



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS
ELEKTROS IR ELEKTRONIKOS FAKULTETAS

Svajūnas Popa

**ŠIUOLAIKINĖS PRAMONINĖS BIOREAKTORIAUS AERAVIMO
SISTEMOS TYRIMAS IR PROGRAMINIŲ JUTIKLIŲ KŪRIMAS**

Magistro projektas

Vadovas

Prof. dr. Vytautas Galvanauskas

KAUNAS, 2015

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

ELEKTROS IR ELEKTRONIKOS FAKULTETAS

AUTOMATIKOS KATEDRA

**Šiuolaikinės pramoninės bioreaktoriaus aeravimo sistemos tyrimas ir
programinių jutiklių kūrimas**

Magistro projektas

Valdymo technologijos (kodas 621H66001)

Vadovas

(parašas) Prof. dr. Vytautas Galvanauskas

(data)

Recenzentas

(parašas) Doc. dr.

(data)

Projektą atliko

(parašas) Svajūnas Popa

(data)

KAUNAS, 2015



KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS

(Fakultetas)

(Studento vardas, pavardė)

(Studijų programos pavadinimas, kodas)

Šiuolaikinės pramoninės bioreaktoriaus aeravimo sistemos tyrimas ir programinių jutiklių kūrimas

AKADEMINIO SAŽININGUMO DEKLARACIJA

20 ____ m. _____ d.
Kaunas

Patvirtinu, kad mano **Svajūno Popos** baigiamasis projektas tema „.....“ yra parašytas visiškai savarankiškai, o 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)

Popa, S. Šiuolaikinės pramoninės bioreaktoriaus aeravimo sistemos tyrimas ir programinių jutiklių kūrimas. *Magistro* baigiamasis projektas / vadovas prof. dr. Vytautas Galvanauskas; Kauno technologijos universitetas, elektros ir elektronikos fakultetas, automatikos katedra.

Kaunas, 2015. 56 psl.

Santrauka

Darbe apžvelgiami biotechnologiniai procesai, parametrų tipai bei įvairių kintamųjų matavimo metodai. Ištiriami esami programiniai jutikliai, jų tipai ir matavimo parametrai. Ištiriama šiuolaikinė pramoninė bioreaktoriaus aeravimo sistema, įvairios balanso lygtys, matematiniai metodai.

Tyrimams pasirinktas realiai veikiantis bioprocetas, kuris naudoja periodinio veikimo su pamaitinimu bioreaktorių. Buvo atlikti eksperimentai iš kurių surinkti dujų koncentracijų, srautų duomenys, taip pat įvairių į bioreaktorių tiekiamų medžiagų kiekiai, surinkti (*off-line*) ne realiu laiku išmatuoti biomasės koncentracijos duomenys, imant bandinius.

Pasitelkiant gautus duomenis, balanso lygtis bei matematinius modelius, sukuriama biomasės koncentracijos netiesioginio įvertinimo programiniai jutikliai. Pastarieji realiuoju laiku netiesiogiai įvertina biomasės koncentracijos vertes, naudojant įvairius tiesiogiai, realiuoju laiku matuojamus proceso kintamuosius (O₂ tiekimo, išsiskyrusio CO₂ koncentracijos, srautai ir kt.). Panaudoti du biomasės koncentracijos įvertinimui naudojami metodai. Vienas iš jų deguonies sunaudojimo greičio (OUR) matavimų metodas, kitas – anglies dioksido gamybos greičio (CPR) matavimų metodas. Atliktas sukurtų programinių jutiklių testavimas, modeliavimo kokybės patikrinimas.

Galiausiai atliktas modelio parametrų identifikavimas, kas leido dar labiau patikslinti gaunamus biomasės įvertinimo rezultatus, atitinkamai užtikrinant naudojamų metodų veiksmingumą. Parametrų identifikavimas atliktas pasitelkiant skaitmenines *Chemotaxis* atsitiktinės paieškos procedūras.

Reikšminiai žodžiai: biotechnologija, programinis jutiklis, bioreaktorius, biomasės koncentracija, deguonis, anglies dioksidas,

Popa, Svajūnas. Investigation of a Modern Bioreactor Aeration System and Elaboration of Software-Sensors. Final project of *master degree* / supervisor prof. dr. Vytautas Galvanauskas; Kaunas University of Technology, Faculty of Electrical and Electronics Engineering, department of automatino.

Kaunas, 2015. 56 psl.

Summary

Biotechnological processes, types of parameters and measuring methods of different variables are reviewed in this work. Currently existing soft sensors, their types and measuring parameters are examined. Modern industrial aeration system of bioreactor, various balance equations and mathematical models are studied as well.

A real and operative bioprocess using a batch bioreactor was chosen for the research. Experiments were carried out and gas concentrations, flows, as well as measured amounts of various materials supplied for bioreactor and data about biomass concentrations measured using an off-line method, were collected.

Using balance equations, mathematical models and the data collected, the soft sensors for indirect evaluation of biomass concentration are created. By using various on-line directly measured process variables (concentrations, flows of O₂ supply and emitted CO₂, etc.) they evaluate the values of biomass concentration indirectly and on-line. Two different methods for evaluation of biomass concentration were used. One of them was measuring of oxygen uptake rate (OUR) and the other – carbon dioxide production rate (CPR) measurement. A testing of the created soft sensors was carried out, as well as a quality check of the simulation.

Finally, the identification of model parameters was carried out, which led to even more accurate results of biomass evaluation, accordingly ensuring the effectiveness of the methods used. The identification of parameters was performed by means of digital *Chemotaxis* random search procedures.

Key words: biotechnology, soft sensor, bioreactor, biomass concentration, oxygen, carbon dioxide.

Turinys

Turinys.....	4
ĮVADAS	6
1. APŽVALGINĖ DALIS	7
1.1. Darbo tikslai ir uždaviniai, problemos	7
1.1.1. Problema	7
1.2. Biotechnologija, biotechnologiniai procesai, kintamųjų matavimo, įvertinimo metodai jų įtaką procesui ir valdymo būdai.....	8
1.2.1. Biotechnologinio proceso kintamųjų matavimo metodai	8
1.2.2. Tiesioginiai matavimo metodai.....	8
1.2.3. Netiesioginiai matavimo metodai	9
1.3. Biotechnologinio proceso parametrai	9
1.4. Programiniai jutikliai, esami tipai ir technologijos	14
1.4.1. Šiandienos mokslo ir technologijų viršūnė, iššūkiai.....	17
1.4.2. Matavimo technologijos.....	17
1.4.3. Matavimo duomenų matematinis modeliavimas	19
1.4.4. Esami pritaikymo būdai.	20
1.4.5. Modeliuotų duomenų perdavimas.....	22
1.4.6. Intelektinių jutiklių poreikis ir galimybės biochemijos pramonėje.	22
1.5. Programinių jutiklių kūrimui naudojami biomasės įvertinimo metodai, matematiniai modeliai, balanso lygtys	24
1.5.1. Biomasės įvertinimas pagal OUR, CPR ir sunaudoto buferinio šarminio tirpalo kiekį	24
1.5.2. Biomasės koncentracijos įvertinimas paremtas pagal Luedeking-Piret sąryšį.	24
1.5.3. Biomasės koncentracijos įvertinimas paremtas daugelio kintamųjų regresijos metodu.....	25
1.5.4. Biomasės įvertinimas paremtas svarbiausių komponentų analize (PCA).....	26
1.5.5. Biomasės įvertinimas pasitelkiant dirbtinius neuroninius tinklus	26
1.5.6. Netiesioginis biomasės įvertinimas pagal OUR matavimus	27
1.5.7. Biomasės įvertinimas pagal buferinio tirpalo sunaudojimo greičio matavimus.....	27
1.5.8. Biomasės įvertinimas pagal artimųjų infraraudonųjų spindulių jutiklį.....	28
1.5.9. Biomasės koncentracijos įvertinimas pagal amoniako titravimą.....	28
1.6. Modelio parametrų identifikavimas.....	29
1.6.1. Chemotaxis, atsitiktinis paieškos metodas.....	30

2. TYRIMO METODOLOGIJA	34
2.1. Pagrindiniai tiesiogiai matuojami kintamieji bioprocese	35
2.2. Parametrų matavimas, skaičiavimas, įvertinimas.....	36
2.2.1. Deguonies ir anglies dioksido išeinančių dujų srautai	36
2.2.2. Apskaičiuojama deguonies sklendės atidarymo eiga.....	37
2.2.3. Buferinio šarmo tirpalo (bazės) tiekimas	38
2.2.4. Tūrio apskaičiavimas, aeracijos srautai	38
2.2.5. Įvertinamas OUR ir CPR	40
3. REZULTATAI, REZULTATŲ PALYGINIMAS	44
3.1. Netiesioginis biomasės įvertinimas pagal OUR matavimus.....	44
3.2. Netiesioginis biomasės įvertinimas pagal CPR matavimus	46
3.3. Biomasės įvertinimas pagal buferinio tirpalo sunaudojimo greičio matavimus.....	49
3.4. Modelio parametrų identifikavimas.....	52
4. IŠVADOS.....	54
5. LITERATŪRA.....	55
Priedai	57

ĮVADAS

Pastaruoju metu pramonėje vis daugiau naudojami biotechnologiniai procesai, kurie daugiausiai priklauso nuo mikroorganizmų. Šie procesai naudojami ne tik retų vaistų, pramoninių chemikalų, bioproduktų, kuro bet ir maisto gamybai. Kalbant apie biotechnologinius procesus, tai yra vieni sudėtingiausių technologinių procesų, kuriuose vyksta šimtai biocheminių reakcijų, kurios daro įtaką gamybos sąnaudoms, galutinio produkto kiekiui ir kokybei. Kadangi šių procesų svarba, ekonominiu atžvilgiu yra labai didelė, tad būtina užtikrinti optimalų jų darbą ir maksimizuoti ekonominius bei kokybės rodiklius, tad vienas iš galimų pasirinktų sprendimo variantų yra programiniai jutikliai, jie realaus laiko masteliu geba įvertinti sudėtingus parametrus biotechnologiniuose procesuose, kas turi didelę reikšmę procesų valdyme ir stebėjime.

Programinių jutiklių kūrimo technologijos plačiau pradėjo vystytis tik pastaraisiais metais, kai pakankamai išstobulėjo kompiuteriniai skaičiavimo pajėgumai ir atsirado didesnis poreikis įvairiose pramonės srityse. Programiniai jutikliai vis plačiau naudojami biotechnologijos srityje. Dėl daugybės svarbių proceso kintamųjų, kurių neįmanoma išmatuoti tiesiogiai su įprastais jutikliais yra pasitelkiami programiniai jutikliai. Šios technologijos suteikia galimybę su pakankamai mažais kaštais labai padidinti technologinių procesų stebėsenos ir valdymo efektyvumą, leidžia optimizuoti sunkiai valdomus procesus.

