



Kauno technologijos universitetas

Elektros ir Elektronikos fakultetas

**PERIODINIŲ SU PAMAITINIMU MIKROORGANIZMŲ
KULTŪRŲ KULTIVAVIMO PROCESŲ PAMAITINIMO
GREIČIO ALGORITMŲ SUDARYMAS IR TYRIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Arnas Survyla

Projekto autorius

Prof. Donatas Levišauskas

Vadovas

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Elektros ir elektronikos fakultetas

**PERIODINIŲ SU PAMAITINIMU MIKROORGANIZMŲ
KULTŪRŲ KULTIVAVIMO PROCESŲ PAMAITINIMO
GREIČIO ALGORITMŲ SUDARYMAS IR TYRIMAS**

Baigiamasis magistro projektas

Valdymo technologijos (6211EX014)

Arnas Survyla

Projekto autorius

Prof. Donatas Levišauskas

Vadovas

Doc. Renaldas Urniežius

Recenzentas

Kaunas, 2019



Kauno technologijos universitetas

Elektros ir elektronikos fakultetas

Arnas Survyla

**PERIODINIŲ SU PAMAITINIMU MIKROORGANIZMŲ
KULTŪRŲ KULTIVAVIMO PROCESŲ PAMAITINIMO
GREIČIO ALGORITMŲ SUDARYMAS IR TYRIMAS**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Arno Surylos, baigiamasis projektas tema „Periodinių su pamaitinimu mikroorganizmų kultūrų kultivavimo procesų pamaitinimo greičio algoritmų sudarymas ir tyrimas“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

(parašas)

Arnas Survyla. Periodinių su pamaitinimu mikroorganizmų kultūrų kultivavimo procesų pamaitinimo greičio algoritmų sudarymas ir tyrimas. Magistro studijų baigiamasis projektas vadovas prof. Donatas Levišauskas; Kauno technologijos universitetas, Elektros ir elektronikos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų krypčių grupė): Elektronikos inžinerija, Inžinerijos mokslai

Reikšminiai žodžiai: *biotechnologija, mikroorganizmai, pamaitinimo tirpalas, matematinis modelis*.

Kaunas, 2019. 44 p.

Santrauka

Įmonėms, užsiimančioms biotechnologiniais procesais, labai svarbus kultivuojamo produkto atsikartojamumas ir kokybė. Šie du kriterijai įgyvendinami tinkamai sudarant periodinio su pamaitinimu, limituoto augimo kultivavimo proceso valdymą. Tačiau šiuo metu pramonėje dažniausiai pasitaikantys nelimituoto augimo kultivavimo procesai, palaikant vienodą pamaitinimo tirpalo koncentraciją bioreaktoriuje.

Darbe aprašomas ir išvystomas matematinės struktūros mechanistinis modelis, skirtas periodiniams su pamaitinimu, pramonėje naudojamų mikroorganizmų kultūrų, kultivavimo procesų valdymo algoritmams sudaryti.

Identifikuojami alaus mielių (*lot. Saccharomyces cerevisiae*) ir *E. coli* bakterijų (*lot. Escherichia coli*) matematiniai modeliai. Palyginami apskaičiuoti teoriniai rezultatai su eksperimentiniais duomenimis.

Atliekamas *E. coli* bakterijų eksperimentinis tyrimas pagal matematinio modelio sudarytą valdymo algoritmą. Palyginami modelio prognozuoti parametrai su eksperimentinio tyrimo rezultatais.

Survyla, Arnas. Development and Investigations of Feed-Rate Control Algorithms of Fed-Batch Cultivation Processes of Microorganisms Cultures. Master's Final Degree Project supervisor prof. Donatas Levišauskas; Faculty of Electrical and Electronics Engineering, Kaunas University of Technology.

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

Keywords: *biotechnology, microorganisms, feed solution, mathematical model.*

Kaunas, 2019. 44 p.

Summary

The reproducibility and quality of the cultivated product is crucial for biotechnological companies. These two criteria are implemented through proper management of the fed-batch growth-limited cultivation process. However, currently the most common non-limiting growth cultivation processes in the industry, maintaining the same concentration of feed solution in the bioreactor.

This paper describes the development of mathematical model which performs control algorithms for fed-batch cultivation processes of industrial microorganisms cultures.

Mathematical models of beer yeast (*lot. Saccharomyces cerevisiae*) and *E. coli* bacteria (*lot. Escherichia coli*) are identified. The calculated theoretical results are compared with experimental data.

An experimental study of *E. coli* bacteria is performed according to a mathematical model-based control algorithm. Model predicted parameters are compared with experimental results.

Turinys

| | |
|---|-----------|
| Paveikslų sąrašas..... | 7 |
| Įvadas | 8 |
| 1. Literatūros apžvalga | 9 |
| 1.1. Tyrimo objektas | 9 |
| 1.1.1. Mielių ląstelės | 9 |
| 1.1.2. <i>E. coli</i> bakterija | 10 |
| 1.2. Santykinio ląstelių augimo fazės ir priklausomybė nuo valdymo | 11 |
| 1.3. Periodinio su pamaitinimu mikroorganizmų kultivavimo proceso mechanistinio matematinio modelio sudarymas | 13 |
| 1.3.1. Medžiagų balanso lygtis biomasei | 13 |
| 1.3.2. Medžiagų balanso sąlyga substratui..... | 14 |
| 1.4. Pramonei taikytini biotechnologinių procesų matematiniai modeliai..... | 15 |
| 1.4.1. Periodiniu su pamaitinimu kultivavimo proceso mielių modelis | 16 |
| 1.4.2. Kultivavimo proceso matematinis modelis pagrįstas santykinę entropija | 18 |
| 2. Eksperimentų vykdymo metodai ir įranga | 21 |
| 2.1. Aparatinė įranga..... | 21 |
| 2.2. Kultivuojamos terpės svorio matavimas | 22 |
| 2.3. Substrato tiekimas ir duomenų surinkimas..... | 24 |
| 2.4. Kultivavimo metu atlikti papildomi matavimai..... | 25 |
| 2.5. Biotechnologinio proceso paruošimas ir vykdymas | 25 |
| 3. Matematinio modelio eksperimentinis tyrimas ir rezultatai | 27 |
| 3.1. Kultivavimo proceso universalus matematinio modelio sudarymas..... | 27 |
| 3.2. Mielių <i>Sacharomices cerevisae</i> periodinio su pamaitinimu kultivavimo proceso modeliavimas | 29 |
| 3.3. <i>E. coli</i> periodinio su pamaitinimu kultivavimo proceso modeliavimas | 31 |
| 4. Biotechnologinio proceso valdymo algoritmo sudarymas ir eksperimentinis tyrimas | 35 |
| Išvados | 40 |
| Literatūros sąrašas..... | 41 |

Paveikslų sąrašas

| | |
|--|----|
| 1.1 pav. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ląstelės dalijimasis..... | 9 |
| 1.2 pav. <i>E. Coli</i> naujos ląstelės atsiskyrimas nuo motininės | 10 |
| 1.3 pav. Keturių ląstelių augimo fazės | 12 |
| 1.4 pav. Struktūrinė schema pilkos dėžės modelio identifikavimui | 20 |
| 2.1 pav. EDF-5.4_1 bioreaktorius ir valdymo sistema | 21 |
| 2.2 pav. Autoklavuojama bioreaktoriaus sistema „Applikon“ | 22 |
| 2.3 pav. Svorio keitiklio jungikliai ir indikatoriai. | 23 |
| 2.4 pav. Svėrimo platformos, keitiklio ir valdiklio sujungimo elektrinė schema | 23 |
| 2.5 pav. Programos „Feeding Box“ valdymo langas..... | 24 |
| 2.6 pav. Gliukomatis „Accu-Chek“ | 25 |
| 3.1 pav. Pirmojo kultivavimo proceso specifinio augimo greičio priklausomybė nuo biomasės koncentracijos | 29 |
| 3.2 pav. Pirmojo kultivavimo proceso biomasės išėigos koeficiento priklausomybė nuo biomasės koncentracijos .. | 30 |
| 3.3 pav. Pirmojo kultivavimo proceso eksperimentinio ir apskaičiuoto biomasės koncentracijos laiko trajektorijos | 30 |
| 3.4 pav. Antrojo kultivavimo proceso specifinio augimo greičio priklausomybė nuo biomasės koncentracijos..... | 30 |
| 3.5 pav. Antro kultivavimo proceso biomasės išėigos koeficiento priklausomybė nuo biomasės koncentracijos | 31 |
| 3.6 pav. Antro kultivavimo proceso eksperimentinio ir apskaičiuoto biomasės koncentracijos laiko trajektorijos.... | 31 |
| 3.7 pav. Pirmojo kultivavimo proceso specifinio augimo greičio priklausomybė nuo biomasės koncentracijos | 32 |
| 3.8 pav. Pirmojo kultivavimo proceso biomasės išėigos koeficiento priklausomybė nuo biomasės koncentracijos .. | 32 |
| 3.9 pav. Pirmojo kultivavimo proceso eksperimentinio ir apskaičiuoto biomasės koncentracijos laiko trajektorijos | 33 |
| 3.10 pav. Antrojo kultivavimo proceso specifinio greičio priklausomybė nuo biomasės koncentracijos | 33 |
| 3.11 pav. Antrojo kultivavimo proceso biomasės išėigos koeficiento priklausomybė nuo biomasės koncentracijos . | 34 |
| 3.12 pav. Antrojo kultivavimo proceso eksperimentinio ir apskaičiuoto biomasės kiekio laiko trajektorijos | 34 |
| 4.1 pav. Matematinio modelio schema..... | 35 |
| 4.2 pav. Sudaryta specifinio augimo greičio kreivė | 36 |
| 4.3 pav. Sumodeliuotas pamaitinimo tirpalo kiekio profilis | 37 |
| 4.4 pav. Biomasės koncentracijos kitimas laike..... | 38 |
| 4.5 pav. Specifinio biomasės augimo greičio kitimas laike | 38 |
| 4.6 pav. Biomasės kiekio kitimas laike | 38 |
| 4.7 pav. Bioreaktoriaus tūrio kitimas laike..... | 39 |

Ivadas

Biotechnologinių procesų valdymas iki šiol yra sudėtingas uždavinys. Norint tinkamai valdyti šiuos procesus, tam reikia biotechnologinių, matematinių, inžinerinių žinių. Šiuose procesuose dalyvauja daug įvairių biocheminių, biotechnologinių reiškinių, dėl kurių gali kisti gaminio gamyba ir viso proceso valdymas, sąnaudos ir produkto išeiga. Todėl prieš pradėdant kultivavimo procesą, reikia kruopščiai suplanuoti ir apskaičiuoti vykdomo proceso eigą. Kad suplanuotas modelis sklandžiai veiktų realiose situacijose, inžinieriai iš pradžių savo žinias ir modeliavimo įgūdžius siekia realizuoti teoriniuose modeliuose, ypač fizika pagrįstomis matematinėmis lygtimis. Procesų optimizavimas, stebėjimas ir valdymas yra pagrindiniai bioprocėsų inžinerijos uždaviniai. Todėl iš pradžių biotechnologinius procesus reikia tinkamai išanalizuoti ir aprašyti matematiniuose modeliuose, kad būtų galima pritaikyti tinkamą valdymo būdą. Pagrindinis objektas biotechnologiniuose procesuose yra kultivuojama mikroorganizmų kultūra. Šiame darbe pasirinkti objektai yra gamyboje dažnai pasitaikančios ląstelių rūšys eukariotai ir prokariotai – nesudėtingos sandaros ląstelės, sudarytos tik iš branduolio ir jį supančios membranos, kurių galima rasti žmogaus organizme. Šios ląstelės yra auginamos dėl į auginimo terpę išskiriamų naudingųjų produktų: baltymai, vitaminai ir kiti produktai, kurie naudojami farmacijoje. Norint gauti aukštą gaminio kokybę ir optimizuoti sąnaudas, reikia į gamybos procesą įdiegti technologinius įtaisus, automatizuojančius mikroorganizmų auginimo procesą su matematiškai pagrįstu valdymo metodu. Kiekviena biotechnologijos įmonė siekia gauti kuo aukštesnę produkcijos kokybę ir optimizuoti gamybos sąnaudas, bet be tikslaus ir patikimo valdymo tai įvykdyti neįmanoma. Pagrindinis biotechnologinio proceso valdymas priklauso nuo ląstelių pamaitinamo tirpalo kiekio, kuris yra tiekiamas į bioreaktorių. Todėl prieš kultivavimo procesą yra suprojektuojamas pamaitinimo tirpalo, tiekimo į bioreaktorių, profilis, pagal kurį bus valdomas procesas. Šio projekto tikslas yra **sudaryti periodinių su pamaitinimu mikroorganizmų kultūrų *E. coli* ir mielių kultivavimo procesų pamaitinimo greičio algoritmus, realizuojančius pageidaujama mikroorganizmų biomasės augimo dinamiką**. Norint pasiekti šį tikslą buvo išsikelti šie uždaviniai:

1. atlikti mikroorganizmų kultūrų *E. coli* ir mielių periodinius su pamaitinimu kultivavimo procesų eksperimentinius tyrimus laboratoriniuose bioreaktoriuose;
2. remiantis eksperimentinių tyrimų rezultatais, sudaryti tiriamųjų procesų matematinius modelius, skirtus pamaitinimo greičiams skaičiuoti ir kultivavimo procesams prognozuoti;
3. apskaičiuoti pamaitinimo greičio algoritmus realizuojančius pageidaujančius biomasės augimo greičio trajektorijas;
4. atlikti kultivavimo proceso eksperimentinius tyrimus naudojantis apskaičiuotus pamaitinimo greičio algoritmus;
5. palyginti modelio prognozuojamus rezultatus su eksperimentinių tyrimų rezultatais;
6. pateikti tyrimų išvadas ir rekomendacijas.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Tyrimo objektas

1.1.1. Mielių ląstelės

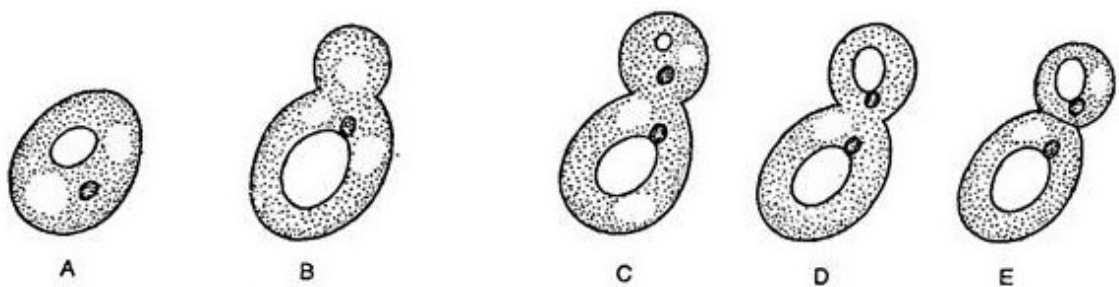
Biotechnologiniuose procesuose pagrindinis darbo objektas yra ląstelės. Ląstelių tipų yra daug ir kiekviena rūšis išskiria skirtingus naudingus fermentus, todėl pasaulyje vyksta įvairių tipų ir rūšių fermentacijos su skirtingomis ląstelių kultūromis. Pramonėje labiausiai yra naudojamos dvi ląstelių rūšys. Viena iš jų *eukariotinių* ląstelių domeniui priklausančios mielių ląstelės.

Mielės tai vienaląsčiai grybai, dažnai naudojami alaus ir maisto pramonėje, nes mielėse yra naudingųjų B grupės vitaminų bei kitų naudingų išskyrų. Taip pat šios ląstelės plačiai naudojamos ūkio sektoriuose gaminant maisto papildus, pašarus ar davinius gyvūnams ir su šiomis ląstelėmis yra atliekami moksliniai tyrimai ir daromi eksperimentai biotechnologijos srityje [1,2].

Alaus mielės (*lot. Saccharomyces cerevisiae*) yra labiausiai paplitusi mielių rūšis alaus, maisto pramonėje. Taip pat šis ląstelių porūšis plačiai naudojamas mokslo ar biotechnologijų srityje dėl jų žemos savikainos ir išskiriamų naudingųjų fermentų, kurie yra panašūs į žmogaus organizme esančiuosius. Mielių ląstelių kultivavimo proceso atlikimas nėra sudėtingas, nes šioms ląstelėms nereikia didelio sterilumo [3].

Saccharomyces scerevisae augimas yra didelis, kaip eukariotinei ląstelei. Šios kultūros biomasė padidėja dvigubai vienos arba dviejų valandų intervale [4]. Todėl alaus mielės yra naudojamos pramonėje ir eksperimentiniuose tyrimuose, dėl greito jų augimo greičio ir biomasės didėjimo. Ši ląstelių kultūra taip pat paranki vykdant eksperimentinius ar mokslinius tyrimus ir projektuojant automatinius valdymo algoritmus, sistemas, nes nereikalauja didelio sterilumo ir kruopštumo. Augimas yra parankus, realiu laiku matomas biomasės didėjimas ir tuo pačiu metu galima suspėti adaptuoti valdymo sistemą nesukeliant streso ląstelėms dėl staigiai pasikeitusios aplinkos ar parametru [5].

Saccharomyces scerevisae ląstelių dauginimosi būdas yra vegetatyvinis pumpuravimasis. Tai nelytiniu būdu dauginimosi procesas, kai ant motininės ląstelės paviršiaus formuojasi nauja ląstelė. Pradiniu momentu ląstelės branduolys dalijasi į dvi lygias dalis. Naujame branduolyje yra išsaugota identiška motininės ląstelės DNR. Naujasis auglys auga ant motininės ląstelės membranos iki kol pasiekia pirmtakės ląstelės dydį [1,2]. Mielių pumpuravimosi būdas pavaizduotas 1.1 paveiksle.



