



Kauno technologijos universitetas

Elektros ir elektronikos fakultetas

**Tikslinio produkto koncentracijos prognozavimo modelių
tyrimas periodinėse su pamaitinimu *E. coli* kultivacijose**

Baigiamasis magistro projektas

Benas Kemėšis

Projekto autorius

prof. dr. Renaldas Urniežius

Vadovas

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Elektros ir elektronikos fakultetas

**Tikslinio produkto koncentracijos prognozavimo modelių
tyrimas periodinėse su pamaitinimu *E. coli* kultivacijose**

Baigiamasis magistro projektas

Valdymo technologijos (6211EX014)

Benas Kemėšis

Projekto autorius

prof. dr. Renaldas Urniežius

Vadovas

prof. dr. Vytautas Galvanauskas

Recenzentas

Kaunas, 2022



Kauno technologijos universitetas

Elektros ir elektronikos fakultetas

Benas Kemėšis

Tikslinio produkto koncentracijos prognozavimo modelių tyrimas periodinėse su pamaitinimu *E. coli* kultivacijose

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad:

1. baigiamąjį projektą parengiau savarankiškai ir sąžiningai, nepažeisdama(s) kitų asmenų autoriaus ar kitų teisių, laikydamasi(s) Lietuvos Respublikos autorių teisių ir gretutinių teisių įstatymo nuostatų, Kauno technologijos universiteto (toliau – Universitetas) intelektinės nuosavybės valdymo ir perdavimo nuostatų bei Universiteto akademinės etikos kodekse nustatytų etikos reikalavimų;
2. baigiamajame projekte visi pateikti duomenys ir tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti teisėtai, nei viena šio projekto dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar elektroninių šaltinių, visos baigiamojo projekto tekste pateiktos citatos ir nuorodos yra nurodytos literatūros sąrašė;
3. įstatymų nenumatytų piniginių sumų už baigiamąjį projektą ar jo dalis niekam nesu mokėjęs (-usi);
4. suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo ar kitų asmenų teisių pažeidimo faktui, man bus taikomos akademinės nuobaudos pagal Universitete galiojančią tvarką ir būsiu pašalinta(s) iš Universiteto, o baigiamasis projektas gali būti pateiktas Akademinės etikos ir procedūrų kontrolieriaus tarnybai nagrinėjant galimą akademinės etikos pažeidimą.

Benas Kemėšis

Patvirtinta elektroniniu būdu

Kemėšis Benas. Tikslinio produkto koncentracijos prognozavimo modelių tyrimas periodinėse su pamaitinimu *E. Coli* kultivavimuose. Magistro baigiamasis projektas vadovas prof. Renaldas Urniežius; Kauno technologijos universitetas, Elektros ir elektronikos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): elektronikos inžinerija, inžinerijos mokslai.

Reikšminiai žodžiai: *biotechnologija, tikslinis produktas, matematiniai modeliai*.

Kaunas, 2022. 49 p.

Santrauka

Biotechnologiniai pramoniniai procesai siekia išgauti kiek įmanoma daugiau kokybiškesnio tikslinio produkto. Tačiau šiuo metu nėra techninių priemonių, leidžiančių tiesiogiai įvertinti produkto koncentraciją ląstelių kultivavimo proceso metu. Problemai spręsti naudojami programiniai jutikliai, paremti matematiniais modeliais, kurie naudoja informaciją iš realiu laiku matuojamų proceso biotechnologinių parametrų ir būsenos kintamųjų.

Darbe aprašyti ir realizuoti skirtingų struktūrų matematiniai modeliai, skirti įvertinti *E. Coli* ląstelių kultūrų sintezuojamo rekombinantinio baltymo koncentraciją periodinių su pamaitinimu kultivavimo procesų metu. Darbe realizuoti literatūros šaltiniuose pateikti mechanistiniai modeliai, taip pat sudaryti empiriniai („juodosios dėžės“) ir hibdriniai modeliai.

Pateiktos modelių parametrų indentifikavimo procedūros mechanistiniams modeliams ir mokymo algoritmai dirbtiniu neuroniniu tinklu grįstiems empiriniams ir hibridiniams modeliams. Modeliai ištirti naudojant realius eksperimentinius duomenis, tyrimų rezultatai palyginti remiantis pasirinktais tikslumo kriterijais.

Kemešis, Benas. Investigation of Concentration Estimation Models for Target Product in *E. coli* Fed-batch Bio-synthesis. Master's Final Degree Project supervisor prof. Renaldas Urniežius; Faculty of Electrical and Electronics Engineering, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Electronics engineering, Engineering science.

Keywords: *biotechnology, target product, mathematical models.*

Kaunas, 2022. 49 p.

Summary

Biotechnological industrial processes aim to produce as much high-quality desired (target) product as possible. However, it is impossible to directly assess target product concentration during cell cultivations. To solve this problem, engineers use software sensors that employ mathematical models which use information from physical measurements and state variables captured during the process.

The paper describes and implements mathematical models with different structures to estimate the concentration of the target protein during fed-batch cultivations of *E. Coli* cell cultures. Mechanistic models described in the literature are implemented, together with developed empirical and hybrid models.

Paper presents the procedure for identifying model parameters for mechanistic models and training algorithms for empirical and hybrid models based on artificial neural networks. The models are tested with experimental data and their results are compared according to selected criteria.

Turinys

Lentelių sąrašas	7
Paveikslų sąrašas	8
Įvadas.....	9
1. Literatūros analizė.....	10
1.1. Biotechnologijos sritis	10
1.2. <i>E. coli</i> bakterija.....	10
1.3. Kultivavimo procesas	12
1.4. Programiniai jutikliai bioprocusuose	14
1.4.1. Tradiciniai matematiniai modeliai.....	15
1.4.2. Empiriniai modeliai	16
1.4.3. Daugialypiai statistiniai modeliai	18
1.4.4. Hibridiniai modeliai.....	20
2. Metodinė dalis.....	22
2.1. Eksperimentiniai duomenys	22
2.2. Balanso lygtys produkto koncentracijos įvertinimui	23
2.2.1. p_{max} modelis	23
2.2.2. Kriterijai modelių lyginimui.....	25
2.2.3. Parametrų identifikavimas.....	27
2.3. Dirbtinis neuroninis tinklas	29
2.3.1. Perdavimo funkcijos	30
2.3.2. Mokymo algoritmas.....	32
2.3.3. Mokymo imtis	33
2.3.4. Tinklo struktūros parinkimas.....	35
2.4. Hibridinis modelis	37
3. Tyrimo rezultatai.....	38
3.1. Balanso lygčių modelių rezultatai	38
3.2. Neuroninio tinklo modelio rezultatai.....	39
3.3. Hibridinio modelio rezultatai	41
3.4. Apibendrinti rezultatai.....	43
Rezultatai ir išvados	45
Literatūros sąrašas	46

Lentelių sąrašas

1 lentelė. Ląstelių kultivavimo sąlygos	22
2 lentelė. Lyginami p_{max} modeliai ir jų parametrai	26
3 lentelė. Produkto koncentracijos įvertinimo modelių, pagrįstų balanso lygtimis, identifikuoti parametrai ir AIC kriterijaus vertės	38
4 lentelė. Produkto modelių vidutinės absoliutinės paklaidos ir nuokrypių kvadratų sumos	38
5 lentelė. DNT įėjimo kintamųjų parinkimas remiantis RSS kriterijumi kai tinklo išėjimas yra tikslinio produkto koncentracija	39
6 lentelė. Daugiasluoksnio perceptrono, su vienu paslėptu sluoksniu, produkto koncentracijos (prognozavimo rezultatai esant skirtingiems neuronų skaičiui n paslėptame sluoksnyje	40
7 lentelė. Hibridinio modelio DNT įėjimo kintamųjų parinkimas remiantis RSS kriterijumi, kai tinklo išėjimas yra tikslinio produkto koncentracijos kitimo greitis qpx	41
8 lentelė. Hibridinio modelio neuroninio tinklo su vienu paslėptu sluoksniu produkto koncentracijos kitimo greičio qpX prognozavimo rezultatai esant skirtingiems neuronų skaičiui paslėptame sluoksnyje	42

Paveikslų sąrašas

1.1.1 pav. Skirtingos biotechnologijos sritys.....	10
1.2.1 pav. Skirtingos ląstelių augimo fazės	11
1.3.1 pav. Principinė pilno biotechnologinio ląstelių auginimo proceso ir jo dalių schema	12
1.3.2 pav. Pertraukiamos fermentacijos su pamaitinimu atvaizdavimas, ir pagrindinių fizikinių dydžių kitimo kreivės proceso metu.....	13
1.4.1 pav. Programinio jutiklio principinis modelis	14
1.4.2 pav. Rekursinio būsenos įvertinimo modelio schema	16
1.4.3 pav. Neuroninio tinklo ir EKF biomasės koncentracijos X estimavimo paklaidos esant 10% triukšmo amplitudei.....	17
1.4.4 pav. DNT grįstu programinio jutiklio prognozavimo rezultatai: biomasės (kairėje) ir penicilino (dešinėje) koncentracijos	18
1.4.5 pav. Principinių komponentų analizės panaudojimas dimensijų sumažinimui	19
1.4.6 pav. PLS modelio prognozavimo rezultatai: fenoksato rūgšties koncentracija (kairėje) ir penicilino koncentracija (dešinėje).....	19
1.4.7 pav. Hibridinio modelio, skirto produktui ir biomasei prognozuoti, struktūra iš balanso lygčių ir ANN modelių, paklaidos lyginant su tradiciniu modeliu.....	20
1.4.8 pav. <i>PLS</i> ((a) pav.) ir hibridinių (b) modelių biomasės ir penicilino koncentracijos prognozavimo palyginimas su realiais duomenimis.....	21
2.2.1 pav. Santykinio ląstelių aktyvumo m priklausomybė nuo ląstelių amžiaus.	24
2.2.2 pav. Modelio „pririšimo“ prie duomenų iliustracija (dešinys paveikslukas), kai taikant daugybę parametru, modelio prognozuojamų verčių tikėtumo funkcija yra maksimizuota ir prognozuojamos vertės beveik sutampa su duomenimis	26
2.2.3 pav. Gradientinio metodo trūkumo iliustracija ieškant lokalaus ekstremumo (šiuo atveju, funkcijos minimumo)	29
2.2.4 pav. <i>GRG</i> metodas su atsitiktinę paiešką, kur A ir D yra atsitiktinai sugeneruotos pradinės reikšmės.....	29
2.3.1 pav. Daugiasluoksnio tiesinio sklaidimo tinklo pavyzdys, su keturiais įėjimo neuronais, penkiais paslėpto sluoksnio neuronais ir dvejais išėjimo neuronais.....	30
2.3.2 pav. <i>ReLU</i> perdavimo funkcija. Visos neigiamos svorių sumos vertės generuoja signalą, lygų nuliui, o teigiama vertė tampa išėjimo signalu	31
2.3.3 pav. <i>ReLU</i> ir <i>Leaky ReLU</i> perdavimo funkcijų skirtumai. Tiesės koeficientas a apibrėžia, kokio stiprumo signalą generuos perceptronas, kai jo įėjimų svorių suma yra neigiama	32
2.3.4 pav. Skirtingi <i>DNT</i> mokymo atvejai.....	34
2.3.5 pav. Principinė neuroninio tinklo įėjimų pasirinkimo algoritmo schema	35
2.3.6 pav. <i>Akaike</i> kriterijaus A priklausomybė nuo neuroninio tinklo parametru skaičiaus, kai naudojami 50 eksperimentiniai duomenų taškai	37
2.4.1 pav. Hibridinio modelio struktūra koncentracijai prognozuoti.	37
3.1.1 pav. Balansų lygtimis grįstų modelių <i>RSS</i> ir <i>MAE</i> kriterijų palyginimas.....	39
3.2.1 pav. Galutinio <i>DNT</i> modelio, tikslinio produkto koncentracijai įvertinti, struktūra	40
3.2.2 pav. <i>DNT</i> modelio mokymas ir rezultatai.....	41
3.3.1 pav. Realizuoto hibridinio modelio principinė schema	42
3.3.2 pav. <i>DNT</i> modelio mokymas ir rezultatai.....	43
3.4.1 pav. Skirtingų tipų geriausių rezultatų pasiekusių modelių palyginimas naudojant validavimo imties eksperimentus	44

Įvadas

Biotechnologijos ir bioinžinerija vaidina vis didesnę vaidmenį šiuolaikinėje pramonėje ir sveikatos sektoriuose. Daugelio pramoninių biotechnologijos procesų kontrolė realiu laiku yra sudėtingas bioinžinerijos uždavinys. Pagrindinės problemos yra susijusios su tikslios informacijos apie proceso būseną surinkimu, proceso stebėjimu ir valdymu. Auginami mikroorganizmai turi savitus bruožus, pradedant nuo mitybos ir augimo terpių iki skirtingų specifinių augimo greičių. Pramonėje trūksta tikslų realaus laiko matavimų, esminių proceso kokybei ir eigai įvertinti. Kiekvieno pramoninio bioproceso vienas svarbiausių matavimų yra auginamų ląstelių sintezuojamo tikslinio produkto koncentracija. Pastarąjį dydį išmatuoti tiesiogiai proceso metu yra neįmanoma. Norint išmatuoti sintezuojamo produkto koncentraciją reikia periodiškai imti kultivuojamos terpės mėginius ir juos analizuoti proceso metu arba jam pasibaigus. Mėginio analitika dažnai yra ilgai trunkantis ir sudėtingas procesas. Tuo pačiu, analitikai skirta aparatūrinė įranga ir reikalingos medžiagos didina proceso kaštus. Problemai spręsti taikomas alternatyvus sprendimas – programinių jutiklių pritaikymas netiesioginių dydžių matavimui ir įvertinimui. Programiniai jutikliai yra grįsti matematiniais modeliais, taikančiais tiesiogiai bioproceso metu matuojamų dydžių informaciją (kaip temperatūra, ištirpusio deguonies kiekis, pH, išeinančių dujų ir biomasės koncentracijos), sudaryti kintamųjų tarpusavio ryšius, kurie netiesiogiai galėtų įvertinti ir prognozuoti neišmatuojamą dydį. Matematiniais modeliais realizuoti yra taikomos matematinės išraiškos nuo tradicinių masės, energijos balansų lygčių iki empirinių, juodosios dėžės modelių, kaip dirbtiniai neuroniniai tinklai. Tiriamojo darbo metu siekiama realizuoti skirtingus matematinius modelius, kurie galėtų kuo tiksliau įvertinti *Escherichia coli* ląstelių kultivavimo procesų metu sintezuojamo rekombinantinio baltymo koncentraciją kultūriniame skystyje.

Darbo tikslas. Realizuoti skirtingus matematinius modelius tikslinio baltymo koncentracijai įvertinti *E. Coli* kultivacijose ir palyginti juos naudojant eksperimentinius duomenis.

Darbo uždaviniai:

1. Realizuoti skirtingus balanso lygtimis paremtus matematinius modelius produkto koncentracijai įvertinti ir identifikuoti modelių parametrus.
2. Išvystyti dirbtiniu neuroniniu tinklu grįstą matematinį modelį, parenkant tinkamus tinklo įėjimus ir neuronų skaičių. Validuoti neuroninį tinklą su eksperimentiniais duomenimis.
3. Sukurti hibridinį modelį naudojant masės balanso lygtis ir dirbtinį neuroninį tinklą, ir palyginti modelių paremto prognozavimo rezultatus su eksperimentiniais.
4. Palyginti modelių prognozavimo tikslumo (kokybės) rezultatus remiantis pasirinktais vertinimo kriterijais.

Pirmajame skyriuje aprašomas tiriamas procesas ir apžvelgiami skirtingus matematinius modelius produkto koncentracijai įvertinti pritaikę darbai. Antrajame skyriuje pateikiami balanso lygčių modeliai produkto formavimuisi, aprašomas taikomas dirbtinis neuroninis tinklas, jo struktūros parinkimas ir mokymo algoritmas, pateikiamas hibridinis modelis. Trečiame skyriuje pateikiami modelių rezultatai su eksperimentiniais duomenimis, identifikuoti parametrai, parinkti neuroninių tinklų įėjimai ir neuronų kiekiai paslėptuose sluoksniuose.

1. Literatūros analizė

1.1. Biotechnologijos sritis

Biotechnologinių procesų svarba žmogaus išgyvenimui ir įvairių poreikių tenkinimui aptinkama nuo pat žmonijos istorijos [1]. Ketvirtame tūkstantmetyje prieš mūsų erą egiptiečiai buvo pirmieji žmonės, kurie panaudojo biotechnologinius procesus, gamindami alų ir kepdami duoną. Tuo tarpu kinai dar antrame tūkstantmetyje prieš Kristų atrado etanolio distiliavimo metodą [1].

Biotechnologinis proveržis prasidėjo XIX a., atsiradus platesniam supratimui apie biologines sistemas, jų komponentus ir reakcijas. Pirmieji reikšmingieji fermentacijos procesai buvo susiję su penicilino, laikomo pirmuoju antibiotiku, biosinteze [2]. Sėkmingai pritaikius penicilino antibiotikus gydyti ligoms, biotechnologija įgijo vis didesnę susidomėjimą ir finansavimą.

XXI a. amžiuje biotechnologija ir jos teikiami privalumai aprėpia ne vieną sritį. Pagal taikymą, biotechnologija skirstoma į kelias kategorijas, kurios yra neretai atskiriamos skirtingų spalvų pavadinimais [3] (1.1.1 pav.). Viena pagrindinių sričių, susijusi su šiuo tiriamuoju darbu, yra raudonoji biotechnologija. Ji apima medicinos, sveikatos apsaugos, farmacijos biotechnologijos šakas. Raudonosios biotechnologijos tikslas yra įvairių vaistinių medžiagų kūrimas, gamyba bei paieška, ligų diagnozavimas ir jų gydymas, bendras ligonių gyvenimo kokybės gerinimas. Prie raudonosios biotechnologijos priskiriamos tokios sritys kaip farmakogenomika, organizmų, gaminančių antibiotikus, vakcinas kūrimas, klinikiniai tyrimai, ir molekulinė medicina bei diagnostika.

Spalva	Apimamos sritys
Raudona	Sveikata, medicina, diagnostika
Geltona	Maisto biotechnologija
Mėlyna	Vandens, pakrančių, jūrinė biotechnologija
Žalia	Žemės ūkio, aplinkos biotechnologija (biokuras, biotrašos, bioperdirbimas, geomikrobiologija)
Ruda	Sausų zonų ir dykumų biotechnologija
Tamsi	Bioterorizmas, bionusikaltimai, biokaras
Purpurinė	Patentai, publikacijos, išradimai
Balta	Genais grindžiama biopramonė
Auksinė	Bioinformatika, nanobiotechnologija
Pilka	Klasikinė fermentacija, bioprocėsų technologijos

1.1.1 pav. Skirtingos biotechnologijos sritys

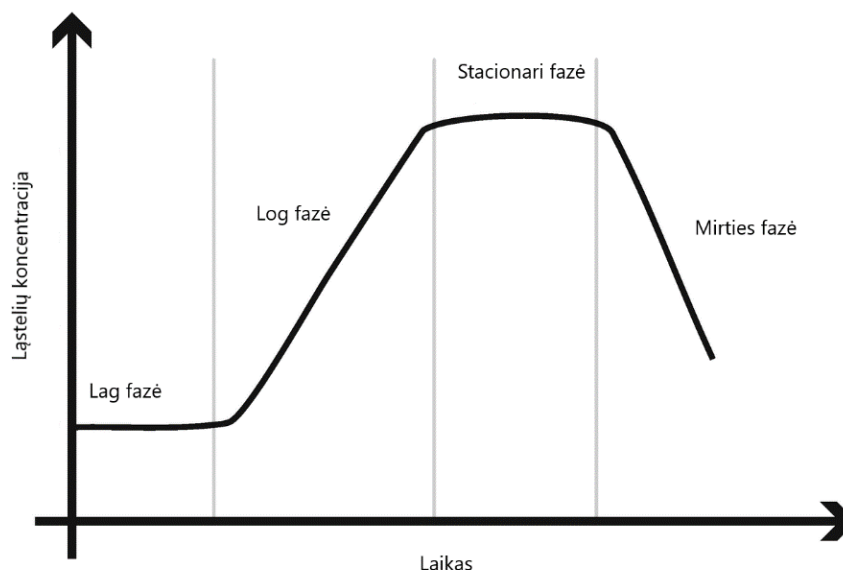
1.2. *E. coli* bakterija

Raudonoji biotechnologija sieja molekulinės medicinos ir farmacijos sritys, kuriose kuriami vaistai ir jų sudedamosios dalys, pasitelkiant genų inžineriją ar manipuliuojant baltymais įvairiuose organizmuose. Tokio organizmo pavyzdys yra *Escherichia coli* (toliau, *E.coli*) bakterija. *E.coli* yra vienas labiausiai tyrinėjamų ir naudojamų modeliųjų organizmų biotechnologijoje dėl savo galimybės gaminti fermentus ir rekombinantinius baltymus [4]. Rekombinantinis baltymas yra manipuluojama baltymo forma, kuri yra kuriama siekiant pagaminti didelius baltymų kiekius, modifikuoti genų sekas ir taip gaminti komercinius produktus. Rekombinantinio baltymo sudarymas atliekamas specializuotose transformavimo vektoriuose (specialiose molekulėse) [5]. Esminė šių vektorių savybė yra ta, kad jie geba replikuotis ląstelėje šeimininkėje, į kurią yra įterpiami. Tokiu būdu yra užkoduotos

darbe tiriamos *E.coli ląstelių kultūros*. Pastarųjų kultivavimo metu sintezuojami rekombinantiniai baltymai sėkmingai naudojami gaminti vaistiniams preparatams, kuriuose yra pagrindinė veiklioji medžiaga [6].