Kuriant programinius jutiklius skaičiuoti svarbiems proceso aeracijos sistemos išvestiniams dydžiams, galima panaudoti matematinius modelius, balanso lygtis paremtus eilę metodų, tokių kaip Luedeking-Piret sąryšis, kintamųjų regresijos metodas, svarbiausių komponentų analizė, buferinio tirpalo sunaudojimo greičio matavimas ir kt. Programinių jutiklių kūrimui ar tobulinimui galima pasitelkti modeliavimo technikas, kurios padės įvertinti kuriamo modelio efektyvumą

1. APŽVALGINĖ DALIS

1.1. Darbo tikslai ir uždaviniai, problemos

Darbo tikslas. Ištirti pateiktą šiuolaikinę pramoninę bioreaktoriaus aeravimo sistemą, jos veikimo principus, vykstančius procesus. Sukurti programinius jutiklius biomasės koncentracijai įvertinti pagal išeinančias ir tiekiamas į bioreaktoriaus dujų analizės rezultatus.

Darbo uždaviniai. Ištirti literatūrą tyrimo tema, duomenų paruošimas, modelių kūrimas, jų parametrų identifikavimas, rezultatų pateikimas ir analizė.

1.1.1. Problema

Fiziniais, cheminiais dydžiams, tokiems kaip temperatūra, slėgis, matuoti yra sukurta begalė jutiklių tipų, ko negalima pasakyti apie biotechnologinius parametrus, tokius kaip biomasės koncentracija. Biomasės koncentracijos išmatavimui, nėra sukurto jutiklio, kuris realiu laiku, tiesiogiai galėtų išmatuoti esamą, biomasės koncentraciją. Tai sukelia daug problemų, biomasės koncentracija matuojama ne realiu laiku, kai paėmus kas kart bandinius, ištiriama esama koncentracija, toks matavimas labai uždelstas, neveiksmingas. Sprendžiant šią problemą, biomasės koncentracijos matavimui, vis dažniau taikomi netiesioginio įvertinimo metodai, pasitelkiant keletą realiai matuojamų dydžių ir naudojantis funkcinėmis priklausomybėmis, įvertinama koncentracija. Pastaruoju metu kuriami vis pažangesni biomasės koncentracijos įvertinimo metodai, tačiau jų praktinis taikymas dažnai būna ribotas. Savajame darbe sprendžiu šią problemą, kurdamas programinį jutiklį. Šis programinis jutiklis gebės įvertinti biomasės koncentraciją, realizuojant keletą netiesioginio įvertinimo metodų vienu metu, pagal specifinį anglies išskyrimo greitį – CPR ir pagal deguonies tiekimo greitį OUR.

1.2. Biotechnologija, biotechnologiniai procesai, kintamųjų matavimo, įvertinimo metodai jų įtaką procesui ir valdymo būdai.

Kas yra biotechnologija. Pastaruoju metu pramonėje vis daugiau naudojami biotechnologiniai procesai, kurie daugiausiai priklauso nuo mikroorganizmų. Šie procesai naudojami ne tik retų vaistų, pramoninių chemikalų, bioproduktų, kuro bet ir maisto gamybai. Nors biotechnologiniai procesai apima visų gyvų organizmų formų veiklą, šios pramonės šakos vystyme dažniausiai naudojami mikroorganizmai, dėl jų greito ir santykinai paprasto biomasės auginimo, kurį galima užtikrinti naudojant pigias žaliavas (pramonines atliekas) ir didelio metabolizmo būdų įvairumo.

Tiek pats terminas biotechnologija, tiek biotechnologiniai procesai nėra labai nauji. Jau 6000 metų prieš mūsų erą buvo žinomi duonos rauginimo, alkoholio fermentavimo, acto susidarymo iš vyno procesai. Tačiau šie procesai vykdavo spontaniškai, jie nebuvo kontroliuojami. Esminis lūžis praktinio biotechnologinių procesų taikymo revoliucija įvyko XX a. kai buvo pradėtos naudoti modifikuotos *E.coli* bakterijos[13].

Kalbant apie biotechnologinius procesus, tai yra vieni sudėtingiausių technologinių procesų, kuriuose vyksta šimtai biocheminių reakcijų, kurios daro įtaką gamybos sąnaudoms, galutinio produkto kiekiui ir kokybei. Kadangi šių procesų svarba, ekonominiu atžvilgiu yra labai didelė, tad būtina užtikrinti optimalų jų darbą ir maksimizuoti ekonominius bei kokybės rodiklius.

1.2.1. Biotechnologinio proceso kintamųjų matavimo metodai

Biotechnologiniai parametrai gali būti įvertinami dviem būdais, pasitelkiant tiesioginio matavimo priemones, kurios skirstomos pagal matuoklių montavimo vietą, matavimo signalų pateikimo laiką ir naudojant netiesioginio įvertinimo metodus, kai matuojant keletą matuojamų dydžių nustatomas dominantis dydis, pasitelkiant nustatytas funkcines priklausomybes.

1.2.2. Tiesioginiai matavimo metodai

Taikant tiesioginį matavimo metodą, jutikliai gali būti montuojami *in-situ* arba *ex-situ* tipu. *In-situ* tipo jutikliai matuoja terpės parametrus pačiame bioreaktoriuje, *ex-situ* tipo analizuoja terpės bandinius, ištrauktus iš už reaktoriaus ribų. Matavimo signalas gali būti gaunamas realaus laiko

masteliu (angl. *on-line*) arba ne realiu laiku, su dideliu vėlavimu ir diskrečių matavimo forma (angl. *off-line*).

In-situ tipo jutikliai pakankamai gerai nustato pH redukciniį potencialą, O₂, CO₂, laidumą ir drumstumą. Taip pat šis jutiklių montavimo tipas leidžia dideliu dažniu išmatuoti esamus terpės parametrus, todėl yra galimas realaus laiko matavimas ir valdymas. Kartais *in-situ* jutikliai gali būti montuojami bioreaktoriaus išorinėse kilpose. Pridedat papildomus išorinius įrenginių, gali atsirasti papildoma rizika procese (pvz. pažeistas barjero sterilumas, nejautra baltymų absorbuavimui), todėl tai turi būti atidžiai apsvaustoma.

Ex-situ tipo jutikliai yra naudojami išmatuoti iš bioreaktoriaus išeinančio deguonies ir anglies dioksido koncentraciją, taip pat *ex-situ* tipu yra paremti tokie matavimo metodai kaip: įpurškiamo srauto analizė, LC, GC ir chromatografija, masės spektrometrija, biologiniai jutikliai.

1.2.3. Netiesioginiai matavimo metodai

Vis plačiau yra taikomi netiesioginio matavimo metodai biotechnologiniuose procesuose. Taikant šiuos metodus praktikoje matuojami vienas ar keletas matuojamų dydžių ir naudojantis nustatytomis funkcinėmis priklausomybėmis nustatomas dominantis dydis. Dažnai pasitaikantis pavyzdys yra biomasės koncentracijos nustatymas pagal iš bioreaktoriaus išeinančių dujų sudėties matavimo rezultatus arba pagal terpės optinio tankio matavimo rezultatus. Pirmu atveju nustatoma santykinio biomasės augimo greičio priklausomybė nuo deguonies sunaudojimo greičio ir realaus laiko masteliu skaitmeniniais metodais sprendžiama dinaminė biomasės balanso lygtis. Antru atveju naudojama iš anksto sudaryta statinė netiesinė kalibravimo kreivė.

1.3. Biotechnologinio proceso parametrai

pH

pH yra ypač svarbus veiksnys daugelyje biotechnologinio procesų srityse. Dažnai siekiant efektyvumo proceso stebėjime ir valdant, naudojami *in-situ* jutikliai, be to mažinant riziką yra naudojamas periodinis *off-line* matavimas. Viena iš dažniausiai paplitusių pH matuojamų ir valdomų technologinių parametrų yra fermentų ir metabolinės reakcijos, nes jos yra labai jautrios pH lygiui. pH pokytis veikia jonų difuziją ir taip sukuria elektrodo potencialą, kuris matuojamas standartinio elektrodo atžvilgiu. Elektros grandinė užsidaro per diafragmą, skiriančią standartinį tirpalą nuo matuojamo tirpalo. Viena iš didžiausių problemų yra standartinio elektrolito užteršimas

vykdant ilgalaikius kultivavimo procesus. pH jutikliai gali būti sterilizuojami vietoje, tačiau reikia atsižvelgti, jog taip sutrumpinamas jo tarnavimo laikas, nes sterilizavimas garais turi neigiamą poveikį diafragmai. pH matavimo pokyčius galima labai tiksliai išmatuoti pagal absorbciją ir fluorescencijos pokyčius su sąlyga kad terpė bioreaktoriuje maišoma gana intensyviai.

Jai kultivavimo procese aktyviai yra palaikomas tam tikras pH, gali būti apskaičiuojamas santykinės biomasės augimo greitis ir jos koncentracija, pagal sunaudotą buferinio tirpalo kiekį [7].

Temperatūra

Temperatūra yra gerai suprantamas ir gerai valdomas parametras biotechnologijos procesuose. Bioprocesai yra stebimi ir valdomi, paprastai 0-121 °C diapazone. Keletas skirtingų prietaisų galinčių matuoti temperatūrą: termistorinis, talpinis ir bimetalinis temperatūros jutiklis. Dažniausiai temperatūra matuojama Pt100 ir Pr1000 platinos jutikliais, kurie užtikrina didelį temperatūros matavimo tikslumą (0,001-0,01 °C) ir stabilumą. Paprastai atitinkama terpės temperatūra palaikoma grįžtamojo ryšio valdymo sistema [5].

Slėgis

Slėgis yra svarbus valdymo parametras, nes jis įtakoja ne tik bioprosesą bet ir saugumą. Slėgis paprastai įtakoja ištirpusių dujų prisotinimo koncentracija skystoje terpėje. Todėl reikia atsižvelgti į kalibravimo sąlygas (jais nėra automatinio slėgio kalibravimo). Kai kuriais atvejais bakterijų fermentavimui, slėgio padidėjimas yra naudojamas padidinti masių mainus. Ląstelių kultūrų auginimui, tai gali padidinti anglies dioksido kiekį, kuris gali neigiamai paveikti šį procesą. Slėgiant fermentavimą, taip pat sumažinama nepageidaujama užterštumo rizika. Slėgio palaikymas taipogi svarbus sterilizuojant bioreaktorių. Slėgio jutiklių galimi tipai: pjezoelktriniai, talpiniai ar varžiniai, tačiau ne visuose pakankamai kompensuojamas temperatūros poveikis [5].

