
- 4 фактора

# Спасибо за внимание!



 +7(812)703-79-75

+7(912)702-41-60

Хасаншина Зухра

 [geropharm.ru](http://geropharm.ru)

 [inform@geropharm.ru](mailto:inform@geropharm.ru)  
[Zuhra.hasanshina@geropharm.com](mailto:Zuhra.hasanshina@geropharm.com)

 [@geropharm\\_official](https://www.instagram.com/geropharm_official)

 [facebook.com/geropharm](https://facebook.com/geropharm)