E. Coli ląstelės svarbiausia savybė yra jos sugebėjimas sparčiai daugintis dalinantis (dvigubėjimas ar skilimas) [7, 8]. Tai procesas, kurio metu iš vienos ląstelės atsiskiria nauja, dukterinė ląstelė. *E. coli* bakterija yra patraukli tyrimams, kadangi jos dauginimuisi vykti užtenka laboratorinių sąlygų, naudojant paprastą auginimo terpę, susidedančią iš nedidelių kiekių mineralinių druskų ir gliukozės, kaip anglies šaltinio [7].

Augant optimaliomis auginimo terpės ir aplinkos sąlygomis, *E. coli* dvigubėjimo laikas yra apie 20 minučių. Tai lemia, jog *E. coli* ląstelės stacionarią augimo fazę gali pasiekti greičiau nei kitos [8]. Stacionari augimo fazė yra viena iš keturių augimo fazių, su kuriomis susiduriama kultivavimo metu: latentinė (*lag*) fazė, logaritminė (*log*) fazė, minėtoji stacionari fazė ir mirties fazė [15] (1.2.1 pav.).



1.2.1 pav. Skirtingos ląstelių augimo fazės

Kultivavimo pradžioje ląstelės yra *lag* fazėje, kurios metu vyksta adaptacija prie auginimo terpės ir sudarytų augimo sąlygų. Esant *lag* fazėje ląstelės praktiškai neauga. Laiko tarpas, kurį ląstelės praleidžia šioje fazėje, priklauso tiek nuo į auginimo terpę suleistos pradinės ląstelių koncentracijos, tiek nuo pačios terpės ir ląstelių.

Prasidėjus ląstelių dalijimuisi, procesas pereina į *log* fazę, kurioje ląstelių koncentracija didėja eksponentiškai. Čia kiekviena ląstelių kultūra turi savo specifinį augimo greitį μ (1/h), kuris priklauso nuo įvairių aspektų, susijusių su auginimo terpe (esančių ištirpintų mineralų, maistinių medžiagų (substrato) koncentracijos ir kita) [9]:

$$\mu = \frac{\ln \left(\frac{x_2}{x_1} \right)}{t_2 - t_1}, \quad (1)$$

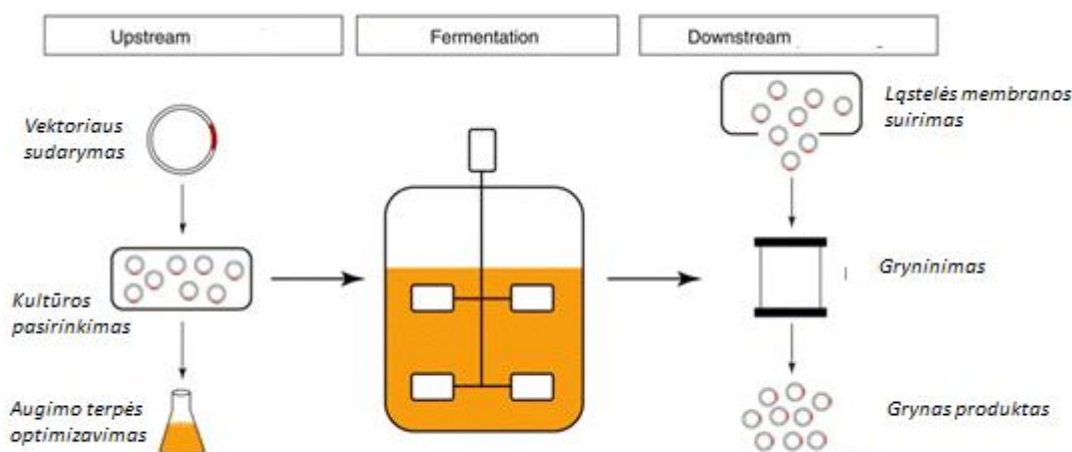
kur x_1 ir x_2 yra biomasės koncentracijos laiko momentais t_2 ir t_1 . Likusios augimo fazės yra stacionari ir mirties fazės. Pirmojoje, ląstelių koncentracija išlieka tokia pati, kadangi mirstančių ir naujai besidauginančių ląstelių skaičius tampa apytiksliai lygus. Galiausiai, baigiantis maistinėms medžiagoms ir praėjus ilgesniam laikui, kultivuojamos ląstelės pradeda mirti. Natūralu, jog pramonėje siekiant užauginti kuo įmanomai didesnę biomasės kiekį, šie du etapai yra nepageidaujami. Pramonėje pritaikomi įvairūs maistingųjų medžiagų tiekimo profiliai, terpės aplinkos parametru palaikymas ir valdymo būdai, kurie įmanoma ilgiau išlaikytų ląsteles eksponentinėje fazėje [10, 11].

Darbe tiriamų procesų metu, ląstelėms esant *log* fazėje ir pasiekus atitinkamą biomasės kiekį, į kultivavimo terpę suleidžiamas specialus ITPG (Izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozidas) reagentas. Tai vadinama ITPG indukcija, kurios pagrindinis tikslas yra suaktyvinti tikslinio produkto (rekombinantinio baltymo) sintezavimą genetiškai modifikuotose ląstelėse [12]. Po indukcijos ląstelės pradeda sintetinti baltymus ir skirti juos į terpę arba laikyti savyje kaip intarpinius kūnus.

1.3. Kultivavimo procesas

Siekiant išgauti kuo daugiau tikslinio produkto iš ląstelių, pramonėje taikomi išvystyti biotechnologiniai procesai. Tradiciškai, visas ląstelių auginimo procesas yra skirstomas į dvi dalis: patį auginimą (angl. *up-stream processing*) bei produkto išskyrimą ir jo gryninimą (angl. *down-stream processing*) [3]. Pirmoji dalis susideda iš maitinimo terpių paruošimo bei jų optimizavimo, pirminio ląstelių auginimo kolboje, jų perkėlimo į bioreaktorių, ten procesą valdant ir stebint operatoriams ir inžinieriams. Proceso metu yra sekami aktualiausi proceso parametrai kaip temperatūra, terpės pH lygis ir ištirpusio deguonies koncentracija, įpučiamų ir išpučiamų dujų koncentracijos, slėgis. Iš terpės imami mėginiai siekiant išmatuoti substrato, biomasės ar sintetinio produkto koncentracijas.

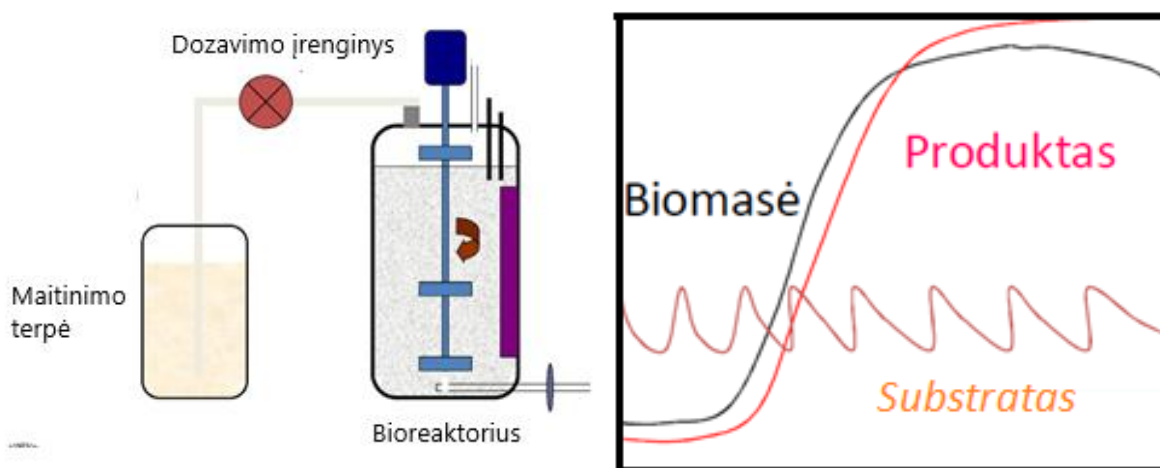
Antroji dalis prasideda pasibaigus auginimo procesui, kai pradedamas tikslinio produkto skyrimas ir gryninimas iš užaugintos biomasės bei koncentracijos matavimas. Tam naudojami įvairūs biocheminiai analitiniai procesai ir metodai, kaip elektroforezė ar chromatografija [13].



1.3.1 pav. Principinė pilno biotechnologinio ląstelių auginimo proceso ir jo dalių schema [3]

Yra skiriami keli skirtingi kultivavimo (fermentavimo) būdai. Pramoninėje biotechnologijoje naudojami šie pagrindiniai fermentacijos procesų tipai:

- **Pakartotina fermentacija.** Pastaroji dažniausiai pasirenkama esant mažo mastelio fermentacijoms. Prieš pradėdant fermentavimą, į bioreaktorių supilamas pradinis ir ribotas maistinės terpės kiekis [13]. Inokuliuojus ląstelių kultūrą, ląstelės pereina skirtingas augimo fazes ir fermentacija tęsiama tol, kol pasiekiamas užbrėžta jos trukmė arba terpėje baigiasi maistinės medžiagos ir sąlygos tolimesniai dauginimuisi yra netinkamos. Užauginta biomasė yra surenkama produkto atskyrimui ir gryninimui.
- **Nepertraukiama fermentacija.** Nepertraukiamos fermentacijos metu, į bioreaktorių nuolat, arba su pertraukomis, yra tiekama mitybinė terpė ir tuo pačiu yra šalinamas toks pats kiekis senosios terpės su ląstelėmis ir jų išskirtu produktu [14]. Todėl nepertraukiamos fermentacijos metu yra pastoviai palaikomas terpės tūris. Įgyvendinti tokiai fermentacijai reikia brangesnės įrangos ir sudėtingesnės technikos bioreaktorių, kas padidina proceso kaštus.
- **Pertraukiama fermentacija su pamaitinimu.** Skirtingai nuo pertraukiamos fermentacijos, šiuo atveju bioreaktoriuje periodiškai atnaujinama mitybinė terpė. Toks būdas leidžia palaikyti užbrėžtą substrato koncentraciją terpėje [15]. Pertraukiama fermentacija su pamaitinimu yra naudojama tiriamojo darbo analizuojamose kultivacijose. Kultivavimo metu naudojama speciali automatinė pamaitinimo sistema, kuri dozuoja substratą į fermentatorių pagal nurodytus dozavimo greičio ir kiekio profilius. Auginimas tęsiamas tol, kol pasiekiamos užbrėžtos biomasės ar produkto koncentracijos, ląstelės pereina į mirties fazę, arba pasiekta užbrėžta proceso trukmė. Principinė pertraukiamos fermentacijos su pamaitinimu iliustracija pavaizduota žemiau:



1.3.2 pav. Pertraukiamos fermentacijos su pamaitinimu atvaizdavimas, ir pagrindinių fizikinių dydžių kitimo kreivės proceso metu

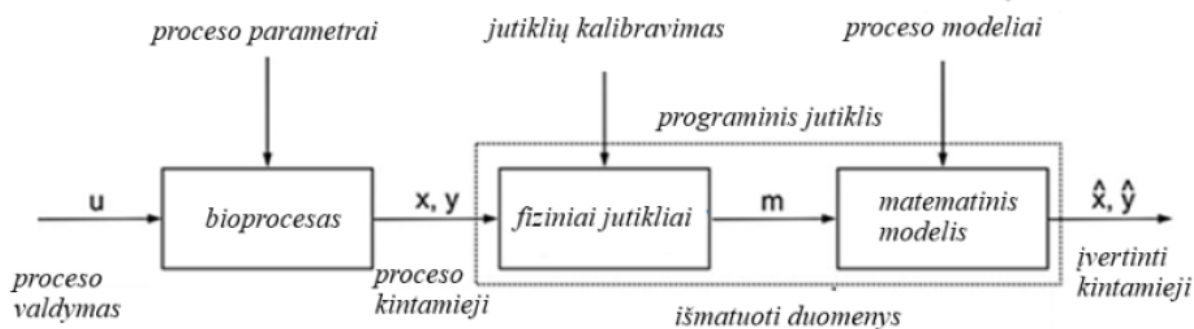
Sėkmingai užauginus biomasę, sekantis žingsnis yra iš jos atskirti ir išgryninti ląstelių išskirtą tikslinį produktą ir išmatuoti jo užaugintą koncentraciją. Darbe tiriamo proceso metu, kultivuojamų *E. coli* ląstelių skiriamo rekombinantinio baltymo koncentracija yra matuojama naudojant elektroforezės analitinį metodą [16]. Tai cheminis procesas, kurio metu, naudojant elektrinį lauką, yra atskiriamos skirtingą molekulinę masę turinčios dalelės. Gautų rezultatų nuotraukos yra skaitmeniniu būdu

perduodamas vaizdų analizės programoms, kurios pateikia reikalingus parametrus, norint apskaičiuoti galutinę baltymo koncentraciją.

1.4. Programiniai jutikliai bioprocusuose

Kultivuojant ląsteles bioreaktoriuje yra neįmanoma tiesiogiai pamatuoti visų procesą nusakančių kintamųjų. Esminiai dydžiai kaip substrato, biomasės ir ląstelių koncentracijos yra dažnai matuojamos imant mėginį iš kultivuojamos terpės ir jį analizuojant naudojant specialią įrangą (gliukometrai, spektrofotometrai ir kt.). Tiesioginių jutiklių išmatuoti šiems dydžiams terpėje nėra, skirtingai nei temperatūrai, pH ar ištirpusio deguonies koncentracijai. Todėl netiesiogiai išmatuoti esminius bioproceso dydžius yra pasitelkiami programiniai jutikliai [17]. Tai matematiniais modeliais grįsti jutikliai, kurie gaudami pateiktą tikslingą informaciją apie procesą, netiesiogiai įvertina norimą dydį [18, 19].

Programiniai jutikliai dažniausiai įgyvendinami kompiuterinėse programose, kurios taip pat surenka visą fizinių jutiklių informaciją. Programinio jutiklio principinė veikimo schema pateikta žemiau:



1.4.1 pav. Programinio jutiklio principinis modelis [17]

Antriniai bioproceso išėjimai, pavyzdžiui, temperatūra, dujų srauto greičiai, deguonies ir anglies dioksido koncentracija, yra matuojami realiu laiku naudojant fizinius jutiklius. Šių matavimų rezultatai, kartu su rečiau atliekamais mėginių matavimais (biomasės ar substrato koncentracijos) yra pateikiami programiniam jutikliui. Jame realizuotas matematinis modelis sudaro ryšius tarp pateiktų įėjimų ir grąžinamo įvertinto dydžio išėjimo. Tam įgyvendinti svarbi išankstinė informacija apie procesą, kuri gali būti duomenų ar fundamentinių dėsnių pavidale [17]. Jeigu gauti programinio jutiklio rezultatai yra tenkinami, jie taip pat gali būti pritaikomi kaip grįžtamasis ryšys proceso valdymo bei optimizavimo sistemoms [3, 10, 20].

Sunkiausiai išmatuojamas kultivavimo proceso dydis yra auginamų ląstelių sintezuojamo tiksline produkto koncentracija. Tai ilgiausiai trunkantis, analitiškai sudėtingiausias bei didžiausius kaštus turintis matavimas. Todėl inžinieriai ir mokslininkai taiko programinius jutiklius, kurie galėtų netiesiogiai įvertinti produkto koncentraciją realiu laiku ar su mažesniu vėlavimu nei mėginio analizė. Literatūroje aptinkami skirtingais metodais ir technikomis paremti matematiniai modeliai tiksline produktui įvertinti. Toliau bus apžvelgiami skirtingos matematinių modelių tipai, kurie buvo sėkmingai pritaikyti įvairių ląstelių kultivacijose ir fermentacijose.

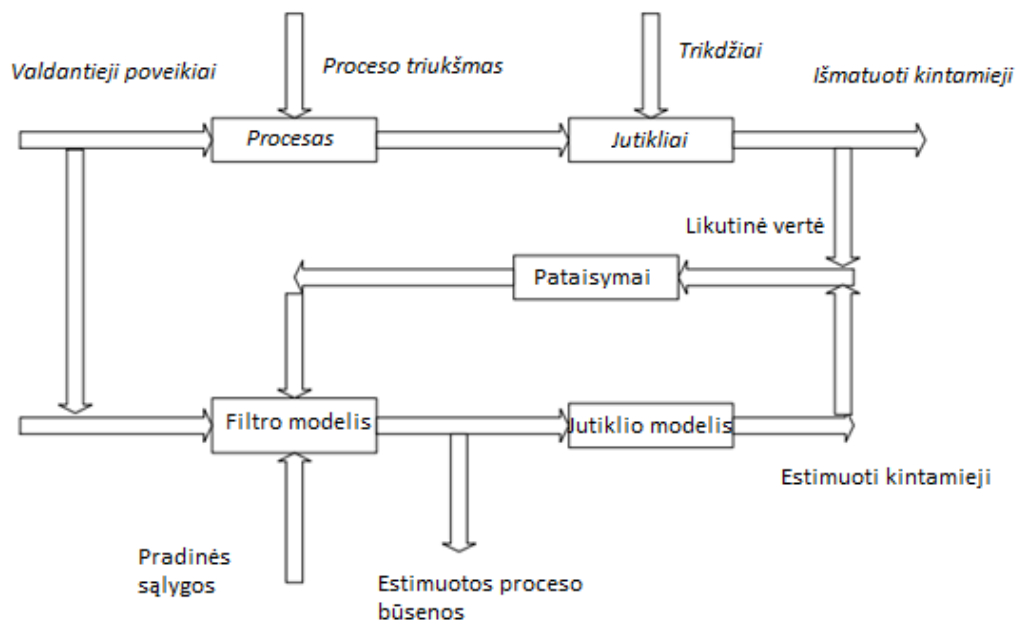
1.4.1. Tradiciniai matematiniai modeliai

Tradicioniai matematiniai modeliai yra pagrįsti pagrindiniais fundamentiniais fizikiniais dėsniais, kaip masių, energijos ar momentų balansais. Aprašytos balansų lygtys apibūdina bioproceso statines ir dinamines būsenas. Priklausomai nuo modelio struktūros yra skiriami du skirtingi tradicinio matematinio modelio tipai: struktūrizuoti ir nestructūrizuoti modeliai [17].

Struktūrizuoti modeliai pasižymi išsamiau svarbiausių ląstelėse vykstančių reakcijų aprašymu. Reakcijoms aprašyti, reikia gerai nusimanyti apie proceso kinetiką, termodinamiką, fizines savybes ir kt. Norint pasiekti tenkinamus mechanistinio modelio rezultatus, reikia siekti jį aprašyti kuo plačiau, nepaliekant jokių informacijos „skylių“ [21]. Tradiciniai modeliai išlieka rečiausiai naudojami sprendžiant produkto koncentracijos įvertinimo uždavinius, dėl plataus proceso mastelio, kurį modelis turi tiksliai aprašyti. Nepaisant to, literatūroje yra aptinkami atvejai, kada mechanistiniai modeliai yra pritaikomi produkto koncentracijos įvertinimui. Toks pavyzdys gali būti Ka-Yiu San and Gregory Stephanopoulos aprašytas etanolio koncentracijos įvertinimas mielių fermentacijose [22]. Modelio pagrindas yra išmatuotas amoniako kiekis, kuris yra pridodamas į reaktorių pH lygiui palaikyti. Žinodami terpės sudėtį, autoriai išskiria būsenos kintamųjų rinkinį, nekintantį reaktoriuje vykstančių cheminių reakcijų metu. Nors pateiktuose produkto koncentracijos įvertinimo ir jo matavimų rezultatuose, nematyti didelių paklaidų, tikslūs skaičiai nėra pateikti. Autoriai taip pat rekomenduoja periodiškai palyginti realaus laiko produkto koncentracijos matavimą su mėginių matavimais, taip įsitikinant ar modelyje nesusidarė integravimo paklaidos.