Klampumas

Informacija apie klampumą gali padėti užtikrinti biologinio proceso efektyvumą ir įvertinti mišinio, srauto, masės perdavimo ir šilumos perdavimo elgesį. Gyvūnų kilmės ląstelių kultūros terpės yra dažniausiai Niutoniniai skysčiai. Tačiau didelė baltymų koncentracija procesų formavime ir bakterijų fermentacijoje skirtų polisacharidų ir DNR gamybai skysčiuose gali vaizduoti ne Niutonines charakteristikas. Tai gali turėti skaudžių poveikių galios charakteristikai, masės perdavimui, šlyties įtampai, perpumpavimui, bioreaktoriaus konstrukcijai ir kt. Klampumas gali būti nustatomas naudojant viskozimetrus, pavyzdžiui kūgio ir plokštumos viskozimetrai,

bendrasiajai cilindriškai viskozimetrai ir sparnuotiniai viskozimetrai. Klampumas yra ypač svarbus didelės koncentracijos baltymų gamybai, pvz. po oda formuojamiems antikūnams [7].

Oksidacijos ir redukcijos potencialas

Bioproceso terpės redukcinio potencialo stebėjimas gali suteikti informacijos apie pusiausvyros tarp esančių oksiduojančių ir redukuojančių rūšių (atitinkamai elektronų gavėjai ir donoriai). Oksidacijos-redukcijos potencialas vaidina svarbų vaidmenį analizuojant ir optimizuojant sekretinį baltymą iš žinduolių ląstelių. Biotechnologiniuose procesuose taikomų kultivavimo terpių ir pamaitinimo tirpalų oksidacijos ir redukcijos potencialas, kuris yra matuojamas oksidacijos-redukcijos potencialo elektrodu, yra susijęs su „bendru laisvų elektronų kiekiu“. Šis matuojamas signalas yra ypač informatyvus esant žemoms ištirpusio deguonies koncentracijoms, kai pO_2 jutiklio signalas yra netikslus. Signalas matuojamas greičiau nei matuojant pO_2 , nes matavimo procese nėra difuzijos etapo. Paprastai, metalinis elektrodas gali būti aukso, iridžio arba dažniausi platinos. Redukcijos jutiklis yra susijęs su pH jutikliu, kuriame sumontuotas keitiklis rodmenis teikti milivoltais [9].

Ištirpusio deguonies koncentracija

Ištirpusio deguonies koncentracijas bioprocese paprastai matuojama ištirpusio deguonies elektrodu, kitaip vadinamas kaip DO zondas. Yra dviejų tipų plačiai naudojami: galvaniniai ir poliarografiniai elektrodai. Abiejose jutikliuose yra membranos pralaidžios deguoniui. Deguonis prasiskverbia pro membraną ir pasiekus katodą, sureaguoja ir susidaro srovė tarp anodo ir katodo, proporcingai deguonies dalinis slėgis fermentacijos terpėje. Elektrolitų tirpalai elektroduose, kad dalyvautų reakcijose turi būti naudojami skystoje terpėje [5].

Biomasės koncentracija

Biomasės koncentracijos matavimai realaus laiko masteliu yra labai svarbūs atliekant proceso valdymą. Biomasės koncentracijos matavimo metodų ir jutiklių veikimo principas pagrįstas optinių terpės savybių, filtravimo savybių, terpės tankio pokyčiais, dialektrinėmis ląstelių savybėmis [6]. Esamos biomasės koncentracijos įvertinimui realaus veikimo masteliu yra netiesiogiai naudojami tie dydžiai, kurie gali būti lengvai išmatuojami. Vieni iš galimų: anglies dioksido išskyrimas greitis CPR, deguonies sunaudojimo greitis OUR ir bazė kuri apskaičiuojama kartu su pH [7].

Kultūrinės terpės fluorescencija

Fluorescencijos matavimai buvo naudojami ne tik techninėms bioreaktorių savybėms apibūdinti, bet ir mikroorganizmų fiziologijai tirti. Ląstelių viduje arba išorėje spinduliams jautrios medžiagos (fluoroforas) yra apšviečiamoms matomo arba ultravioletinio spektro spinduliais, kuriuos skleidžia mažo slėgio gyvsidabrio lempa ir kurie prieš nukreipiat į reaktorių filtruojami, atsižvelgiant į tiriamo fluoroforo žadinimo spektrą. Fluoroforo emisijos spektro spinduliai gali būti surenkami tinkamu pluoštinės optikos įrenginiu, filtruojami, ir likusių spindulių intensyvumas matuojamas fotojutikliu [6].

LC, HPLC chromatografija

Chromatografijos metodų tikslas – atskirti sudėtinės cheminių tirpalų dalis, kai jos prateka pro kolonas, pripildytas stacionariose fazėse esamų atitinkamų medžiagų. HPLC didelio slėgio skysčio chromatografija (angl. high pressure liquid chromatography) [6].

OUR deguonies sunaudojimo greitis, OTR deguonies tiekimo greitis

OUR (oxygen uptake rate) – deguonies sunaudojimo greičio ir OTR (oxygen transfer rate) – deguonies tiekimo greičio matavimai. Literatūroje šie matavimai dar vadinami respirometrija (respirometry) arba biomasės kvėpavimo matavimais. Respirometriniai matavimai gali būti atliekami įvairiais metodais, tačiau jie visi pagrįsti principu, kad ištirpusio deguonies koncentracijos pokyčio greitis lygus deguonies tiekimo ir sunaudojimo greičio skirtumu ($\frac{dc}{dt} = OTR - OUR$).

Atitinkamai, esant stacionarioms proceso sąlygoms, $OTR = OUR$. Labai svarbus atliekant OTR matavimus yra tūrinis deguonies masės perdavimo koeficientas iš dujinės į skystąją fazę $k_L a$. Tai išvestinis parametras, turintis labai daug išraiškų, priklausančių nuo konstrukcinių bioreaktoriaus parametru, terpės savybių, darbinių parametru ir t.t. OTR ir $k_L a$ sieja toks ryšys: $OTR = k_L a \cdot (c^* - c)$. OTR ir OUR gali būti matuojami tokiais praktikoje taikomais metodais:

1) Dujų analizė: metodo esmė labai paprasta, todėl jis labai plačiai taikomas – matuojama deguonies koncentracija į bioreaktorių tiekiamose ir iš jo ištekančiose dujose; deguonies masių balansą galima užrašyti lygtimi $F_{O_2}^{in} - F_{O_2}^{out} - V \cdot OUR = 0$, Čia $F_{O_2}^{in}$ ir $F_{O_2}^{out}$ – moliniai deguonies

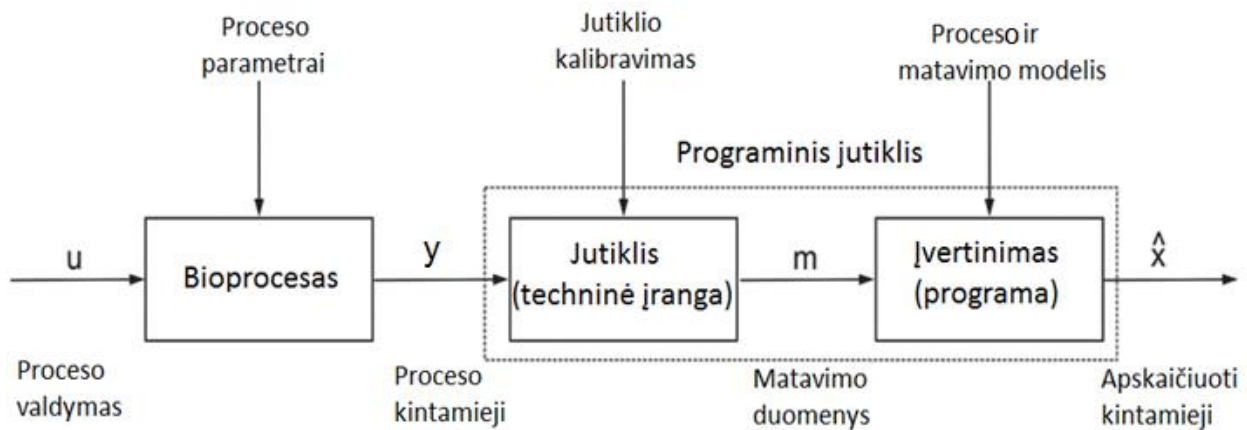
srautai, matuojami bioreaktoriaus įėjime ir išėjime, o V – bioreaktoriaus tūris; atitinkamai apskaičiuojamas OUR, paskui $k_L a$;

2) Dinaminiai metodai : jie remiasi 1966 m. Taguchi ir Humphrey sukurtais principais, reikalaujančiais atlikti bioreaktoriuje aktyviai augančių mikroorganizmų respirometrijos matavimus; taikomas matematinis modelis, apskaičiuojamas OUR, paskui $k_L a$;

3) Kiti metodai: pirmaisiais dviem metodais atliekam didžioji dalis visų OUR matavimų; vis dėlto yra ir daug kitų metodų , kurie pagrįsti $k_L a$ ir OUR skaičiavimu iš konkrečių biologinių medžiagų cheminių reakcijų greičio; pH pokyčių matavimų, sukeltų burbuliuojant anglies dvideginiui gerai maišomame bioreaktoriuje; iš mikroorganizmų augimo stebėjimų griežtai aerobinėmis sąlygomis; grynai fizikiniais metodais arba panaudojant radioaktyvius žymenis [11, 12, 16].

1.4. Programiniai jutikliai, esami tipai ir technologijos

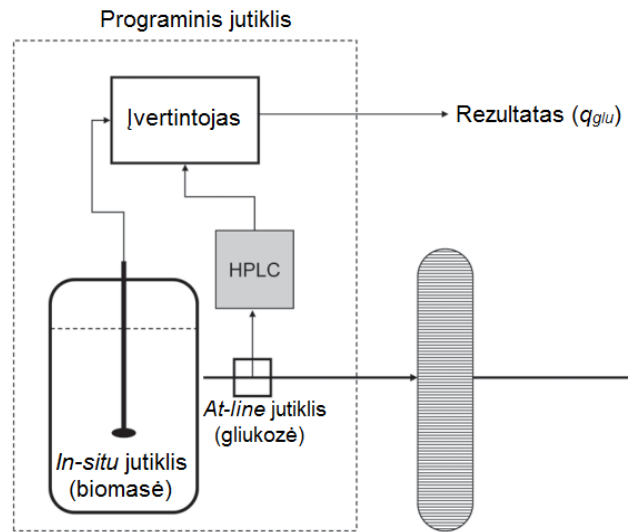
Kas yra programinis jutiklis. Terminas - intelektinis jutiklis arba programinis jutiklis dažnai naudojamas biotechnologinių procesų stebėjime. Programinis jutiklis apima žodžiai “programa“ (angl. *software*), nes jutiklio siunčiamus duomenis įvertina modeliai, kurie dažniausiai aprašomi kompiuterio programoje ir “jutiklis” (angl. *sensor*), kadangi informacijos siuntimas modeliuose yra panašus kaip ir aparatinuose (angl. *hardware*) jutikliuose [14]. Programinio jutiklio principinę schemą iliustruoja 1.1 pav. ir 1.2 pav. Šios schemas vaizduoja, jog programiniai jutikliai gali veikti realaus laiko masteliu (angl. *on-line*). Realus laikas apibrėžimas, kai numatytų matavimo zondu, jutiklių ar kitų prietaisų esančių bioreaktoriuje ar kitame bioproceso įrenginyje, duomenys gali būti stebimi tiesiogiai realiame laike.