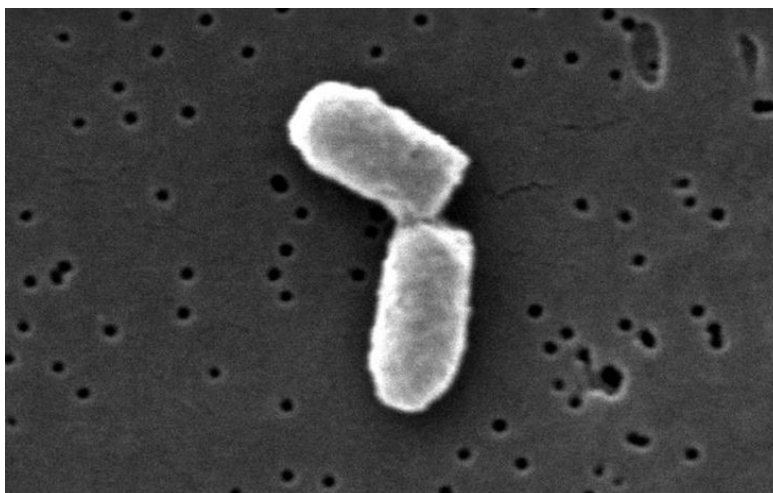
1.1 pav. *Saccharomyces cerevisiae* ląstelės dalijimasis

1.1.2. *E. coli* bakterija

Sekanti ląstelių rūšis dažnai naudojama pramonėje yra *Escherichia coli* bakterija. Tai ląstelė priklausanti prokariotų domenui paprastos sandaros gyvybės forma, kuri susideda tik iš nukleido, vienos DNR molekulės, kuri atstoja branduolį [6].

Escherichia coli bakterija yra gramneigiamos, lazdelės formos, 1–3 μ x 0,4–0,7 μ dydžio bakterijos, dažniausiai randamos žmogaus ar gyvūnų žarnyne. Šios bakterijos auginamos pramonėje dėl į terpę išskiriamų naudingųjų fermentų, rekombinantinių baltymų [2,6,7]. Rekombinantiniai baltymai yra labai stipri veiklioji medžiaga, vaistinis preparatas, kuris pasižymi saugiu vartojimu ir yra be netikslinių šalutinių poveikių. Šį baltymą labai lengva modifikuoti ir pritaikyti plačiam vaistų spektrui [8]. Kadangi *E. coli* bakterijos gaminamas produktas yra labai paklausus, ši ląstelių rūšis yra viena iš dažniausiai kultivuojamų ląstelių pramonėje dėl didelės rinkos.

Taip pat ši bakterijos rūšis pasižymi dideliu dauginimosi greičiu. Gliukozės druskų terpėje ir optimaliomis aplinkos sąlygomis jos dvigubėjimo laikas yra apie 20 min. Taigi kultūra, inokuluota 1/100 praskiedimu gali pasiekti stacionarią fazę per kelias valandas [9]. *E. coli* dauginasi ląstelių dalijimosi būdu, kai genetinės medžiagos perkeliama per membraną. Nauja ląstelė, dar vadinama dukterinė ląstelė, kuri buvo suformuota dalijimosi būdu, yra kopija senosios ląstelės. Atskira bakterija pradeda šį procesą išilgai ląstelės, po to eina beveik tiksli genomo transdukcija. Genetinės replikacijos metu gali atsirasti mutacijos ir klaidos, tačiau dažniausiai jų būna nedaug ir neturi didelės įtakos bakterijai. Naujos bakterijos sienelė suformuojama ir lygiai padalinami ląstelių komponentai, viena tėvų genomo kopija perkeliama į naujos ląstelės pusę. Ląstelė dalijasi palikdama dvi originalias bakterijos kopijas, vadinamas dukterinėmis ląstelėmis [2, 9].



1.2 pav. *E. Coli* naujos ląstelės atsiskyrimas nuo motininės

1.2. Santykinio ląstelių augimo fazės ir priklausomybė nuo valdymo

Santykinis ląstelių augimo greitis yra svarbus kultivavimo proceso parametras, kuris apibūdina proceso valdymą, jo atlikimą ir nusako biomasės kitimą tam tikru laiku [10], matematinė išraiška parametro:

$$\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X} \quad (1.1)$$

Šioje formulėje parametras X yra biomasė. Kiekviena ląstelių rūšis turi savo santykinį maksimalų augimo greitį. Augimo greitis priklauso nuo auginamos terpės ir joje esančių ištirpintų mineralų koncentracijos, maistinių medžiagų koncentracijos, gliukozės dozavimo į bioreaktorių bei kitų, parametrų turinčių įtaką kultivavimo terpei [11]. Vykdamas ląstelių kultivavimą, visas procesas yra suskaidytas į keturias atskiras augimo fazes: latentinė arba lag, log, stacionari ir atmirimo [12].

Latentinė arba lag fazė yra pirmasis etapas, kai ląstelės, patekusios į naują terpę, turi prie jos adaptuotis. Šios fazės metu augimo greitis iš esmės yra lygus nuliui, fazės trukmė gali būti nuo valandos iki kelių dienų. Nors ląstelės praktiškai nesidalija, šiuo laikotarpiu jos nėra neveiksnios. Lag fazės metu mikrobo populiacijai būdingas intensyvus metabolinis aktyvumas, kai yra sintetinami fermentai ir įvairios kitos molekulės, leidžiančios prisitaikyti prie naujų sąlygų. Šios fazės trukmė priklauso nuo pradinio organizmų tankio bioreaktoriuje. Dėl mažo ląstelių tankio bioreaktoriuje atsiranda eksogenų (iš ląstelės išskiriami fermentai) trūkumas. Kai ląstelių tankis yra mažas, šios medžiagos yra atskiestos ir ne taip lengvai įsisavinamos.

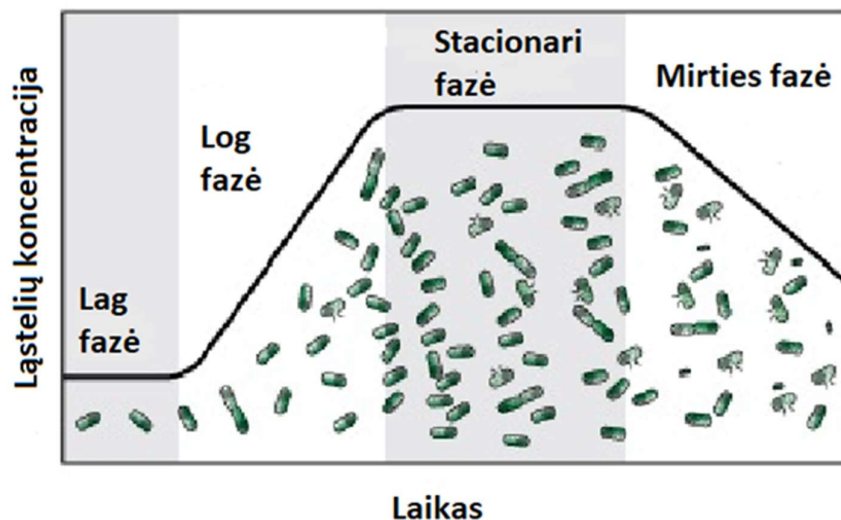
Log arba eksponentinio augimo fazė, tai antroji kultūros augimo pakopa. Kai ląstelės apsipranta, jos pradeda intensyviai dalintis ir pereina prie augimo periodo arba eksponentinio didėjimo. Eksponentinio augimo metu ląstelių padidėjimo greitis yra proporcingas ląstelių skaičiui bet kuriuo metu. Mikroorganizmų dauginimasis yra aktyviausias šiuo metu, o generacijos laikas yra nekintantis, t. y. pastovus. Log fazė augimo kreivėje žymima kylančia tiese. Šios fazės metu ląstelės yra labiausiai metaboliškai aktyvios – aplinkoje yra gausu augimui reikalingų medžiagų. Eksponentinio augimo fazė yra naudojama pramonės tikslais, nes šiuo metu augančios ląstelės gamina didžiausią kiekį siekiamo produkto.

Trečias augimo etapas yra stacionarus. Stacionari fazė kultivuojamoje kultūroje gali būti apibrėžiama kaip būklė nusistovėjusio proceso, kuri gali būti išreikšta matematiškai:

$$\frac{dX}{dt} = 0. \quad (1.2)$$

Šioje fazėje ląstelės vis dar auga ir dalijasi, tačiau naujų ląstelių skaičius lygus mirstančių ląstelių skaičiui. Viena iš dažniausiai pasitaikančių priežasčių, kai augimo fazė iš eksponentinės pereina į stacionarią yra ta, kad energijos šaltinio (anglies) koncentracija drastiškai nukrito.

Paskutinis augimo etapas yra mirimo, kurio metu prarandama kultivuojamų ląstelių. Mirties etape gali būti ir atskirų gyvų ląstelių, kurios dalijasi, tačiau nustatyta, kad didesnis skaičius ląstelių miršta nei dauginasi [12, 13].



1.3 pav. Keturios ląstelių augimo fazės

Šiame darbe matematinis modelis bei valdymas yra taikomas log fazei, nes šioje fazėje augimo greitis yra didžiausias. Kad biomasės koncentracija didėtų maksimaliu greičiu bei kultivavimo efektyvumas būtų didžiausias, reikia tinkamo valdymo [14]. Kitu atveju augimo greičio mažėjimą gali nulemti susidarę įvairūs pašaliniai reiškiniai.

Ląstelių augimo greitį labiausiai sąlygoja tiekiamas maistinių medžiagų kiekis ir jo koncentracija bioreaktoriuje [15]. Pradiniu kultivavimo metu, kai mikroorganizmai yra užsėjami į bioreaktorių, ląstelės naudoja terpėje ištirpusias maistines medžiagas. Pradėjus kultūrai daugintis, pradinių maistinių medžiagų atsargos pradeda sparčiai mažėti, kol pradinis medžiagų šaltinis yra išsekvojamas. Taigi norint toliau palaikyti gerą organizmų augimą, į terpę yra tiekiamas gliukozės substratas, maistinė medžiaga, kuri suteikia energijos mikroorganizmų gyvybinėms funkcijoms, produkto gaminimui ir dauginimuisi [16, 17]. Tačiau per didelis substrato kiekis terpėje, neigiamai pradeda veikti biomasės augimą, inhibuoti. Santykinio augimo greičio priklausomybe nuo substrato koncentracijos yra matematiškai išreikšta per *Monod* modelį [18]:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \quad (1.3)$$

Išraišką sudarantys kintamieji:

- μ – santykinis augimo greitis, [1/h];
- μ_{\max} – maksimalus auginamos kultūros augimo greitis, [1/h];
- S – substrato koncentracija, [g/l];
- K_s – pusiau soties konstanta arba dar vadinama „Monod“ koeficientas, [g/l].

(1.3) lygtis buvo sukurta mokslininko Monod'o iš eksperimentinių duomenų. Šių eksperimentų rezultatai parodė, kad esant žemai substrato koncentracijai, augimo greitis tampa substrato koncentracijos funkcija [19].

1.3. Periodinio su pamaitinimu mikroorganizmų kultivavimo proceso mechanistinio matematinio modelio sudarymas

1.3.1. Medžiagų balanso lygtis biomasei

Pagrindinis tikslas pramonėje vykdomų kultivavimo procesų yra užauginti kuo didesnę kultūros biomasę. Užaugintos biomasės kiekis per tam tikrą laiką priklauso nuo daugybės aplinkybių. Viena iš pagrindinių aplinkybių yra ta, kad kiekviena ląstelių kultūra turi savo santykinį augimo greitį, kuris nusako ląstelių dalijimosi spartą laiko intervale. Prie skirtingų kultūrų gaunamas skirtingas biomasės kiekis. Identifikavus skirtingus ląstelių specifinius greičius, galima aprašyti fermentacijos medžiagų balanso sąlygą biomasei [16]:

[Biomasės kaupimo bioreaktoriuje greitis] = [biomasės sintezės greitis bioreaktoriuje].

Mikrobų augimas yra autokatalizinis procesas, t. y. augimo greitis proporcingas biomasei. Taigi, mikrobų augimą galima apibūdinti kaip proporcingą viso jo ląstelinio turinio padidėjimą esant tinkamam kiekiui maistingų medžiagų ir aplinkos sąlygoms [11], matematiškai išreiškiama:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X. \quad (1.4)$$

Išraišką sudarantys kintamieji yra :

- X – biomasės kiekis bioreaktoriuje, matuojama gramais (g);
- t – laikas, valandomis (h);
- μ - santykinis biomasės augimo greitis (1/h);

Kultivavimo proceso metu yra naudojamas spektrofotometras [20] ir gautas optinis tankis yra verčiamas į biomasės koncentraciją litrui per apytikslų biomasės koeficientą 0.4 [g/L/o.u] [21]. Gavus biomasės koncentraciją x [g/l] ir išmatavus terpės tūrį V [l], tada (1.4) formulė aprašanti biomasės augimo dinamiką yra išreiškiama per biomasės koncentraciją:

- Biomasė išreiškiama : $X = x \cdot V.$ (1.5)

- Biomasės kaupimo lygtis išreiškiama: $\frac{d(x \cdot V)}{dt} = \mu \cdot x \cdot V.$ (1.6)

(1.4) ir (1.6) lygtyse esantis santykinis augimo greitis atspindi kultūros būseną ir taip pat priklauso nuo kultivavimo sąlygų: $\mu = f(\text{substrato, biomasės, metabolitų koncentracijos, temperatūros, pH...})$. Jeigu kultivavimo proceso metu pradinė substrato koncentracija yra pastovi bei kiti technologiniai parametrai tokie, kaip temperatūra, pH, aeracija ir t.t, yra išlaikomi tame pačiame lygyje, tai specifinis biomasės augimo greitis yra viena iš pagrindinių biotechnologinio proceso parametrų, kuri atspindi biomasės kaupimo trajektorija [22]. Tokiu atveju, skaičiuojant biomasės pokytį, santykinis augimo greitis yra išreiškiamas per biomasės koncentraciją : $\mu(X)$. Biomasės kitimo trajektorijos formulė (6) yra išreiškiama :

$$\frac{d(x \cdot V)}{dt} = \mu(x) \cdot x \cdot V. \quad (1.7)$$

1.3.2. Medžiagų balanso sąlyga substratui

Substrato koncentracijos įtaka ląstelių augimo greičiui ir galutiniam biomasės kiekiui yra labai didelė. Iš esmės biotechnologinio proceso valdymas susideda iš substrato kiekio ir supylimo į bioreaktorių greičio. Reguluojant pamaitinimo tirpalo srautą į reaktorių galima valdyti ląstelių augimo greitį ir kitus biosintezės procesus [23]. Esant nepakankamam maistinių medžiagų kiekiui bioreaktoriuje, ląstelių dauginimasis, deguonies suvartojimo kiekis sumažėja, taip pat ir proporcingai mažėja santykinis augimo greitis. Per didelę substrato koncentracija terpėje suaktyvina neigiamus, inhibuojančius procesus. Šiuo atveju, ląstelės pradeda gaminti pašalinius produktus, metabolitus, kurie sustabdo mikroorganizmų augimą, inhibuoja. Todėl pramonėje siekiama išlaikyti saugų substrato srauto tiekimą į bioreaktorių, kai visa tiekiamą maistinę medžiagą yra suvartojama ir dar išlieka substrato poreikis [24]. Toks bioproceso maitinimo būdas vadinamas limituotu.

Medžiagų balanso sąlyga substratui aprašoma:

[Substrato kaupimo bioreaktoriuje greitis] = [pamaitinančia substrato pylimo į bioreaktorių greitis] – [substrato suvartojimo bioreaktoriuje greitis].

Matematiškai tai galima išreikšti formule:

$$\frac{dS}{dt} = s_{pam} \cdot F - q_s \cdot X. \quad (1.8)$$

Šioje išraiškoje kintamieji yra:

- S – substrato kiekis bioreaktoriuje, [g],
- F – pamaitinamo substrato leidimo greitis į bioreaktorių, [l/h];
- s_{pam} – substrato koncentracija pamaitinimo tirpale, [g/l];
- q_s – santykinis substrato suvartojimo greitis, [1/h], $q_s = (dS/dt)/X$. (1.9)

Ryšys tarp biomasės augimo ir substrato suvartojimo yra panašus į tiesinį, dėl to kultivavimo procesų išraiškose q dažnai išreiškiamas per specifinį augimo greitį μ : $q_s = \frac{\mu}{\gamma}$. (1.10)

(1.10) formulėje γ yra biomasės išėigos koeficientas.