Kitas tradicinio modelio tipas yra nestructūrizuotas modelis. Pastarasis pasižymi masių ir energijos balanso lygtimis kartu su *Monod* tipo kinetinėmis išraiškomis, aprašančiomis mikroorganizmų augimo modelį [2]. Kuriant nestructūrizuotą modelį, atsižvelgiama į priklausomybes tarp proceso būsenos kintamųjų ir valdančiojo poveikio kintamųjų. Tokio modelio trūkumas yra tai, jog jis gali nusakyti tik ilgalaikį procesą ir jo būsenas. Tuo tarpu trumpalaikiams pakitimams ir proceso dinamikai jis yra netinkamas [17]. Nestructūrizuoti modeliai dažniausiai yra paprastesni už struktūrizuotus ir naudojami praktinių fermentacijų ar kultivacijų metu.

Populiariausias nestructūrizuoto modelio metodas aptinkamas programiniuose jutikliuose yra išplėstinis *Kalmano* filtras (angl. *Kalman Filter*) [19]. *Kalmano* filtras yra būsenos įvertinimas tiesinei sistemai, kai pastarosios modelis yra žinomas kartu su stochastiniais parametrais ir triukšmais. Tuo tarpu išplėstinis *Kalmano* (angl. *Extended Kalman Filter*, EKF) filtras yra skirtas netiesinėms sistemoms ir jų būsenų įvertinimui, kurios yra sutinkamos bioprocesuose. Tokie modelio tipai taip pat vadinami rekursiniais, ir jų principinis veikimas pateiktas žemiau:



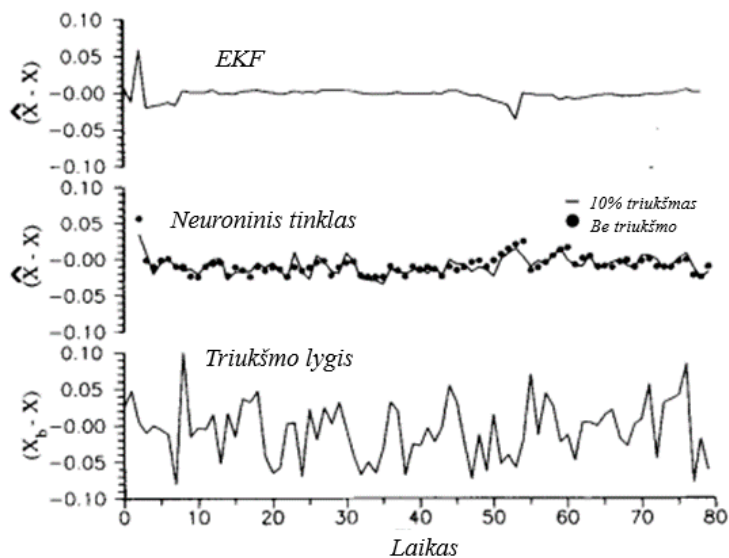
1.4.2 pav. Rekursinio būsenos įvertinimo modelio schema [17]

D. Krämer and R. King pademonstravo EKF pritaikymą genetiškai modifikuotos *S. Cerevisiae* ląstelių kultūros fermentacijose, kuriose gaminamas *Endopolygalacturonase* fermentas (EPG) [23]. Dėl konfidencialumo nepateikiami jokie EPG gamybos rezultatai. EKF modelis buvo sujungtas su duomenimis iš infraraudoniesiems artimų spindulių spektroskopijos (angl. *Near-Infrared Spectroscopy, NIR*). Literatūroje taip pat galima aptikti ir kitų Kalmano filtro tipų netiesinėms sistemoms, kaip *Unscented Kalman Filter (UKF)* [24, 25]. Dažniausiai tokie modeliai yra jungiami kartu su duomenimis pagrįstais stebėjimo modeliais.

1.4.2. Empiriniai modeliai

Dėl mažo diferencialinių lygčių lankstumo, taikant tradicinius matematinius modelius netiesinėms ir daugiamatėms sistemoms yra gaunamos nemažos paklaidos. Todėl kaip alternatyvus būdas yra pasirenkamas empirinis modelis, kuriam nereikia detalaus proceso aprašymo, bet daug procesą nusakančių duomenų. Pagrindiniai duomenimis grįstų empirinių modelių pavyzdžiai yra dirbtiniai neuroniniai tinklai (toliau – *DNT*), neraiškiųjų aibių logikos (toliau - *Fuzzy*), daugiamatiai statistiniai modeliai ir kita.

Pirmieji metodai prognozuoti biotechnologinio proceso kintamuosius naudojant neuroninius tinklus buvo pasiūlyti dar 1990-aisiais, naudojant sukauptą atliktų fermentacijų duomenų bazę [26]. Publikacijos autoriai neuroniniu tinklu prognozavo biomasės ir substrato koncentracijas nuolatinio maišymo bioreaktoriuje, bei lygino gautus rezultatus su *EKF* pagrįstu modeliu, taikant skirtingą duomenų triukšmo lygį (1.4.3 pav.).



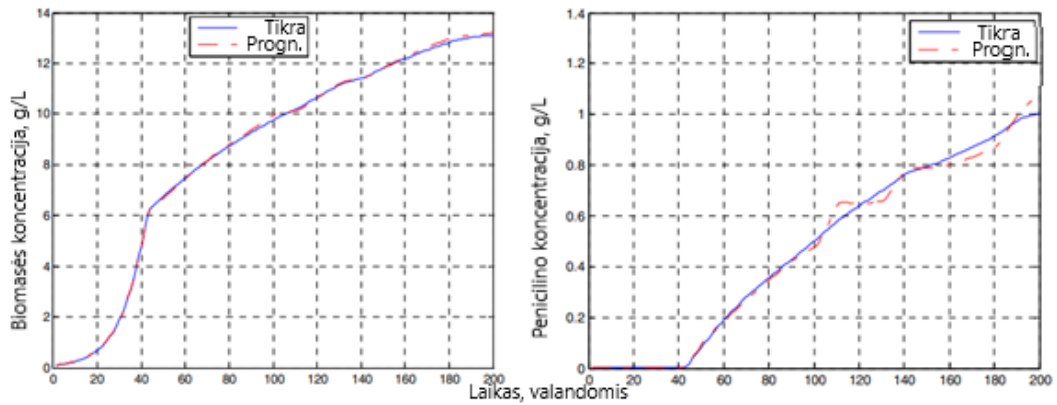
1.4.3 pav. Neuroninio tinklo ir EKF biomasės koncentracijos X estimavimo paklaidos esant 10% triukšmo amplitudei [26]

Pagrindinis *DNT* privalumas – nebūtinos išankstinės žinios apie procesą. *DNT* sudaro ryšius tarp kintamųjų naudodamasis surinkta proceso informacija. Tai yra ypač patogu, kadangi bioprocusuose sutinkama daug netiesinių priklausomybių, kurios sunkiai aprašomos įprastomis lygtimis.

Laikui bėgant, buvo išbandytos skirtingos *DNT* architektūros: tiesioginio sklidimo (angl. *Feedforward*), rekurentiniai (angl. *Reccurent Backpropagation* neuroniniai tinklai) ar radialinių bazinių funkcijų tinklai (angl. *Radial Basis Function, RBF*) [27, 28]. Šie metodai sėkmingai pasiteisino, tačiau praktikoje susiduriama atvejais, kurių metu prognozuotos *DNT* vertės neatitinka fundamentinių apribojimų. Tai būdinga tada, kai realiu metu procese pasitaiko situacijos, kurios nebuvo tinklo mokyme.

DNT architektūros pasirinkimas priklauso nuo jo taikymo ir duomenų pateikimo. Sudėtingus modelius yra sunkiau mokytį, o neuronų ir/ar sluoksnių skaičiaus parinkimas dažnai priklauso nuo sprendžiamos užduoties tipo ir sudėtingumo. Parametrai dažniausiai pasirenkami bandymų būdu. Kitas svarbus dalykas yra tinklo mokymo algoritmas. Norint pasirinkti ir suderinti mokymo algoritmą tinklui dar nematytiems duomenims, reikia atlikti nemažai eksperimentų.

DNT taikymas yra neretai susietas su produkto koncentracijos prognozavimu, kadangi tradiciniai matematiniai modeliai produktui prognozuoti yra gan sudėtingai aprašomi. Turint pakankamą kiekį duomenų nusakančių pasikartojantį procesą, neuroniniai tinklai dažniausiai pralenkia tradicinius modelius. Toks pavyzdys yra H. Zang publikacija [17]. Joje aprašomas penicilino fermentacijos procesas, kuriame pritaikytas tiesioginio sklidimo tinklu grįstas programinis jutiklis. Pasitelkiant antrinius kintamuosius (aeracijos greitis, maišymo galia, substrato ir deguonies tiekimo srautai, CO₂ koncentracija ir kita) iš 30 fermentacijų duomenų, suformuojamas dviejų sluoksnių *DNT* modelis, kurio išėjimai yra penicilino ir biomasės koncentracijos. Programinio jutiklio rezultatai pateikiami žemiau pateiktuose paveikslėliuose:



1.4.4 pav. DNT grįstu programinio jutiklio prognozavimo rezultatai: biomasės (kairėje) ir penicilino (dešinėje) koncentracijos [17]

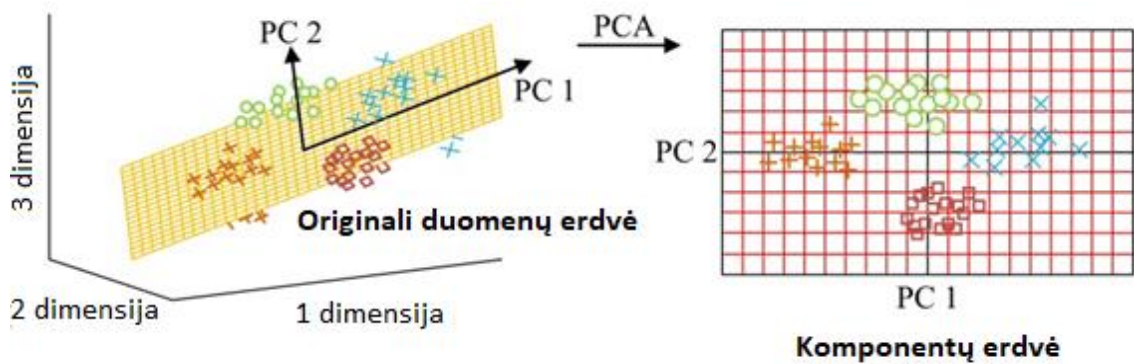
Literatūroje galima sutikti pavyzdžių, kur *DNT* mokymui yra naudojami ne tik proceso metu fiksuojami pagrindiniai kintamieji, bet ir papildomai naudojamos įrangos duomenys. Pavyzdžiui, *DNT* galima pritaikyti analizuojant bioreaktoriaus išėjimo dujas su papildoma dujų analizės įranga. Stebint įvairias dujų koncentracijas, neuroninis tinklas gali sudaryti priklausomybes tarp jų pokyčių ir produkto formavimosi [29]. Žinoma, naudojant papildomą įrangą padidėja ir galimas paklaidų skaičius. Tai yra ypač aktualu dirbant su dujų jutikliais, kurie pasižymi dreifavimu, kuriam kompensuoti reikia papildomų algoritmų.

Pagrindinis *DNT* grįstų programinių jutiklių privalumas išlieka tai, jog jiems nereikia išankstinių žinių apie procesą ir jį aprašančias balanso ir kinematinės lygtis. Tačiau norint realizuoti tikslų modelį, reikalingas didelis kiekis duomenų, kurie turi būti kokybiški bei atspindėti įvairius galimus proceso eigos scenarijus, siekiant padidinti tinklo ekstrapoliavimo galimybes.

1.4.3. Daugialypiai statistiniai modeliai

Turint daug procesą apibūdinančių duomenų, galima rinktis kitą empirinio modelio alternatyvą - daugiaparametrinio statistinio procesų valdymo (angl. *Multivariate statistical process control, MSPC*) technikas, kaip principinių komponentų analizę (angl. *Principle Component Analysis, PCA*) ar dalinius mažiausius kvadratus (angl. *Partial Least Squares, PLS*) [30].

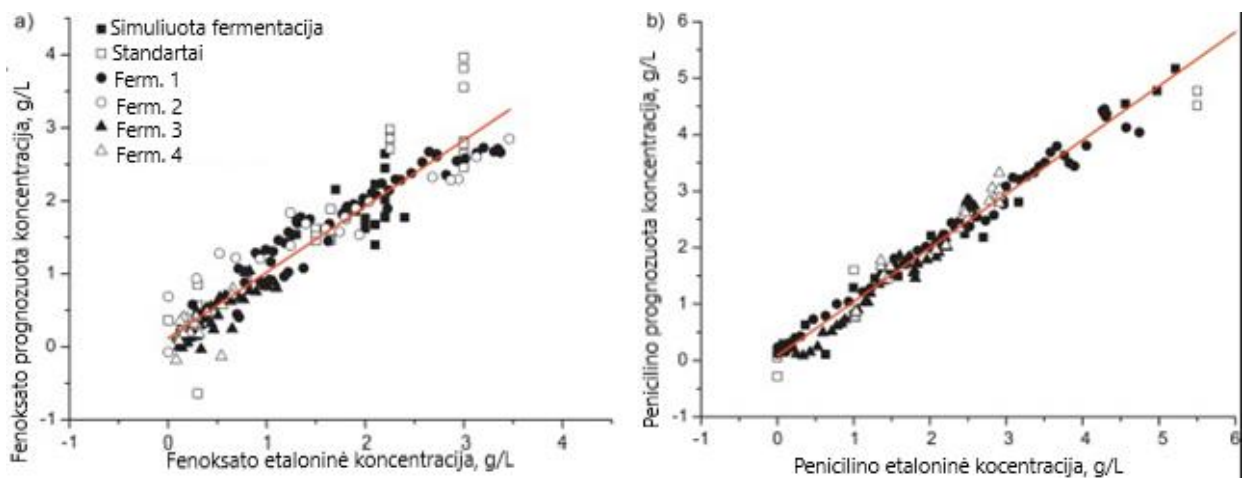
PCA yra metodas, naudojamas kintamųjų rinkinio kovariacijai analizuoti. Metodas transformuoja matricą su n matavimais iš proceso kintamojo į vienas nuo kito nepriklausomų komponentų matricą. Naudojant *PCA*, galima sumažinti proceso duomenų dimensijas ir taip identifikuoti pagrindines proceso duomenų rinkinio charakteristikas. Tuo tarpu *PLS* metodas naudojamas tuo metu, kai parametrus galima skirstyti į priežasties ir pasekmės kintamuosius. Metodas naudojamas regresijai arba, panašiai kaip *PCA*, sumažinti duomenų dimensijas. *PLS* naudojimo metu siekiama maksimizuoti kovariaciją/priklausomybę tarp priežasties ir pasekmės kintamųjų. Privalumas, kurį suteikia šis modelis yra tas, jog jis gali išgauti modelius net ir aplikacijose, kuriose yra daugybė labai susijusių ir triukšmingų proceso kintamųjų matavimų [17, 30].



1.4.5 pav. Principinių komponentų analizės panaudojimas dimensijų sumažinimui

PCA ir *PLS* modeliai neretai yra sukuriami pasitelkus nominalius duomenis, kurie yra surinkti sėkmingos, didelę išeią pasižymėjusios periodinio pamaitinimo fermentacijos metu [17]. Taip modeliai parodo charakteristikas ir kintamųjų ryšius, kurie yra susiję su didele proceso išeią. Atliekant papildomas periodines fermentacijas, jas galima lyginti su gautais modeliais ir stebėti pasitaikančius nukrypimus [31].

PLS modelį galima panaudoti ir produkto koncentracijos prognozavimui. C. Koch straipsnyje autoriai pristato spektroskopinį metodą, naudojantį FTIR (angl. *Fourier-Transform-Infrared*) analitiką, taikomą paimtiems penicilino V mėginiams kultivavimo metu [34]. Iš gautų duomenų sudarytas *PLS* modelis prognozuoti penicilino ir fenoksato rūgšties koncentracijai:



1.4.6 pav. *PLS* modelio prognozavimo rezultatai: fenoksato rūgšties koncentracija (kairėje) ir penicilino koncentracija (dešinėje) [33]

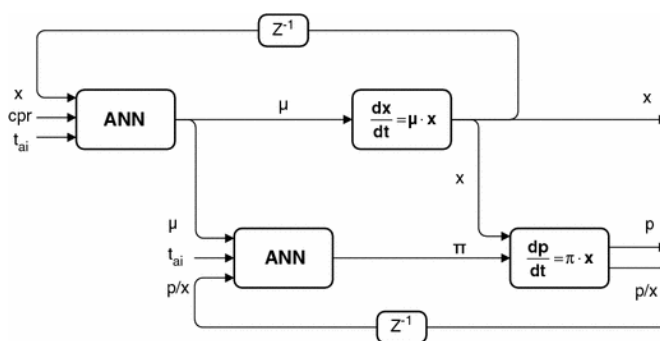
Periodinių fermentacijų su pamaitinimu metu, kai laikas tampa svarbiu kintamuoju, naudojama daugiaparametrinės pagrindinių komponentų analizė (angl. *Multiway Principle Component Analysis, MPCA*) ir daugialypiai daliniai mažiausiai kvadratai (angl. *Multiway Partial Least Squares, MPLS*). Pagrindinis *MPCA* ir *MPLS* pranašumas yra tai, kad informacija, esanti pirminiuose duomenų rinkiniuose, yra paverčiama į mažesnių matmenų vektorius ir matricas. Taip pasiektas duomenų sumažinimas yra reikšmingesnis ir leidžia atlikti palyginimus bei analizes lengviau ir greičiau nei naudojant neapdorotus duomenis. Nors *MPCA* ir *MPLS* yra greiti ir efektyvūs metodai, vienas jų reikšmingas trūkumas yra tas, kad metodai fiksuoja tik tiesinius ryšius tarp pagrindinių įėjimo ir

išėjimo kintamųjų komponentų. Todėl sukurti modeliai kenčia nuo blogų prognozių, susijusių netiesiniais periodinio pamaitinimo procesais [17]. Išvengti to MPLS modelyje, galimas vienas iš dviejų pasirinkimų: netiesinių metodo atitikmenų kūrimas arba duomenų pertvarkymas, pašalinant netiesines charakteristikas [33].

1.4.4. Hibridiniai modeliai

Tiek tradiciniai, tiek empiriniai matematiniai modeliai turi savo trūkumų, todėl natūralu, jog pradėti vystyti modelių hibridai, kurių tikslas yra panaudoti geriausias abiejų modelių savybes ir jas pritaikyti proceso modeliavimui. Literatūroje aptinkama keletas skirtingų hibridinių modelių tipų. Bene populiariausias jų yra balanso lygčių ir *DNT* hibridinis modelis, kur tradiciniu matematiniu modeliu aprašoma proceso fundamentika, o neuroninis tinklas naudojamas aprašyti mažiau ar/ir sunkiau modeliuojamas proceso dalis, pavyzdžiui, kinetines reakcijas. Hibridinių modelių pagrindinis trūkumas yra ilgesnis skaičiavimo laikas tiek apmokant, tiek apskaičiuojant modelio išėjimo vertę [17].