1.1 pav. programinio jutiklio (intelektinio jutiklio) blokinė schema, šioje schemoje pavaizduotas vienas aparatinis jutiklis, realybėje jų gali būti ir daugiau

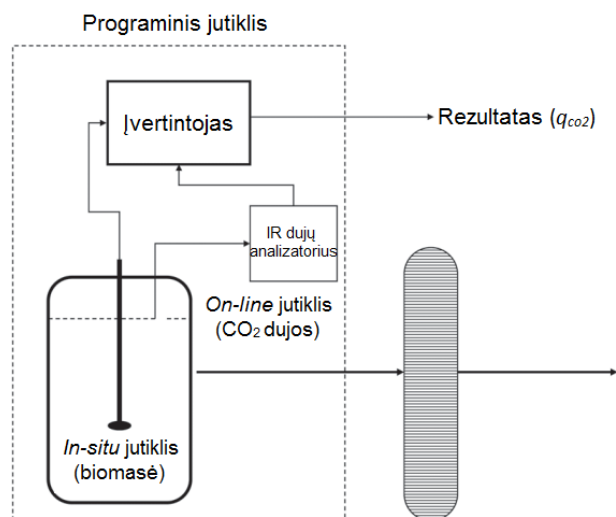
Kaip vieną iš pavyzdžių programinio jutiklio taikymą pasiūlė Warth ir kt. [1]. Programinio jutiklio kūrimui jie panaudojo konfigūraciją, labai panašią į matomą 1.3 pav. Rekombinatinės žarnyno lazdelių *Escherichia coli*, periodiniam su pamaitinimu (angl. *fed-batch*) kultūros auginimui, gaminančios žalią florescentinį baltymą, stebimos realaus laiko artimo infraraudoniesiems spinduliams zondo (NIR), kuris patalpinamas į bioreaktorių *in-situ* metodu ir kuris įvertina biomasės koncentraciją remdamasis absorbcija ties 1100 nm, bei filtravimo zondas, kuris paima terpės pavyzdžius iš bioreaktoriaus, gliukozės ir acetato koncentracijų didelio slėgio skysčio chromatografijai HPLC. Programinių jutiklių algoritmai apskaičiuoja biomasės specifinį augimo greitį iš NIR signalo, taip pat specifinis gliukozės įsisavinimo greitis ir acetato susidarymo

greitis yra apskaičiuojami iš NIR ir HPLC duomenų. Šie duomenys yra nuolat atnaujinami ir pateikiami proceso operatoriui.



1.2. pav. Programinis jutiklis, gliukozės įsisavinimo dydis apskaičiuojamas naudojant *in-situ* biomasės jutiklį ir su *at-line* HPLC išmatuota gliukozės koncentracija

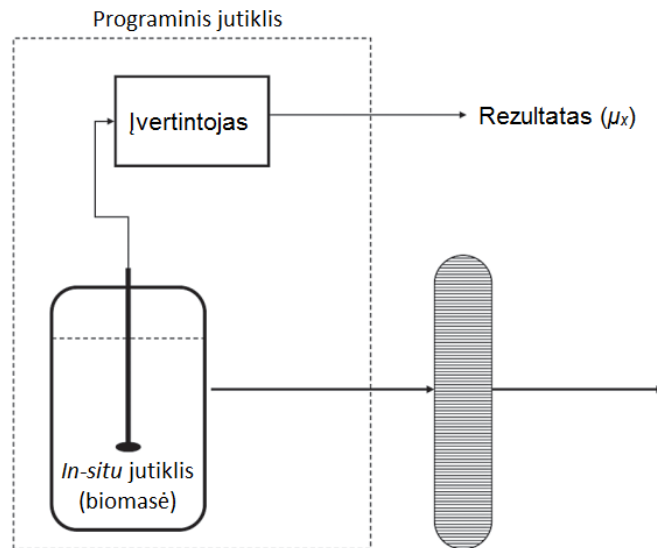
Programinio jutiklio modelis dažnai yra prognozuojamo pobūdžio. Naudojami terminai – inferencialiniai jutikliai (angl. *inferential sensors*), virtualus realaus laiko mastelio analizavimo jutiklis (angl. *virtual on-line analyzer*) arba stebėjimų pagrįsti jutikliai (angl. *observer-based sensors*).



1.3 pav. Programinis jutiklis, kuriame *in-situ* tipo jutiklis derinamas kartu su išskiriamų dujų infraraudonųjų spindulių matavimu, išskiriamo anglies dvideginio nustatymui, pagal kurį nustatomas specifinis anglies gamybos greitis (CPR).

Pagrindinė idėja programinių jutiklių yra tai, jog jie santykinai lengvai įvertina realaus laiko mastelio duomenis iš kultivavimo kintamųjų, kai kitu atveju tai yra labai sunku padaryti arba nepakanka matavimo skaičiaus kiekio. Kitas panaudojimo būdas intelektinių jutiklių yra proceso stebėjime, pvz. atliekant proceso diagnostiką arba siekiant užfiksuoti galimus gedimus. Bendrais bruožais galima išrinkti dvi skirtingas klases intelektinių jutiklių t.y. paremti modelio veikimo principu (angl. *model-driven*) ir paremti duomenų apdorojimo principu (angl. *data-driven*). Chemometriniai metodai, kaip kad, dalinis mažiausiųjų kvadratų (PLS) metodas priklauso pastarajai intelektinių jutiklių klasei, bet taip pat gali būti paremtas ir tradicinių duomenų apdorojimo principu. Žinoma yra ir kitų programinių jutiklių, kurie paremti duomenų apdorojimo principu. Dažnai duomenų apdorojimo principu paremti programiniai jutikliai yra taikomi farmacijoje, svarbu pabrėžti, jog intelektiniams jutikliams paremtais PLS metodu arba pagrindinės sudedamosios dalies analizės (PCA) metodu paprasti yra suteikiama pirmenybė, nes šie metodai yra gerai žinomi farmacijos pramonėje ir tai palengvina modelių validavimą. Modelio veikimo principu paremtiems intelektiniams jutikliams gali būti priskirtas masės ir energijos balanso metodas. Kalmano filtro ir išplėsto Kalmano filtro metodai taip pat priklauso šiai klasei. Pagrindinė problema yra tai, jog kuriant modelio veikimo principu paremtus intelektinius jutiklius yra reikalinga ganėtinai daug laiko [14]. Kuriant farmacijos gamybos procesus, dažnai laikas yra vienas iš svarbiausių veiksnių todėl greičiausiai viena iš priežasčių ir yra tai, dėl ko šiuo principu kuriami programiniai jutikliai nėra labai paplitę farmacijos pramonėje.

Atsiranda didelis susidomėjimas intelektiniu jutiklių keliose inžinerijos srityse ir pramonėje, pvz. liofilizacija (angl. *lyophilisation*), distiliavimas ir nuotekų valymas.



1.4 pav. Programinis jutiklis, bioreaktoriuje specifinis augimo greitis yra įvertinamas biomasės koncentracijos *in-situ* tipo jutikliu

1.4.1. Šiandienos mokslo ir technologijų viršūnė, iššūkiai

Analitinių prietaisų klasės technologijų viršūnė yra tiesiogiai priklausoma nuo dviejų pagrindinių komponentų prieinamumo ir suderinamo, pvz. matavimo įtaiso (-ų) ir matematinio (-ių) proceso (-ų) modelio (-ių), kuriuos sėkmingai apjungus, sudaromas intelektinis jutiklis. Be to, šių komponentų technologinės galimybės apibrėžia viso intelektualinio jutiklio konfigūracijos ribas.

Taigi, būtų įdomu išsamiai išanalizuoti matavimo technologijos ir matematinio modeliavimo potencialias galimybes vystant programinių jutiklių technologiją. Tai bus labai kontrastinga, šiuo metu esamą programinių jutiklių technologiją lyginant koku mastu iš tikrųjų yra neišnaudotas potencialas šioje srityje, bet uždavinys yra atrasti neišnaudotas galimybes.

1.4.2. Matavimo technologijos

Literatūra atskleidžia, kokie įvairūs matavimo metodai buvo taikomi biotechnologinių procesų stebėjime [2-4]. 1 lentelėje apibendrinta svarbiausi ir dažniausiai pasitaikantys rezultatai. Taip pat lentelėje pateikiami realaus laiko mastelio matavimo metodai pabrėžiant jų naudingumą, taip bandant sujungti su modeliavimo metodais gali būti sukuriami programiniai jutikliai.

Realaus laiko matavimo metodai yra pagrįsti *in-situ* tipu, kurie yra suskirstyti į du tipus. Vienas iš tipų - *in-line* tipo invaziniai jutikliai pvz. temperatūra, slėgis, drumstumo zondai, kurie montuojami tiesiogiai į bioreaktorių. Prietaisai tokie kaip - masės srauto reguliariai, išskiriamųjų dujų analizatoriai (angl. *off-gas analyzers*), spektrometrai, kurie nėra naudojami invaziniu būdu, bet yra arti bioproceso (bioreaktoriaus) jie taip pat gali išmatuoti realiu laiku matuojamos terpės parametrus.

Kai kurie iš šių matavimų gali atlikti svarbų vaidmenį, anglies ir deguonies balanse ir augimo procese. Lankieji junginiai, tokie kaip metanolio ir amoniako išmetamos dujos, gali būti susijusios su skystų fazių koncentracija, tokiu būdu palaikomas balansas.

Šie metodai kartais derinami su neinvaziniais *on-line* spektroskopijos metodais, kur spektro informacija gaunama iš 2D fluorescencijos, NIR / MIR (vidutinio bangos ilgio infraraudonųjų spindulių (mid-infrared)), ir Raman'o spektrinių duomenų, kurie gali būti naudojami proceso stebėjimui ir modeliavimui su daugiamatę duomenų analize [15].

Pasitelkiant analitinius cheminius metodus *at-line* matavimu principu gali būti panaudojama bioproceso srauto analizei arba uždaroms ar atviroms srauto apėjimo procedūroms. HPLC gali būti labai naudinga analizuojant tikslias molekules, šalutinius produktus. Geriausias rezultatas buvo pasiektas su rekombinatiniais baltymais, (pvz. vakcinom, baltymais, fermentais) kur baltymų gryninimo metodai dažnai remiasi HPLC procedūroms [1].

In-line, on-line, at-line matavimo principai padidina analizės ir matavimo skaičių kiekį ir taip atveria galimybes jų panaudojimą intelektiniams jutikliams. Dėl programinio jutiklio koncepcijos *in-situ* jutikliai gali atrodyti patrauklesni, nei *at-line* jutikliai, tačiau precizika, kalibravimas, stabilumas ir bendrosios analitinės charakteristikos dažnai palankesnės *at-line* alternatyvai.