Koeficientas γ yra vienas iš auginamos kultūros parametru, nusakančių kokio kiekio maistinių medžiagų reikia tam tikram ląstelių kiekiui. Susiejant biomasę su substrato suvartojimo greičiu yra matoma tiesioginis proporcingumas nuo specifinio ląstelių augimo greičio. Tačiau daugybė eksperimentinių duomenų parodė, kad biomasei didėjant dalis substrato sunaudojama procesams nesusijusiems su biomasės augimu. Dalį energijos gautos iš maistinių medžiagų ląstelės naudoja gyvybinių funkcijų palaikymui [25,26]. Galutinė santykinio substrato suvartojimo greičio matematinė išraiška yra :

$$q_s = \frac{\mu}{\gamma} + m. \quad (1.11)$$

Čia m yra vadinamas gyvybinių funkcijų palaikymo koeficientu. Kadangi koeficientas m yra palyginti nedidelis, kultivavimo proceso pradžioje jis turi mažai įtakos. Tik proceso eigoje, kai terpėje yra didelė biomasės koncentracija, gyvybinių funkcijų palaikymo koeficientas įgauna didesnę įtaką. Tada gyvybės funkcijų palaikymas tampa pirminiu reiškiniu ir santykinio greičio matematinė išraiška yra užrašoma [27, 30]:

$$\mu = (q_s - m) \cdot \gamma. \quad (1.12)$$

Kultivuojamos kultūros biomasė yra tiesiogiai proporcinga proceso metu gautam specifiniam augimo greičiui, kuris priklauso nuo substrato koncentracijos bioreaktoriuje. Ląstelėms išsikvojus pradines terpėje ištirpintas maistinės medžiagos, augimas sustoja. Todėl log fazės metu, tenka teikti ląstelėms pamaitinimo tirpalą iš išorės į terpę. Tiekiamo tirpalo kiekis ir dozavimo greitis į bioreaktorių turi būti optimalūs proceso būsenai. Nes parinkus blogą tirpalo dozavimo greitį galima bloginti vykdomo proceso rezultatus. Esant per dideliu pamaitinimo tirpalo greičiui, bioreaktoriuje gali pradėti didėti substrato koncentracija. Likusio substrato koncentracija terpėje pradeda stabdyti santykinį augimo greitį iki kada koncentracija viršija ribą, nuo kurios ląstelės pradeda gaminti pašalinius fermentus, metabolitus, kurie dar labiau inhibuoja ląstelių augimo greitį [28]. Parinkus per mažą pamaitinimo tirpalo greitį, maistinės medžiagos iš karto yra suvartojamos, joms patenkant į terpę ir jų poreikis nesumažėja. Tada vyksta limituotas augimas, kurio metu santykinis augimo greitis yra mažesnis už maksimalų parinktos kultūros augimo greitį. Todėl gliukozės suvartojimo skaičiavimo metodų parinkimas priklauso gaunamos didesnės kultivavimo proceso sąnaudos ir žymiai pailgėja atlikimo laikas. Todėl pagrindinis kultivavimo valdymas yra pamaitinimo tirpalo dozavimo, greičio sudarymas išlaikant jį optimaliu [24, 30].

Šiame darbe bus tiriami biotechnologiniai procesai, kurie yra limituoto augimo. Esant limituotam augimui, kai substrato koncentracija bioreaktoriaus terpėje yra artima 0, tada (1.8) formulės išraiška gaunama:

$$dS/dt = 0. \quad (1.13)$$

Tai nusako, kad visas tiekiamas substratas yra suvartojamas, nėra jokių pašalinių metabolizmo, visa maistinė medžiaga suvartota biomasės augimui. Tokiomis sąlygomis, aplinkybėmis yra atliekami moksliniai bei eksperimentiniai tyrimai. Nes terpėje nėra pašalinių fermentų ar substrato koncentracijos, galima tiksliau apskaičiuoti biomasės išėigos koeficientą bioreaktoriuje [29] adaptavus (1.8) formulę:

$$q_s = \frac{S_{\text{pam}} \cdot F}{X}. \quad (1.14)$$

1.4. Pramonei taikytini biotechnologinių procesų matematiniai modeliai

Biotechnologija, tai inžinerijos ir biologijos mokslo principų taikymas kuriant naujus produktus iš biologinės kilmės žaliavų. Modernioji biotechnologija pradėjo vystytis nuo 1953m. kai Watson`as ir Crick`as pirmieji išaiškino DNA genomo paslaptis [31]. Nuo tada biotechnologijos ir inžinerijos ryšiai tapo dar glaudesni. Vystantis biotechnologijai ir biotechnologijos pramonei, didėjant biotechnologijos produktų rinkai, atsirado poreikis didinti kultivavimo procesų našumą. Šiam tikslui įgyvendinti, inžinerijos reikšmė biotechnologijoje dar labiau išaugo [32]. Daugiau prietaisų, jutiklių pradėta naudoti biotechnologijoje, kad proceso atlikimas būtų sklandesnis ir dėl duomenų surinkimo, kad būtų surinkta kuo daugiau duomenų atspindinčių kultivavimo procesą [33]. Pagal sugeneruotus duomenis pradėta planuoti ir apskaičiuoti procesų eigą bei jų valdymą. Kadangi naujų valdymo algoritmų eksperimentų atlikimas yra brangus ir laiko sąnaudų reikalaujantis procesas, pradėta kurti matematinius biotechnologinių procesų modelius su kuriais yra teoriškai testuojami tyrimai ir

valdymo sistemų bandymai [34]. Šiuo metu pramonėje paplitę universalūs mechanistiniai augimo biotechnologinių procesų matematiniai modeliai.

1.4.1. Periodiniu su pamaitinimu kultivavimo proceso mielių modelis

Šiame poskyryje yra pateiktas KTU automatikos katedroje sukurtas matematinis mielių modelis, kuriame matematinėmis formulėmis ir išraiškomis yra pavaizduojami ir apibūdinami mielių augimo metu vykstantys biotechnologiniai reiškiniai ir medžiagų virsmai [35]. Efektyvus metodas modeliuojant kompleksinius procesus tokius kaip biotechnologiniai procesai, yra atskiriant skirtingas proceso būsenas. Pagrindinis šio metodo privalumas yra bendro modelio supaprastinimas, kai yra skaičiuojama einamoji proceso būsena, susijusi su konkrečiu lokaliu modeliu ir gali būti lengvai atvaizduota iš stebėtinų atskirų būsenos parametrų.

Šiame matematiniam modelyje nagrinėjamos keturios fiziologinės alaus mielių kultūros būsenos, ląstelių pamaitinimo proceso metu.

1. Etanolio gamybos būsena. Šis procesas yra apibrėžtas, kai cukraus koncentracija yra aukščiau kritinio lygio (S_{crit}).
2. Mišri oksidacinė būsena. Šios būsenos procesas pradeda dalyvauti, kai cukraus koncentracija nukrenta žemiau kritinio taško. Tada tiek cukrus, tiek etanolis yra metabolizuojami oksidaciniais būdais.
3. Cukraus oksidacinė būsena. Šios būsenos procesai vyksta tada, kai visiškai nėra etanolio fermentacijoje ir cukraus kiekis neviršija kritinio lygio.
4. Etanolio vartojimo būsena. Ši būsena pasireiškia, kai cukraus koncentracija fermentacijoje pasibaigia ir lieka tik etanolis.

Kiekvienoje mielių augimo būsenoje vyksta skirtingi biotechnologinio proceso reiškiniai, kurie turi skirtingus parametrų įverčius ir išraiškas. Modeliuojant mielių augimo procesą, reikia aprašyti pagrindinių parametrų: specifinio biomasės augimo greičio, etanolio gamybos, cukraus ir etanolio suvartojimo ryši su masių balanso lygtimi, kiekvienai būsenai atskirai. Bioprocesų parametrų išraiškos keturiose būsenose :

- Specifinis biomasės augimo greitis μ :

$$\circ 1 \text{ būsena: } \mu_I = \mu_{sf}, \quad (1.15)$$

$$\circ 2 \text{ būsena: } \mu_{II} = \mu_{so} + \mu_{eo}, \quad (1.16)$$

$$\quad \blacksquare \mu_{so} = \frac{\mu_{2s} \cdot S}{S + k_S}, \quad (1.17)$$

$$\quad \blacksquare \mu_{eo} = \frac{\mu_{2e} \cdot e}{e + k_e}, \quad (1.18)$$

$$\circ 3 \text{ būsena: } \mu_{III} = \frac{\mu_3 \cdot S}{S + k_S}, \quad (1.19)$$

$$\circ 4 \text{ būsena: } \mu_{IV} = \mu_{eo}. \quad (1.20)$$

- Specifinis cukraus suvartojimo greitis, q_S :

$$\circ 1-3 \text{ būsenos: } q_S = \frac{q_{sm} \cdot S}{S + k_S}, \quad (1.21)$$

$$\circ 4 \text{ būsena: } q_S = 0. \quad (1.22)$$

- Specifinis etanolio gamybos/suvartojimo greitis, q_e :

$$\circ 1 \text{ būsena } q_{eI} = (q_S - q_S(S_{crit})) \cdot Y_{e/s}, \quad (1.23)$$

$$\circ 2 \text{ būsena } q_{eII} = -\frac{q_{em} \cdot e}{e + k_e}, \quad (1.24)$$

$$\circ 3 \text{ būsenos } q_{eIII} = 0, \quad (1.25)$$

$$\circ 4 \text{ būsenos } q_{eIV} = -\mu_{eo} \cdot Y_{e/s}. \quad (1.26)$$

Lygtys S ir e yra koncentracijos gliukozės, etanolio. $\mu_{sf}, \mu_{2s}, \mu_{2e}, \mu_3, k_e, k_s, Y_{e/s}, q_{em}$ yra eksperimentiškai nustatyti parametrai. Įvertinant proceso būseną matematiniam modelyje, pateikiamos parametrų tipų perėjimo būsenos:

$$\bullet 1 \text{ arba } 2,3 \text{ būsenos įvertinimas: } f_1(s) = \frac{\arctg(k_{f1}(s-s_{crit}))+0.5\pi}{\pi}; \quad (1.27)$$

$$\bullet 2 \text{ arba } 4 \text{ būsenos įvertinimas: } f_2(s) = \frac{2\arctg(k_{f2} \cdot s)}{\pi}; \quad (1.28)$$

$$\bullet 2 \text{ arba } 3 \text{ būsenos įvertinimas: } f_3(s) = \frac{2\arctg(k_{f3} \cdot e)}{\pi}; \quad (1.29)$$

Naudojantis aukščiau aprašytais funkcijomis, jų ryšiais tarpusavyje ir masių balanso sąlyga bioreaktoriuje, gautos bendros matematinio mielių augimo modelio kultivavimo proceso parametrų kitimo išraiškos:

$$\frac{dx}{dt} = \alpha_1 \cdot \mu_I \cdot x + (1 - \alpha_1) \cdot \alpha_3 \cdot \mu_{II} \cdot x + (1 - \alpha_3) \cdot \mu_{III} \cdot X - u \cdot \frac{x}{V}; \quad (1.30)$$

$$\frac{ds}{dt} = -q_s \cdot x + u \cdot \frac{S_f - S}{V}; \quad (1.31)$$

$$\frac{de}{dt} = \alpha_1 \cdot q_{eI} \cdot x - (1 - \alpha_1) \cdot (\alpha_2 \cdot q_{eII} + (1 - \alpha_2) \cdot q_{eIV}) \cdot X - u \cdot \frac{e}{V}; \quad (1.32)$$

$$\frac{dV}{dt} = u; \quad (1.33)$$

$$\frac{d\alpha_1}{dt} = \frac{1}{T_{\alpha_1}} \cdot (f_1(s) - \alpha_1); \quad (1.34)$$

$$\frac{d\alpha_2}{dt} = \frac{1}{T_{\alpha_2}} \cdot (f_2(s) - \alpha_2); \quad (1.35)$$

$$\frac{d\alpha_3}{dt} = \frac{1}{T_{\alpha_3}} \cdot (f_3(s) - \alpha_3). \quad (1.36)$$

Šiose lygtyse kintamieji:

- V yra terpės tūris bioreaktoriuje, [l];
- u – pamaitinimo tirpalo pumpavimo greitis, [g/h];
- S_f – substrato koncentracija, [g/l];
- $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ – pagalbiniai būsenų kintamieji, lygus 0 arba 1.
- $T_{\alpha_1}, T_{\alpha_2}, T_{\alpha_3}$ – laiko konstanta fiziologinių būsenų pasikeitimas.

Mielių fiziologinių būsenų pasikeitimo laiko konstantos gali būti identifikuotos tik atlikus eksperimentinius testus.

Šis matematinis modelis yra universalus ir skirtas visam kultivavimo procesui. Modelis yra veiksmingas, kai eksperimentiškai rasti fermentacijos charakteristiniai parametrai ir proceso būsenos yra tiksliai identifikuojamos.

Šiame poskyryje aprašomas mielių modelis yra sudėtingas ir skirtas vienam ląstelių rūšiai lyginant su darbe aprašomu matematinės struktūros mechanistiniu modeliu. KTU automatikos katedroje sukurtas matematinis modelis yra skirtas tik mielių *Saccharomyces cerevisiae* rūšiai ir apimantis visas augimo ir metabolizmo fazes, kas padaro modeli sudėtingu. Kai šiame darbe vystomas matematinis modelis yra skirtas visoms pramonėje auginamoms mikroorganizmų rūšims. Modelis yra sudaromas tik pagrindiniai logaritminiai augimo fazėi, todėl jo struktūra yra nesudėtinga.

1.4.2. Kultivavimo proceso matematinis modelis pagrįstas santykinė entropija

Kitas universalus pramonėje naudojamas biotechnologinių procesų matematinis modelis yra sukurtas KTU automatikos katedros docento Renaldo Urniežiaus, kuris tinkamas naudoti įvairaus štamo ląstelėms [36]. Šis modelis paremtas santykinė entropija, kuri yra kaip raktas, leidžiantis nustatyti, kaip tolimesnių skaičiavimų pasiskirstymas lemia prieš tai buvusių kintamųjų vertes, naudojant Langranžo daugiklių metodą [37]. Iš atlikto nelimituoto kultivavimo proceso duomenų, modelis suformuoja biotechnologinio proceso pilkosios dėžės modelį, pagal apskaičiuotus du pagrindinius parametrus:

- maksimalų specifinį biomasės augimo greitį kiekvienai augimo fazei;
- maksimalų gliukozės substrato suvartojimo greitį kiekvienai augimo fazei.

Konkreto laiko specifinio augimo greitis μ yra svarbiausia sąlyga siekiant užtikrinti procesų valomumą [38]. Maksimaliam specifiniam greičiui pasiekti yra naudojami keli būdai. Čia klasikinė paprastoji procedūra padeda nustatyti maksimalų ląstelių oksidacinį pajėgumą, darant prielaidą, kad per visą auginimo procesą:

- biomasės išeiga substratui nesikeičia;
- ribotas maitinimo greitis užtikrins medžiagų metabolitų vengimą ar pokyčius.

Pirmasis proceso kūrimo etapas įprastai yra įvertinti maksimalų turimą specifinį augimo greitį skirtinguose proceso etapuose. Šiam tikslui bendras metodas yra taikomas maitinamai kultivavimo daliai, kai maitinimas yra dozuojamas, t. y. norint gauti bendrą gliukozės suvartojimą ir aukštą biomasės išeigos koeficientą, reikia atlikti kultivavimo maitinimą dozuojant gliukozės substratą [38]. Kiekvieno epizodinio švytavimo ciklo pradžioje, priklausomai nuo gliukozės koncentracijos matavimų, procesas apima periodinį substrato pildymą, kad gliukozės koncentracija pasiektų norimą lygį. Tiek auginimo terpės tūris bioreaktoriuje, tiek gliukozės suvartojimas perskaičiuojami kiekviename virpesių cikle, kuris paprastai trunka apie 30 min - 1 val. Yra du praktiniai būdai rasti gliukozės suvartojimą kiekviename švytavimų cikle:

1. Gliukozės koncentracijos matavimas prieš kiekvieną ciklą ir po jo pabaigos. Prieš kiekvieną ciklą, iškart po to, kai gliukozės koncentracija pasiekė norimą koncentraciją dėl substrato pridėjimo, gliukozės suvartojimas apskaičiuojamas per paskutinį etapą, kai iš auginamos terpės tūrio padidėjimo bioreaktoriuje yra padalinama iš gliukozės koncentraciją pokyčio.
2. Kita alternatyva grindžiama OD matavimais. Siekiant gauti kumuliacinį gliukozės suvartojimą per kiekvieną virpesių ciklą, OD vertė (o.u.) padauginama iš biomasės koncentracijos koeficiento (apytiksliai 0,4 g / l / o.u.) ir auginimo terpės tūrio bioreaktoriuje. Po to padalijama iš biomasės išeigos koeficiento gliukozei kiekio (maždaug 0,5 g / g) [21].

Gliukozės suvartojimo skaičiavimo metodų parinkimas priklauso nuo praktinių sumetimų.