Stefan Gnoth, R. Simučio ir A. Lubbert publikacijoje lyginami tradicinis matematinis ir hibridinis modeliai, kurie realizuoti kaip programinis jutiklis, prognozuoti biomasės ir *E. coli* kultivavimų metu sintezuojamo tirpus rekombinantinio baltymo produkto koncentracijas [34]. Abejų modelių parametrai buvo identifikuoti naudojant tuos pačius duomenis. Autorių teigimu, tradicinis modelis reikalavo ilgesnio parametru identifikavimo ir yra visiškai pririštas prie atliekamo kultivavimo. Todėl autoriai rekomenduoja naudoti hibridinį modelį, susidedantį iš dviejų *DNT* ir matematinio modelio, kuris ne tik greičiau apmokomas, bet ir gauna geresnius rezultatus. Pirmo neuroninio tinklo išėjimas (specifinis augimo greitis) yra antrojo tinklo įėjimas. Antrasis tinklas skirtas prognozuoti produkto skyrimosi greitį. Modelio struktūra pavaizduota žemiau:

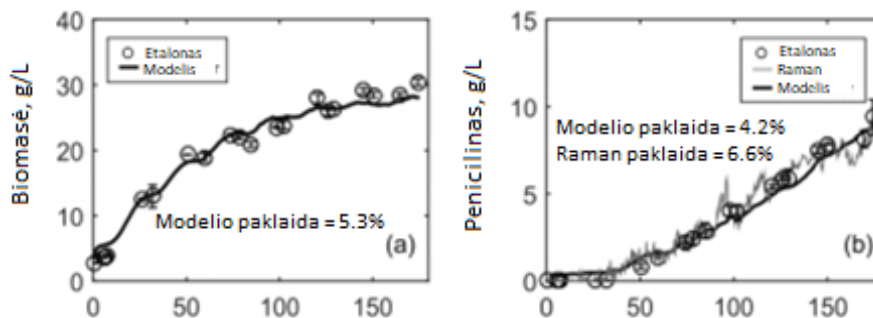


	RMSEC [g]		
	Biomasė	Tirpus baltymas	IB-baltymas
Tradicinis modelis	10.81	1.78	0.87
Hibridinis modelis	4.71	1.28	0.62

1.4.7 pav. Hibridinio modelio, skirto produktui ir biomasei prognozuoti, struktūra iš balanso lygčių ir ANN modelių, paklaidos lyginant su tradiciniu modeliu. Modelio įėjimai ir išėjimai: biomasė x , bendra anglies dvideginio produkcijos greičio masė cpr , laikas po indukcijos t_{ai} , specifinis augimo greitis μ , tikslinis produktas p , specifinis produkto formavimosi greitis π [34].

Kitas hibridinio modelio pavyzdys, kur sujungiamas tradicinis matematinis modelis ir PLS modelis yra aprašomas A. Golabgir ir C. Herwig darbe [35]. Autoriai pristato hibridinį modelį, pritaikytą

penicilino kultivacijoms ir jo koncentracijos estimavimui. Autoriai panaudojo PLS modelį sudaryti ryšius tarp naudojamos *Raman* spektroskopijos duomenų, gaunamų kultivacijos metu imant mėginius. Autoriai taip pat palygino hibridinio ir PLS modelio rezultatus atskirai:



1.4.8 pav. PLS ((a) pav.) ir hibridinių (b) modelių biomasės ir penicilino koncentracijos prognozavimo palyginimas su realiais duomenimis [35].

Hibridiniai modeliai išlieka populiariausiu pasirinkimu kuriant bioprocėsų valdymo, stebėjimo ar optimizavimo sistemas. Jiems realizuoti taikomos įvairios procedūros, kurios apjungia abiejų modelių privalumus arba pagerina vieno iš modelių tikslumą bei veikimą kito pagalba. Norint sėkmingai realizuoti hibridinį modelį, svarbu tinkamai pasirinkti jungiamus matematinius modelius, kurie priklauso nuo sprendžiamo uždavinio ir turimos informacijos.

2. Metodinė dalis

2.1. Eksperimentiniai duomenys

Tiriamąjį darbo objektą yra rekombinantinės *E. coli* ląstelės, kurios buvo kultivuojamos periodinio su pamaitinimu proceso metu. Kultivavimų duomenys yra surinkti iš dviejų skirtingų ląstelių kultūrų auginimų:

- I kultūra - *E. coli* (BL21(DE3) pLysS);
- II kultūra - *E. coli* BL21 (DE3) pET21-IFN-alfa-5.

Abejos ląstelių kultūros skiria tirpius ir netirpius baltymus. Netirpiaisiais laikomi baltymai, kurie pasilieka ląstelių viduje kaip intarpiniai kūneliai (angl. *inclusion bodies*) arba netirpsta išskirti į terpę. Pastarieji yra tikslinis kultivacijų produktas, kurio koncentraciją yra siekiama įvertinti. *E. coli* ląstelėms auginimo metu taip pat buvo naudotas IPTG preparatas, aktyvinti tikslinio produkto sintezei. Eksperimentų metu sintezuoto produkto koncentracija buvo nustatyta imant mėginius iš kultivuojamos terpės, juos gryninant ir galutinę koncentraciją nustatant naudojantis SDS PAGE elektroforezės analitiniu metodu.

Žemiau pateikiamos pagrindinės kultivavimų sąlygos ląstelių auginimo metu:

1 lentelė. Ląstelių kultivavimo sąlygos

Kultivavimo sąlygos	I Kultūra	II Kultūra	Komentaras
Bioreaktoriaus tūris	15 L	7 L	-
Proceso tipas	Periodinis su pamaitinimu	Periodinis su pamaitinimu	-
Temperatūros nuostatas	30 °C	37 °C	Matuota naudojant PT100 temperatūros jutiklį
Ištirpusio deguonies nuostatas	30 %	20 %	Matuota Ingold ištirpusio deguonies jutikliu (<i>Mettler Toledo</i>)
pH nuostatas	7	6.8	Nuostatas palaikytas PID reguliatoriumi tiekiant NaOH (natrio šarmas)
Maišyklės sūkių nuostatų intervalas	100-1400 RPM	800-1200 RPM	-
Oro srautas	0.3–15 l/min	1.75–3.75 L/min	Grynas deguonis buvo paduotas į bioreaktorių 0-7.5 l/min srautu siekiant padidinti deguonies pernešimą
Išėjimo dujų matavimai	Deguonies ir anglies dvideginio konc.	Deguonies konc.	Matuota paramagnetiniu deguonies jutikliu (<i>Maihak Oxor 610</i>) I kultūros auginimo metu ir <i>BlueSens</i> dujų analizatoriumi (<i>BCpreFerm, BlueSens, Herten, Germany</i>) II kultūros kultivacijų metu

Eksperimentinių duomenų imtį sudaro 43 eksperimentai, kurių 19 buvo atlikti su I kultūra, o 24 – su II-ja. Pirmajame duomenų rinkinyje užfiksuoti 93 netirpaus baltymo koncentracijos matavimai (n_I), tuo tarpu antrajame - 131 (n_{II}).

2.2. Masės balanso lygtys produkto koncentracijos įvertinimui

Gauto produkto masė, kurią galima išgryninti iš ląstelių kultūros, priklauso nuo ląstelių biomasės kiekio ir jų sugebėjimo sintetinti produktą. Šis gebėjimas aprašomas specifiniu produkto susidarymo (akumuliacijos) greičiu q_{p_x} [36]:

$$\frac{dp_x}{dt} = q_{p_x}(\mu, p_x), \quad (2)$$

kur p_x yra specifinė baltymo koncentracija, arba kitaip, baltymo koncentracija p (g/L) normalizuota biomasės X atžvilgiu:

$$p_x \equiv p/X. \quad (3)$$

Fiziškai, q_{p_x} galima išreikšti kaip produkto koncentracijos vieneto U kaupimosi greitį vienam vienetui biomasės (pvz., biomasę išreiškiant gramais (g), q_{p_x} dimensija būtų U/g/h).

Daugumoje bioprocėsų didelį biomasės kiekį pirmiausiai nulemia specifinio augimo greitis. Pastarasis parametras taip pat galioja ir ląstelių fiziologinėms galimybėms sintetinti produktą [37]. Pramonėje naudojama strategija yra vykdyti procesą su dideliu specifiniu biomasės greičiu, taip pasiekiant didesnius kiekius biomasės, o tada jį sumažinti tiek, jog būtų galima pasiekti kiek įmanoma daugiau produkto [38]. Vertinant tai, produkto sintezės išraiška (2) tampa tiesiogiai priklausoma nuo μ [36]:

$$\frac{dp_x}{dt} = q_{p_x}(\mu, p_x) = p_{\max}(\mu, x) - k_t \cdot p_x, \quad (4)$$

kur parametras k_t yra laiko konstanta, laikoma savaiminės inhibicijos efekto forma (skiriamas produktas lėtina ląstelių augimą), o p_{\max} dedamoji yra maksimali specifinė produkto koncentracija, kurią ląstelės gali sintetinti esamu laiko momentu.

2.2.1. p_{\max} modelis

Literatūroje galima aptikti skirtingus p_{\max} dedamosios modelius. Tiriamajame darbe pateikiamos kelios skirtingos p_{\max} išraiškos, kurios bus lyginamos naudojant eksperimentinius duomenis siekiant įvertinti tikslinio produkto koncentraciją. Modeliai yra pateikti jų publikavimo eilės tvarka.

2.2.1.1. Vidutiniu ląstelių populiacijos amžiumi paremtas modelis

D. Levišauskas, kartu su bendraautorais, dar 1999-as metais išreiškė p_{\max} dedamąją išskeldamas prielaidą apie fiziologiškai aktyvią biomasę [39, 40]. Pastaroji buvo apibūdinta kaip biomasės dalis, kuri yra tiesiogiai atsakinga už produkto sintezę. Taip pat, autoriai iškėlė prielaidą, jog fiziologinė ląstelių veikla kultivavimo metu priklauso nuo ląstelių amžiaus. Abi prielaidos leidžia išreikšti aktyvią biomasę laiko momentu t_i kaip vidutinį ląstelių populiacijos amžių:

$$\overline{Am\dot{z}ius(t)}_i = \frac{x_0 \cdot t_i + \int_0^{t_i} (t_i - t_j) \cdot x'(t_j) dt_j}{x_i}, \quad (5)$$

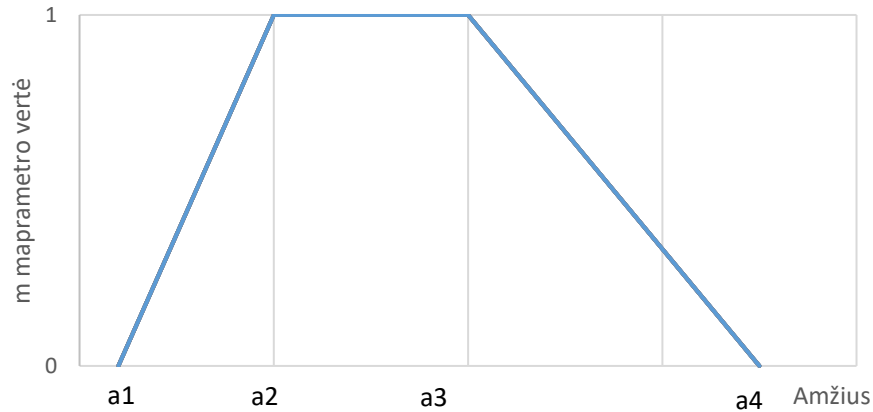
kur x_0 yra pradinė biomasės koncentracija inokuliacijos metu (g/L), o x_i – biomasės koncentracija i -tuoju laiko momentu (g/L). Jeigu pradinė biomasė yra nežymi ir nereikšminga, gaunama vidutinio amžiaus išraiška yra:

$$\begin{aligned} \overline{Am\dot{z}ius(t)}_i &= \frac{\int_0^{t_i} (t_i - t_j) \cdot x'(t_j) dt_j}{x_i} \cong \frac{\sum_{j=0}^i (t_i - t_j) \frac{\Delta x(t_j)}{\Delta t_j} \cdot \Delta t_j}{x_i} \\ &= \frac{\sum_{j=0}^i (t_i - t_j) \Delta x(t_j)}{x_i}. \end{aligned} \quad (6)$$

Darant prielaidą, jog $t_j \sim j\Delta t$, P_{\max} vertė laiko momentu t_i yra išreiškiama:

$$p_{\max,1999}(t_i) = \frac{1}{x(t_i)} \sum_{j=1}^i \Delta x_j \cdot m(t_i - j\Delta t), \quad (7)$$

kur Δx_j yra biomasės prieaugis per j -ąjį laiko intervalą, o parametras m , vadinamas santykinu ląstelių aktyvumu (nuo 0 iki 1), aprašo tiesiškai didėjančią ir mažėjančią amžiaus poveikį produkto sintezei. Parametras apibūdinamas keturiais modelio parametrais a_1, a_2, a_3, a_4 , kurie, pasak autorių, priklauso nuo ląstelių kultūros. Parametro m kitimą galima pavaizduoti neraiškiųjų aibių logikos trapezoidinės narystės funkcijos principu:



2.2.1 pav. Santykinio ląstelių aktyvumo m priklausomybė nuo ląstelių amžiaus.

2.2.1.2. *Monod* kinetikos lygtimis paremtas modelis

Alternatyvus p_{\max} dedamosios modelis, pasiūlytas 2003 metais, buvo pagrįstas *Monod* kinetinėmis lygtimis produkto inhibicijai [36, 41]:

$$p_{\max,2003}(\mu) = \frac{\mu(t) \cdot k_m}{k_\mu + \mu(t) + \mu^2(t)/k_{i\mu}}, \quad (8)$$

kur k_μ yra *Monod* konstanta produkto modeliui ($1/h$), $k_{i\mu}$ – produkto modelio inhibicijos konstanta (U/g), o k_m – modelio parametras. Išraiška pagrįsta tuo, jog maksimali baltymo koncentracijos vertė nuo specifinio augimo greičio priklauso asimptomiškai, reiškiant, jog prie didesnių greičių maksimali baltymo vertė yra mažesnė arba, atvirkščiai, esant mažesniems specifinio augimo greičiams, modelio maksimali baltymo koncentracija yra didesnė.

2.2.1.3. Indukcijos laiko kintamaisiais paremtas modelis

Prieš tai aprašyti modeliai netyrinėjo indukuojamo *IPTG* preparato momento modelio išraiškai. Yra įrodyta, jog produkto sintezė priklauso ne tik nuo šio preparato indukcijos į terpę, bet ir nuo biomasės indukcijos metu [42]. Atsižvelgdami į tai, 2019 metais R. Urniežius ir A. Survyla pateikė maksimalios baltymo koncentracijos išraišką [43]:

$$p_{\max,2019}(\mu, x) = \mu(t) \cdot (k_{m0} + k_{m1} \cdot (x(t) - x_{ind})), \quad (9)$$

kur x_{ind} yra biomasės koncentracija indukcijos metu, k_{m0} ir k_{m1} yra empiriniai koeficientai. Pirmasis sieja specifinio augimo greitį ir produkto sintezę, o antrasis – biomasės koncentraciją indukcijos metu ir ląstelių produktyvumą [42]. Išraiška (9) galioja tik po *IPTG* preparato indukcijos. Prieš indukciją, parametras k_{m1} laikomas 0 ir p_{\max} dedamosios išraiška paprastėja:

$$p_{\max,2019}(\mu, x) = \mu(t) \cdot k_{m0} \quad (10)$$

2.2.1.4. Vidutiniu amžiumi ir indukcijos kintamaisiais paremtas modelis

R. Urniežius pratęsė indukcijos poveikio bioprocesui tyrinėjimą ir produkto modelio tobulinimą [44]. 2021 metų publikacijoje autoriai pasiūlė į maksimalios produkto vertės santykinį greitį įtraukti ląstelių vidutinį amžių, su prielaida, jog ląstelės sintezuoja tikslinį produktą per tam tikrą laikotarpį, per kurį egzistuoja vidutinis ląstelių populiacijos amžius, leidžiantis pasiekti maksimalią produkto koncentraciją. Modelyje atsižvelgiama į indukcijos poveikį išskiriant du esminius dydžius indukcijos laiko metu: vidutinį ląstelių amžių $\overline{Amžius}_{ind}$ ir specifinį biomasės augimo greitį μ_{ind} . Publikacijoje nagrinėjamos skirtingos p_{\max} išraiškos, kurios apjungia šiuos fizikinius dydžius kartu su modelio empiriniais parametrais. Atsižvelgiant į pateiktas skirtingų p_{\max} išraiškų vidutines absoliutines paklaidas įvertinant galutinį tikslinį produktą, geriausius rezultatus pasiekiantis modelis yra:

$$p_{\max,2021} = k_0 \cdot (\mu_{ind} - \mu_{ind}^2) + \frac{k_1 \cdot \mu_{ind} \cdot \overline{Amžius}}{k_2 + \overline{Amžius}} + k_1 - k_1 \cdot \mu, \quad (11)$$

kur k_1 ir k_2 yra modelio parametrai, turintys savo fizikinę prasmę. Sandauga $k_1 \cdot \mu$ yra didžiausias specifinis tikslinių baltymų susidarymo greitis, o vardiklyje esanti suma apibrėžia vidutinį ląstelių amžių, kurio metu produkto susidarymo greitis yra perpus mažesnis.

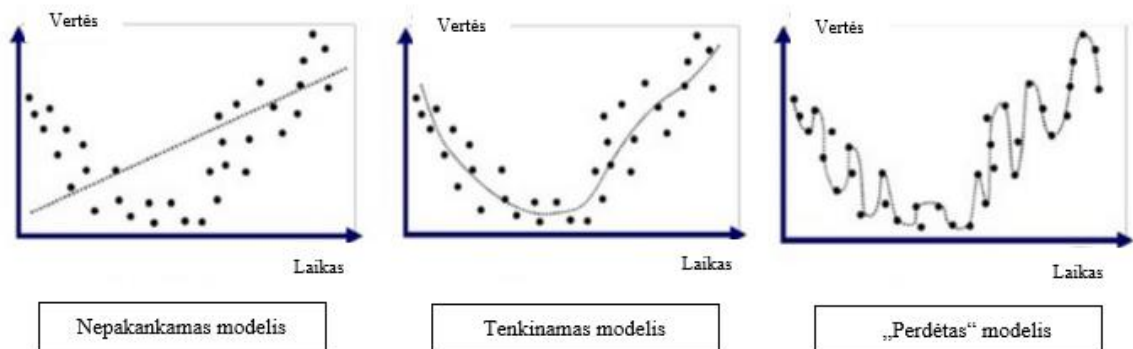
2.2.2. Kriterijai modelių lyginimui

Apibendrinant 2.4 poskyrį, tikslinio baltymo koncentracijai įvertinti pasirinktos keturios skirtingos maksimalios specifinės produkto koncentracijos vertės p_{\max} modelio išraiškos:

2 lentelė. Lyginami p_{max} modeliai ir jų parametrai

p_{max}	p_{max} kintamieji	Būsenos kintamieji	Visi parametrai produkto išraiškai
$p_{max,1999}$	m	$\overline{Amžius}(t)$	k_t, m
$p_{max,2003}$	$k_m, k_\mu, k_{i\mu}$	$\mu(t)$	$k_t, k_m, k_\mu, k_{i\mu}$
$p_{max,2019}$	X_{ind}, k_{m0}, k_{m1}	$\mu(t), x(t)$	X_{ind}, k_{m0}, k_{m1}
$p_{max,2021}$	k_0, k_1, k_2, μ_{ind}	$\mu(t), x(t), \overline{Amžius}(t)$	k_0, k_1, k_2, μ_{ind}

Renkantis modelį svarbu išlaikyti racionalų jo kompleksiškumą ir universalumą duomenų atžvilgiu. Modelis turi būti adekvatus ir „neprištas“ prie eksperimentų ir jų duomenų, iš kurių buvo sudarytas. Tokios situacijos yra būdingos modeliams, kurie turi didesnę skaičių parametru (2.2.2 pav.). Kitas argumentas mažinti parametru skaičių yra tai, jog pramonėje mažiau parametru turintys modeliai yra palankesni. Norint racionaliai optimizuoti procesą, mažesnis parametru kiekis reikalauja mažesnių kaštų ir pastangų atlikti bandymus, skirtus parametru identifikacijai. Siekiant pastebimai padidinti bendrą produkto kiekį, mažesnės apimties modeliams reikėtų įvesti tik vieną arba du pakeitimus.



2.2.2 pav. Modelio „pririšimo“ prie duomenų iliustracija (dešinys paveikslukas), kai taikant daugybę parametru, modelio prognozuojamų verčių tikėtimumo funkcija yra maksimizuota ir prognozuojamos vertės beveik sutampa su duomenimis

Renkantis ar lyginant skirtingus modelius, neretai naudojami papildomi kriterijai kaip *Akaike* informacijos kriterijus [45]. Iš esmės, *Akaike* kriterijus įvertina modelio prarastą informaciją, todėl kokybiškesniu modeliu laikomas tas, kuris praranda jos mažiausiai. Kriterijus baudžia modelį už parametru kiekį, o informatyvesniu modeliu bus laikomas tas, kurio *Akaike* kriterijaus vertė bus mažesnė.

Akaike kriterijaus *AIC* išraiška:

$$AIC(k, n) = n \ln(L) + 2 \cdot k, \quad (12)$$

kur k yra modelio parametru skaičius, n – matavimų imtis, o L yra modelio tikėtimumo funkcija (matavimo verčių tikimybinio tankio funkcija atsižvelgiant į duomenis).