1 lentelė

Matavimo įranginys	Analitinių ir būsenos kintamųjų pavyzdžiai
<i>In-situ jutikliai / analizatoriai:</i> Fiziniai <i>in-situ</i> jutikliai / zondai	Temperatūra, slėgis, tūris, srautas
<i>Elektrodai:</i> NIR /MIR <i>in-situ</i> zondai Bangos ilgių fluorimetrija Turbidimetrija <i>In-situ</i> mikroskopija Radijo dažnio varža	Terpės komponentai, biomasė NAD(P)H, amino rūgštys Biomasė Ląstelių form ir t.t. Biomasė, ląstelių gyvbingumas
<i>At-line jutikliai / analizatoriai:</i> <i>Skystos fazės analizė:</i> Didelio slėgio skysčio chromatografijos HPLC Įpurškiamo srauto analizė FIA Elektrodas-pagrįstas biojutikliu Imunitetas-pagrįstas biojutikliu Srauto difuzijos analizatorius In-line mikroskopija Dalelių matmens spektro analizė	Terpės komp. (organinės rūgštys, sacharidai) Terpės komp. ekstraląstelinei produktai Fermentų substratai (pvz. terpės komponentai) Antigenai (pvz. baltymai) Gliukozė, metanolis Vaizdo analizė Ląstelių skaičius, jų pasiskirstymas pagal dydį
<i>Išeinamųjų dujų analizė:</i> Paramagnetiniai deguonies analizatoriai Infraraudonųjų spindulių adsorbcijos fotometrai Dujų chromatografai Masių spektrometrai Liepsnos jonizavimo detektorius Elektroninė nosis	O ₂ CO ₂ O ₂ , lakieji junginiai Mažos molekulinės masės junginiai CH ₃ , OH, CH ₄ Mikrobinės lakios medžiagos (etanolis, sulfidai)

1.4.3. Matavimo duomenų matematinis modeliavimas

Biotechnologijoje apie bioproceso duomenų matematinį modeliavimą kalbama pastaruosius 30 metų. Šie modeliai paprastai gali būti suskirstyti į statinius ir dinامينius modelius.

Statiniai modeliai dažniausiai kuriami iš masių ir komponentų balansų, iš masės arba šilumos mainų dėsnių arba tiesiog iš medžiagų balanso. Empiriniai „juodos dėžės“ modeliai su nekintamais parametrais paprastai taipogi priskiriami šiai modelių grupei.

Dinaminiai modeliai paprastai apima dinامينius balansus, kartu su kinetika, kuri reikalinga spartos išraiškoms, kaip būsenos kintamųjų funkcijoms, aprašyti. Šie modeliai gali būti klasifikuojami kaip struktūrizuoti ir nestruktūrizuoti. Pagrindinis nestruktūrizuotų modelių trūkumas intelektinių jutiklių kontekste yra tai, kad jie naudoja pastovius išėigos koeficientus. Kai tuo tarpu struktūrizuoti modeliai gali būti naudojami su kintamais koeficientais, taip leidžiant aprašyti sudėtingesnę kultūrų elgesį. Tačiau, nors struktūrizuoti modeliai gali aprašyti įvairius

sudėtingus kultūrų elgsenos bruožus, statistika ar stebėjimu paremtuose intelektiniuose jutikliuose, dėl savo santykinio paprastumo, dažniausiai naudojami nestructūrizuoti modeliai. Tuo tarpu structūrizuoti modeliai dažniausiai naudojami optimalaus tiekimo skaičiavimui bei kitoms valdymo strategijoms.

Modeliai, tinkamiausi intelektinių sensorių panaudojimui, dažniausiai būna paremti dirbtiniais neuroniniais tinklais arba fuzzy logika. Neuroniniai tinklai labai pritaikomi dėl jų lankstumo. Jie gali būti naudojami kaip daugelio įėjimų, vieno išėjimo, arba net kaip daugelio įėjimų ir daugelio išėjimų modeliai. Fuzzy logika grindžiama pagrindinėmis taisyklėmis, o rezultatai rodo, kad ji geba puikiai aprašyti nežinomus būsenos kintamuosius iš žinomų matavimo rezultatų.

1.4.4. Esami pritaikymo būdai.

Egzistuojantys intelektinių jutiklių pritaikymo atvejai, paremti aukščiau paminėtais modeliais ir prietaisais, kol kas gausa nepasižymi. Antroje lentelėje keletas jų pateikiama. Intelektiniai jutikliai paprastai grindžiami tiesioginių matavimo rezultatų iš išskiriamų dujų analizatorių duomenimis. Gana dažnai taikomas ir elementarus gautų kintamųjų, tokių kaip deguonies suvartojimo greitis OUR, anglies dioksido išsiskyrimo greitis CPR, respiratorinio koeficiento RQ bei deguonies perdavimo koeficiento (k_{LA}), skaičiavimas. Labiau pažengusi technika apima statistinį vertinimą bei stebėjimą, kurie naudojami įvertinti biomasės koncentracijai, augimo tempui, substrato bei produkto koncentracijoms arba substrato suvartojimo ir produkto formavimosi spartai. Jei auginimo metu keičiasi pagrindinio proceso reakcijos stochiometrija, modeliavimo tikslumui padidinti naudojami pagalbinių analizatorių, tokių kaip titravimo tūris ar kiti, duomenys.

Naujų ir tvirtesnių gyvai veikiančių analizės technikų tobulinimas sąlygos patobulintų sensorių atsiradimą, kurie teiks detalesnę informaciją apie svarbius parametrus, tokius kaip augimo sparta ar produkto formavimosi sparta, net kai išskiriamų dujų analizė sunkiai įgyvendinama. Vienas iš būdų tai pasiekti galėtų būti jutiklių masyvų kombinacijos su šablonų atpažinimo sistemomis dujinėje būsenoje (elektroninė nosis) bei skystoje būsenoje (elektroninis liežuvis) panaudojimas bioreaktorių stebėjimui ir valdymui [16].

2 lentelė

Programinio jutiklio taikymas	Matavimo įrenginys	Modelis
μ-įvertinimas valdymui μ-įvertinimas su pagrindiniu titravimu μ ir q _p įvertinimas	Dujų analizatoriai O ₂ ir CO ₂ pH elektrodas, titravimo tūris NIR, <i>at-line</i> HPLC	Masės balansas Masės balansas Masės balansas
Įvertinimai/Stebėjimai Netiesioginių matavimų ir koreliacijų vertinimas: OUR, CPR, RQ, k _L a	Dujų analizatoriai O ₂ ir CO ₂ , ištirpusio O ₂ zondas	Masių balansai, masės perdavimo lygtis
Stechiometrinio koeficiento įvertinimas	Dujų analizatoriai O ₂ ir CO ₂ , titravimo substrato konc., biomasės sudėtis (off-line)	Masių balansai, elementinis balansas, nestruktūriniai modeliai
Išplėstas Kalmano filtras biomasei, substrato ir produkto koncentracijos, išeigos ir augimo greičio įvertinimas	Dujų analizatoriai O ₂ ir CO ₂ , azoto sunaudojimo greičio matavimas	Dinaminiai masių balansai, nestruktūriniai modeliai
Asimptotinis stebėjimų įvertinimas- C-šaltinis, N, biomasė	Ištirpusio O ₂ zondas, O _{2,in} srautas, O _{2,out} srautas, tūris, įleisto azoto ir fruktozės konc. (off-line)	Dinaminių komponentų balansai
Ląstelių masės, gyvybinių ląstelių, gliukozės, amoniako, acetato ir vidaus ląstelių produkto realaus laiko mastelių aptikimas	Dujų analizatoriai O ₂ ir CO ₂ , radijo dažnio varža, 2D- fluorescencijos spektroskopija, FIA, HPLC	Dinaminiai masių balansai, PCA, ICA, MISO, MIMO, ANN

Jutiklių informacijos apdorojimo reikalavimai labiausiai susiję su produktu ir kritinę reikšmę turinčiais teršalais. Patraukliausias matavimas yra produkto molekulės matavimas, tačiau biologinių elementų gamyboje tai reikalauja aiškaus apibrėžimo ką tai reiškia, nes egzistuoja toleruojama produkto heterogeniškumo apimtis. Kai kurios produkto formos bus laikomos su produktu susijusiomis priemaišomis (pvz. multimerai, produkto fragmentai arba nepageidaujamos produkto cheminės atmainos). Tai apsunkina tiesioginį matavimą panaudojant intelektinius jutiklius. Yra duomenų apie pasiektus teigiamus rezultatus naudojant biojutiklius ir infraraudonųjų spindulių spektroskopijos Fourier transformacijos metodus. Tokie metodai paprastai suteikia gana grubius apytikslius duomenis apie produktą, o detalesnė informacija apie produkto struktūrą išmatuojama jau ne tiesiogiai, o kontroliuojamoje laboratorijoje, dažniausiai naudojant masių spektrometrijos metodą. Ši sritis tebetiriama ir nustatyta, kad Raman'o spektroskopija paremti metodai parodo glikuotas būsenas paprastose sistemose.

1.4.5. Modeliuotų duomenų perdavimas.

Norint pritaikyti intelektinį jutiklį pramoniniam procesui, turi būti atliekamas duomenų perdavimas ir tvarkymas.

Paruošimui ir parametrizavimui intelektinis jutiklis remiasi konkrečiais proceso duomenimis, tokiais kaip bandomųjų leidimų rezultatais, laboratorijos tyrimais ar modeliavimo rezultatais. Tai paprastai būna duomenys išsaugoti iš anksčiau, kas lemia partijomis suskirstytų duomenų archyvavimo poreikį. Šiuolaikinės pramoninės automatikos sistemos tokius archyvus pateikia, tačiau toks didelis duomenų kiekis tampa ribojančiu faktoriumi tiek informacijos kaupime, tiek perdavime.

Programinis jutiklis gali būti realizuojamas proceso automatikos sistemoje. Tačiau skaičiavimų galimybės iš automatikos aparatūrinės pusės yra gana ribotos, o automatikos sistemos pirminė užduotis užtikrinti saugų, patikimą ir savalaikį proceso valdymą, o ne atlikti kažkokius statistinius skaičiavimus. Trumpai tariant, intelektiniai jutikliai apimantys daugiau nei keletą elementarių skaičiavimų turėtų būti leidžiami tam paskirtoje atskiroje skaičiavimo aparatūroje. Komunikacija paprastai realizuojama per „Industrial Ethernet“. Komunikacija turėtų apsiriboti informacijos, o ne duomenų perdavimu. Pavyzdžiui, intelektinis jutiklis turėtų atiduoti galutinę tokių duomenų, kaip baltymo koncentracijos reikšmę. Savaimė suprantama, šie duomenys turėtų būti išsaugomi archyve pagal ankščiau minėtą skirstymą į partijas.