Visas biotechnologinis procesas susideda iš dviejų etapų ir gali būti išreikšti dviem pilkosios dėžės modeliais. Pirmasis modelis apima lag ir eksponentinę fazes kultivavimo proceso:

$$x_{t < t_{induction}}(t) = k_{11} \cdot e^{k_{12}t} - k_{13} \cdot t + k_{14}. \quad (1.37)$$

Formulėje $x(t)$ yra vieno matmens kintamasis, apimantis kumuliacinį maitinimo substrato kiekį, kuris turi būti maitinamas per pirmąjį etapą metu t , $t_{induction}$ yra indukcinio momento laiko žymė ir koeficientai k_{1i} yra pilkosios dėžutės modelio trikdžio parametras pirmajam proceso etapui. Kito etapo modelis apibrėžia kaip biotechnologinis procesas elgiasi po indukcijos laiko:

$$x_{t \geq t_{induction}}(t) = k_{21} \cdot e^{k_{22} \cdot t + k_{25} \cdot t^2} - k_{23} \cdot t + k_{24}. \quad (1.38)$$

Kur koeficientai k_{2j} yra pilkosios dėžės modelio trikdžio parametrai, nustatyti antrajam proceso etapui. Šis antrosios pakopos modelis yra lėtėjančio biotechnologinio proceso augimo etapas. Jame yra papildomas parametras k_{25} , kuris atspindi specifinio augimo greičio lėtėjimo dinamiką. Tačiau jo skaitinė vertė nebūtinai atitinka faktinio specifinio augimo greičio lėtėjimo vertę, padalytą iš dviejų. Tai yra Maksimalios Entropijos nauda neapibrėžtoms sistemoms. Pilkosios dėžės modelio taikymas laiko eilės tikimybiniais kintamiesiems Maksimalioje Entropijoje reikalauja atrankos ir apibrėžimo tikimybiniam pasiskirstymui galimiems variantams [39]. Tam tikslui pilkosios dėžės modelio išraiška yra apibendrinta į :

$$x_m(t) = k_{m1} \cdot e^{k_{m2} \cdot t + k_{m5} \cdot t^2} - k_{m3} \cdot t + k_{m4}, \quad (1.39)$$

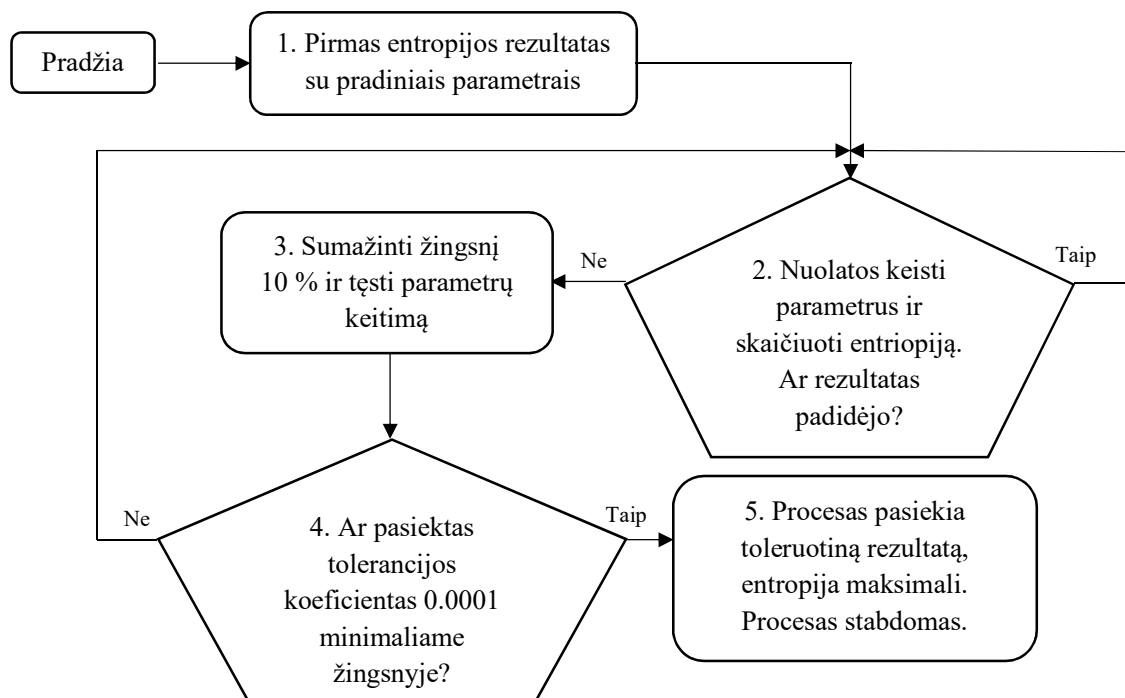
indeksas m yra lygus 1, pirmos pakopos modeliui ir lygus 2, antrosios pakopos modeliui, ir t_k - laikas, kai apskaičiuotas k -ojo svyravimo ciklo kumuliacinis gliukozės suvartojimas $x_m(t_k)$.

Šiame matematiniam modelyje parametų radimui buvo pasirinktas MAPE (vidutinė absoliuti procentinė paklaida) optimizavimo būdas. Šiam optimizavimo būdai pritaikius (1.40) formulės integralą pagal maksimalią entropiją, gaunama parametų radimui naudojama išraiška:

$$S(k_{mi}, k_{mj}) \equiv S(\langle x_{m,k} \rangle, \langle \dot{x}_{m,k} \rangle) = -\frac{(\langle x_{1,1} \rangle - cx_{1,1})^2}{0.05 \cdot cx_{1,1}^2} - \sum_{ki=2}^{n_i} \frac{(\langle x_{1,ki} \rangle - cx_{1,ki})^2}{cx_{1,ki}^2} - \sum_{kj=1}^{n_j} \frac{(\langle x_{2,kj} \rangle - cx_{2,kj})^2}{cx_{2,kj}^2} - \frac{(\langle \dot{x}_{1,n_i} \rangle - \langle \dot{x}_{2,1} \rangle)^2}{0.5 \cdot cx_{2,1}^2} - \frac{(\langle \dot{x}_{1,n_i-1} \rangle - \langle \dot{x}_{2,0} \rangle)^2}{100 \cdot cx_{1,n_i-1}^2} - \frac{(\langle \dot{x}_{1,n_i+1} \rangle - \langle \dot{x}_{2,2} \rangle)^2}{100 \cdot cx_{2,2}^2}. \quad (1.40)$$

Paskutinėje išraiškoje kur $cx_{m,k}$ yra stebėjimo vertė, atstovaujama substrato padavimo profilio vertei diskretizuoto laiko žingsnyje k , n_i ir n_j yra bendras kumuliacinių maitinimo tirpalų svorių skaičius prieš ir po indukcijos laiko, $\langle x_{1,n_i} \rangle = \langle x_{2,1} \rangle$, ir $cx_{1,n_i} = cx_{2,1}$ dėl sankirtos apribojimo. (1.41) lygtis susigrąžina svertinę liekanų sumą [40, 41] ir parodo dvi maksimalios entropijos naudas. Intuityvus manipuliavimas neapibrėžtumu paskatina optimizavimo metodą taikyti svertinius koeficientus ir leido atsižvelgti į pradines bei ribines sąlygas. Šis kriterijus vis dar išsaugo savo formos paprastumą, apeina variacijų Lagrango ar Hamiltono [42] formuluotes.

Aprašyto matematinio modelio ir jo pilkųjų dėžių parametų radimui iš eksperimentinių duomenų yra naudojamas statinis laikas. Pilkųjų dėžių modelio parametų skaičiavimo darbo eigą sudaro dvi projekcinės dalys pavaizduotos 1.4 paveiksle. Pirmojoje dalyje pasirenkamas geriausias unikalus parametų pakeitimas, kuris maksimaliai padidina entropiją. Antroji dalis apima parametų pažangos mažinimą, kai santykinė entropija nebedidėja.



1.4 pav. Algoritmo blokinė schema pilkos dėžės modelio identifikavimui

Kai yra žinomi optimalūs pilkosios dėžės modelio parametrai, programinės įrangos įrankio grafinė vartotojo sąsaja leidžia manipuluoti įvairiomis profilio formomis, kurios vėliau gali padėti bandyti maksimaliai padidinti produktą arba siekti geresnės tikslinės baltymų išėigos.

Entropija pagrįsto matematinio modelio pagrindinė funkcija yra sudaryti valdymo algoritmą iš nelimituoto mikroorganizmų kultivavimo proceso duomenų, kuris bus skirtas periodinio su pamaitinimu kultivavimo procesui pagal norimą maistinių medžiagų tiekimo ribojimo koeficientą.

Palyginus šiame darbe aprašomą matematinės struktūros mechanistinį modelį su entropijos pagrįstu modeliu, pirmasis yra paprastesnės struktūros ir jam nereikia eksperimentinių duomenų norint sudaryti periodinio su pamaitinimu kultivavimo proceso valdymo algoritmą pagal norimą limitavimo koeficientą. Užtenka žinoti biomasės išėigos koeficientą pasirinktai mikroorganizmų rūšiai.

2. Eksperimentų vykdymo metodai ir įranga

2.1. Aparatinė įranga

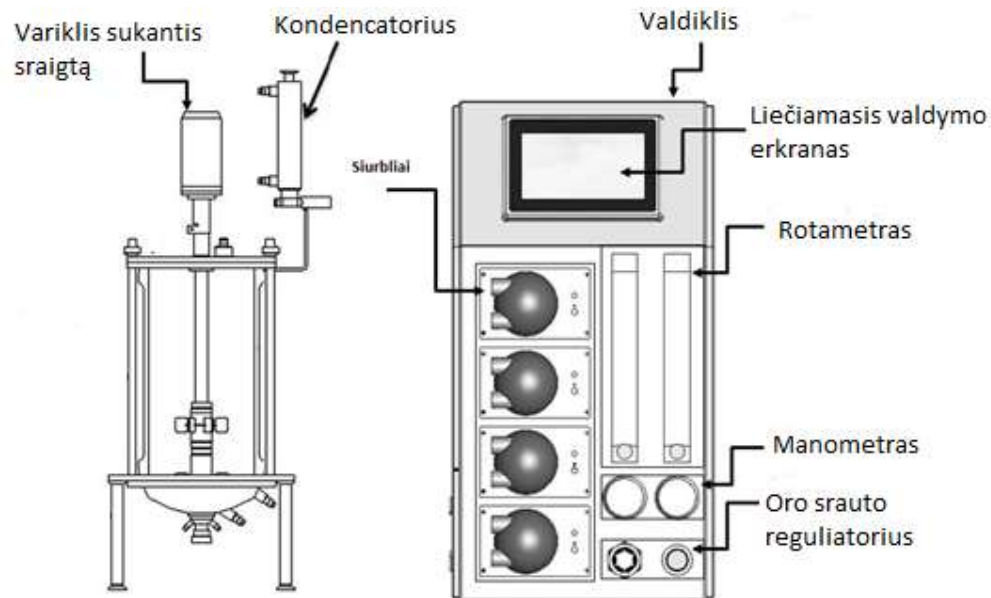
Bioreaktorius, tai inžinerinis įrenginys, kuriame yra vykdomi įvairių mikroorganizmų kultūrų kultivavimai. Šiame įrenginyje yra palaikoma stacionari aplinka, kuri pritaikyta tam tikrai ląstelių rūšiai, kad šios galėtų daugintis ir gaminti biologines medžiagas. Bioreaktoriaus pagrindą sudaro indas, kuriame vyksta kultivavimo procesas dalyvaujant mikroorganizmams arba biologiškai aktyvioms medžiagoms. Biotechnologinių procesų tipai vykdomi bioreaktoriuose, gali būti aerobiniai ir anaerobiniai [43].

Bioreaktoriai yra skirstomi pagal:

1. deguonies tiekimą į kultivuojamą terpę ir jos maišymą;
2. biomasė yra suspenduota ar įmobilizuota;
3. žaliavos patekimą į bioreaktorių.

Pagrindiniai bioreaktoriuose matuojami parametrai: temperatūra, pH, slėgis, aeracijos srautas, ištirpusio deguonies koncentracija terpėje, iš reaktoriaus išeinančių dujų koncentracija, optinis terpės tankis ir kiti parametrai [44].

Šiame darbe tyrimas yra atliktas su KTU biotechnologinių procesų modeliavimo ir valdymo laboratorijoje esančiu aerobiniu bioreaktoriumi „EDF-5.4“. Šiame įrenginyje terpė yra aprūpinama deguonimi per oro burbuliavimo sistemą. Kadangi ši burbuliavimo sistema geba deguonimi aprūpinti terpę tik apie 8 mg deguonies litrui, naudojamas magnetinis sraigtas, kuris padidina deguonies pernešimo į terpę koeficientą. Pagrindinius matuojamuosius parametrus valdo ir registruoja valdymo blokas „BIO 4“ [45, 46].



2.1 pav. EDF-5.4_1 bioreaktorius ir valdymo sistema

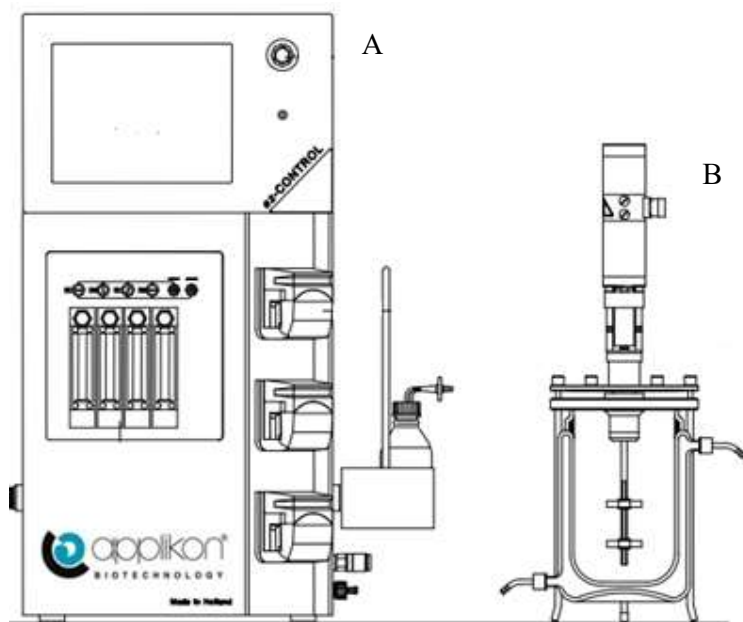
„EDF-5.4“ bioreaktoriaus kultivuojamos terpės tūris gali svyruoti nuo 2 iki 4,5 l. Kultivavimo terpė yra maišoma sraigtu, sujungtu per magnetinę jungtį su nuolatinės srovės varikliu. Valdymo bloke

„BIO 4“ esantis valdiklis – „Siemens IM151-8“ valdo pagrindinius terpės parametrus: temperatūrą, pH lygį, pO₂ koncentraciją ir maišyklės sukimosi greitį.

Dalis tyrimų su *E. coli* bakterijomis buvo vykdomi inovatyvios medicinos centre, mikroorganizmų skyriuje, kuris priklauso uždarei bendrovei „Biotechpharma“. Šiame skyriuje buvo naudojama autoklavuojama bioreaktoriaus sistema „Applikon“. Ši sistema susideda iš dviejų dalių:

1. autoklavuojamas bioreaktorių su pritaikytais pagalbinais įtaisais;
2. „Ez-Control“ valdymo blokas.

Šios sistemos bioreaktoriaus talpa gali kisti nuo 1 iki 20 l. Terpės maišymas vyksta sraigtu, per servo pavara. Oro padavimas, pH reguliavimas ir kiti parametrai tinkamai terpei palaikyti yra valdomi iš „Ez-control“ valdymo bloko, kuriame yra įrašyta Applikon programinė įranga [47].



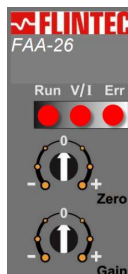
2.2 pav. Autoklavuojama bioreaktoriaus sistema „Applikon“. A – valdymo blokas, B – autoklavuojamas bioreaktorių.

2.2. Kultivuojamos terpės svorio matavimas

Šiame darbe matematinis modelis yra taikomas visam bioreaktoriaus tūriui, o dalis reikalingų matuojamųjų parametrų, iš matavimo prietaisų, yra gaunami koncentracijos išraiška litrai. Todėl terpės svoris yra reikalingas, kad parametrų dimensijos būtų suvienodintos ir skaičiuojamos visam terpės tūriui. Dėl brangaus ir sudėtingo tiesioginio terpės tūrio matavimo, pasirinktas kitas netiesioginis būdas bioreaktoriaus biokultūros tūriui apskaičiuoti per svorio pokytį. Bioreaktorių su įranga padedamas ant svėrimo platformos. Viso proceso metu yra sekamas svėrimo platformos svorio kitimas. Kai yra žinomas pradinis bioreaktoriaus terpės svoris bei tankis, galima pagal terpės svorio kitimą apskaičiuoti biokultūros tūrį.

Inovatyvios medicinos centre, mikroorganizmų skyriuje bioreaktoriaus terpei matuoti buvo naudojamas analitinės svarstyklės „Mettler toledo XSR32001L/M“, kurios buvo sujungtos su programine įranga „FeedingBox“, duomenų registravimui.

KTU biotechnologinių procesų modeliavimo ir valdymo laboratorijoje bioreaktoriaus terpei sverti buvo naudojama svėrimo platforma, kurioje yra sumontuotas svorio jutiklis, galintis matuoti iki 50 kg. Šis jutiklis gaunamą elektros srovę adaptuoja, jo išėjime srovės įtampos signalas yra proporcingas gaunamai elektros srovei ir apkrovos svoriui. Tačiau jutiklio išėjimo įtampa tiesiogiai nematuojama dėl silpno signalo ir galimų trikdžių. Tam tikslui yra naudojama svorio jutiklio keitiklis „Flintec FAA-26“, kuris yra prijungtas prie 24V maitinimo šaltinio ir jo išėjime yra standartinis 4–20mA išėjimas, proporcingas apkrovos svoriui. Šis keitiklis yra sujungtas su valdymo bloko analoginių įėjimų moduliu, kurio matavimų skiriamoji geba – 13 bitų.



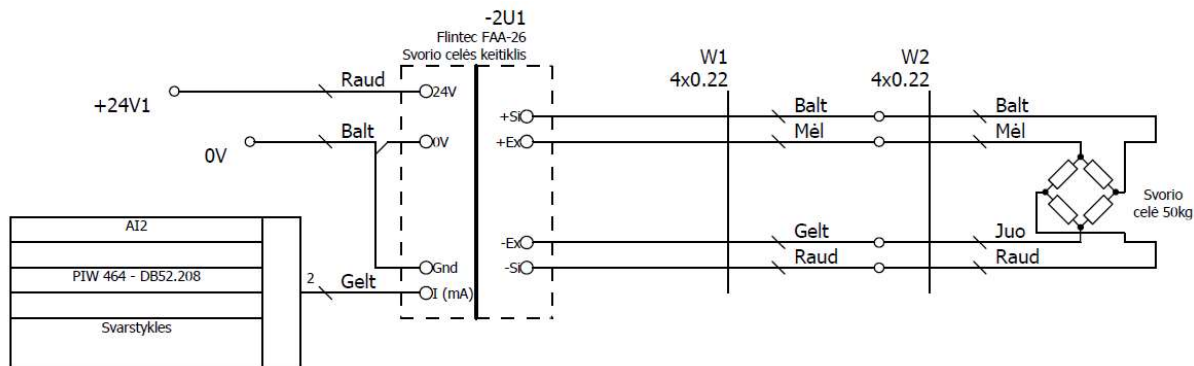
2.3 pav. Svorio keitiklio jungiklis ir indikatorius.