Daugumoje praktinių pritaikymų modelio tikėtumo funkcija apskaičiuoti nėra lengva. Pavyzdžiui, tikslųjų mokslų srityse daugelis modelių išreiškiami kaip deterministinės lygtys, dedukcijos būdu gautos iš ankstesnių teorijų ir dažnai priklausomos nuo jų išvedimo aproksimacijų. Prielaidų, įvestų kuriant konkuruojančius modelius, tikimybės paprastai nežinomos, o modelio įverčių tikimybė nėra apskaičiuojama. Norint įveikti praktinius sunkumus, kylančius patikimai apskaičiuojant tikimybę, dažnas sprendimas yra priimti prielaidą, jog modelio ir duomenų paklaidos yra identiškai paskirstytos ir nepriklausomai atrinktos iš normaliojo Gauso skirstinio [45]. Pastaroji prielaida leidžia išreikšti *Akaike* kriterijų:

$$AIC(k, n) = n \ln(\sigma) + 2 \cdot k, \quad (13)$$

kur σ yra n matavimų vidutinė kvadratinė paklaida tarp prognozuoto dydžio $f_i(k)$ ir išmatuotos dydžio vertės y_i :

$$\sigma = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - f_i(k))^2. \quad (14)$$

Reikia pabrėžti, jog *AIC* nieko nepasako apie absoliučią modelio kokybę, o tik apie jo santykinę kokybę, lyginant su kitais modeliais. Todėl, jei visi modelių kandidatai yra prasti, *AIC* apie tai neinformuos. Taigi vertinant modelį naudojant *AIC*, taip pat reikia patvirtinti absoliučią modelio kokybę. Tikslinio produkto modelio kokybei vertinti pasirinkta vidutinė absoliutinė paklaida (angl. *mean absolute error, MAE*):

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^n |p_i - p_i^y|}{n}, \quad (15)$$

kur p_i yra modelio prognozuota tikslinio produkto koncentracija, p_i^y – eksperimento metu išmatuota koncentracija, n – matavimų skaičius. Atsižvelgiant į tai, jog eksperimentiniai duomenų taškai yra iš dviejų nepriklausomų šaltinių, kuriuose jų kiekis yra skirtingas, pasirinkta normalizuota *MAE* kriterijaus forma:

$$MAE = \frac{MAE_I \cdot n_{II} + MAE_{II} \cdot n_I}{n_I + n_{II}}. \quad (16)$$

2.2.3. Parametrų identifikavimas

Iš 2 lentelės galime matyti, jog p_{\max} dedamoji yra priklausoma nuo būsenos kintamųjų, kurie priklauso nuo laiko, todėl bendra produkto išraiška (2 formulė) įgauna tikslesnę formą:

$$\frac{dp_X(t)}{dt} \equiv q_{p_X}(\mu, p_X) = p_{\max}(\mu, x, t) - k_t \cdot p_X \quad (17)$$

Toliau galime išreikšti šią lygybę integraline forma laiko momentu t :

$$p_X(t) = \int_{t_0}^t p_{\max}(t^*) dt^* - k_t \cdot \int_{t_0}^t p_X(t^*) dt^*. \quad (18)$$

Atlikus integravimo operacijas, gaunama galutinė produkto modelio forma parametrų identifikavimui:

$$p_{X,i} = \frac{(\sum_{j=1}^i p_{\max,j} \cdot \Delta t_{j,j-1} - k_t \cdot \sum_{j=1}^{i-1} p_{X,j} \cdot \Delta t_{j,j-1}) \cdot x_i}{1 + \Delta t_{i,i-1} \cdot k_t}. \quad (19)$$

Pasirinktas optimizavimo kriterijus identifikuojant modelių parametrus yra nuokrypių kvadratų suma (angl. *residual sum of squares*, toliau *RSS*). Jeigu visų eksperimentų metu atliktų matavimų n , tam tikru laiko momentu t_i išmatuota produkto vertė yra $y(t_i)$, o modelio, priklausančio nuo parametro ar parametrų rinkinio k , prognozuojama vertė yra $f(t_i, k)$, *RSS* turi išraišką:

$$RSS(k, n_i) = \sum_{i=1}^{n_i} (y(t_i) - f(t_i, k))^2 = \sum_{i=1}^{n_i} (y_i - f_i(k))^2, \quad (20)$$

Parametrų identifikavimo metu siekiama rasti modelio parametrų rinkinį, su kurio *RSS* būtų mažiausia:

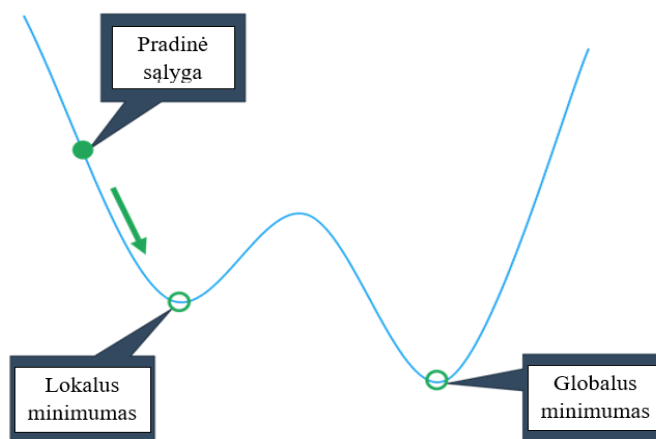
$$RSS(k, n_i) \rightarrow \min; \quad (21)$$

Kadangi tiriamajame darbe yra analizuojami du atskiri nepriklausomi eksperimentinių duomenų rinkiniai, kuriuose yra skirtingi tikslinio produkto matavimo kiekiai, parametrų identifikavimo procedūrai pasirinkta normalizuota *RSS* kriterijaus forma:

$$RSS = \frac{n_{II} \cdot RSS_I + n_I \cdot RSS_{II}}{n_I + n_{II}}. \quad (22)$$

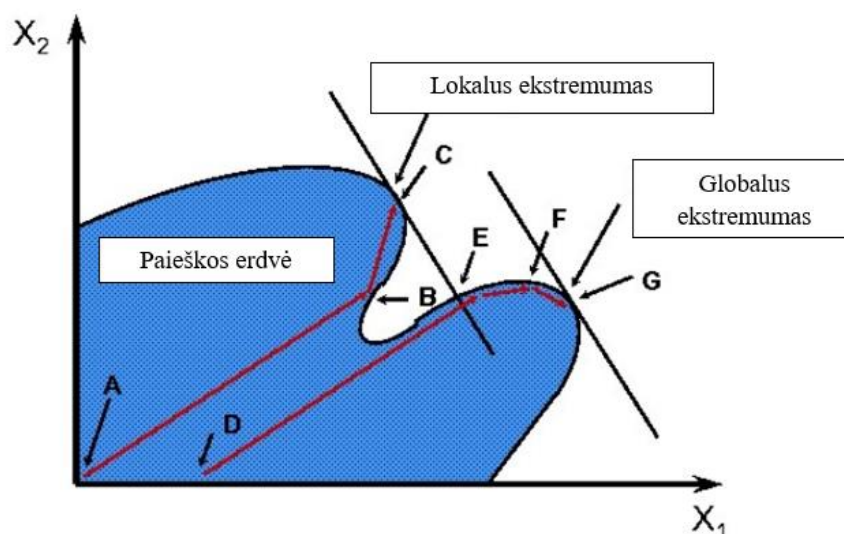
Parametrų identifikavimui pasirinktas įrankis, kuris paremtas gradientiniu netiesiniu optimizavimo metodu, vadinamas *Generalized Reduced Gradient* (liet. apibendrintas sumažintas gradientas, toliau *GRG*) [46]. Tai gradientinio metodo išplėtimas, kuris pritaiko netiesinės nelygybės apribojimus. Taikant metodą, randama tokia parametrų paieškos kryptis, jog atliekant bet kokio dydžio žingsnį, esami parametrų apribojimai išliktų aktyvūs. Parametrui išėjus iš paieškos erdvės, jis yra grąžinamas atgal, atitinkamai adaptuojant gradiento žingsnį. Funkcijos lokalus ekstremumas randamas tada, kai dalinė funkcijos išvestinė, parametro atžvilgiu, yra lygi nuliui.

Pagrindinė gradientinių metodų problema sprendžiant netiesines funkcijas, yra ta, jog metodai yra priklausomi nuo pradinių sąlygų ir gali konverguoti į lokalius ekstremumus neradę globalaus ekstremumo. Pavyzdinė situacija iliustruota žemiau:



2.2.3 pav. Gradientinio metodo trūkumo iliustracija ieškant lokalaus ekstremumo (šiuo atveju, funkcijos minimumo)

Siekiant padidinti tikimybę rasti pseudo-globalų ekstremumą, *GRG* metodas yra kombinuojamas su atsitiktine paieška – generuojamos atsitiktinai paskirstytos pradinės reikšmės parametru kitimo erdvėje, iš kurių vykdomas *GRG* algoritmas. Toks hibridinis netiesioginio programavimo metodas su atsitiktinės paieškos elementais padidina tikimybę rasti pseudo-globalų optimumą bei išlieka pakankamai greitas. Metodo pranašumas iliustruotas žemiau:



2.2.4 pav. *GRG* metodas su atsitiktinę paieška, kur A ir D yra atsitiktinai sugeneruotos pradinės reikšmės.

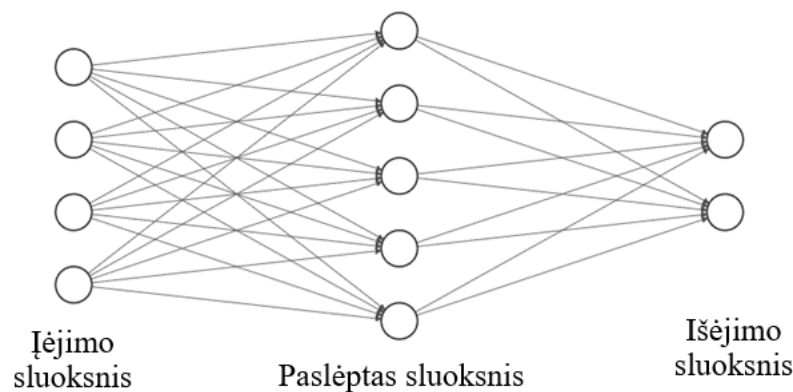
2.3. Dirbtinis neuroninis tinklas

Alternatyviam matematiniam programinio jutiklio modeliui pasirinktas empirinis modelis, pagrįstas dirbtiniu neuroniniu tinklu. Dirbtiniai neuroniniai tinklai remiasi žmogaus smegenyse esančių neuronų tinklo veikimo principu. Gaudami įėjimo signalus, neuronai generuoja ir perduoda išėjimo signalą sekančiam neuronui, taip formuojant skirtingo stiprumo (svorio) tarpusavio ryšius ir apdoroja informaciją [47]. Matematiškai neurono išėjimo signalą y galima išreikšti:

$$y = f\left(\sum_{i=1}^n w_i x_i + w_0\right), \quad (23)$$

kur $x_{i..n}$ yra neurono įėjimai, $w_{i..n}$ –įėjimų svoriai, w_0 – slenkstinė vertė. Funkcija f yra vadinama neurono perdavimo funkcija.

Formulėje (21) pateikta neurono išraiška vadinama perceptronu. Vieno sluoksnio perceptronas, susidedantis iš n neuronų yra pati paprasčiausia dirbtinio neuroninio tinklo struktūra. Tačiau tokios struktūros taikymo galimybės yra ribotos. Praktikoje paplitusi daugiasluoksnio perceptrono tinklo architektūra, susidedanti iš įėjimo ir išėjimo sluoksnių bei iš vieno ar kelių paslėptųjų sluoksnių. Sudėtingesnė struktūra leidžia jį pritaikyti regresijos, klasifikavimo ar prognozavimo uždaviniams spręsti.



2.3.1 pav. Daugiasluoksnio tiesinio sklidimo tinklo pavyzdys, su keturiais įėjimo neuronais, penkiais paslėpto sluoksnio neuronais ir dvejais išėjimo neuronais.

Tikslinio produkto koncentracijai įvertinti pasirinktas tiesinio sklidimo daugiasluoksnis tinklas (angl. *Multilayer Feed-forward Neural Network*). Tiesioginis sklidimas reiškia, jog visų neuronų signalai tinkle susieti vienkrypčiais ryšiais tarp sluoksnių (2.3.1 pav.) ir sluoksnio išvestis nedaro įtakos pačiam sluoksniui. Tai dažniausiai sutinkama neuroninio tinklo struktūra modeliuoti netiesinius ryšius tarp kintamųjų, kuri taikoma ir modeliuojant biotechnologinius procesus [17, 37, 48].

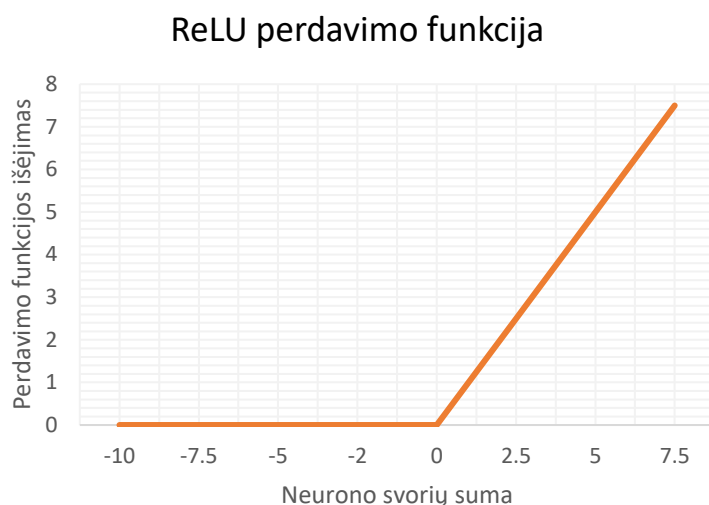
2.3.1. Perdavimo funkcijos

Neurono signalo perdavimo funkcijas galima sugrupuoti į tris grupes:

- Tiesinės - neurono išėjimas yra tiesiškai proporcingas jo įėjimo svorių sumai;
- Slenkstinės - neurono išėjimas priklausys nuo to, ar svorių suma perkopė specifinę slenkstinę vertę.
- Netiesinės - neurono išėjimas yra netiesiškai proporcingas įėjimo svoriams.

Pirmenybė teikiama netiesinėms perdavimo funkcijoms, kurios leidžia tinklui sudaryti sudėtingesnes duomenų struktūras, artimas žmogaus smegenų veiklai [49]. Pradėjus taikyti neuroninius tinklus, populiariausios netiesinės aktyvavimo funkcijos buvo hiperbolinio tangento *tanh* ir sigmoidinė *sigmoid* funkcijos. Tangentinė funkcija pasirenkama dažniau dėl greitesnio modelių mokymo ir geresnių rezultatų pasiekimo [49].

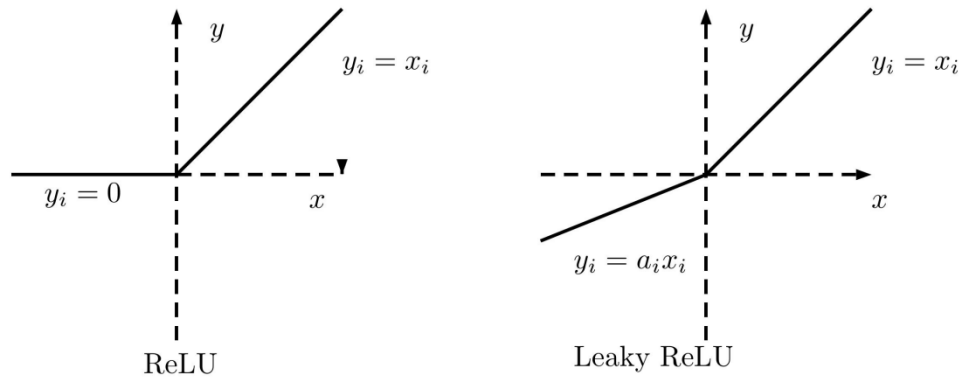
Paskutinįjį dešimtmetį išpopuliarėjo nauja aktyvavimo funkcija, kuri išsprendė problemas, susijusias su netiesinėmis funkcijomis ir giliais (daugiau nei keli sluoksniai) neuroniniais tinklais, bei padidino mokymo spartą. Ši funkcija vadinama ištaisyta linijinė funkcija (angl. *rectified linear activation*, arba *ReLU*). :



2.3.2 pav. *ReLU* perdavimo funkcija. Visos neigiamos svorių sumos vertės generuoja signalą, lygų nuliui, o teigiama vertė tampa išėjimo signalu

ReLU funkcija pasižymi tiesinės funkcijos savybėmis, kurios pagreitina tinklo mokymą dėl lengvesnio funkcijos diferencijavimo, o netiesinė jos prigimtis taip pat leidžia sudaryti sudėtingesnius ryšius tarp neuronų [49]. Papildomas funkcijos pranašumas yra tai, jog ji gali išvesti tikrąją nulinę vertę, skirtingai nei *tanh* ir *sigmoidinio* perdavimo funkcijos, kurios mokosi nustatyti nulinę išvestį tik apytiksliai. Tai reiškia, kad neigiami įėjimai gali išvesti tikrąsias nulines reikšmes, leidžiančias suaktyvinti tinklo paslėptuose sluoksniuose esančius neuronus, kuriuose gali būti viena ar daugiau tikrojo nulio verčių. Dėl savo privalumų, *ReLU* funkcija tapo viena plačiausiai naudojamų perdavimo funkcijų [50].

Žinoma, *ReLU* funkcija nėra be savo apribojimų. Taikant šį perdavimą, yra galimybė susidurti su „mirštančios“ *ReLU* atveju. Tai atvejis, kai mokymo metu ženkliai atnaujinus neurono svorius, jų suma yra visada neigiama, kas reikš, jog neurono išėjimas bus lygus nuliui. Gradientinio mokymo atveju, toks neuronas niekad neatsinaujins ir taps „mirusiu“. Problemai išspręsti naudojamos modifikuotos *ReLU* funkcijos. Kurtam dirbtiniam neuroniniam tinklui pasirinkta *Leaky ReLU* funkcija, kuri sugeneruoja neigiamą signalą esant mažoms neigiamoms neurono įėjimų svorių sumos reikšmėms [51].



2.3.3 pav. *ReLU* ir *Leaky ReLU* perdavimo funkcijų skirtumai. Tiesės koeficientas a apibrėžia, kokio stiprumo signalą generuos perceptronas, kai jo įėjimų svorių suma yra neigiama

2.3.2. Mokymo algoritmas

Neuroninio tinklo mokymo metu siekiama koreguoti tinklo svorius taip, jog paklaida tarp generuojamo išėjimo ir faktinės mokymo duomenų vertės būtų kuo mažesnė. Tam realizuoti apskaičiuojamas paklaidos pokytis svoriui padidėjus arba sumažėjus, arba kitaip, jo išvestinė. Esant keliems įėjimams į neuroną, jie sudaro įėjimo vektorių, kurio pirmosios eilės išvestinių vektorius vadinamas gradientu.

Populiariausias svorių išvestinių algoritmas, pateiktas D. Rumelhart'o, yra klaidos atgalinio skleidimo algoritmas (angl. *error back-propagation*) [52]. Pasirinkus paklaidos kriterijų E , tinklo neuronų svorių ir įėjimo slenkstinių verčių gradientai yra skaičiuojami kryptimi nuo išėjimo iki įėjimo neuronų (atgaline kryptimi). Kriterijus tampa tikslo funkcija J , kurios kintamieji yra tinklą apibūdinantys parametrai. Mokymo metu naudojami optimizavimo algoritmai, kurie minimizuoja tikslo funkciją keisdami tinklo svorius ir slenkstines vertes. Istoriskai, dažniausiai naudojamas optimizavimo algoritmas yra stochastinis gradientinis nusileidimo metodas. Jo taikoma išraiška:

$$\theta_{i+1} = \theta_i - \alpha \cdot \nabla J(\theta_i, x) = \theta_i - \alpha \cdot \frac{\delta E}{\delta \theta_i}, \quad (24)$$

kur θ yra tinklo parametro vertė (svoris, slenkstinė vertė), α yra vadinamasis mokymosi greičio žingsnis (angl. *learning rate*), J yra tikslo arba klaidos funkcija, x yra tinklo įėjimai. Tačiau gradientinių metodų pagrindinis minusas yra jų savybė „užstrigti“ lokaliuose funkcijos minimume. Metodai seka tik parametro pokytį, o ne bendrą tikslo funkcijos vertę, todėl pasiekus lokalų ekstremumą, pokytis tampa lygus nuliui ir algoritmas sustoja neradęs globalaus optimumo. Taip pat, tradicinis stochastinis gradientinio nusileidimo metodas pasižymi lėtesne greitime [49].