1.4.6. Intelektinių jutiklių poreikis ir galimybės biochemijos pramonėje.

Bioreakcijų ir priklausančių paskesnių tyrimo etapų sudėtingumas bioprocėsų apdorojime bei poreikis supaprastinti šių etapų proceso stebėjimą, metai iš metų skatino susidomėjimą intelektinių jutiklių technologija. Ankstyvieji darbo su intelektiniais jutikliais etapai dažniausiai apimdavo realaus laiko, paprastai sudėtingų arba daug laiko pareikalaujančių proceso kintamųjų, tokių kaip biomasės ar produkto koncentracijos, trajektorijų prognozavimą laike. Šie jutikliai paprastai naudojo realaus laiko mastelio išsiskiriančių dujų sudėties bei cheminių parametrų, tokių kaip pH, temperatūra ar ištirpusio deguonies koncentracija, matavimus. Jie būdavo dažnai pritaikomi įvairiuose bioprocėsuose, nuo mikrobuų iki ląstelių kultūrų auginimo, stebėjimui, realaus laiko proceso valdymui bei klaidų aptikimui, su tikslu padidinti produktyvumą ir proceso efektyvumą. Šie sprendimai daugiausia būdavo įgyvendinami panaudojant tam paskirtą

skaičiavimus atliekančią įrangą, kartu su duomenis saugančiomis sistemomis, naudojamomis individualių kompanijų, kas tenkindavo aukščiau aprašytus reikalavimus.

Dėl augančio spektrinės analizės metodų pritaikymo pramonėje, intelektinių jutiklių panaudojimas išsiplėtė iki realaus laiko mastelio skirtingų metabolitų stebėjimo ir prognozavimo.

Projektavimo kokybė bei proceso analizavimo technologija suteikė naują postūmį intelektinių jutiklių panaudojime pramonėje, o tiksliau stipriai prižiūrime biologinių vaistų pramonėje. Proceso dinamikos sudėtingumas, nuo žaliavos įvairovės atsirandantis nevienodumas, ar apdorojimas partijomis bei kaip niekad sparčiai augantis spaudimas sumažinti naujo produkto įvedimo į rinką laiką, lėmė domėjimąsi intelektiniais jutikliais tiek proceso tobulinimo stadijoje, tiek realaus laiko mastelio produkcijos valdyme. Taipogi juntami augantys poreikiai pramoninėje biotechnologijoje, srityje kurios vienas iš esminių siekių atrasti tvarių alternatyvų naftos ir dujų ištekliams. Kad taptų ekonomiškai patrauklu, tam turbūt reikės produktyvumo didinimo, kurį leistų nuolatinis informacijos apdorojimas. Tai iššaukia padidėjusį poreikį patikimiems matavimams, stebėjimui, modeliavimui ir valdymui.

Pritaikymui tokioje sudėtingoje srityje, programiniam jutikliui keliama eilė svarbių reikalavimų. Vienas tokių reikalavimų tai minimalus perkalibravimo poreikis partijoje, ar tarp atskirų partijų. Tai svarbu, nes tai padidina intelektinio jutiklio produktyvų laiką procese. Pastebėta, kad kai kurie jutikliai reikalauja įvairių išankstinių duomenų apdorojimo technikų geresniam jų pritaikymui. Pramoninėje aplinkoje intelektinių jutiklių panaudojime siekiant pasiekti pageidaujamą pajėgumą, susiduriama su kitomis iš analitinių matavimų prigimties išskylančiomis problemomis, tokiomis kaip duomenų dreifas, pašalinių arba trūkstamų duomenų apdorojimas.

Su sąlyga, kad į šias su funkcionavimu susijusias problemas kreipiamas tinkamas dėmesys, intelektiniai jutikliai pramonėje turės didelį pasisekimą. Žaliavų kokybės vertinimas svarbus ten, kur sudėtingos žaliavos tiria natūralius nuokrypius, galinčius lemti kritinius skirtumus skirtingose partijose, kas vėliau paveikia viso proceso efektyvumą. Sėkmingų žaliavos vertinimo pramoniniuose gamybiniuose bioprocusuose intelektiniais jutikliais pavyzdžių randama įvairiuose bioprocusuose. Sėklų, naudojamų gamybiniuose talpose, kokybė yra vienodai svarbi bet kokiam bioprocui. Taip pat svarbu nustatyti intelektinių jutiklių panaudojimo perdirbimo procesų optimizavime galimybes. Tokioje optimizavimo struktūroje, atskiro intelektinio jutiklio ar jų junginių efektyvumas vertinamas pagal tai, kiek jis prisideda prie viso proceso efektyvumo, stengiantis pasiekti optimalią proceso išeią, o ne išrinkti atskirą jutiklį ar sistemą, kuris galėtų optimizuoti atskirą parametą. Įvertinant plačiai pripažintą atskirų operacijų įtaką nuosekliam

apdorojimui bei žaliavų įvairovės tikimybę, darančią įtaką produkto kokybei ir kiekybei, tokia struktūra pramonei suteiktų labai reikiamą įrankį, kokybiškumo įdiegimą į galutinį produktą [16].

1.5. Programinių jutiklių kūrimui naudojami biomasės įvertinimo metodai, matematiniai modeliai, balanso lygtys

1.5.1. Biomasės įvertinimas pagal OUR, CPR ir sunaudoto buferinio šarminio tirpalo kieki

Proceso kintamieji, kurie gali būti nesudėtingai išmatuojami augančioje kultūroje, netiesioginis panaudojimas leidžia realaus laiko masteliu įvertinti esančios biomasės koncentraciją. Šiuo atveju matavimai, kurie atliekami gamybiniuose bioreaktoriuose: tūris arba molinė deguonies ir anglies dvideginio frakcija bioreaktorių išėjimo linijoje bei bazės papildymo sparta, kartu su pH valdymu bioreaktoriuje. Iš šių, kvazi-pastovių matavimų, tiesiogiai nustatoma deguonies suvartojimo greitis (OUR), taip pat anglies dioksido išskyrimo greitis (CPR). Taigi, šie trys parametrai (OUR, CPR, Bazė), gali būti vadinami realaus laiko masteliu išmatuoti kiekiai. Toliau aptariami įvairūs metodai realaus laiko mastelio biomasės koncentracijos įvertinimui pagal šiuos kintamuosius [7].

1.5.2. Biomasės koncentracijos įvertinimas paremtas pagal Luedeking-Piret sąryšį.

Daugelyje aerobinių kultūrų santykis tarp biomasės x ir deguonies suvartojimo greičio OUR bei CPR bioreaktoriuje, gali būti modeliuojamas pagal Luedeking – Piret sąryšį [10].

$$OUR = Y_{OX} \cdot R_X(t) + m_o \cdot \frac{x(t)}{W(t)}, \quad (1.1)$$

$$CPR = Y_{CX} \cdot R_X(t) + m_c \cdot \frac{x(t)}{W(t)}, \quad (1.2)$$

Kur R_x [g(X)/kg(kultūra)/h] yra ląstelinės sistemos biomasės formavimosi greitis, x visas biomasės kiekis (g), W – kultūros masė (kg), ir Y_{OX} [g(O₂)/g(X)], Y_{CX} [g(CO₂)/g(X)], yra išeigos išraiškos. Iš šių parametrų galima sudaryti diferencialines lygtis, iš kurių išsiskaičiuoja reikiami parametrai.

$$\frac{dx}{dt} = R_x(t) \cdot W(t), \quad [g(X)/h] \quad (1.3)$$

Lygtis (3.1) ir (3.2), galima perrašyti:

$$\frac{dx}{dt} = \frac{OUR(t) \cdot W(t) - m_o \cdot x(t)}{Y_{OX}}, \quad [g(X)/h] \quad (1.4)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{CPR(t) \cdot W(t) - m_c \cdot x(t)}{Y_{CX}}, \quad [g(X)/h] \quad (1.5)$$

1.5.3. Biomasės koncentracijos įvertinimas paremtas daugelio kintamųjų regresijos metodu

Tiesioginis, grynai duomenimis paremtas biomasės įvertinimo būdas, naudoja koreliacijas tarp realių laiku išmatuotų biomasės koncentracijų. Akivaizdus pirmas pasirinkimas būtų paprasta tiesinė daugelio kintamųjų regresija

$$X = a_0 + a_1 \cdot CPR + a_2 \cdot OUR + a_3 \cdot \sum Base \quad (1.6)$$

Čia a_i tai regresijos parametrai, kurie gali būti apskaičiuojami klasikiniu mažiausių kvadratų metodu. Prie bazės pažymėtas sumos ženklas reiškia, kad įvertinamas visas bazės kiekis paduotas į bioprocesą iki duotojo momento. Paprasta daugelio kintamųjų regresija taip pat gali būti patobulinta kumuliaciniais CPR ir OUR kiekiais. Tai galima laikyti savotišku triukšmų filtru. Tuomet biomasės įvertinimo lygtis gaunama:

$$X = a_0 + a_1 \cdot \sum CPR + a_2 \cdot \sum OUR + a_3 \cdot \sum Base \quad (1.7)$$

Priežastis, dėl kurios koreliacija tarp kumuliacinių kintamųjų ir biomasės koncentracijos veikia geriau, tai todėl, kad biomasės koncentracijos parametras ir pats yra kumuliacinis. Kita priežastis, dėl kurios verta naudoti kumuliacinius kintamuosius, yra ta, kad šių kintamųjų įvedimas eliminuoja didžiąją dalį matavimo triukšmų.

1.5.4. Biomasės įvertinimas paremtas svarbiausių komponentų analize (PCA)

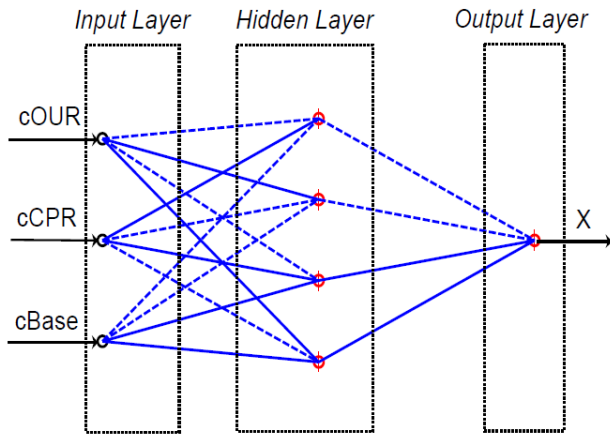
Kai daugelis kintamųjų, kuriuos fermentacijos metu galima išmatuoti realiu laiku, OUR, CPR, Bazė, ir pO_2 , yra stipriai tarpusavyje koreliuoti, šių parametru gebėjimas tinkamai aprašyti procesų būsenas yra sumažinamas. Tokiu atveju supaprastinimui gali būti panaudojamas svarbiausių komponentų analizės metodas (PCA). Šio metodo pagrindinė mintis yra atvaizduoti proceso būseną panaudojant mažesnę kiekį nepriklausomų kintamųjų. Svarbiausių komponentų analizė išrikiuoja šiuos kintamuosius pagal jų indėlį į informacijos įvairovę. Komponentas, kuris pateikia daugiausiai pradinių duomenų įvairovės, vadinamas pirmu svarbiausiu komponentu. Visų sekančių komponentų duomenų nuokrypiai yra mažesni. Kai kurie iš jų netgi perduoda tik proceso ar matavimo triukšmus ir dėl šios priežasties gali būti visai eliminuojami. Tokiu principu supaprastinamas duomenų atvaizdavimas.