Gautą keitiklio išduotą analoginį 4–20mA signalą būtina konvertuoti į svorio vertes pagal (2.1) lygtį:

$$m = \frac{m_{max} - m_{min}}{I_{max} - I_{min}} * (I - I_{min}) + b; \tag{2.1}$$

- čia m_{min} – minimalus svoris, nustatytas kalibravimo metu;
- m_{max} – maksimalus svoris, nustatytas kalibravimo metu;
- I_{min} – Apatinė 4-20mA analoginio signalo riba – 4mA;
- I_{max} – Viršutinė 4-20mA analoginio signalo riba – 20mA;
- I – išmatuojamas keitiklio išėjimo signalas, mA;
- b – Tiesinės lygties narys, kuriuo galima įvertinti nulinio taško poslinkį, kg;

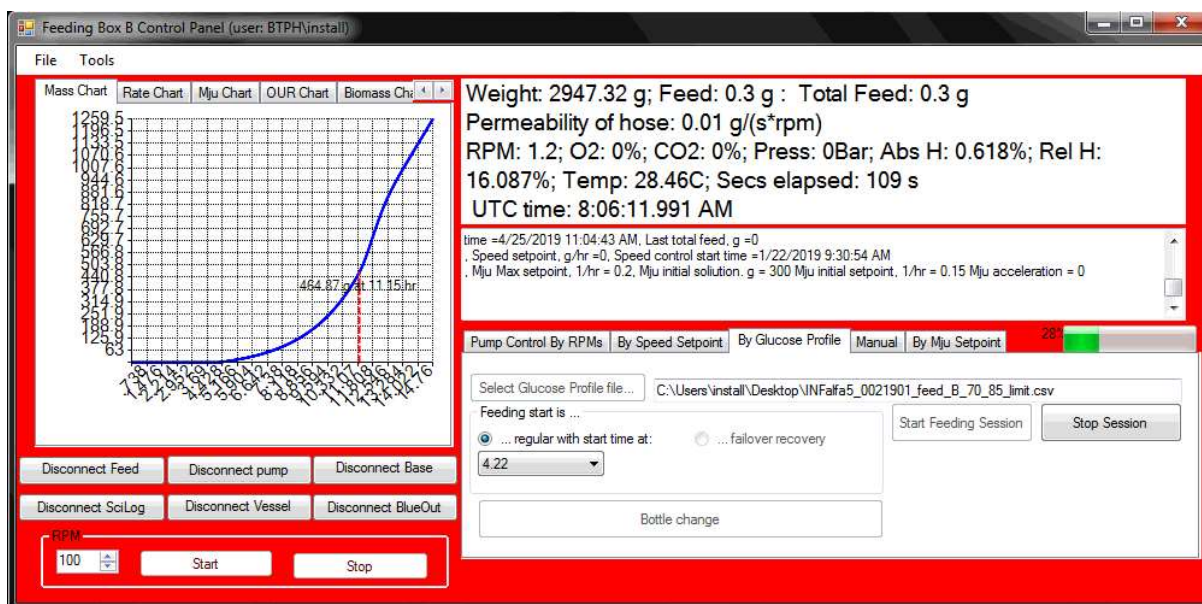
„Flintec FAA-26“ keitiklis su valdymo bloko analoginių įėjimų moduliu sujungtas pagal 2.2.2 paveikslėlyje pavaizduotą elektrinę schemą. Sujungus pagal pavaizduotą schemą, valdiklio programa yra modifikuojama ir gaunamą keitiklio signalą operatorius gali nuskaityti kompiuteriu.



2.4 pav. Svėrimo platformos, keitiklio ir valdiklio sujungimo elektrinė schema

2.3. Substrato tiekimas ir duomenų surinkimas

Tiksliam gliukozės substrato suleidimui į bioreaktorių ir duomenų surinkimui buvo naudojama programinė įranga „Feeding Box“, kurią 2017 metais KTU automatikos katedros doc. Renaldas Urniežius sukūrė ir toliau programą plėtojęs bei vystęs studentas Arnas Survyla. Sukurtos programos tikslas yra automatizuoti pamaitinimo tirpalo tiekimą į reaktorių pagal sukurtą valdymo algoritmą, pagrįstą matematinio modeliu (*angl.* „Model based“). „Feeding Box“ programa skaito pamaitinimo substrato tirpalo svorį iš svėrimo svarstyklių (pvz. „Mettler Toledo“, „Kern“, „Axis“ arba valdiklio su apkrovos elementais) ir pagal gautus rodmenis bei užduoties profilį valdo „Masterflex“ siurblij, kuris tiekia substratą į bioreaktorių [36]. Kadangi ši programinė įranga parašyta C# programavimo kalba, joje papildomai yra įdėta „Snap7“ biblioteka parašyta ta pačia C# kalba. Ši biblioteka leidžia programai komunikuoti su valdymo bloku per „Siemens S7“ protokolą ir tiesiogiai pasiimti duomenis iš valdiklio vidinės duomenų bazės. Ši papildoma funkcija pagrindė buvo naudojama KTU biotechnologinių procesų modeliavimo ir valdymo laboratorijoje, nuskaityti duomenis iš valdymo bloko „BIO 4“ bei valdyti dalį jo įrenginių (pvz. siurblius).



2.5 pav. Programos „Feeding Box“ valdymo langas

2.4. Kultivavimo metu atlikti papildomi matavimai

Tiriamam matematiniam modeliui yra reikalingi papildomi biotechnologinio proceso parametrai: gliukozės koncentracija terpėje, biomasės koncentracija bioreaktoriuje, kurie nėra stebimi realiu laiku. Šiems parametrams gauti yra reikalingi mėginiai iš kultivuojamo proceso. Todėl kiekvienos biotechnologinio proceso metu kas valanda nuo kultivavimo pradžios imami mėginiai.

Gliukozės koncentracijai nustatyti buvo imamas 4ml mėginys, kuris yra atskiedžiamas 21 kartą ir išmaišytas. Šis skiedimo ir maišymo procesas reikalingas, kad mėginio gliukozės koncentracija būtų praskiesta ir gauto tirpalo gliukozės koncentracija neviršytų gliukozės matavimo prietaiso, gliukomačio matavimo ribų. Gliukomatis pateikia gliukozės koncentraciją mmol/l. Norint gauti gliukozės koncentraciją terpėje g/l, prietaiso parodytą vertę padauginama iš skiedimų skaičiaus ir iš gliukozės molinės masės 0,18 g/mmol.



2.6 pav. Gliukomatis „Accu-Chek“

Biomasės koncentracijai nustatyti buvo imamas 5ml mėginys, kuris yra atskiedžiamas ir išmaišomas. Šis skiedimo ir maišymo procesas reikalingas, kad paimto mėginio biomasės koncentracija būtų praskiesta ir gauto tirpalo biomasės koncentracija neviršytų spektrofotometro matavimo ribų. Spektrofotometro bangos ilgis yra nustatytas 600 nm ir jo apatinė, nulinė riba yra nustatoma su bioreaktoriuje naudota terpe be mielių. Norint gauti biomasės kiekį visame bioreaktoriuje, gautas matavimo rezultatas yra padauginamas iš skiedimo skaičiaus taip pat iš biomasės koeficiento 0.4 [g/L/o.u] [21] ir iš kultivuojamos terpės tūrio L.

2.5. Biotechnologinio proceso paruošimas ir vykdymas

Siekiant patikrinti substrato pamaitinimo matematinio modelio universalumą, patikimumą ir tikslumą, buvo renkami duomenys iš dviejų skirtingų ląstelių kultūrų, kurios buvo kultivuojamos skirtingose laboratorijose. Kauno technologijos universiteto biotechnologinių procesų modeliavimo ir valdymo laboratorijoje buvo atliekami tyrimai su alaus mielėmis (*lot. Saccharomyces Cerevisiae*), kurių štamo numeris DY7221. Mielės buvo kultivuojamas standartinėje maistinėje terpėje (YPD) [25, 48], kurioje buvo 1 % mielių ekstrakto, 2 % Bacto peptono ir 0,1 % gliukozės. Kadangi terpės buvo ruošiama 3,5 litrai, tai joje yra 0,6 g mielių azoto bazės, 17,5 g gliukozės, 4,04 g NH₄Cl ir 70 mg uracilo. Gliukozės substrato tirpale buvo 600 g/kg gliukozės ir šio skysčio tankis yra 1,21 g/l.

Fermentacijos temperatūra buvo matuojama temperatūros jutikliu „Pt100“ ir palaikoma 30 laipsnių pagal Celsijų, pH buvo palaikomas pastovus 4,9, šiai nuostatai išlaikyti buvo naudojamas bazės tirpalas NaOH (aq) [49]. Bioreaktoriuje ištirpusio deguonies kiekis DOT buvo matuojamas „Mettler Toledo“ polarografiniu pO₂ jutikliu. DOT nuostata pasirinkta ties 30 % nuo deguonies prisotinimo taško. Ši nuostata buvo palaikoma reguliuojant bioreaktoriaus sraigto sukimosi greitį nuo 230 iki 600 RPM. Oro srautas laikomas pastovus, apie 4 l/min. Dujos iš bioreaktoriaus matuojamos realiu laiku, dujų analizatoriumi „BlueInOne Ferm“, turinčiu O₂, CO₂ ir slėgio jutiklius.

Inovatyvios medicinos centre, mikroorganizmų skyriuje buvo tiriama kita ląstelių rūšis *E. coli* bakterija (BL21 (DE3) pLysS). Kultivavimo metu buvo naudojama mineralinė terpė [24], sudaryta iš: 2,46 g (NH₄)₂SO₄, 0,5 g NH₄Cl, 3,6 g NaH₂PO₄ × H₂O, 2 g Na₂SO₄, 14,6 g K₂HPO₄, 1 g (NH₄)₂-citrato, 1 M 5 ml MgSO₄ tirpalo, 2 ml mikroelementų tirpalo. Gliukozės tirpalas ir pradinė substrato koncentracija bioreaktoriuje, naudojami tokie patys kaip ir mielių fermentacijose, terpės rūgštingumas buvo palaikomas pastovus 7 pH ir temperatūros nuostata nustatyta ties 30 °C. Ištirpusio deguonies kiekis buvo matuojamas ampero metriniu deguonies elektrodu „Mettler Toledo“ ir DOT buvo palaikomas 30 % deguonies prisotinimo terpėje. Šiai nuostatai palaikyti pastoviai buvo reguliuojami trys biotechnologinio proceso parametrai:

1. bioreaktoriaus sraigto sukimosi greitis nuo 300 iki 750 RPM;
2. oro srauto tiekimas į bioreaktorių nuo 0,3 iki 15 l/min;
3. deguonies srauto tiekimas į bioreaktorių nuo 0 iki 7 l/min.

Bioreaktoriaus darbinis tūris 9 l. Kultivavimo metu, kai biomasės koncentracija reaktoriuje siekė 50 optinių vienetų, buvo suleista 25 ml baltymų sintezę skatinančio preparato izopropilo β-D-1-tiogalaktopiranozido (IPTG)) [50].

3. Matematinio modelio eksperimentinis tyrimas ir rezultatai

3.1. Kultivavimo proceso universalus matematinio modelio sudarymas

Norint sudaryti matematinį modelį bei jį patikrinti pagal tikrus eksperimentinius duomenis, tam buvo atliktos keturios ląstelių fermentacijos su skirtingomis mikroorganizmų rūšimis. Dveji biokultūros auginimai buvo atlikti su mielių (*lot. Saccharomices cerevisae*) ląstelėmis 5 l bioreaktoriuje, Kauno Technologijos Universiteto, biotechnologinių procesų modeliavimo ir valdymo laboratorijoje. Kiti du auginimai buvo atlikti su *E. coli* (*lot. Escherichia coli*) bakterijomis 10 l bioreaktoriuose, inovatyvios medicinos centre (IMC). Po atliktų ląstelių kultivavimų, surinkti duomenys buvo apdorojami, tai yra išvalomos šiukšlės, suvienodinamas laikas duomenų, kurie yra gauti iš skirtingų prietaisų, ir paruošiami matematinio modelio skaičiavimams. Matematiniam modeliui sudaryti ir patikrinti yra naudojama apdorotų duomenų dalis, kurioje vyko limituotas biokultūros augimas, kurio metu ląstelės augo žemesniu augimo greičiu nei galimu maksimaliu, dėl maistiniu medžiagų nepakankamumo.

Po duomenų analizės, kiekvienai fermentacijai yra taikomas sudarytas matematinis modelis. Pirmiausia iš apdorotų eksperimentinių duomenų yra apskaičiuojamos pagrindinės procesą charakterizuojančios kintamųjų laiko trajektorijos:

- biomasės koncentracijos kaupimo trajektorija laike, pagal (1.5) formulę;
- santykinio biomasės augimo greičio trajektorija pagal laiką, naudojantis (1.1) formulę;
- limituoto augimo, santykinio substrato sunaudojamo greičio trajektorija pagal laiką, kuri yra aprašyta (1.11) formule;
- biomasės išėigos koeficiento trajektorija pagal laiką: $\gamma(t) = \frac{\mu(t)}{q(t)}$. (3.1)

Apskaičiavus proceso kintamųjų laiko trajektorijas, sekantis modeliavimo etapas yra biomasės koncentracijos įtakos nustatymas kitiems svarbiems biotechnologinio proceso parametrams. Šiame darbe ir matematiname modelyje biomasės koncentracijos įtaka yra modeliuojama dviem parametrams:

- specifiniam augimo greičiui - $\mu(X)$;
- biomasės išėigos koeficientui – $Y(X)$.

Didėjant biomasės koncentracijai, specifinis biomasės augimo greitis tolygiai krenta ir po indukcijos kirtimo greitis padidėja. Ši priklausomybė modeliuojama tiesine lygtimi:

$$\mu(X) = \begin{cases} k_1 - k_2 \cdot X; & \text{iki indukcijos} \\ k_{1_ind} - k_{2_ind} \cdot X; & \text{po indukcijos} \end{cases} \quad (3.2)$$

Biomasės išėigos koeficientas taip pat kaip ir specifinis biomasės augimo greitis, didėjant biomasės koncentracijai, tolygiai krenta. Ši priklausomybė pavaizduojama tiesine lygtimi:

$$Y(X) = k_{1Y} - k_{2Y} \cdot X. \quad (3.3)$$

Modeliuojant biomasės koncentracijos įtaką specifiniam augimo greičiui ir biomasės išėigos koeficientui pagal (3.2) ir (3.3) lygtis, parametrai k_1 , k_2 , k_{1_ind} , k_{2_ind} , k_{1Y} , k_{2Y} identifikuojami naudojant mažiausių kvadratų metodą [51]:

$$S = \sum (k_1 - k_2 \cdot X - \mu(X))^2 \rightarrow \min. \quad (3.4)$$

Skaičiuojama funkcijos S dalines išvestines kintamųjų k_1 ir k_2 atžvilgiu ir prilyginame 0;

$$\begin{cases} \partial S / \partial k_1 = 0 \\ \partial S / \partial k_2 = 0 \end{cases} \quad (3.5)$$

Gaunama lygčių sistema parametrų k_1 ir k_2 atžvilgiu;

$$\begin{cases} \sum k_1 - k_2 \cdot \sum X - \sum \mu(X) = 0 \\ k_1 \cdot \sum X - k_2 \cdot \sum X^2 - \sum \mu(X) \cdot X = 0 \end{cases} \quad (3.6)$$

Iš sistemos (3.6) yra sutraukiami žinomi ir panašius nariai, gauti supaprastinti kintamieji ir naujosios išraiškos;

$$\bullet A = \sum X; \quad (3.7)$$

$$\bullet B = \sum \mu(X); \quad (3.8)$$

$$\bullet C = \sum X^2; \quad (3.9)$$

$$\bullet D = \sum \mu(X) \cdot X. \quad (3.10)$$

Pasinaudojus naujaisiais kintamaisiais ir juos sukėlus į (3.6) lygčių sistemą, gauname:

$$\begin{cases} k_1 \cdot n - k_2 \cdot A = B \\ k_1 \cdot A - k_2 \cdot C = D \end{cases} \quad (3.11)$$

Iš lygčių sistemos (3.11) iškeliami pagrindiniai kintamieji, kurie apskaičiuojami ir naudojami duomenų verifikavime:

$$\bullet k_1 = (B \cdot C - D \cdot A) / (n \cdot C - A^2); \quad (3.12)$$

$$\bullet k_2 = (D \cdot n - B \cdot A) / (A^2 - C \cdot n); \quad (3.13)$$

čia n – tai skaičius, nurodantis surinktų duomenų kiekį.

Kiti nežinomi parametrai k_{1_ind} , k_{2_ind} , k_{1Y} , k_{2Y} apskaičiuojami identiškai, kaip ir k_1 , k_2 . Suradus nežinomus (3.2) ir (3.3) lygčių parametrus, paskutinis etapas yra modelio verifikavimas, tai yra skaičiavimų palyginimas su eksperimentiniais duomenimis. Į vieną iš pagrindinių matematinio modelio formulių (1), μ vertę pakeičiame (3.2) formule, $\mu(X)$ lygybę su apskaičiuotais parametrais:

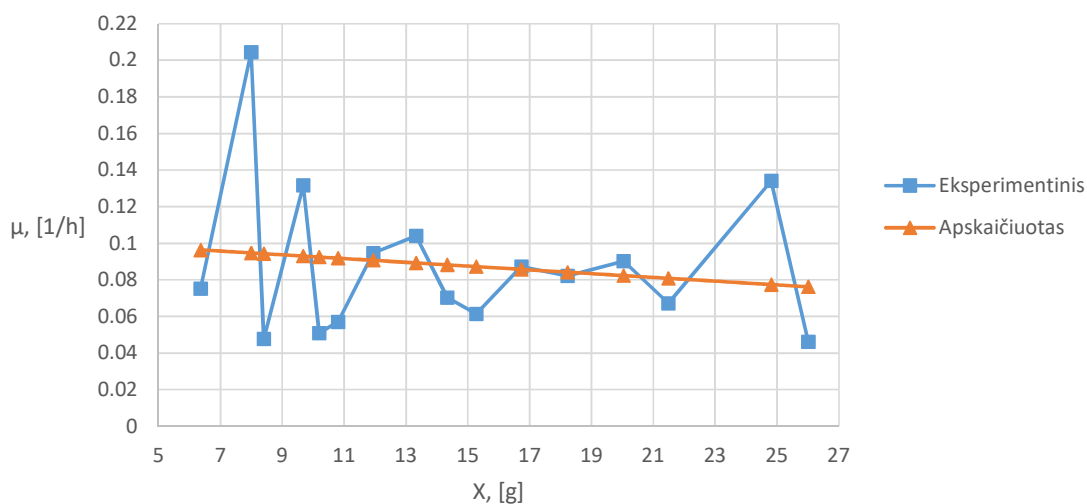
$$\frac{dX}{dt} = \begin{cases} (k_1 - k_2 \cdot X) \cdot X; \text{ iki indukcijos} \\ (k_{1_ind} - k_{2_ind} \cdot X) \cdot X; \text{ po indukcijos} \end{cases} \quad (3.14)$$

Šią lygtį suintegravę, gautą rezultatą palyginame su eksperimento metu tiesiogiai išmatuota biomasės koncentracija.