Kilusioms problemoms spręsti vystyti algoritmai, kurie pradėjo vertinti nusileidimo pagreitį:

$$\theta_{i+1} = \theta_i - \alpha \cdot \nabla J(\theta_i, x) + \gamma \cdot v(i), \quad (25)$$

kur γ yra pagreičio konstanta, o $v(i)$ yra parametro θ pokyčių (gradientų) suma:

$$v(i) = \sum_{t=0}^i \alpha \cdot \nabla J(\theta_t, x), \quad (26)$$

Pagreičio dedamoji leidžia greičiau pasiekti tikslo funkcijos minimumą ir išvengti mažų gradientinio nusileidimo žingsnių, kurie gali sukelti tinklo mokymą lėtinančius švytavimus. Tačiau naudojant pagreitį, realu patekti į situacijas, kurių metu „praleikiama“ pro tikslo funkcijos minimumą, dėl per ne lyg didelio pagreičio vertės, taip iššvytuojant paiešką aplink ekstremumą. Todėl darbe neuroninio tinklo parametrams optimizuoti pasirinktas adaptyvus pagreičio įvertinimo algoritmas *Adam* (angl. *adaptive moment estimation*), sprendžiantis tradicinių gradientinių metodų problemas [53]. Pagrindinis algoritmo skirtumas yra tai, jog taikomas mokymosi greičio žingsnis nėra konstanta, o tampa adaptyvus. Algoritmas startuoja su didesniu žingsniu ir pagreičiu, tačiau artėjant prie tikslo funkcijos minimumo, žingsnis yra mažinamas, siekiant „neprašoti“ ekstremumo taško. *Adam* gradiento išraiška parametrai:

$$\theta_{i+1} = \theta_i - \frac{\alpha \cdot \widehat{m}_i}{\sqrt{\widehat{v}_i + \varepsilon}} \quad (27)$$

kur ε yra konstanta, lygi 10^{-8} , skirta išvengti dalybos iš nulio. Dydžiai \widehat{m}_i ir \widehat{v}_i išreiškiami:

$$\widehat{m}_i = \frac{m_i}{1 - \beta_1^i}, \quad (28)$$

$$\widehat{v}_i = \frac{v_i}{1 - \beta_2^i}, \quad (29)$$

Dydžiai β_1 , ir β_2 yra laikomi pagreičio nykimo koeficientais. m_i ir v_i išraiškos:

$$m_i = (1 - \beta_1) \cdot \nabla J(\theta(i), x) + \beta_1 \cdot m_{i-1}, \quad (30)$$

$$v_i = (1 - \beta_2) \cdot \nabla J(\theta(i), x)^2 + \beta_2 \cdot v_{i-1} \quad (31)$$

Adam algoritmas palaiko kiekvieno tinklo parametro mokymosi greitį ir jį adaptuoja pagal tai, kaip vidutiniškai greitai keičiasi parametro gradientas. Algoritmas padidina tikimybę surasti globalų funkcijos minimumą eksponentiškai mažindamas mokymosi greitį.

2.3.3. Mokymo imtis

Duomenų rinkinys, kurį sudarė 43 eksperimentai (19 I kultūros ir 24 II kultūros), buvo padalintas į:

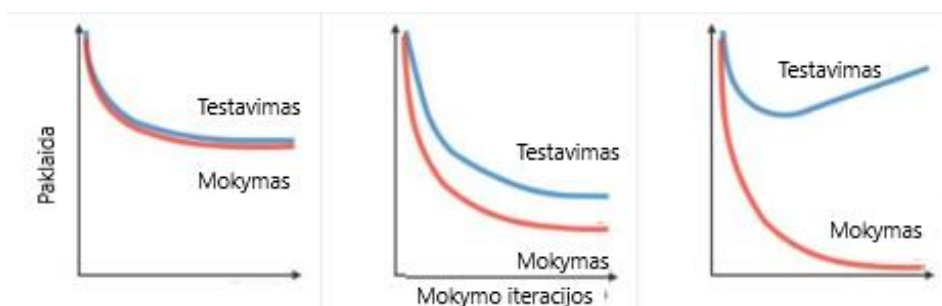
1. 37 eksperimentus (~85% visų eksperimentų), kurių:
 - 1.1. 26 eksperimentai (~75 % mokymo eksperimentų) skirti mokymo imčiai;
 - 1.2. 11 eksperimentų (~25 % mokymo eksperimentų) skirti kryžminiam patikrinimui (testavimo imčiai);
2. 6 eksperimentų modelio validavimui (~15 % visų eksperimentų);

Kryžminis patikrinimas (angl. *cross-validation*) taikomas siekiant išlaikyti modelio generalizaciją [54]. Tai savybė generuoti adekvačius išėjimo signalus tais atvejais, kai modeliui pateikiami dar nematyti, mokymo imtyje nenaudoti duomenys, praktikoje vadinami testavimo imti. Kryžminio patikrinimo metu, modelio svoriai yra keičiami minimizuojant klaidos funkciją ir tuo pačiu tikrinant

testavimo imties paklaidas. Mokymui ir kryžminiam patikrinimui darbe pasitelkta populiariausiai naudojamas klaidos funkcijos kriterijus - vidutinė kvadratinė paklaida MSE (angl. *mean squared error*):

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n}, \quad (32)$$

kur n yra prognozuojamų verčių kiekis, Y_i yra faktinė (išmatuota) vertė, o \hat{Y}_i yra neuroninio tinklo prognozuota vertė. Mokymo ir testavimo imčių klaidos funkcijos yra vieni informatyviausių rodiklių, nusakančių modelio kokybę. Pasitelkus klaidos funkcijų kitimo grafikus galima spręsti kaip kokybiškai apsimokė modelis (2.3.4 pav.).



2.3.4 pav. Skirtingi DNT mokymo atvejai: kairėje- blogo mokymo atvejis, ir jo gaunama paklaida yra didelė; viduryje- gero modelio mokymo atvejis, kai nematytų testavimo duomenų paklaida šiek tiek viršija mokymo imties duomenų paklaidą; dešinėje – atvejis, kai modelis yra permokomas, prisiriša prie mokymo imties duomenų ir turi dideles paklaidas su testavimo duomenimis.

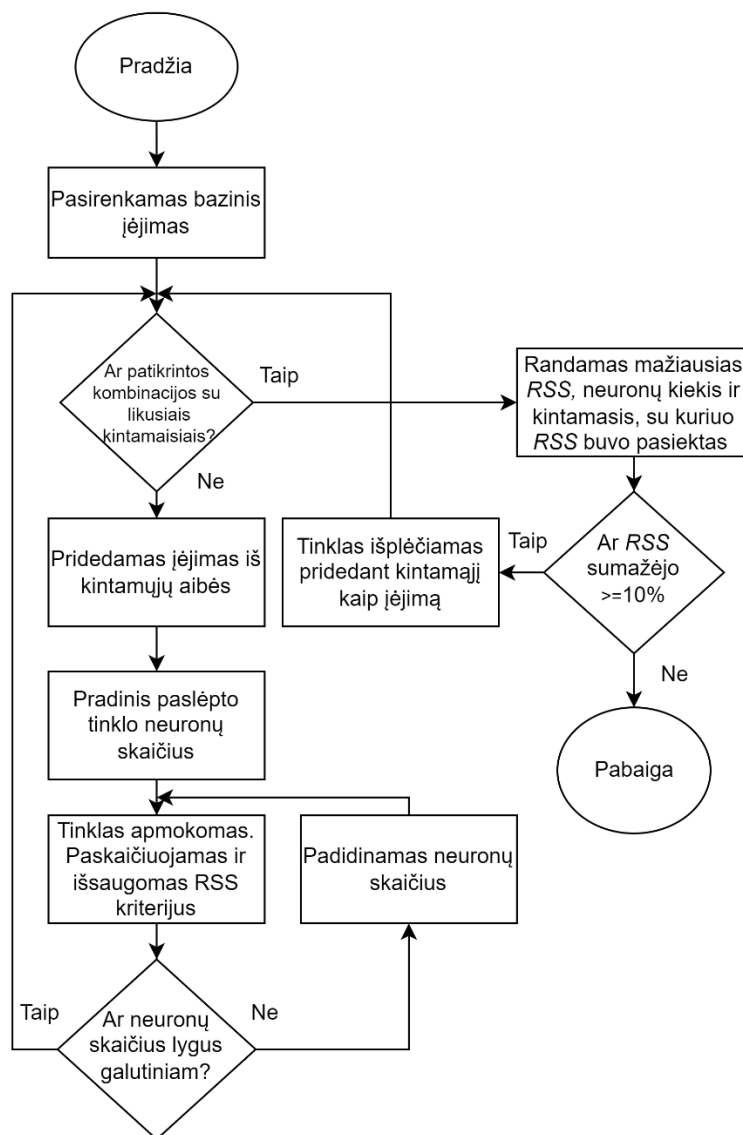
Neuroninio tinklo mokymui pasirinktas prižiūrimasis mokymas (angl. *supervised learning*), kur tinklui apmokyti yra pateikiamos išmatuotos tikslinio produkto koncentracijos, padalintos iš biomasės (specifinės baltymo koncentracijos p_X). Mokymo ir testavimo imtims taip pat pritaikytas normalizavimo algoritmas. Duomenų normavimas taikomas, kai neuroninio tinklo įėjimo kintamųjų dimensijos kinta skirtingose režiuose (pvz. 0-10 ir 100 - 1000). Kintamieji su didesniu kitimo intervalu nusvers mažesnę pokytį turinčius kintamuosius. Tai reikš, jog vieni modelio įėjimai turės didesnę šališkumą galutiniam tinklo išėjimui. Todėl praktikoje įėjimai į neuroninį tinklą yra normalizuojami:

$$x_{norm} = \frac{x - \bar{x}}{\sigma}, \quad (33)$$

kur x yra modelio įėjimo kintamieji, \bar{x} yra įėjimo kintamųjų vidurkis, o σ – jų standartinis nuokrypis. Normalizuojant duomenis, duomenų skalė keičiama taip, jog jų verčių vidurkis būtų lygus nuliui, o standartinis nuokrypis lygus 1, taip centruojant duomenis. Taikant normalizavimą, taip pat svarbu atkreipti dėmesį į pašalinius duomenis mokymo imtyje, kurie gali paveikti neuroninio tinklo apsimokymo rezultatus. Pašaliniai duomenys laikomi tokiais, kurie nepatenka į likusių duomenų pasiskirstymą, dažniausiai atsirandantys dėl žmoniškųjų klaidų atliekant matavimus ar trikdžių jutikliuose.

2.3.4. Tinklo struktūros parinkimas

Neuroninio tinklo modeliui įėjimams atsirinkti sudarytas algoritmas, paremtas skirtingų įėjimo kombinacijų nagrinėjimu:



2.3.5 pav. Principinė neuroninio tinklo įėjimų pasirinkimo algoritmo schema

Algoritmo principas yra ieškoti skirtingų tinklo įėjimo kombinacijų, kurios suteiktų daugiau informacijos tinklui bei turėtų mažiausias paklaidas įvertinant produkto koncentraciją. Tinklas pradamas nuo pasirinkto bazinio įėjimo, prie kurio cikliškai po vieną pridedamas įėjimas su kintamuoju iš likusiųjų kintamųjų aibės. Kiekvienos įėjimų kombinacijos metu neuroninis tinklas yra apmokomas taikant kryžminį patikrinimą, o galutinis modelis yra validuojamas taikant validavimo imties eksperimentus su *RSS* kriterijumi (22 formulė). Siekiant išvengti skirtingo paslėpto sluoksnio neuronų skaičiaus daromos įtakos galutiniams modelio rezultatams, vienos įėjimų kombinacijos tyrimo metu tinklas testuojamas su skirtingu neuronų kiekiu paslėptame sluoksnyje (nuo 1 iki 8). Daugiausiai paklaidą sumažinęs kintamasis yra pridedamas prie bazinio įėjimo (tinklas turi du įėjimus), ir „nagrinėjimas“ vėl kartojamas, pridedant likusius kintamuosius po vieną. Algoritmas stabdomas tada, kai pridėjus įėjimus iš kintamųjų aibės, mažiausia ciklo metu gauta *RSS* kriterijaus vertė nesumažėjo bent 10 % už praėjusią vertę.

Remiantis literatūra, baziniu kintamuoju pasirinktas specifinis biomasės augimo greitis μ . Likusi kintamųjų aibė yra sudaryta atsižvelgiant į 2.3 skyriuje aprašytas balanso lygtis produkto formavimuisi:

1. Biomasės koncentracija x ;
2. Laikas t ;
3. Vidutinis ląstelių amžius $\overline{Amžius}$;
4. Vidutinis deguonies suvartojimo greitis OUR (angl. *cumulative oxygen uptake rate*) – visų tiriamų kultivavimų metu fiksuotas dydis, kuris pasirinktas dėl sėkmingų jo pritaikymų prognozuojant biomasę ar specifinį augimo greitį [18, 55].

Atsirinkus tinklo įėjimus, reikia pasirinkti racionalų sluoksnių ir neuronų kiekį. Taikant daugiasluksnį perceptroną, įvairaus sudėtingumo uždaviniai neretai išsprendžiami taikant vieną paslėptą sluoksnį. Kai kuriais atvejais, tinklui pridedamas antras paslėptas sluoksnis, tačiau daugiau nei du paslėpti sluoksniai rezultatų ženkliai nepagerina, tik prailgina mokymo laiką. Neuronų kiekis paslėptame sluoksnyje taip pat daro įtaką modelio savybėms. Mažas neuronų skaičius gali sąlygoti dideles paklaidas, o tuo tarpu per didelis neuronų skaičius gali bloginti modelio generalizavimo savybes. Modelio parametrais laikomi visi ryšiai, susidarantys tarp neuronų. Pavyzdžiui, modeliui turint 3 įėjimo, 4 paslėpto sluoksnio, 2 išėjimo ir šališkumo (*bias*) neuronus n , bendrą parametru skaičių pilnai sujungtame tinkle galima išreikšti:

$$k = (n_{\text{iėjimo}}) \cdot (n_{\text{paslėpto}} + n_{\text{bias}}) + (n_{\text{paslėpto}} + n_{\text{bias}}) \cdot n_{\text{išėjimo}} \quad (34)$$

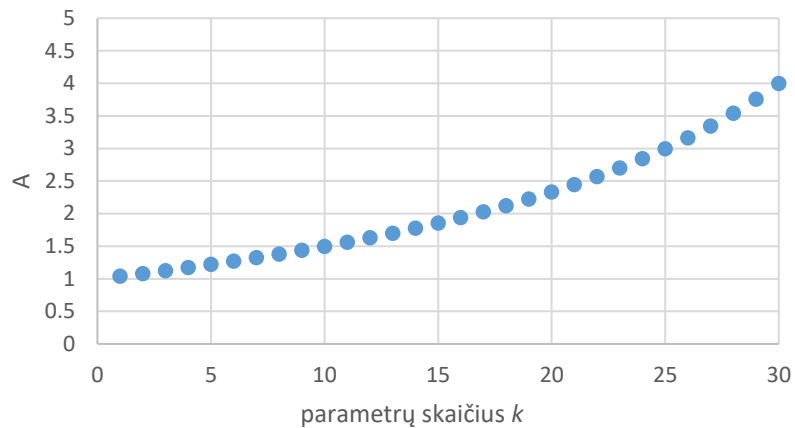
$$= 3 \cdot (4 + 1) + (4 + 1) \cdot 2 = 25;$$

Skirtingiems neuronų kiekiams paslėptuose sluoksniuose lyginti pasirinkta *Akaike* kriterijaus forma, kuri dalyvauja kaip papildomas daugiklis modelio vertinimo kriterijui E [56]:

$$E_{AIC} = E \cdot \left(\frac{1 + \frac{k}{n}}{1 - \frac{k}{n}} \right) \Rightarrow RSS_A = RSS \cdot \left(\frac{1 + \frac{k}{n}}{1 - \frac{k}{n}} \right) = RSS \cdot A, \quad (35)$$

kur n yra duomenų taškų skaičius. Kriterijus A už kiekvieną modelio parametą didina RSS kriterijų vis stipriau:

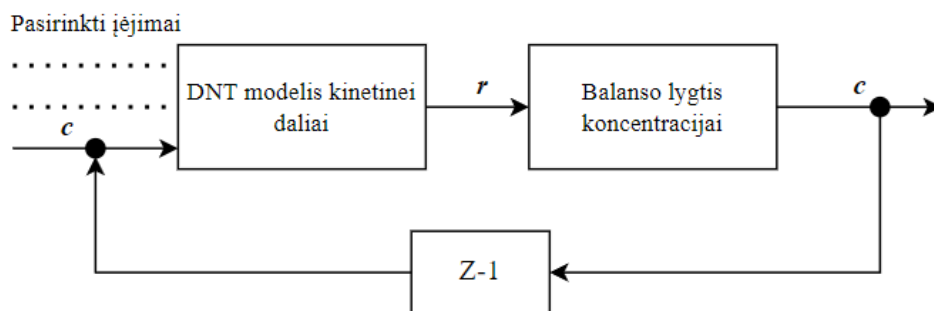
$$A = f(k), \text{ kai } n = 50$$



2.3.6 pav. Akaike kriterijaus A priklausomybė nuo neuroninio tinklo parametrų skaičiaus, kai naudojami 50 eksperimentiniai duomenų taškai

2.4. Hibridinis modelis

Atsižvelgiant į literatūroje apžvelgtus darbus, tikslinio produkto koncentracijai įvertinti pasirinktas ir hibridinis modelis, susidedantis iš dirbtinio neuroninio tinklo ir balanso lygties produkto formavimosi greičiui [57]. Skirtingai nei prieš tai, dirbtinis neuroninis tinklas pasirenkamas prognozuoti ne tikslinio produkto veiklą, bet jos kitimo greitį q_{px} . Tokios struktūros hibridiniuose modeliuose DNT skirtas parašyti proceso biocheminės kinetikos lygtis, kurios nėra gerai žinomos ir iširtos. Tuo tarpu masės balanso lygtis naudojama galutinei koncentracijai gauti. Pastaroji taip pat naudojama kaip DNT įėjimas reakcijos greičiui prognozuoti. Principinė modelio struktūra:



2.4.1 pav. Hibridinio modelio struktūra koncentracijai prognozuoti naudojant dirbtinį neuroninį tinklą, skirtą modeliuoti kitimo greitį r ir masės balanso lygtis koncentracijai c .

DNT įėjimų baziniams kintamiesiems pasirinkti specifinė produkto koncentracija p_x ir specifinis biomasės augimo greitis μ . Tinklo mokymui, įėjimų ir neuronų skaičiui parinkti naudoti metodai aprašyti 2.3 skyrelyje. Balanso lygtis, parinkta specifiniam produkto sintezės greičiui q_{px} , aprašyta 2.2 skyrelyje (2 formulė).