1.5.5. Biomasės įvertinimas pasitelkiant dirbtinius neuroninius tinklus

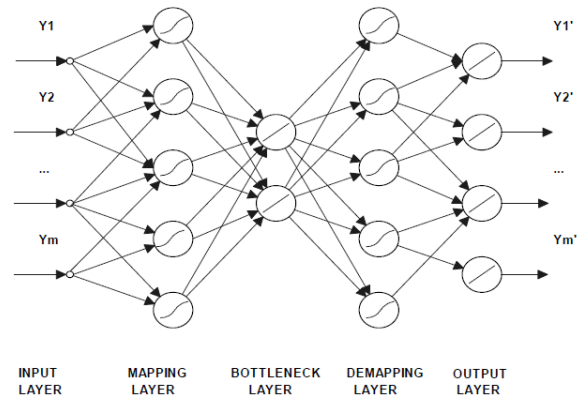
Išreikšti netiesinėms proceso kintamųjų priklausomybėms dažnai panaudojami dirbtiniai neuroniniai tinklai (ANN) (paveikslas 1.5a). Šio metodo panaudojimo atveju vis daugėja, taip pat atsiranda vis daugiau tam skirtų kompiuterinių programų. Biomasės įvertinimui naudojant ANN siūlomi du būdai. Pirmas būdas tai tiesioginis kumuliacinių duomenų iš realiu laiku išmatuojamų OUR, CPR ir Bazės kiekių priskyrimas biomasės koncentracijos reikšmėms naudojantis neuroninių tinklų sugebėjimais. Antrasis būdas paremtas auto asociatyvių neuroninių tinklų idėja (AANN).

Naudojantis pirmuoju metodu, realiu laiku išmatuoti kintamieji tiesiogiai priskiriami biomasės koncentracijai X . Tai galima atlikti naudojantis paprastu tiesioginiu ANN su trimis įėjimo mazgais, plius vienu įstrižu mazgu bei keletu paslėpto sluoksnio mazgų, taip atiduodant vieną išėjimo reikšmę X . Mazgų skaičių paslėptame sluoksnyje galima nustatyti empiriškai, bandymų ir klaidų metodu.

Antrasis metodas paremtas netiesine pagrindinių komponentų analize, naudojant auto asociatyvinius dirbtinius neuroninius tinklus (AANN). Pastebėta, kad AANN puikiai tinka atlikti įvairioms atpažinimo užduotims, taip pat ir cheminių procesų stebėjimui. AANN tai tokie tinklai, kurių išėjimo struktūra tokia pat kaip ir įėjimo (paveikslas 1.5b). Toks tinklas turi taip vadinamą „butelio kakliuko“ sluoksnį, kuriame yra mažiau mazgų nei įėjimo sluoksnyje. Tai priverčia tinklą išvystyti kompaktišką įėjimo duomenų atvaizdavimą. AANN tinklų apmokymui galioja tos pačios taisyklės kaip ir klasikiniams ANN tinklams [7].



1.5a pav. ANN tipo struktūra



1.5b pav. auto asociatyvinis dirbtinis neuroninis tinklas AANN

1.5.6. Netiesioginis biomasės įvertinimas pagal OUR matavimus

Biomasės koncentracija taip pat gali būti apskaičiuojama naudojantis deguonies sunaudojimo greičio matavimų rezultatais [8]. Proceso metu deguonis sunaudojamas auginimui ir gyvybinėms funkcijoms palaikyti, gali būti apskaičiuojamas pagal (3.8):

$$OUR = \gamma_1 \mu x + \gamma_2 x. \quad (1.8)$$

Įstačius šią išraišką į biomasės balanso lygtį, gaunama:

$$\frac{dx}{dt} \mu x - \frac{F}{w} x = \frac{OUR - \gamma_2 x}{\gamma_1} - \frac{F}{w} x = BIR. \quad (1.9)$$

Sprendžiant diferencialinę lygtį (3.9) Oilerio metodu, gaunama biomasės koncentracija laiku t_i :

$$x_{OUR}(t_i) = x_{OUR}(t_0) + \sum_{i=1}^n BIR(t_{i-1}) \Delta t_i \quad (1.10)$$

1.5.7. Biomasės įvertinimas pagal buferinio tirpalo sunaudojimo greičio matavimus

Biomasės koncentracijos įvertinimas atliekamas pagal proceso metu naudojamo buferinio šarmo tirpalo sunaudojimo greitį BCR (angl. *base consumption rate*). Šarmas dozuojamas bandant

kompensuoti pH pokyčius, atsirandančius dėl kultūros augimo ir pamaitinimo tirpalo tiekimo [8]. Gaunama šarmo sunaudojimo greičio išraiška:

$$BCR = \lambda_1 \mu x + \lambda_2 x \frac{F}{w} \quad (1.11)$$

Kuri įstatoma į biomasės balanso lygtį:

$$\frac{dx}{dt} \mu x - \frac{F}{w} x = \frac{BRC - \lambda_2 \cdot \frac{F_s}{w}}{\lambda_1} - \frac{F}{w} x = BIR. \quad (1.12)$$

Sprendžiant diferencialinę lygtį (3.12) Oilerio metodu, gaunama biomasės koncentracija laiku t_i :

$$x_{BCR}(t_i) = x_{BCR}(t_0) + \sum_{i=1}^n BIR(t_{i-1}) \Delta t_i \quad (1.13)$$

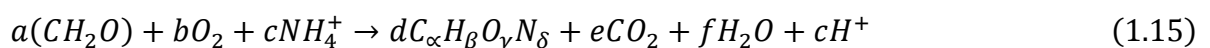
1.5.8. Biomasės įvertinimas pagal artimųjų infraraudonųjų spindulių jutiklį

Biomasės modelis, kur artimųjų infraraudonųjų spindulių zondo (NIR) išeinantis signalas priklauso nuo visų optinių savybių mitybinėje terpėje įskaitant ląstelių daleles, šiukšles ir oro burbuliukus, kurie sukelia absorbcija ties 900-1100nm diapazonu. Absorbcijos signalas (A_{NIR}) iš NIR jutiklio yra kompensuojamas netiesiškumo ir burbuliavimo triukšmo pagal pirmos eilės tiesinį modelį. Kalibravimo faktorius yra sukuriamas programinio jutiklio modelyje, kuriame konvertuojamas NIR jutiklio signalas į biomasės koncentraciją [1]:

$$X_{NIR} = k_{NIR} \cdot A_{NIR} \quad (1.14)$$

1.5.9. Biomasės koncentracijos įvertinimas pagal amoniako titravimą

Programinis jutiklis, kuriame panaudotas amoniako titravimo modelis gali įvertinti E. coli biomasės koncentraciją. Jeigu amoniakas yra tik azoto šaltinio terpėje, vienas protonas išsiskiria iš sunaudoto azoto jono.



Biomasė yra apskaičiuojama nuo pridėtinės amoniako masės vertės ir kultūros tūrio, kuris pasikeičia dėka amoniako ir pamaitinimo [1]:

$$X_{NH_3} = X_{0,NH_3} + \frac{\Delta m_X}{V_R} \quad (1.16)$$

Kur:

$$\Delta m_X = Y_{X/NH_3} \Delta \tau_{NH_3-pump} k_{NH_3-pump} c_{NH_3} \quad (1.17)$$

Ir

$$V_R = V_{R,0} + V_{NH_3} + V_{feed} \quad (1.18)$$

Ir kur

$$V_{NH_3} = \Delta \tau_{NH_3} k_{NH_3} \quad (1.19)$$

Taip pat

$$V_{feed} = \frac{m_{feed}}{\rho_{feed}} \quad (1.20)$$

Ir taip pat kur

$$\Delta m_{feed} = \int F_{feed} dt \quad (1.21)$$

Pagrindinis siurblys yra kalibruojamas, kad nustatyti faktorių $k_{NH_3-pump} \cdot Y_{X/NH_3}$ nurodo biomasės kiekį iš (3.15) amoniako lygties, kuri reikalinga neutralizuojant pH.

1.6. Modelio parametrų identifikavimas

Šiame darbe proceso modelio parametrų identifikavimas suprantamas kaip nežinomų netiesinio dinaminio modelio parametrų paieška pasitelkiant skaitmenines paieškos procedūras. Paieškos metu randamas parametrų rinkinys, minimizuojantis modelio kokybės kriterijų (pvz., vid. nuokrypį), t. y. matematiškai išreikštą proceso duomenų ir modeliavimo rezultatų neatitikimo rodiklį.

Šiuo požiūriu parametrų paieškos procedūra yra laikoma optimizavimo procedūra. Procedūros tikslo funkcija minimizuojama parametrų vektoriaus \mathbf{p} atžvilgiu ir apskaičiuojama kaip svertinis nuokrypis tarp modelio būsenos kintamųjų \mathbf{c} ir atitinkamų eksperimentinių duomenų \mathbf{c}_e :

$$J(\mathbf{p}) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1:n} w_i (c_i - c_{ie})^2}{n}} \rightarrow \min. \quad (1.22)$$

čia w - diagonalinė svorių matrica. Pastarąją būtina taikyti, siekiant įvertinti santykinę atskirų būsenos kintamųjų svarbą identifikavimo procedūros metu, kadangi praktikoje atskirų būsenos kintamųjų matavimo ir modeliavimo vienetai bei jų kitimo diapazonas gali labai skirtis, todėl būsenos kintamieji, kurių skaitinės reikšmės yra didesnės, turėtų santykinai didesnę įtaką kokybės kriterijui. Dėl to būtent pastaruosius kintamuosius modeliuojančio modelio dalių parametrai būtų identifikuojami tiksliau.

Tačiau praktikoje gali būti svarbu tiksliau identifikuoti būtent kitų kintamųjų submodelių parametrus, todėl būtina naudoti svorių koeficientus w_i , kurie subalansuotų atskirų modelio dalių įtaką procedūros kokybės kriterijui. Konkrečios w_i reikšmės parenkamos empiriškai, atsižvelgiant į atskirų būsenos kintamųjų svarbą konkrečiam identifikavimo uždaviniui ir jų matavimo tikslumą, matavimų patikimumą ir naudojamus matavimo vienetus bei jų reikšmių kitimo diapazoną.