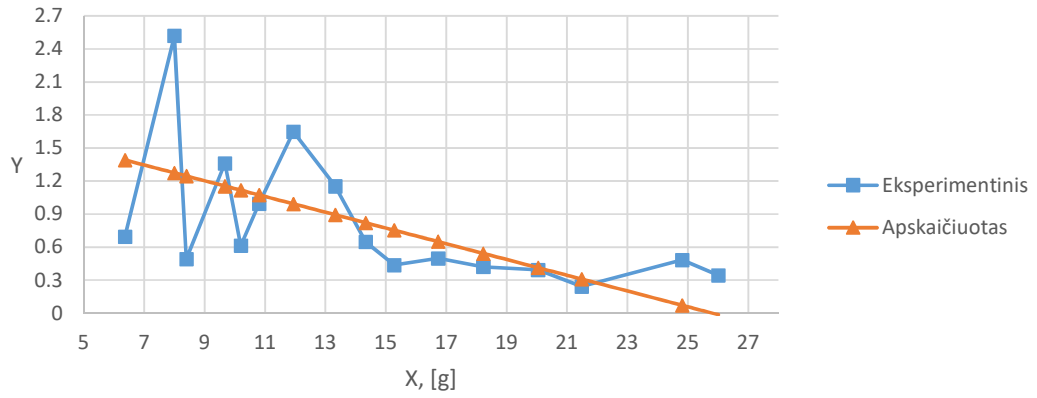
3.2. Mielų *Sacharomices cerevisiae* periodinio su pamaitinimu kultivavimo proceso modeliavimas

Kauno Technologijos Universiteto, biotechnologinių procesų modeliavimo ir valdymo laboratorijoje rugpjūčio mėnesį buvo atlikti dveji mielių (*lot. Sacharomices Cerevisae*) kultivavimai. Abėji procesai vyko 5 litrų tūrio bioreaktoriuje, vienodomis sąlygomis. Matematinis modelis šiems biotechnologiniams procesams buvo taikomas laiko momentu, kai vyko limituoto pamaitinimo mikroorganizmų augimas. Atlikus matematinio modeliavimo skaičiavimus aprašytus 3.1 poskyryje, gautos rezultatų kreivės pavaizduotos 3.1–3.6 paveiksluose, kartu su eksperimentiniais duomenimis. Pasinaudojus mažiausių kvadratų metodu gauti procesų specifinio augimo greičio ir biomasės išeigos koeficiento parametrai:

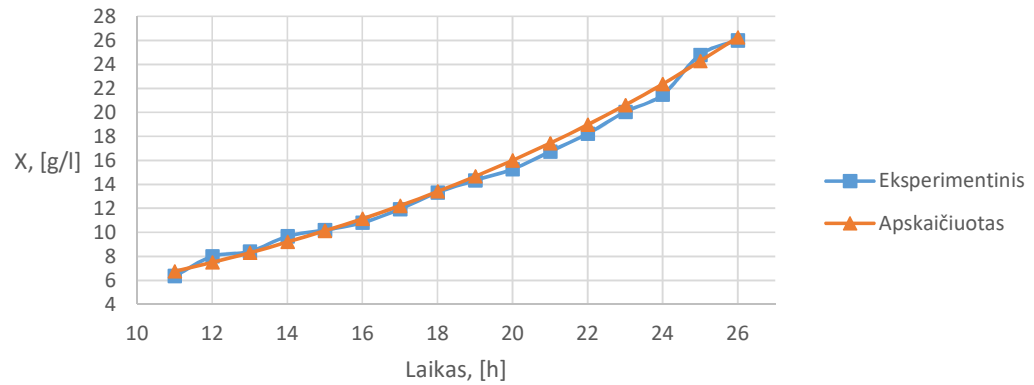
- Pirmas kultivavimas:
 - Specifinio biomasės augimo greičio parametrai: $k_1 = 0.102944$, $k_2 = 0.001027$.
 - Biomasės išeigos koeficiento parametrai: $k_{1Y} = 1.846590$, $k_{2Y} = 0.074512$.
- Antras kultivavimas:
 - Specifinio biomasės augimo greičio parametrai: $k_1 = 0.23317$, $k_2 = 0.0054965$.
 - Biomasės išeigos koeficiento parametrai: $k_{1Y} = 0.825177$, $k_{2Y} = 0.011406$.



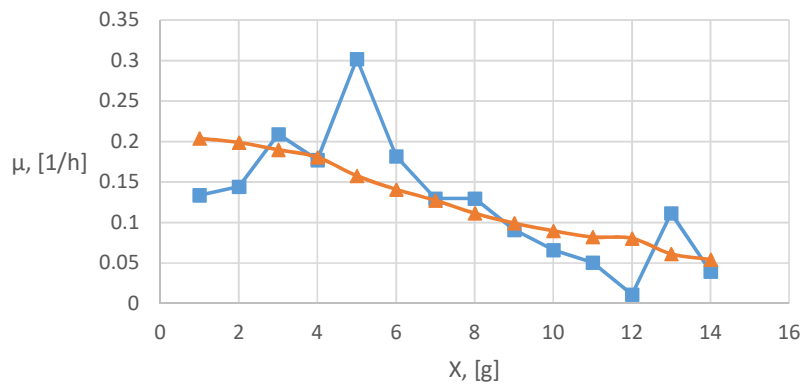
3.1 pav. Pirmojo kultivavimo proceso specifinio augimo greičio priklausomybė nuo biomasės koncentracijos



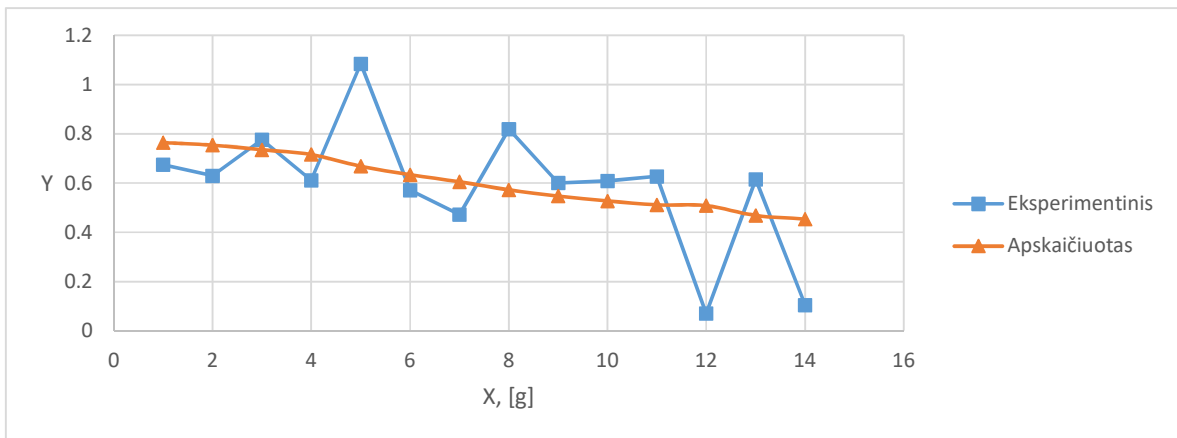
3.2 pav. Pirmojo kultivavimo proceso biomasės išiegos koeficiento priklausomybė nuo biomasės koncentracijos



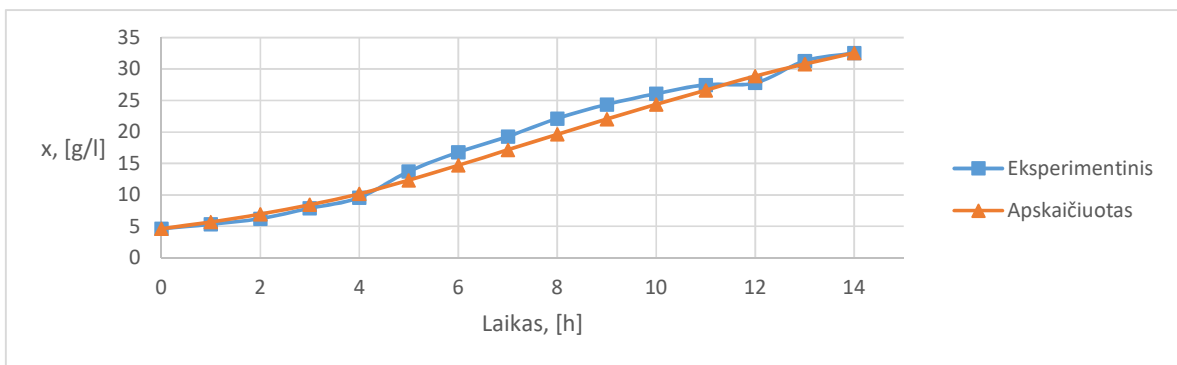
3.3 pav. Pirmojo kultivavimo proceso eksperimentinio ir apskaičiuoto biomasės koncentracijos laiko trajektorijos



3.4 pav. Antrojo kultivavimo proceso specifinio augimo greičio priklausomybė nuo biomasės koncentracijos



3.5 pav. Antro kultivavimo proceso biomasės išeigos koeficiento priklausomybė nuo biomasės koncentracijos



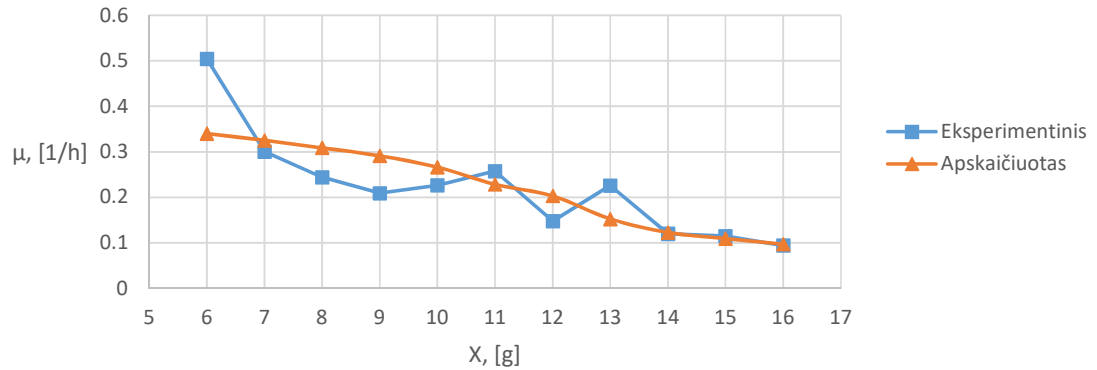
3.6 pav. Antro kultivavimo proceso eksperimentinio ir apskaičiuoto biomasės koncentracijos laiko trajektorijos

3.3. *E. coli* periodinio su pamaitinimu kultivavimo proceso modeliavimas

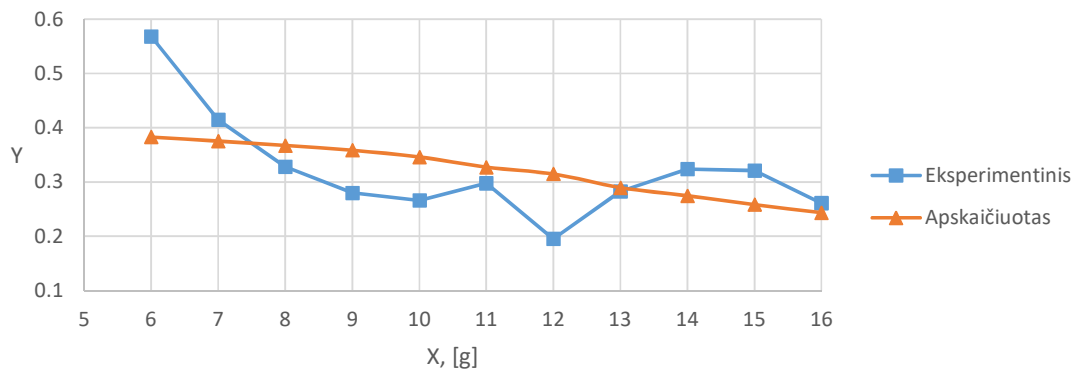
Inovatyvios medicinos centre (IMC) rugsėjo mėnesį buvo atlikti dveji *E. coli* (*lot. Escherichia Coli*) bakterijų kultivavimai. Abeji procesai vyko 10 litrų tūrio bioreaktoriuje, vienodomis sąlygomis. Matematinis modelis šiems biotechnologiniams procesams buvo taikomas laiko momentu, kai buvo pradėtas limituotas periodinis ląstelių pamaitinimas. Atlikus matematinio modeliavimo skaičiavimus aprašytus 3.1 poskyryje, gautos rezultatų kreivės pavaizduotos 3.7 – 3.12 paveiksluose, kartu su eksperimentiniais duomenimis. Pasinaudojus mažiausių kvadratų metodu gauti procesų specifinio augimo greičio ir biomasės išeigos koeficiento parametrai:

- Pirmas kultivavimas:
 - Specifinio biomasės augimo greičio parametrai: $k_1 = 0.375566$, $k_2 = 0.0009758$, $k_{1_ind} = 0.227027$, $k_{2_ind} = 0.0004013$.
 - Biomasės išeigos koeficiento parametrai: $k_{1Y} = 0.400358$, $k_{2Y} = 0.000484$.

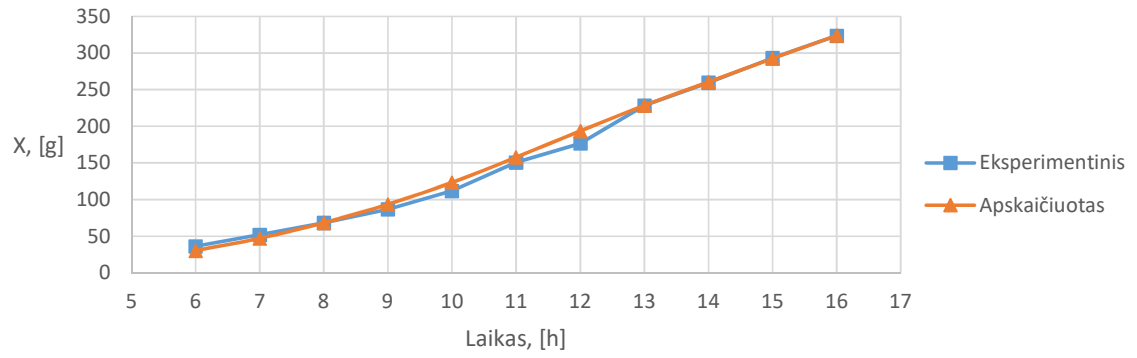
- Antras kultivavimas:
 - Specifinio biomasės augimo greičio parametrai: $k_1 = 0.258829$, $k_2 = -0.00017$, $k_{1_ind} = -0.59046$, $k_{2_ind} = -0.003488$.
 - Biomasės išiegos koeficiento parametrai: $k_{1Y} = 0.435305$, $k_{2Y} = 0.000632$.