3. Tyrimo rezultatai

3.1. Balanso lygčių modelių rezultatai

Pateikiami produkto koncentracijos įvertinimo modelių, pagrįstų balanso lygtimis, identifikuoti parametrai ir *AIC* apskaičiuotos vertės:

3 lentelė. Produkto koncentracijos įvertinimo modelių, pagrįstų balanso lygtimis, identifikuoti parametrai ir *AIC* kriterijaus vertės

P_{max} reikšmės	Parametru skaičius	Identifikuotos parametru vertės	<i>AIC</i>
$p_{max,1999}$	2	$k_t \cong 2.06,$ $m \cong 0.01176;$	-967.01
$p_{max,2003}$	4	$k_t \cong 0.321,$ $k_m \cong 0.01193,$ $k_\mu \cong 0.000173,$ $k_{i\mu} \cong 0.1677;$	-1005.6
$p_{max,2019}$	3	$k_t \cong -0.112,$ $k_{m1} \cong -0.00243,$ $k_{m0} \cong 0.074;$	-977.17
$p_{max,2021}$	3	$k_t \cong -0.13,$ $k_{m1} \cong 0.0232,$ $k_{m0} \cong -1.066;$	-1082.74

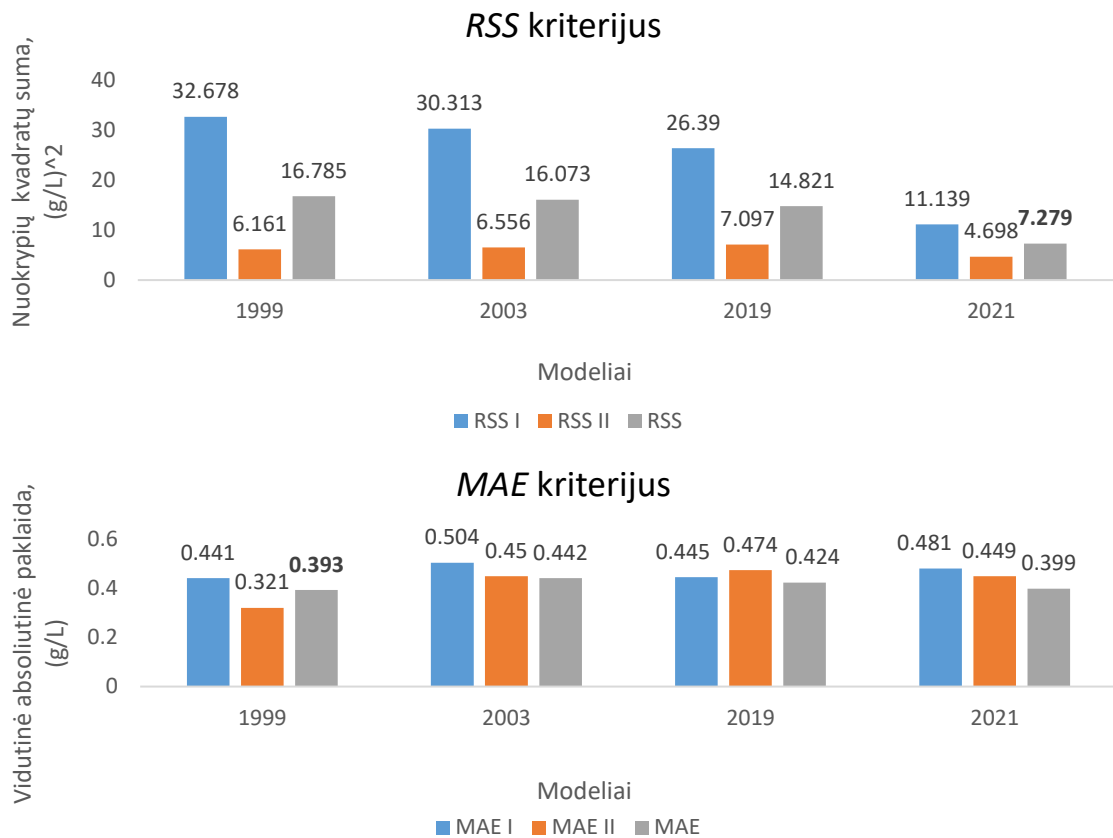
Lyginant modelius, galima matyti, jog *AIC* kriterijus neparodė ženklaus vieno modelio informatyvumo pranašumo prieš kitus. Informatyviausias modelis (žemiausia vertė) yra modelis turintis $p_{max,2021}$ dedamąja. Tai galima paaiškinti tuo, jog autoriai vystė modelį ir jo parametrus atsižvelgdami į papildomus modelio informatyvumo kriterijus. Tuo tarpu modelis su seniausia maksimalaus produkto formavimosi greičio išraiška $p_{max,1999}$ turi didžiausią *AIC* vertę, nors pasižymi mažiausiu parametru skaičiumi.

Toliau pateikiami kokybiniai modelių rodikliai:

4 lentelė. Produkto modelių vidutinės absoliutinės paklaidos ir nuokrypių kvadratų sumos

p įvertinimas	I kultūra (n = 196)		II kultūra (n = 131)		Normalizuoti kriterijai	
	<i>RSS I</i> (g/L) ²	<i>MAE I</i> (g/L)	<i>RSS II</i> (g/L) ²	<i>MAE II</i> (g/L)	<i>RSS</i> (g/L) ²	<i>MAE</i> (g/L)
$p_{max,1999}$	32.678	0.441	6.161	0.321	16.785	0.393
$p_{max,2003}$	30.313	0.504	6.556	0.450	16.073	0.442
$p_{max,2019}$	26.390	0.445	7.097	0.474	14.821	0.424
$p_{max,2021}$	11.139	0.481	4.698	0.449	7.279	0.399

Skirtingai nei *AIC* kriterijus, iš 4 lentelės galima matyti, kad vidutinė absoliutinė paklaida parodė, jog tiksliausias yra seniausias modelis su aktyvios biomasės ir ląstelių amžiaus prielaida $p_{max,1999}$ (0.393 g/L/kg). Naujausias modelis su $p_{max,2021}$ išraiška taip pat pasižymėjo maža vidutine absoliutine paklaida (1.5% procento didesnė už modelį su $p_{max,1999}$). Tuo tarpu modelių paklaidos su $p_{max,2003}$ ir $p_{max,2019}$ išraiškomis buvo atitinkamai 12.46 % ir 7.88% didesnės už mažiausias paklaidas turėjusį modelį. Atsižvelgiant į *RSS* kriterijaus vertę, modelis su $p_{max,2021}$ išraiška turėjo daugiau nei dvigubai mažesnę nuokrypių kvadratų sumą nei likusieji.



3.1.1 pav. Balansų lygtimis grįstų modelių *RSS* ir *MAE* kriterijų palyginimas

3.2. Neuroninio tinklo modelio rezultatai

Neuroninio tinklo įėjimų pasirinkimo algoritmo rezultatai su vieno paslėpto sluoksnio daugiasluoksniu perceptronu:

5 lentelė. *DNT* įėjimo kintamųjų parinkimas remiantis *RSS* kriterijumi kai tinklo išėjimas yra tikslinio produkto koncentracija

Neuroniniam tinklui parinkti įėjimai	Kintamųjų aibė	Rezultatai		
		<i>Min RSS</i> ($(g/L)^2$)	Neuronų skaičius	<i>RSS pokytis, %</i>
μ	-	3.4	5	-
μ	t	3.4	5	23
	x	4.0	3	
	<i>OUR</i>	3.5	5	
	<i>Amžius</i>	2.6	2	
$\frac{\mu,}{Amžius}$	t	3	3	3.84
	x	3.8	5	
	<i>OUR</i>	2.5	3	
$\frac{\mu,}{Amžius, OUR}$	t	2.5	6	0
	x	3.6	7	

Baziniu įėjimu pasirinkus specifinį augimo greitį, mažiausia nuokrypių kvadratų suma buvo gauta su 5 neuronais ($3.4 (g/L)^2$). Antru įėjimu pasirinktas vidutinis ląstelių populiacijos amžius, kuris sumažino *RSS* kriterijaus vertę 23 procentais ($2.6 (g/L)^2$). Trečiam potencialiam tinklo įėjimo

kintamajam (vidutiniam deguonies suvartojimo greičiui *OUR*) pagerinus *RSS* kriterijaus vertę 3.84 %, tinklo įėjimams daugiau kintamųjų nepridėta. Galutiniais modelio įėjimais pasirinkti μ ir $\overline{Amžius}$ kintamieji.

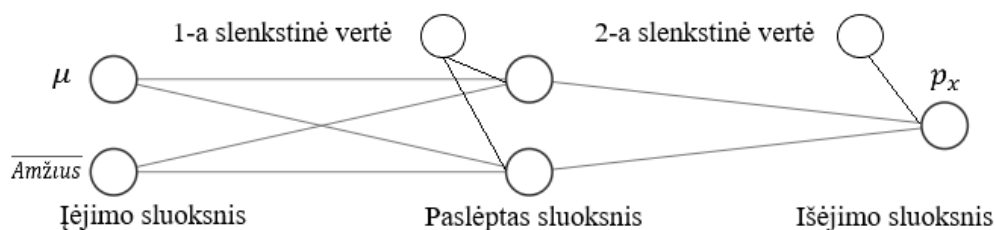
Toliau pateikiami neuroninio tinklo modelio paslėpto sluoksnio neuronų skaičiaus analizė su pasirinktais įėjimais:

6 lentelė. Daugiasluoksnio perceptrono, su vienu paslėptu sluoksniu, produkto koncentracijos (prognozavimo rezultatai esant skirtingiems neuronų skaičiui n paslėptame sluoksnyje

p įvertinimas	Mokymas			Validavimo rezultatai			
	Tinklo įėjimai	n	MSE (g/L) ²	A	RSS (g/L) ²	MAE (g/L)	AIC
μ , $\overline{Amžius}$	1	0.169	1.015	2.373	0.289	1399.609	2.405
	2	0.162	1.028	2.301	0.279	1425.742	2.354
	3	0.161	1.041	2.226	0.298	1421.267	2.335
	4	0.159	1.054	2.276	0.292	1424.112	2.272
	5	0.156	1.068	2.280	0.287	1435.262	2.261
	6	0.142	1.081	2.345	0.288	1499.681	2.498
	7	0.147	1.095	2.300	0.288	1464.017	2.366
	8	0.148	1.109	2.240	0.283	1450.402	2.402

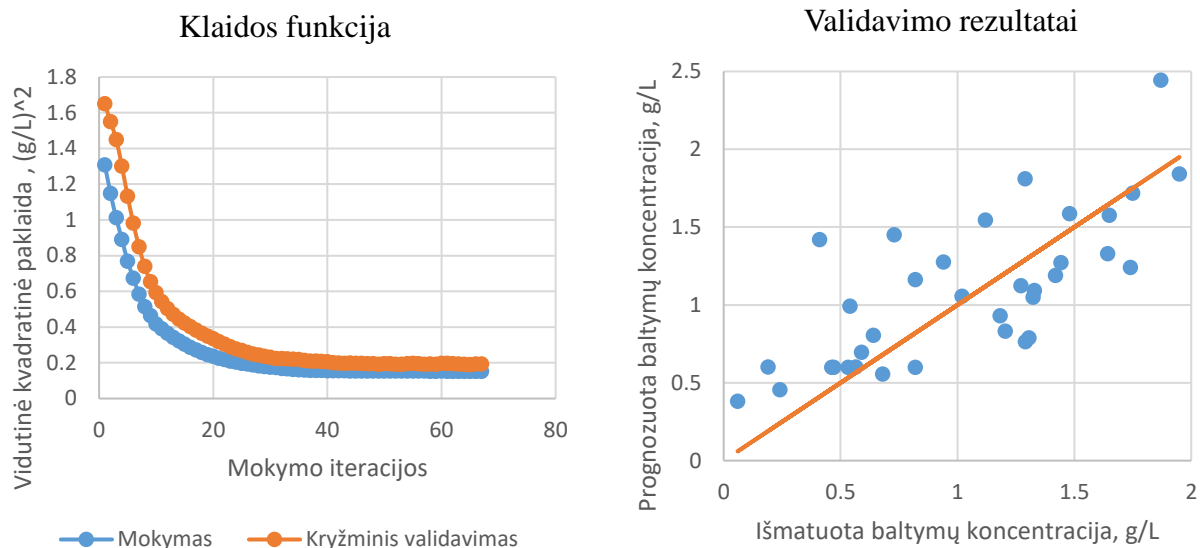
6 lentelėje aprašyti rezultatai yra apskaičiuoti naudojant skirtingas duomenų imtis. Kriterijus *MSE* yra apskaičiuotas naudojant kryžminio patikrinimo duomenų imtį. Tuo tarpu validavimo rezultatai (*RSS*, *MAE*, *RSS_{AIC}*) yra gauti naudojant validavimo imties eksperimentinius taškus. Tinklų mokymo metu, kiekvieno tinklo neurono parinkti svoriai buvo perduodami sekančiam tinklui, prie kurio prisidėdavo naujas neuronas su svoriais, inicializuotais lygus nuliams. Iš validavimo rezultatų matyti, jog geriausias rezultatus (mažiausias *RSS* ir *MAE*) pasiekė tinklas su 3 neuronais paslėptame sluoksnyje. Tačiau tinklas su vienu neuronu mažiau (2 neuronai), pasiekė beveik identiškus rezultatus, turėdamas tik <1 % didesnę paklaidą. Tuo pačiu, atsižvelgiant į *A* kriterijų, modelis pasižymi mažesniu parametru skaičiumi (1.041 ir 1.028). Iš 6 lentelėje pateiktų rezultatų taip pat galima matyti, jog neuronų skaičiaus didinimas paslėptame sluoksnyje rezultatų ženkliai negerina, todėl racijos realizuoti tiesinio sklaidimo *DNT* su dvejais paslėptais sluoksniais nėra.

Galutiniam modeliui pasirinktas neuroninis tinklas su 2 neuronais viename paslėptame sluoksnyje:



3.2.1 pav. Galutinio *DNT* modelio, tikslinio produkto koncentracijai įvertinti, struktūra

Pateikiamos modelio klaidos funkcijos kreivė mokymo metu ir prognozavimo rezultatai su duomenimis iš validavimo imties:



3.2.2 pav. *DNT* modelio mokymas ir rezultatai: kairėje pateikiamas klaidos funkcijos kitimas mokymo su kryžminiu patikrinimu metu; dešinėje pateikiama validavimo imties prognozuotos baltymo koncentracijos p vertės lyginant su išmatuotomis baltymo koncentracijomis

3.3. Hibridinio modelio rezultatai

Neuroninio tinklo, skirto prognozuoti reakcijos greitį q_{px} įėjimams pasirinkti pritaikytas įėjimų nagrinėjimo algoritmas. Galutiniai rezultatai pateikiami žemiau:

7 lentelė. Hibridinio modelio *DNT* įėjimo kintamųjų parinkimas remiantis RSS kriterijumi, kai tinklo išėjimas yra tikslinio produkto koncentracijos kitimo greitis q_{px}

Neuroniniam tinklui parinkti įėjimai	Kintamųjų aibė	Rezultatai			
		$p \min RSS$ (g/L) ²	$q_{px} \min RSS$ $\frac{U}{(kg/h)^2}$	Neuronų skaičius	p RSS pokytis, %
μ, p_x	-	1.5	1.94	4	-
μ, p_x	t	1.2	1.85	4	26
	x	1.4	1.84	6	
	OUR	1.2	1.89	10	
	Amžius	1.1	1.80	5	
$\frac{\mu,}{Amžius}$	t	1.1	1.87	8	0
	x	1.5	1.88	7	
	OUR	1.1	1.85	3	

Kaip *DNT* modelyje baltymų specifinei koncentracijai prognozuoti, taip ir hibridiniame modelyje jos kitimo greičiui modeliuoti, prie pasirinktų bazinių tinklo įėjimų pridėtas vidutinis ląstelių populiacijos amžius (5 ir 7 lentelės). Hibridinio modelio *DNT* dalyje kintamasis $\overline{Amžius}$ pagerino galutinės produkto koncentracijos p nuokrypių kvadratų sumos vertę 26 procentais. Kiti kintamieji tinklo įėjime ženklios įtakos rezultatams neparodė.

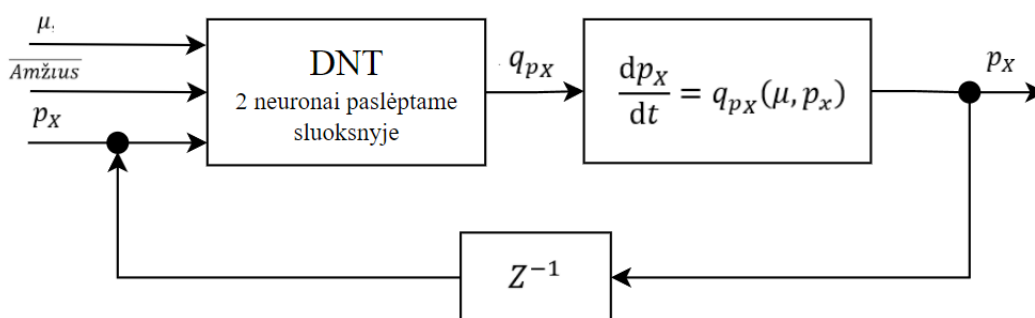
Hibridinio modelio neuroninio tinklo neuronų skaičiaus parinkimas paslėptame sluoksnyje:

8 lentelė. Hibridinio modelio neuroninio tinklo su vienu paslėptu sluoksniu produkto koncentracijos kitimo greičio q_{p_x} prognozavimo rezultatai esant skirtingiems neuronų skaičiui paslėptame sluoksnyje

p įvertinimas	Mokymas			Validavimo rezultatai			
Tinklo įėjimai	Neuronų skaičius	q MSE $\frac{U}{(\frac{U}{kg}/h)^2}$	A	RSS $(g/L)^2$	MAE (g/L)	AIC	RSS_A $(g/L)^2$
$\mu,$ $p_x,$ $\overline{Amžius}$	1	0.089	1.015	1.735	0.246	-2729.866	1.762
	2	0.067	1.028	1.201	0.216	-2773.110	1.235
	3	0.066	1.041	1.449	0.236	-2745.402	1.508
	4	0.088	1.054	2.302	0.290	-2747.131	2.427
	5	0.067	1.068	1.571	0.210	-2808.940	1.678
	6	0.071	1.081	2.413	0.290	-2747.375	2.609
	7	0.072	1.095	1.981	0.255	-2789.686	2.169
	8	0.066	1.109	1.875	0.266	-2800.082	2.079

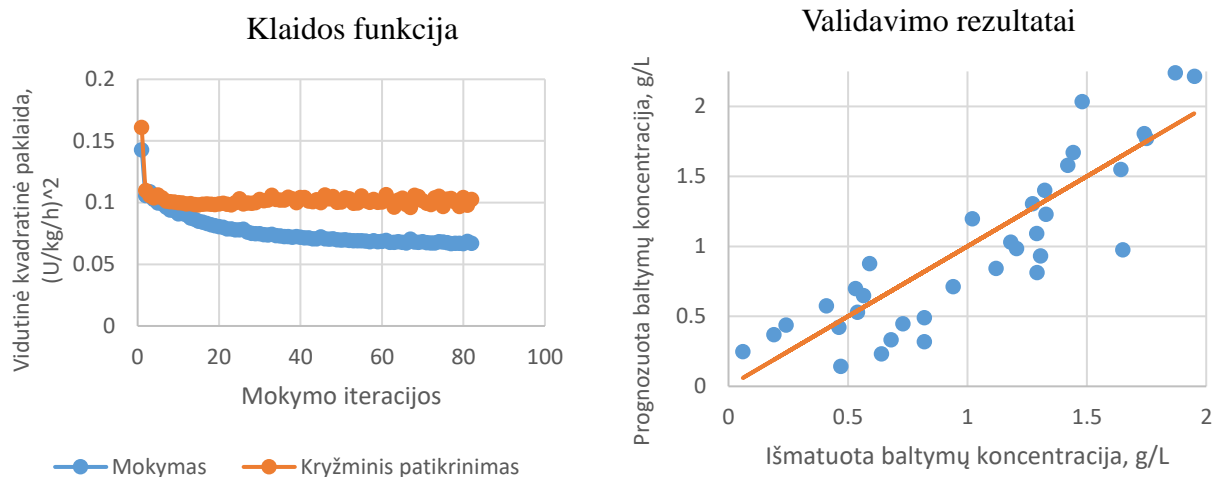
Atsižvelgiant į rezultatus 8 lentelėje, geriausiai pasirodė modelis su 2 neuronais paslėptame sluoksnyje. Lyginant tik neuroniniu tinklu pagrįstą modelį su hibridiniu modeliu, pastarasis pagerino RSS kriterijų ~14 % o MAE kriterijų - ~5.5 % (6 ir 8 lentelės).