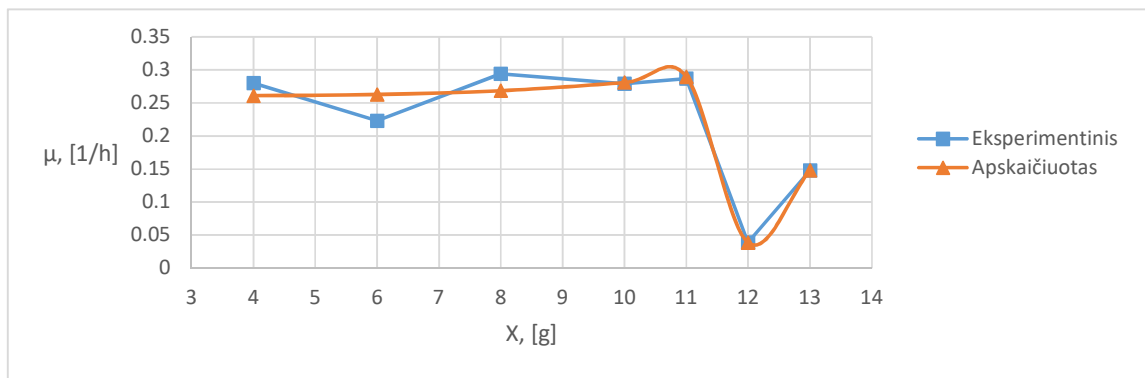
3.7 pav. Pirmojo kultivavimo proceso specifinio augimo greičio priklausomybė nuo biomasės koncentracijos



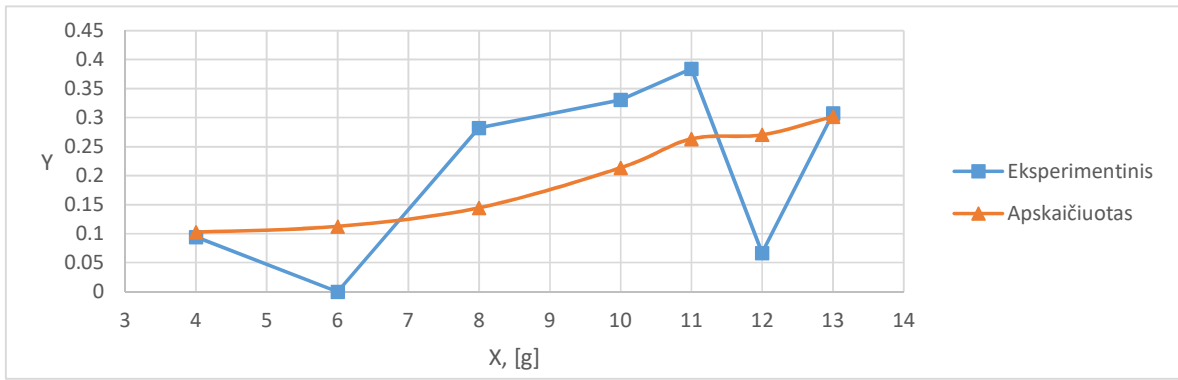
3.8 pav. Pirmojo kultivavimo proceso biomasės išiegos koeficiento priklausomybė nuo biomasės koncentracijos



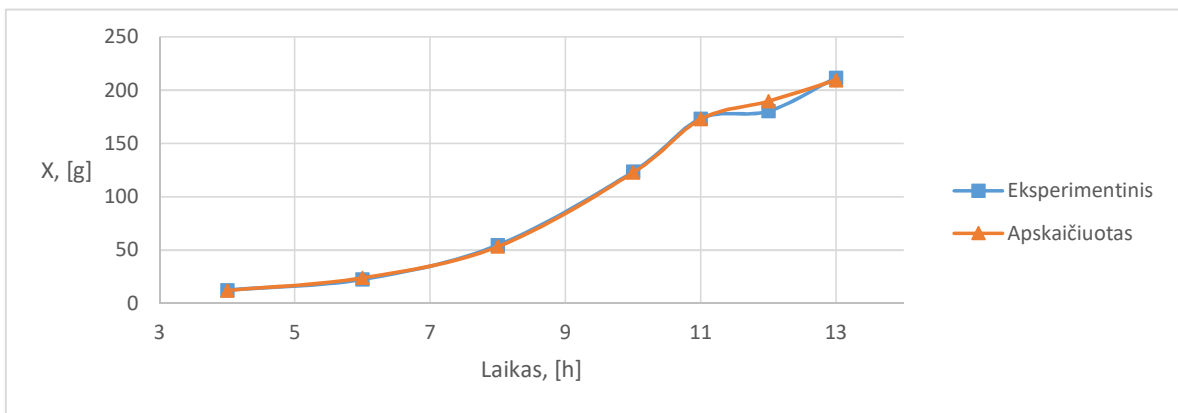
3.9 pav. Pirmojo kultivavimo proceso eksperimentinio ir apskaičiuoto biomasės laiko trajektorijos



3.10 pav. Antrojo kultivavimo proceso specifinio greičio priklausomybė nuo biomasės koncentracijos



3.11 pav. Antrojo kultivavimo proceso biomasės išeišos koeficiento priklausomybė nuo biomasės koncentracijos

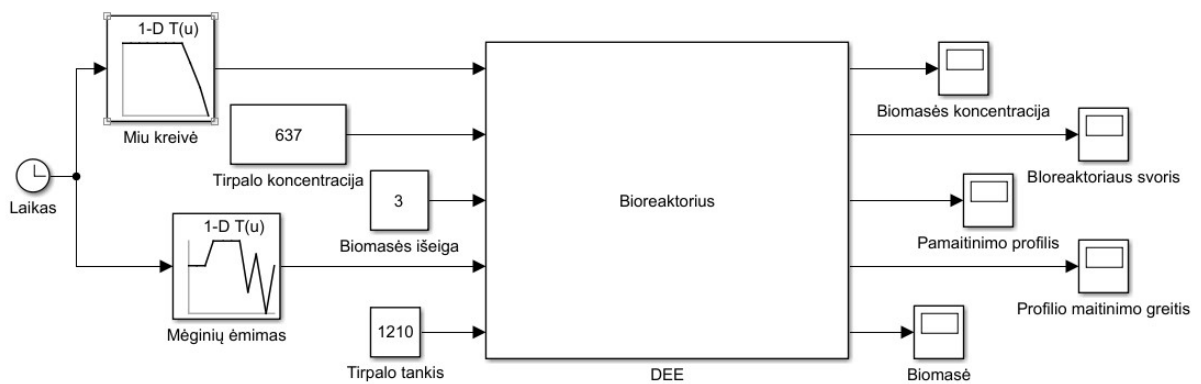


3.12 pav. Antrojo kultivavimo proceso eksperimentinio ir apskaičiuoto biomasės kiekio laiko trajektorijos

4. Biotechnologinio proceso valdymo algoritmo sudarymas ir eksperimentinis tyrimas

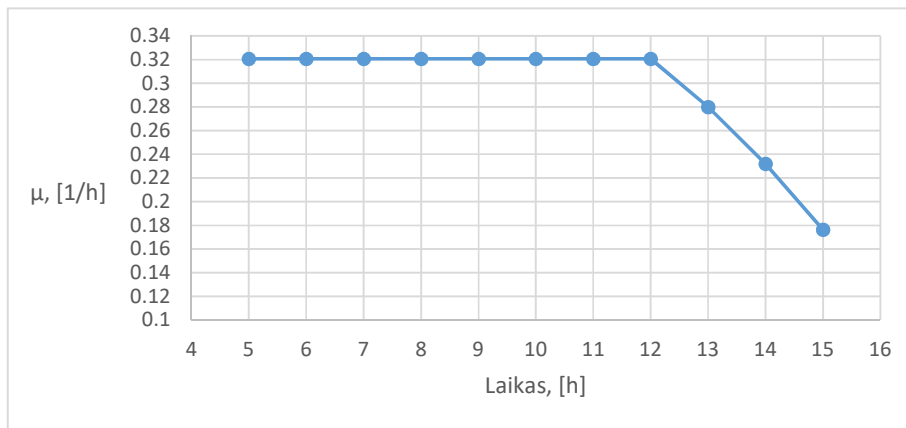
Atlikus matematinio modelio tyrimą su eksperimentiniais duomenimis ir gavus rezultatus, atitinkančius biotechnologinio proceso metu gautus duomenis, kitas žingsnis verifikuoti matematinį modelį, t. y. realiose sąlygose, atlikti ląstelių kultivavimą su matematinio modelio pateiktu pamaitinimo tirpalo profiliu ir palyginti gautus fermentacijos rezultatus su matematinio modelio prognozuotomis vertėmis.

Verifikuojančiai sintezei atlikti pasirinkta ląstelių rūšis yra (*lot. Escherichia coli*) bakterija. Matematinio modelio prognozavimas bei pamaitinimo profilio modeliavimas atliktas programinės įrangos „*Matlab*“ grafiniu modeliavimo paketu „*Simulink*“. Bioreaktoriaus matematinis modelis sumodeliuotas pasinaudojus „*DEE*“ bloku.



4.1 pav. Matematinio modelio schema

Atsižvelgiant į 3.3 poskyryje atliktų *E. coli* kultivavimų duomenis, buvo sudaryta didelio limitavimo matematinio modelio specifinio augimo kreivė pažymėtu „Miu kreivė“ 4.1 paveiksle. Taip pat iš eksperimentinių duomenų yra gautas biomasės išėigos koeficientas „Biomosės išėiga“. Kadangi numatyto kultivavimo proceso atlikimas ir paruošimas buvo vykdomas identiškai atliktiems kultivavimo procesams, eksperimento pradiniai matematinio modelio parametrai parinkti iš buvusių biotechnologinių procesų eksperimentinių duomenų ir įvertintas suplanuotas mėginių ėmimas atvaizduotas „Mėginių ėmimas“ bloke, 4.1 paveiksle.



4.2 pav. Sudaryta specifinio augimo greičio kreivė

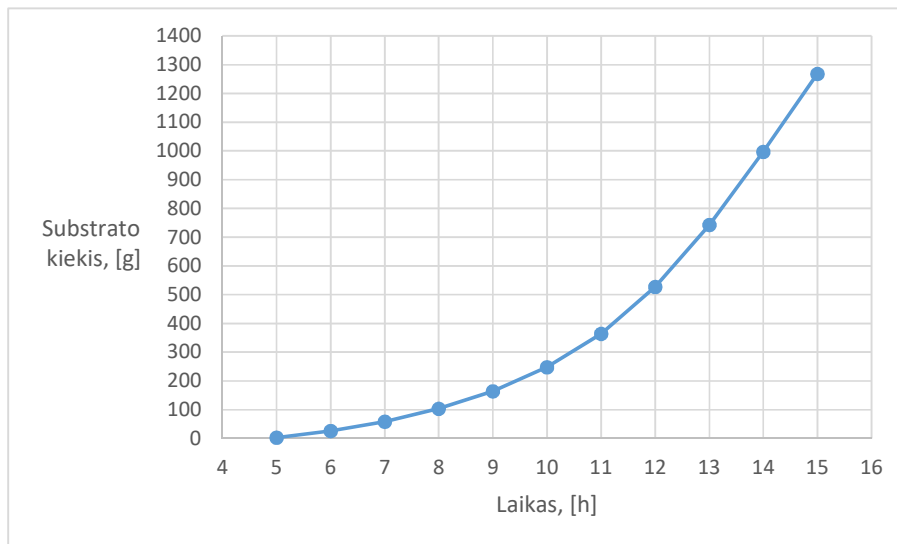
Prognozuojama biomasės koncentracija x [g/l], 4.1 paveiksle pavaizduota „Biomasės koncentracija“ bloke apskaičiuojama pagal (1.4) formulę, o visas biomasės kiekis X [g] „Biomasė“ bloke gauta kreivė panaudojus (1.5) formulę. Limituoto augimo proceso pamaitinimo greičio laiko profilis, „Profilis“ blokas, apskaičiuotas suintegravus išreikštą medžiagų balanso sąlygos substratui formulę (1.14) pagal substrato suleidimo greitį:

$$F = \frac{\mu(t) \cdot X(t) \cdot \gamma \cdot \rho}{S_{\text{pam}}} \quad (4.1)$$

Šioje formulėje parametrai:

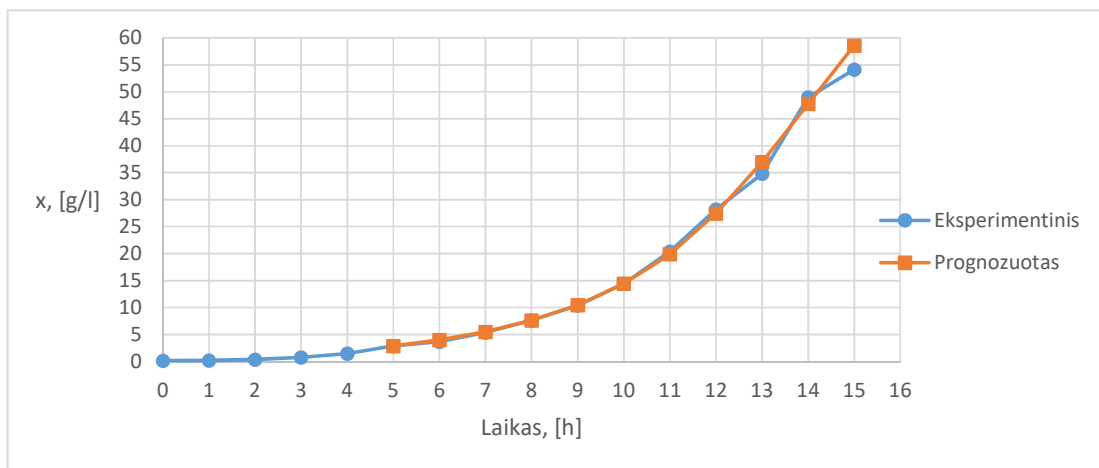
- γ - substrato išeiga biomasei [g/g];
- ρ – substrato tankis [g/l].

Pamaitinimo profilio greitis apskaičiuotas neintegruojant (4.1) formulės. Bioreaktoriaus prognozuojamas svoris gautas, prie pradinio terpės svorio pridėdant numatyto substrato kiekio supumpavimo į reaktorių svorį ir atimant kas valanda daromų mėginių ėmimo kiekius.

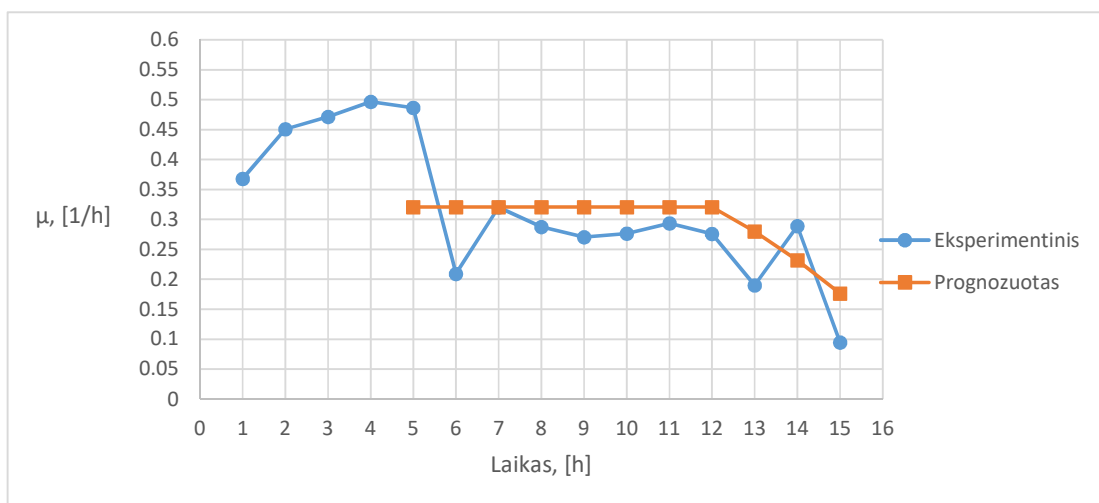


4.3 pav. Kumuliatyvinio pamaitinimo tirpalo kiekio teorinio modelio profilis

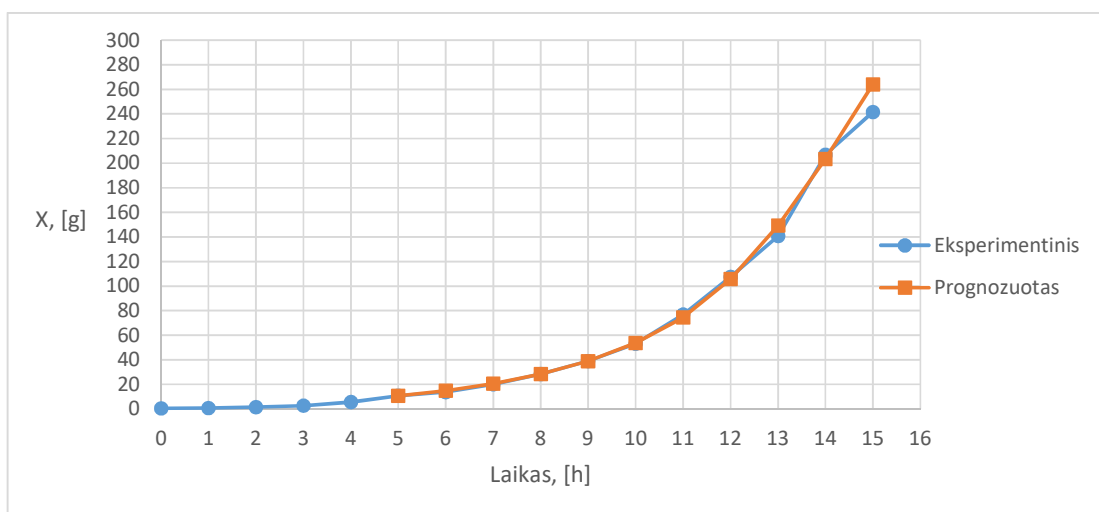
Verifikuojantis *E. coli* kultūros kultivavimo proceso eksperimentas atliktas inovatyvios medicinos centre, mikroorganizmų skyriuje su autoklavuojama bioreaktoriaus sistema „Applikon“, 9 litrų darbinio tūrio bioreaktoriuje. Kultivavimas vyko 15 valandų, proceso pasiruošimas ir atlikimas buvo vykdomas identišškai 3.3 poskyryje aprašytoms fermentacijoms ir taip pat pagal matematiname modelyje aprašytus parametrus. Biomasės, gliukozės koncentracijai nustatyti, kas valanda buvo imami mėginiai iš bioreaktoriaus po 20 ml. Substrato tirpalui suleisti į bioreaktorių buvo naudojama „Feeding Box“ programinė įranga. Tirpalas buvo pradėtas leisti į bioreaktorių po 5 valandų nuo kultivavimo pradžios, kai pradinė gliukozės koncentracija bioreaktoriuje buvo išseikvota ir ištirpusios deguonies kiekis DOT staigiai pradėjo didėti [52]. Po atlikto verifikuojančio kultivavimo proceso, gauti eksperimentiniai duomenys buvo išanalizuoti ir palyginti su matematinio modelio prognozuotomis parametru kreivėmis. Biomasės koncentracija litrai eksperimentiniuose duomenyse gauta, optinį tankį verčiant į biomasę per apytikslų biomasės koeficientą 0.4 [g/L/o.u].



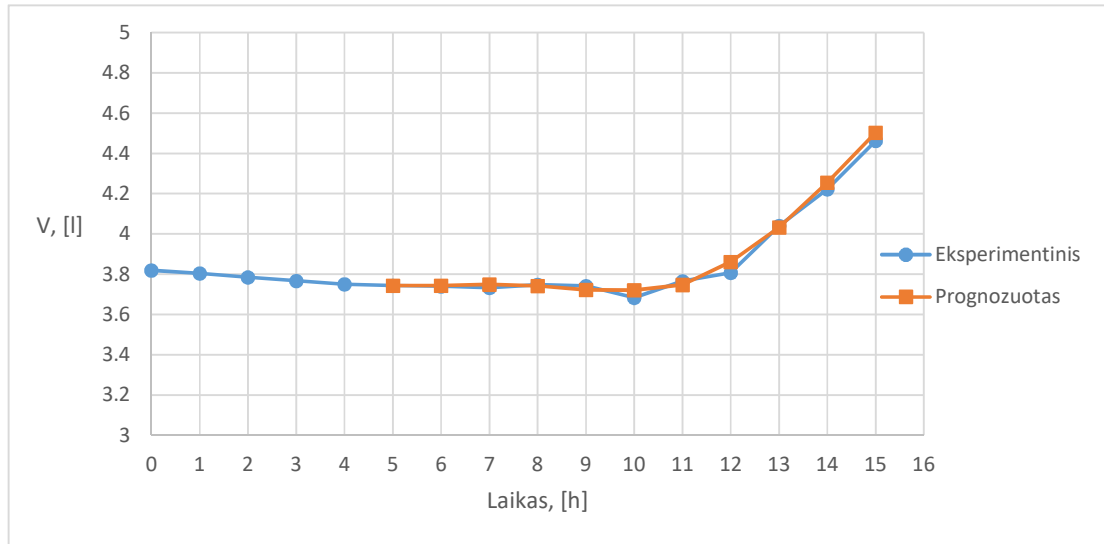
4.4 pav. Biomės koncentracijos kitimas laike



4.5 pav. Specifinio biomės augimo greičio kitimas laike



4.6 pav. Biomės kiekio kitimas laike



4.7 pav. Bioreaktoriaus tūrio kitimas laike

Gauti eksperimento tyrimo rezultatai parodė priimtina matematinio modelio prognozavimo tikslumą. Bendras vidutinis skirtumas tarp rezultatų ir prognozuotų verčių neviršija 3 %. Šią gautą paklaidą tarp rezultatų galima sumažinti tiksliai identifikavus ir išreiškus biomasės išėigos koeficientą per funkciją nuo biomasės.

Gauti eksperimentinio tyrimo rezultatai ir maža jų paklaida nuo prognozuotos vertės parodė matematinės struktūros mechanistinio modelio tikslumą ir patikimumą. Dėl šių savybių, matematinis modelis gali būti naudojamas biotechnologijos pramonėje periodiniu su pamaitinimo kultivavimo proceso valdymo algoritmams sudaryti [53].

Išvados

1. Sudarytas matematinės struktūros mechanistinis modelis, skirtas pamaitinimo greičio skaičiavimams periodiniuose su pamaitinimu mikroorganizmų kultūrose.
2. Identifikuotas mielių *Sacharomice cerevisae* periodinio su pamaitinimu kultivavimo proceso matematinis modelis. Patvirtinta biomasės koncentracijos neigiama įtaka mielių specifiniam augimo greičiui ir biomasės išėigos koeficientui. Matematinio modelio apskaičiuotos biomasės kreivės, pagal pirmojo kultivavimo proceso eksperimentinius duomenis, vidutinė absoliutinė paklaida (*angl. MAPE*) nuo realios biomasės kreivės yra 2.99 %. Taip pat modelio apskaičiuota biomasės kreivė, pagal antrojo mielių kultivavimo proceso eksperimentinius duomenis, turi 7.2 % vidutinę absoliutinę paklaidą, lyginant su realia biomasės kreive.
3. Identifikuotas bakterijos *E. coli* periodinio su pamaitinimu kultivavimo proceso matematinis modelis. Patvirtinta biomasės koncentracijos neigiama įtaka bakterijų specifiniam augimo greičiui ir biomasės išėigos koeficientui. Matematinio modelio apskaičiuotos biomasės kreivės, pagal pirmojo bakterijų kultivavimo proceso eksperimentinius duomenis, vidutinė absoliutinė paklaida nuo realios biomasės kreivės yra 2.81 %. Ir modelio apskaičiuota biomasės kreivė, pagal antrojo *E. coli* kultivavimo proceso eksperimentinius duomenis, turi 5.3 % vidutinę absoliutinę paklaidą, lyginant su realia biomasės kreive.
4. Matlab „*Simulink*“ modeliavimo programoje sudarytu matematiniu modeliu, apskaičiuotas pamaitinimo greičio laiko profilis, realizuojantis pageidaujamą *E. coli* bakterijos biomasės augimo greitį. Atliktas eksperimentinis tyrimas su apskaičiuotu pamaitinimo greičio laiko profiliu parodė gerą modelio prognozavimą ir eksperimentinių rezultatų sutapimą. Palyginta tyrimo metu gauta biomasės kreivė su prognozuota biomasės kreive, vidutinė absoliutinė paklaida – 3.24 %.
5. Pateikto matematinio modelio valdymo algoritmo projektavimo metodika gali būti naudojama pramonėje, įvairių periodiniu su pamaitinimu kultivavimo procesų valdymo algoritmų sudarymui.

Literatūros sąrašas

1. Neelesh T, Saccharomyces: Reproduction and Life Cycle [žiūrėta: 2018 m. Gegužės 28d.] Prieiga internetu: <http://www.biologydiscussion.com/fungi/saccharomyces-reproduction-and-life-cycle-eumycota/46654>;
2. Vida Mildažienė, Sonata Jarmalaitė, Rimantas Daugelavičius “Laštelės biologija“ psl. 16 – 20. Kaunas, 2004. [žiūrėta: 2018 m. Gegužės 29d.]
3. Charles S. Hoffman, Valerie Wood, and Peter A. Fantes, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the Schizosaccharomyces pombe Model System. [žiūrėta: 2018 m. Gegužės 28d.] Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4596657/>
4. J. L. Snoep, M. Mrwebi, J. M. Schuurmans, J. M. Rohwer and M. J. Teixeira de Mattos, Control of specific growth rate in Saccharomyces cerevisiae [žiūrėta: 2018 m. Gegužės 29d.] Prieiga internetu: <https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/155/5/1699.pdf?expires=1554831287&id=id&accname=guest&checksum=9C386D19A8855871626B3C47E4BDE398>
5. Schuler, M.M.; Marison, I.W. Real-time monitoring and control of microbial bioprocesses with focus on the specific growth rate: Current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012, 94, 1469–1482.
6. Anita Sangwan, Escherichia Coli (E. Coli): Meaning, Morphology and Characteristics. [žiūrėta: 2018 m. Gegužės 29d.] Prieiga internetu: <http://www.biologydiscussion.com/bacteriology/systematic-bacteriology/escherichia-coli-e-coli-meaning-morphology-and-characteristics/30821>
7. Tamas Bartfai PhD, Graham V Lees PhD, Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 2d.] Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029002/>
8. Matilde Merlin, Elisa Gecchele, Stefano Capaldi, Mario Pezzotti, and Linda Avesani Comparative Evaluation of Recombinant Protein Production in Different Biofactories: The Green Perspective. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 3d.] Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3972949/>
9. Raina M. Maier, Bacterial growth chapter 3. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 3d.] Prieiga internetu: https://booksite.elsevier.com/samplechapters/9780123705198/Sample_Chapters/04~Chapter_3.pdf
10. Vytautas Galvanauskas, Donatas Levišauskas, Biotechnologinių procesų modeliavimas, optimizavimas ir valdymas. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 6d.]
11. Patrick Wechselberger, Patrick Sagmeister and Christoph Herwigcorresponding, Real-time estimation of biomass and specific growth rate in physiologically variable recombinant fed-batch processes. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 5d.] Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3755222/>
12. V. Lubenova, I. Rocha, E.C. Ferreira, Estimation of multiple biomass growth rates and biomass concentration in a class of bioprocesses, [žiūrėta 2018 m. Birželio 7d.] Prieiga internetu : <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-003-0325-1>
13. Henry C. Vogel, Fermentation and biochemical engineering handbook, 1997. [žiūrėta 2018 m. Birželio 7d.]

14. Mihai Caramihai and Irina Severin, *Bioprocess Modeling and Control*, DOI: 10.5772/55362. [žiūrėta: 2018 m. Birželio d.] Prieiga internetu: <https://www.intechopen.com/books/biomass-now-sustainable-growth-and-use/bioprocess-modeling-and-control>
15. M. Zafar, S. Kumar, S. Kumar, A. K. Dhiman and H.-S. Park, Maintenance energy-dependent dynamics of growth and poly(3 hydroxybutyrate) [p(3hb)] production by *azohydromonas lata* mtcc 2311 using simple and renewable carbon substrates. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 8d.] Prieiga internetu: <http://www.scielo.br/pdf/bjce/v31n2/v31n2a04.pdf>.
16. Farges Bérangère, Poughon Laurent, Pons Agnès and Dussap Claude-Gilles, *Methodology for Bioprocess Analysis: Mass Balances, Yields and Stoichiometries*. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 8d.] Prieiga internetu: http://cdn.intechopen.com/pdfs/30990/intech-methodology_for_bioprocess_analysis_mass_balances_yields_and_stoichiometries.pdf
17. Eric Shiue, Irene M. Brockman, and Kristala L. J. Prather, Improving Product Yields on D-Glucose in *Escherichia coli* via Knockout of *pgi* and *zwf* and Feeding of Supplemental Carbon Sources. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 8d.] Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4629491/>
18. Karin Kovárová-Kovar and Thomas Egli, Growth Kinetics of Suspended Microbial Cells: From Single-Substrate-Controlled Growth to Mixed-Substrate Kinetics. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 8d.] Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98929/>
19. Monod, Jacques (1949). "The Growth of Bacterial Cultures". *Annual Review of Microbiology*. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 9d.] Prieiga internetu: <https://pdfs.semanticscholar.org/77c6/5d8efa0565fdf4386e14656dbb70825f0f6e.pdf>
20. John A Myers, Brandon S Curtis and Wayne R Curtis, Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 10d.] Prieiga internetu: <https://bmcbiophys.biomedcentral.com/articles/10.1186/2046-1682-6-4>
21. Shiloach, J.; Fass, R. Growing *E. coli* to high cell density—A historical perspective on method development. *Biotechnol. Adv.* 2005, 23, 345–357, doi:10.1016/j.biotechadv.2005.04.004.
22. Michael F. Coveney, Robert G. Wetzel Biomass, production, and specific growth rate of bacterioplankton and coupling to phytoplankton in an oligotrophic lake. [žiūrėta: 2018 m. Birželio 10d.] Prieiga internetu: <https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.4319/lo.1995.40.7.1187>
23. Donatas Levišauskas, Tomas Tekorius, Model-based optimization of fed-batch fermentation processes using predetermined type feed-rate time profiles. A comparative study. [žiūrėta 2018 m. Birželio 10d.] Prieiga internetu : <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.471.5483&rep=rep1&type=pdf>
24. Schaepe, S.; Kuprijanov, A.; Simutis, R.; Lübbert, A. Avoiding overfeeding in high cell density fed-batch cultures of *E. coli* during the production of heterologous proteins. *J. Biotechnol.* 2014, 192, 146–153.
25. Johannes R van Dijken, Ruud A. Weusthuis & Jack T. Pronk, Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts, Department of Microbiology and Enzymology, Kluyver Laboratory of Biotechnology, Julianalaan 67, 2628 BC Delft, The Netherlands.
26. Tim Vos, Xavier D. V. Hakkaart, Erik A. F. de Hulster, Antonius J. A. van Maris, Jack T. Pronk, and Pascale Daran-Lapujade Maintenance-energy requirements and robustness of *Saccharomyces cerevisiae* at aerobic near-zero specific growth rates. [žiūrėta 2018 m. Birželio 10d.] Prieiga internetu : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4912818/>

27. Stanley E. Mainzer and Walter P. Hempfling Effects of Growth Temperature on Yield and Maintenance During Glucose-Limited Continuous Culture of *Escherichia coli*. [žiūrėta 2018 m. Birželio 10d.] Prieiga internetu : <https://jb.asm.org/content/jb/126/1/251.full.pdf>
28. Carlos González-Figueroa, René Alejandro Flores-Estrella and Oscar A. Rojas-Rejón Fermentation: Metabolism, Kinetic Models, and Bioprocessing, [žiūrėta 2018 m. Birželio 11d.] Prieiga internetu : <https://www.intechopen.com/online-first/fermentation-metabolism-kinetic-models-and-bioprocessing>
29. K.J. Chae, S. E. Oh, S. T. Lee, J.W. Bae, In. S. Kim, The optimum substrate to biomass ratio to reduce net biomass yield and inert compounds in biological leachate treatment under pure-oxygen conditions. [žiūrėta 2018 m. Birželio 11d.] Prieiga internetu : http://microbecol.khu.ac.kr/PDF_paper/Bioprocess%20Engineering.pdf
30. Vytautas Galvanauskas, Donatas Levišauskas Biotechnologinių procesų modeliavimas, optimizavimas ir valdymas. Mokomoji knyga 2008.
31. Ashish Swarup Verma, Shishir Agrahari, Shruti Rastogi, and Anchal Singh Biotechnology in the Realm of History. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 11d.] Prieiga internetu : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178936/>
32. Klaus Buchholz and John Collins The roots—a short history of industrial microbiology and biotechnology *Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s00253-013-4768-2. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 11d.] Prieiga internetu : https://www.researchgate.net/publication/236056590_The_roots_A_short_history_of_industrial_microbiology_and_biotechnology
33. Sebastian Schaepe, Artur Kuprijanov, Christian Sieblist, Marco Jenzsch, Rimvydas Simutis and Andreas Lübbert, Current Advances in Tools Improving Bioreactor Performance, *Current Biotechnology*, 2014, 3, 000-000. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 11d.]
34. V. Galvanauskas, R. Simutis, A. Lübbert, Hybrid process models for process optimisation, monitoring and control, *Bioprocess Biosyst Eng* (2004) 26: 393–400. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 11d.]
35. Donatas Levišauskas, Vita Plaškutė, Rimvydas Simutis, Functional state model based optimization of yeast fed-batch cultivation process. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 12d.]
36. Renaldas Urniezius , Vytautas Galvanauskas, Arnas Survyla, Rimvydas Simutis, Donatas Levišauskas From Physics to Bioengineering: Microbial Cultivation Process Design and Feeding Rate Control Based on Relative Entropy Using Nuisance Time, October 2018 *Entropy* 20(10):779 DOI: 10.3390/e20100779. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 12d.]
37. Giffin, A.; Urniezius, R. Simultaneous state and parameter estimation using maximum relative entropy with nonhomogenous differential equation constraints. *Entropy* 2014, 16, 4974–4991, doi:10.3390/e16094974. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 13d.]
38. Lim, H.C.; Shin, H.S. *Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors*; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2013; ISBN 978-0-521-51336-4. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 13d.]
39. Urniezius, R. Online robot dead reckoning localization using maximum relative entropy optimization with model constraints. *AIP Conf. Proc.* 2011, 1305, 274–283. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 14d.]
40. Mandel, J. *The statistical analysis of experimental data*; Dover: New York, NY, USA, 1984; ISBN 978-0-486-64666-4. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 18d.]

41. Strutz, T. Data fitting and uncertainty: A practical introduction to weighted least squares and beyond; Vieweg + Teubner: Wiesbaden, Germany, 2011; ISBN 978-3-8348-1022-9. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 18d.]
42. Myerscough, K.W.; Frank, J.; Leimkuhler, B. Observation-based correction of dynamical models using thermostats. Proc. R. Soc. A 2017, 473, 20160730, doi:10.1098/rspa.2016.0730. [žiūrėta 2019 m. Balandžio 18d.]
43. Masinė žinduolinių ląstelių gamyba [žiūrėta: 2019 m. balandžio 19d.] Prieiga internetu: <http://www.imcdb.lt/courses/927/>
44. Jens Høiriis Nielsen, John Villadsen, Gunnar Lida, Bioreaction Engineering Principles, 2003, [žiūrėta 2019 m. balandžio 24d.]
45. Bio-4, operator panel and process visualization, User manual, [žiūrėta 2019 m. Balandžio 24d.]
46. JSC Biotechniskais centr, EDF-5.4_1 laboratory bioreactor, user manual, [žiūrėta 2019 m. Balandžio 24d.]
47. Applikon biotechnology, ez-Control for autoclavable bioreactors, [žiūrėta 2019 m. Balandžio 24 d.] Prieiga internetu: https://archive-resources.coleparmer.com/Manual_pdfs/99206-xx.pdf
48. Eric Rosenfeld, Bertrand Beauvoit, Bruno Blondin, and Jean-Michel Salmon Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics, Appl Environ Microbiol. 2003 Jan; 69(1): 113–121. doi: 10.1128/AEM.69.1.113-121.2003 [žiūrėta 2019 m. Balandžio 24 d.] Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC152411/>
49. S. Gnoth, A. Kuprijanov, R. Simutis, A. Lübbert, Simple adaptive pH control in bioreactors using gain-scheduling methods, Applied Microbiology and Biotechnology January 2010, Volume 85, Issue 4, pp 955–964 [žiūrėta 2019 m. Balandžio 25 d.]
50. Sivashanmugam, A.; Murray, V.; Cui, C.; Zhang, Y.; Wang, J.; Li, Q. Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Protein Sci. 2009, [žiūrėta 2019 m. Balandžio 26 d.] Prieiga internetu: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pro.102>
51. ALEKSA, Algiment. „Matematiak 1 – mažiausių kvadratų metodas“ [žiūrėta 2019 m. Balandžio 26 d.] Prieiga internetu: https://www.personalas.ktu.lt/~algalek/files_mat1/maziausiu%20kvadr%20metodas.pdf
52. Viktor Konakovsky, Christoph Clemens, Markus Michael Müller, Jan Bechmann, Martina Berger, Stefan Schlatter, and Christoph Herwig Metabolic Control in Mammalian Fed-Batch Cell Cultures for Reduced Lactic Acid Accumulation and Improved Process Robustness [žiūrėta 2019 m. Balandžio 29 d.] Prieiga internetu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5597163/>
53. World health organization, WHO GMP for Biological Products, [žiūrėta 2019 m. Gegužės 10 d.] Prieiga internetu: https://www.who.int/biologicals/GMP_for_Biologicals_Draft3-V2_20150218.pdf