Galutinio hibridinio modelio principinė schema:



3.3.1 pav. Realizuoto hibridinio modelio principinė schema

Hibridinio modelio DNT klaidos funkcijos kitimas mokymo metu ir validavimo rezultatai:



3.3.2 pav. Hibridinio modelio *DNT* dalies mokymas ir rezultatai: kairėje pateikiama klaidos funkcijos kitimas mokymo su kryžiniu patikrinimu metu; dešinėje pateikiama validavimo imties prognozuotos koncentracijos vertės lyginant su išmatuotomis produkto koncentracijomis

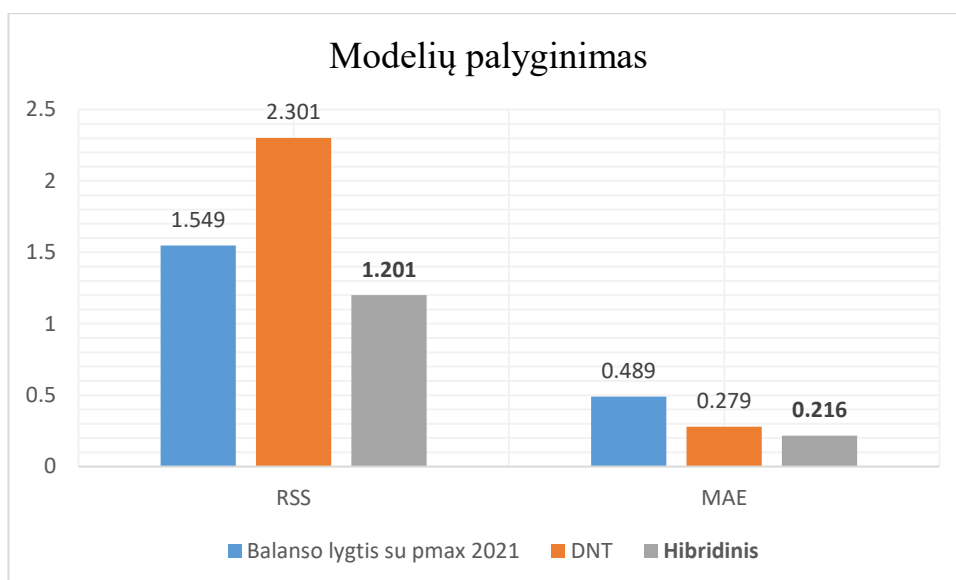
3.4. Apibendrinti rezultatai

Trijų skirtingų tipų modelių, pasiekusių mažiausias paklaidas, rezultatai pateikiami žemiau:

9 lentelė. Mažiausias paklaidas rekombinantinio baltymo koncentracijos p įvertinimo rezultatus pasiekę skirtingo tipo modeliai

p įvertinimas			Visa duomenų imtis (43 eksperimentai)		Validavimo imtis (6 eksperimentai, 36 matavimai)	
Modelio tipas	Modelio kintamieji	Modelio parametrai	RSS $(g/L)^2$	MAE (g/L)	RSS $(g/L)^2$	MAE (g/L)
Balanso lygtis	μ ,	k_0, k_1, k_2, μ_{ind}	7.279	0.399	1.549	0.489
	χ					
	$\overline{Am\check{z}ius}$					
<i>DNT</i>	μ	2 neuronai paslėptajame sluoksnyje (9 parametrai)	-	-	2.301	0.279
	$\overline{Am\check{z}ius}$					
Hibridinis	μ	2 neuronai paslėptajame sluoksnyje (9 parametrai)	-	-	1.201	0.216
	p_x					
	$\overline{Am\check{z}ius}$					
	q_{p_x}					

Skirtingų modelių validavimo imties rezultatai iliustruoti žemiau:



3.4.1 pav. Skirtingų tipų geriausių rezultatus pasiekusių modelių palyginimas naudojant validavimo imties eksperimentus

Iš pateiktų rezultatų (9 lentelė ir 3.4.1 pav.) galima matyti, jog mažiausias bendras paklaidas pasiekė hibridinis modelis (*RSS ir MAE*), pralenkęs balanso lygtimi ir dirbtiniu neuroniniu tinklu grįstus modelius. Hibridinio modelio *RSS* kriterijaus vertė ($1.201 (g/L)^2$) yra beveik dvigubai mažesnė už *DNT* modelį ($2.301 (g/L)^2$) ir ~30% mažesnė už masės balanso lygties modelį ($1.549 (g/L)^2$). Atsižvelgiant į vidutinę absoliutinę paklaidą, hibridinis modelis taip pat pralenkė likusius du matematinius modelius, turėdamas daugiau nei dvigubai mažesnę paklaidą lyginant su balanso lygties modeliu (0.216 ir $0.489 g/L$) ir 29% mažesnę paklaidą už *DNT* modelį. Verta paminėti, jog hibridinis modelis geresnius rezultatus pasiekė su didesniu parametru skaičiumi (9 parametrai), nei mechanistinis modelis (4 parametrai). Tai aktualu modelių ekstrapoliavimo savybėms, arba situacijoms kai atliekami bioproceso pakeitimai, kas reikalauja identifikuoti naujus modelių parametrus.

Rezultatai ir išvados

1. Realizuoti keturi masių balanso lygtimis pagrįsti modeliai, skirti įvertinti tikslinio produkto koncentracijai periodinėse su pamaitinimu *E. Coli* kultūrose. Modelių parametrai identifikuoti naudojant gradientinį optimizavimo metodą. Palyginus modelių tarpusavio rezultatus prognozavimo tikslumo požiūriu su eksperimentiniais duomenimis iš dviejų skirtingų šaltinių, susidedančių iš 43 kultivavimo procesų, mažiausią vidutinę absoliutinę paklaidą turėjo modelis su $p_{max,1999}$ išraiška (0.393 g/L), o mažiausią nuokrypių kvadratų sumą – modelis su $p_{max,2021}$ išraiška ($7.279 (g/L)^2$).
2. Sukurtas daugiasluoksnis tiesinio sklidimo dirbtinis neuroninis tinklas, skirtas prognozuoti specifinę tikslinio produkto koncentraciją p_X . Vieno paslėpto sluoksnio su 2 neuronais tinklas validuotas naudojant 6 mokymui nenaudotus eksperimentus. Validavimo metu gauta vidutinė absoliutinė baltymo koncentracijos paklaida siekė 0.279 g/L, o nuokrypių kvadratų suma – 2.301 (g/L)².
3. Realizuotas hibridinis modelis produkto koncentracijai įvertinti. Neuroninio tinklo daliai parinkti specifinio biomasės augimo greičio μ , p_X ir $\overline{Am\check{z}ius}$ kintamųjų įėjimai ir 2 neuronai paslėptame sluoksnyje. Modelis pasiekė 0.216 g/L vidutinę absoliutinę paklaidą ir 1.201 (g/L)² nuokrypių kvadratų sumą vertinant rekombinantinių baltymų koncentraciją.
4. Palyginus masės balanso lygties, neuroninio tinklo ir hibridinį modelius naudojant validavimo imties eksperimentus, mažiausią vidutinę absoliutinę paklaidą (0.216 g/L) ir nuokrypių kvadratų sumą turėjo hibridinis modelis (1.201 (g/L)²).
5. Balanso lygčių modelių rezultatai publikuoti straipsnyje „*Bridging Offline Functional Model Carrying Aging-Specific Growth Rate Information and Recombinant Protein Expression: Entropic Extension of Akaike Information Criterion*”, R. Urniezius, B. Kemesis, and R. Simutis. Entropy, vol. 23, no. 8, p. 1057, Aug. 2021, doi: 10.3390/e23081057.

Literatūros sąrašas

1. M. Gavrilescu, "Sustainability," in *Comprehensive Biotechnology*, Elsevier, 2011, pp. 905–923. doi: [10.1016/B978-0-08-088504-9.00147-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00147-1).
2. S. Tan and Y. Tatsumura, "Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin," *smedj*, vol. 56, no. 07, pp. 366–367, Jul. 2015, doi: [10.11622/smedj.2015105](https://doi.org/10.11622/smedj.2015105).
3. F. A. Khan, *Biotechnology fundamentals*. Boca Raton: CRC Press, 2012.
4. G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges," *Front. Microbiol.*, vol. 5, Apr. 2014, doi: [10.3389/fmicb.2014.00172](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172).
5. J. J. Greene and V. B. Rao, Eds., *Recombinant DNA principles and methodologies*. New York: Marcel Dekker, 1998.
6. N. Allocati, M. Masulli, M. Alexeyev, and C. Di Ilio, "Escherichia coli in Europe: An Overview," *IJERPH*, vol. 10, no. 12, pp. 6235–6254, Nov. 2013, doi: [10.3390/ijerph10126235](https://doi.org/10.3390/ijerph10126235).
7. *Kanopka, Biotechnologija*.
8. G. Marr, "Growth rate of *Escherichia coli*," *Microbiol Rev*, vol. 55, no. 2, pp. 316–333, Jun. 1991, doi: [10.1128/mr.55.2.316-333.1991](https://doi.org/10.1128/mr.55.2.316-333.1991).
9. Vytautas Galvanauskas, Donatas Levišauskas, *Biotechnologinių procesų modeliavimas, optimizavimas ir valdymas*.
10. Galvanauskas, Simutis, Levišauskas, and Urniežius, "Practical Solutions for Specific Growth Rate Control Systems in Industrial Bioreactors," *Processes*, vol. 7, no. 10, p. 693, Oct. 2019, doi: [10.3390/pr7100693](https://doi.org/10.3390/pr7100693).
11. R. Urniežius, V. Galvanauskas, A. Survyla, R. Simutis, and D. Levisauskas, "From Physics to Bioengineering: Microbial Cultivation Process Design and Feeding Rate Control Based on Relative Entropy Using Nuisance Time," *Entropy*, vol. 20, no. 10, p. 779, Oct. 2018, doi: [10.3390/e20100779](https://doi.org/10.3390/e20100779).
12. G. Faust, A. Stand, and D. Weuster-Botz, "IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*," *Eng. Life Sci.*, vol. 15, no. 8, pp. 824–829, Nov. 2015, doi: [10.1002/elsc.201500011](https://doi.org/10.1002/elsc.201500011).
13. Cinar, Ed., *Batch fermentation: modeling, monitoring, and control*. New York: Marcel Dekker, 2003.
14. W. D. Maxon, "Continuous fermentation; a discussion of its principles and applications," *Appl Microbiol*, vol. 3, no. 2, pp. 110–120, Mar. 1955, doi: [10.1128/am.3.2.110-122.1955](https://doi.org/10.1128/am.3.2.110-122.1955).
15. J. Minihane and D. E. Brown, "Fed-batch culture technology," *Biotechnology Advances*, vol. 4, no. 2, pp. 207–218, 1986, doi: [10.1016/0734-9750\(86\)90309-5](https://doi.org/10.1016/0734-9750(86)90309-5).
16. Kemėšis, "Baltymų gelio elektroforezės analizės programos sukūrimas ir tyrimas", 2020 m.
17. H. Zhang, "Software Sensors and Their Applications in Bioprocess," in *Computational Intelligence Techniques for Bioprocess Modelling, Supervision and Control*, vol. 218, M. do Carmo Nicoletti and L. C. Jain, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, pp. 25–56. doi: [10.1007/978-3-642-01888-6_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01888-6_2).
18. R. Urniežius, A. Survyla, D. Paulauskas, V. A. Bumelis, and V. Galvanauskas, "Generic estimator of biomass concentration for *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch cultures based on cumulative oxygen consumption rate," *Microb Cell Fact*, vol. 18, no. 1, p. 190, Dec. 2019, doi: [10.1186/s12934-019-1241-7](https://doi.org/10.1186/s12934-019-1241-7).
19. B. Lennox, G. A. Montague, H. G. Hiden, G. Kornfeld, and P. R. Goulding, "Process monitoring of an industrial fed-batch fermentation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 74, no. 2, pp. 125–135, Jul. 2001, doi: [10.1002/bit.1102](https://doi.org/10.1002/bit.1102).

20. O. Grigs, "Model Predictive Feeding Rate Control in Conventional and Single-use Lab-scale Bioreactors: A Study on Practical Application," *Chem.Biochem.Eng.Q.*, vol. 30, no. 1, pp. 47–60, Apr. 2016, doi: 10.15255/CABEQ.2015.2212.
21. S. Feyeo de Azevedo, B. Dahm, and F. R. Oliveira, "Hybrid modelling of biochemical processes: A comparison with the conventional approach," *Computers & Chemical Engineering*, vol. 21, pp. S751–S756, May 1997, doi: 10.1016/S0098-1354(97)87593-X.
22. K.-Y. San and G. Stephanopoulos, "Studies on on-line bioreactor identification. IV. Utilization of pH measurements for product estimation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 26, no. 10, pp. 1209–1218, Oct. 1984, doi: 10.1002/bit.260261009.
23. Krämer and R. King, "On-line monitoring of substrates and biomass using near-infrared spectroscopy and model-based state estimation for enzyme production by *S. cerevisiae*," *IFAC-PapersOnLine*, vol. 49, no. 7, pp. 609–614, 2016, doi: 10.1016/j.ifacol.2016.07.235.
24. R. Simutis and A. Lübbert, "Hybrid Approach to State Estimation for Bioprocess Control," *Bioengineering*, vol. 4, no. 4, p. 21, Mar. 2017, doi: 10.3390/bioengineering4010021.
25. J. Wang, L. Zhao, and T. Yu, "On-line Estimation in Fed-batch Fermentation Process Using State Space Model and Unscented Kalman Filter," *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 18, no. 2, pp. 258–264, Apr. 2010, doi: 10.1016/S1004-9541(08)60351-1.
26. J. Thibault, V. Van Breusegem, and A. Chérury, "On-line prediction of fermentation variables using neural networks: PREDICTION OF FERMENTATION VARIABLES," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 36, no. 10, pp. 1041–1048, Dec. 1990, doi: 10.1002/bit.260361009.
27. K. Suzuki, Ed., *Artificial Neural Networks - Methodological Advances and Biomedical Applications*. InTech, 2011. doi: 10.5772/644.
28. B. Lennox, G. A. Montague, H. G. Hiden, G. Kornfeld, and P. R. Goulding, "Process monitoring of an industrial fed-batch fermentation," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 74, no. 2, pp. 125–135, Jul. 2001, doi: 10.1002/bit.1102.
29. Th. Bachinger, U. Riese, R. K. Eriksson, and C. F. Mandenius, "Electronic nose for estimation of product concentration in mammalian cell cultivation," *Bioprocess Engineering*, vol. 23, no. 6, pp. 637–642, Dec. 2000, doi: 10.1007/s004490000213.
30. J. F. MacGregor and T. Kourti, "Statistical process control of multivariate processes," *Control Engineering Practice*, vol. 3, no. 3, pp. 403–414, Mar. 1995, doi: 10.1016/0967-0661(95)00014-L.
31. B. Lennox, H. G. Hiden, G. A. Montague, G. Kornfeld, and P. R. Goulding, "Application of multivariate statistical process control to batch operations," *Computers & Chemical Engineering*, vol. 24, no. 2–7, pp. 291–296, Jul. 2000, doi: 10.1016/S0098-1354(00)00480-4
32. C. Koch, A. E. Posch, H. C. Goicoechea, C. Herwig, and B. Lendl, "Multi-analyte quantification in bioprocesses by Fourier-transform-infrared spectroscopy by partial least squares regression and multivariate curve resolution," *Analytica Chimica Acta*, vol. 807, pp. 103–110, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.aca.2013.10.042.
33. P. Nomikos and J. F. MacGregor, "Monitoring batch processes using multiway principal component analysis," *AIChE J.*, vol. 40, no. 8, pp. 1361–1375, Aug. 1994, doi: 10.1002/aic.690400809.
34. S. Gnoth, M. Jenzsch, R. Simutis, and A. Lübbert, "Product formation kinetics in genetically modified *E. coli* bacteria: inclusion body formation," *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 31, no. 1, pp. 41–46, Jan. 2008, doi: 10.1007/s00449-007-0161-9.

35. Golabgir and C. Herwig, "Combining Mechanistic Modeling and Raman Spectroscopy for Real-Time Monitoring of Fed-Batch Penicillin Production," *Chemie Ingenieur Technik*, vol. 88, no. 6, pp. 764–776, Jun. 2016, doi: 10.1002/cite.201500101.
36. Levisauskas, D., Galvanauskas, V., Henrich, S., Wilhelm, K., Volk, N., & Lübbert, A. (2003). Model-based optimization of viral capsid protein production in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25(4), 255–262. doi:10.1007/s00449-002-0305-x
37. S. Gnoth, M. Jenzsch, R. Simutis, and A. Lübbert, "PRODUCT FORMATION KINETICS IN A RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION PROCESS," *IFAC Proceedings Volumes*, vol. 40, no. 4, pp. 201–206, 2007, doi: 10.3182/20070604-3-MX-2914.00035.
38. V. Galvanauskas, N. Volk, R. Simutis, and A. Lübbert, "DESIGN OF RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION PROCESSES," *Chemical Engineering Communications*, vol. 191, no. 5, pp. 732–748, May 2004, doi: [10.1080/00986440490276056](https://doi.org/10.1080/00986440490276056).
39. Levisauskas, V. Plaskute, "Modeling and optimization of secondary metabolites production in fed-batch biotechnological processes based on physiologically active biomass concept", ISSN 1392-124X, *Information Technology and Control*, Kaunas, Technologija No 1(10). (1999), pp. 33-36.
40. V. Plaskute, D. Levisauskas, "Application of hybrid models for prediction and optimization of enzyme fermentation process. Comparative study". *Systems Science*, vol. 27, no. 3, pp. 115-123, 2001. YADDA identifier: bwmeta1.element.baztech-article-BPW4-0002-0035.
41. K. Han and O. Levenspiel, "Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 32, no. 4, pp. 430–447, Aug. 1988, doi: 10.1002/bit.260320404.
42. V. Babaeipour, S. A. Shojaosadati, and N. Maghsoudi, "Maximizing Production of Human Interferon- γ in HCDC of Recombinant *E. coli*," *Iran J Pharm Res*, vol. 12, no. 3, pp. 563–572, 2013.
43. R. Urniezius and A. Survyla, "Identification of Functional Bioprocess Model for Recombinant *E. Coli* Cultivation Process," *Entropy*, vol. 21, no. 12, p. 1221, Dec. 2019, doi: 10.3390/e21121221
44. R. Urniezius, B. Kemesis, and R. Simutis, "Bridging Offline Functional Model Carrying Aging-Specific Growth Rate Information and Recombinant Protein Expression: Entropic Extension of Akaike Information Criterion," *Entropy*, vol. 23, no. 8, p. 1057, Aug. 2021, doi: 10.3390/e23081057.
45. Murari, E. Peluso, F. Cianfrani, P. Gaudio, and M. Lungaroni, "On the Use of Entropy to Improve Model Selection Criteria," *Entropy*, vol. 21, no. 4, p. 394, Apr. 2019, doi: [10.3390/e21040394](https://doi.org/10.3390/e21040394).
46. L. S. Lasdon, R. L. Fox, and M. W. Ratner, "Nonlinear optimization using the generalized reduced gradient method," *R.A.I.R.O. Recherche opérationnelle*, vol. 8, no. V3, pp. 73–103, 1974, doi: 10.1051/ro/197408V300731.
47. W. S. McCulloch and W. Pitts, "A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity," *Bulletin of Mathematical Biophysics*, vol. 5, no. 4, pp. 115–133, Dec. 1943, doi: 10.1007/BF02478259.
48. K. Hornik, M. Stinchcombe, and H. White, "Multilayer feedforward networks are universal approximators," *Neural Networks*, vol. 2, no. 5, pp. 359–366, Jan. 1989, doi: 10.1016/0893-6080(89)90020-8.
49. Goodfellow, Y. Bengio, and A. Courville, *Deep learning*. Cambridge, Massachusetts: The MIT Press, 2016.
50. C. Nwankpa, W. Ijomah, A. Gachagan, and S. Marshall, "Activation Functions: Comparison of trends in Practice and Research for Deep Learning," 2018, doi: 10.48550/ARXIV.1811.03378.

51. T. Szandała, “Review and Comparison of Commonly Used Activation Functions for Deep Neural Networks,” 2020, doi: 10.48550/ARXIV.2010.09458.
52. D. E. Rumelhart, G. E. Hinton and R. J. Williams, “Learning Internal Representations by Error Propagation: Parallel Distributed Processing, Vol. I,” MIT Press, Cambridge, 1986, pp. 318-362.
53. D. Choi, C. J. Shallue, Z. Nado, J. Lee, C. J. Maddison, and G. E. Dahl, “On Empirical Comparisons of Optimizers for Deep Learning,” arXiv:1910.05446 [cs, stat], Jun. 2020, Accessed: Apr. 22, 2022. [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/1910.05446>
54. P. Refaeilzadeh, L. Tang, and H. Liu, “Cross-Validation,” in Encyclopedia of Database Systems, L. Liu and M. T. Özsu, Eds. Boston, MA: Springer US, 2009, pp. 532–538. doi: 10.1007/978-0-387-39940-9_565.
55. Survyla, D. Levisauskas, R. Urniezius, and R. Simutis, “An oxygen-uptake-rate-based estimator of the specific growth rate in Escherichia coli BL21 strains cultivation processes,” Computational and Structural Biotechnology Journal, vol. 19, pp. 5856–5863, 2021, doi: 10.1016/j.csbj.2021.10.015.
56. J. Sjöberg and L. Ljung, “Overtraining, regularization and searching for a minimum, with application to neural networks,” International Journal of Control, vol. 62, no. 6, pp. 1391–1407, Dec. 1995, doi: 10.1080/00207179508921605.
57. V. Galvanauskas, R. Simutis, and A. Lubbert, “Hybrid process models for process optimisation, monitoring and control,” Bioprocess Biosyst Eng, vol. 26, no. 6, pp. 393–400, Dec. 2004, doi: 10.1007/s00449-004-0385-x.