Kitas svarbus momentas susijęs su nuokrypio tipo parinkimu. Galimi keletas variantų: vidutinis kvadratinis arba absoliutinis nuokrypis. Kvadratinis nuokrypis paprastai pasirenkamas tada, kai eksperimentiniuose duomenyse nėra pavienių, nuo modeliavimo rezultatų labai nutolusių matavimo taškų, priešingu atveju pasirenkamas absoliutinis nuokrypis. Kadangi eksperimentiniuose duomenyse nėra pavienių, nuo modeliavimo rezultatų labai nutolusių nuo matavimo taškų, naudojamas kvadratinis nuokrypis.

1.6.1. Chemotaxis, atsitiktinis paieškos metodas

Darbe, modelių parametrų identifikavimui pasirinktas Chemotaxis atsitiktinis paieškos metodas, todėl kiek plačiau apie jį.

Šalia gradientinių ir tiesioginės paieškos metodų netiesinių modelių parametrus identifikuoti dažniausiai naudojami atsitiktinės paieškos metodai. Esant tam tikros formos tikslo funkcijos paviršiui, gradientiniai ir tiesioginės paieškos metodai gali patekti į lokalinį minimumą. Šiuo atveju gali būti tikslinga naudoti atsitiktinės paieškos metodus.

Netiesinio modelio parametrų identifikavimo problema apibrėžiama taip: reikia rasti parametrų vektoriaus \mathbf{p} reikšmes, kai būsenos kintamieji \mathbf{c} aprašomi funkcine priklausomybe $f(t, \mathbf{p})$:

$$\mathbf{c} = f(t, \mathbf{p}) \quad (1.23)$$

ir turimi proceso eksperimentiniai duomenys $[t_e c_e]$

Paprastai netiesinio optimizavimo metoduose algoritmas inicializuojamas pasirenkant pradinį parametų vektorių p_o . Toliau naudojant funkciją $f(t, p)$ apskaičiuojamos funkcijos reikšmės c laiko momentais t_e . Funkcija $c=f(t, p)$ gali būti algebrinė lygtis (polinomas, splainas, dirbtinis neuroninis tinklas (DNT)) arba diferencialinė lygtis, tokių lygčių sistema arba algebrinių ir diferencialinių lygčių rinkinys (hibridinis modelis).

Parametų paieškos procedūros tikslas rasti tokias optimizuojamo parametų vektoriaus p reikšmes, kurios minimizuotų modelio $c=f(t, p)$ nuokrypį nuo eksperimentinių duomenų $c_e(t_e)$. Taigi apskaičiuoto parametų vektoriaus tinkamumas įvertinamas sudarant tikslo funkciją J , kurios išraiška gali būti apibrėžiama kaip vidutinis kvadratinis arba absoliutinis nuokrypis tarp modeliavimo ir eksperimentinių rezultatų, pvz.:

$$J = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (c_i(t_{ie}, p) - c_{ie}(t_{ie}))^2}}{n} \rightarrow \min. \quad (1.24)$$

Atsitiktinės paieškos algoritmai geresnio parametų vektoriaus paiešką pradeda p_o aplinkoje. Kiekvienas naujai apskaičiuotas parametų vektorius p , sumažinantis J reikšmę naudojamas tolimesnėje paieškoje apibrėžiant naują paieškos sritį. Paieška nutraukiama pasiekus maksimalų paieškos algoritmo iteracijų skaičių, užduotą J reikšmę arba kai santykinis J pagerėjimas nežymus.

Vadinamasis brutaliųjų jėgų (angl. *brutal force*) atsitiktinės paieškos metodas atsitiktiniu būdu generuoja parametų reikšmes ir iš jų atrenka geriausias. Atlikus statistiškai pakankamą kiekį iteracijų, randamas globalus tikslo funkcijos optimumas. Pagrindinis šio metodo privalumas – jis paprastas ir užtikrina sėkmę. Tačiau sugaištama daug laiko skaičiavimams. Atliekant didelio skaičiaus pakankamai sudėtingo modelio parametų identifikavimą ir (arba) turint ribotą laiką skaičiavimams, galimybė taikyti šį metodą gali būti ribota.

Chemotaxis - paprasčiausia atsitiktinės paieškos procedūra – Šios procedūros algoritmas primena mikroorganizmų elgseną ieškant substrato. Mikroorganizmai gali ieškoti substrato tik nedidelėje jų kūną supančioje srityje. Vos kurioje nors pusėje aptikęs substrato, mikroorganizmas juda ta kryptimi, sunaudoja surastą substratą ir toliau jo ieško naujai pasiektos srities aplinkoje. Todėl nagrinėjama optimizavimo procedūra vadinama *Chemotaxis*.

Šis atsitiktinės paieškos metodas parametų p paiešką atlieka tam tikrame apie parametų centrinių reikšmių tašką p_c apribotame intervale Δp . Pradžioje p_c priskiriamos pradinio parametų vektoriaus p_o reikšmės. Radus naują parametų vektorių, pagerinantį $J(p)$ reikšmę, juo pakeičiamas

centras \mathbf{p}_c ir atliekama tolimesnė atsitiktinė paieška. 6.1 lentelėje pateikti pagrindiniai algoritmo žingsniai.

3 lentelė Pagrindiniai Chemotaxis algoritmo žingsniai

Žingsnis	Aprašas	Vykdomi skaičiavimai
1	Apibrėžiama tikslo funkcija J . Pavyzdyje naudojama svertinis vidutinis kvadratinis nuokrypis tarp matuojamų \mathbf{c}_e ir apskaičiuotų koncentracijų reikšmių. \mathbf{W} – diagonalinė komponentų svorių matrica.	$J = \text{sqrt}((\mathbf{c} - \mathbf{c}_e)' * \mathbf{W} * (\mathbf{c} - \mathbf{c}_d))$
2	Inicializuojamas parametrų vektorius \mathbf{p}_0 ir įkraunami matavimų duomenys \mathbf{c}_e .	$\mathbf{p}_0 = [\text{simax } K_s K_i]$ $\text{load } \mathbf{c}_e$
3	Pasirenkama atsitiktinė parametrų \mathbf{p}_0 mutacija.	$\mathbf{p} = \mathbf{p}_0 * (1 + a * \text{randn}(\text{size}(\mathbf{p}_0)))$
4	Naudojant \mathbf{p} apskaičiuojamos modelio funkcijos reikšmės.	$\mathbf{c} = f(t, \mathbf{p})$
5	Apskaičiuojama tikslo funkcijos reikšmė.	$J = \text{sqrt}((\mathbf{c} - \mathbf{c}_e)' * \mathbf{W} * (\mathbf{c} - \mathbf{c}_d))$
6	Jei tikslo negauta mažesnė tikslo funkcijos reikšmė, pereiti į 3 žingsnį	$\text{if } J_{\min} < J$
7	Kitaip atnaujinti \mathbf{p}_0 ir išsaugoti naują J reikšmę J_{\min} .	$J_{\min} = J, \mathbf{p}_0 = \mathbf{p}$
8	Jei pasiekta užduota tikslo funkcijos reikšmė arba maksimalus iteracijų skaičius, baigti procedūrą, kitaip pereiti į 3 žingsnį.	

Praktikoje taikomi sudėtingesni atsitiktinės paieškos metodai sumažina skaičiavimo laiką, tačiau dažniausiai nepagerina parametrų įvertinimo tikslumo. Dažniausiai tobulinant algoritmus įvertinami tam tikros modelių klasės ypatumai ir (arba) apribojama paieškos sritis. Tačiau dažnai tokie patobulinti algoritmai praranda savo universalumą sprendžiant tam tikrų tipų identifikavimo uždavinius. Pvz., modeliavimo atkaitinimo (angl. *simulated annealing*) algoritme pagal pasiektą tikslo funkcijos reikšmę koreguojamas parametrų paieškos srities dydis.

Dar vienas būdas pagerinti atsitiktinės paieškos algoritmų spartą – naudoti evoliucijos procesą. Gamtoje vykstantis evoliucijos procesas įrodė, kad vykstant populiacijos individų atrankai pastarieji tobulėja ir galiausiai išlieka geriausi. Taikant šią idėją, iš esmės, atsitiktinės paieškos algoritmas vykdomas taip pat, kaip jau aprašyta, tačiau generuojama ir vienu metu išbandoma didelis kiekis parametrų rinkinių derinių. Iš sudarytų parametrų rinkinių (populiacijos) pašalinami blogiausią tikslo funkcijos reikšmę užtikrinantys rinkiniai, o jų vietą užima nauji. Naujų rinkinių generavimas atliekamas geriausių rinkinių arba rinkinių derinių srityse. Nauji deriniai gali būti sudaromi kombinuojant (kryžminant) jau turimų geriausių parametrų vektorių reikšmes (angl. *crossover act*).

Būtina pabrėžti, kad netgi naudojant paprasčiausius atsitiktinės paieškos algoritmus, biotechnologinių procesų modelių parametrų sprendinius galima rasti pakankamu tikslumu. Sudėtingesnių algoritmų naudojimas gali tik paspartinti paieškos procedūrą. Kita svarbi identifikavimo algoritmų ypatybė – jų veiksmingumas labai priklauso nuo pradinių parametrų pasirinkimo. Todėl turint *a priori* informacijos apie galimas modelio parametrų reikšmes, tikslinga ją panaudoti [15].

2. TYRIMO METODOLOGIJA

Tyrimams buvo pasirinktas realiai veikiantis bioprocesas, kuris naudoja periodinio veikimo su pamaitinimu bioreaktorių. Pagrindinis proceso tikslas įvairių medžiagų gamyba, pasitelkiant, tam tikras bakterijų rūšis ir pamaitinimo substratus. Kokios medžiagos, bakterijų rūšys naudojamos, šiame darbe nesigilinama. Pagrindinis dėmesys skiriamas į biomasės koncentracijos įvertinimą, pasitelkiant įvairius metodus. Šiuo metu biomasės koncentracija įvertinama ne realiu laiku, paėmus bandinius, valandos ar puse valandos intervaluose ir ištiriant laboratorijoje. Toks koncentracijos įvertinimas gana neefektyvus, nes gaunamas didelis vėlavimas. Gali būti nepasiekiamas didžiausias biorekacijos efektyvumas, arba įvykus netikėtai klaidai ir nepastebėjus laiku, gali būti sugadinamas bioprocesas, ir medžiagos tampa nebenaudojamos.

Tiriant bioprosesą, buvo atlikti kelias dešimt eksperimentų, kiek viename iš jų, paimami bandiniai netiesioginiu būdu ir išmatuojama biomasės koncentracija, taip pat kiek viename eksperimente buvo išmatuojami įvairūs fiziniai, cheminiai parametrai. Šios parametrai panaudojami bioreaktoriaus aeravimo sistemos tyrimui ir programinio jutiklio kūrimui. Realio laiku buvo išmatuota įvairūs parametrai, tokie kaip temperatūra, dozuojamos deguonies srautas, koncentracija ir kiti. Visi jie išsaugojami, vienodais laiko tarpais archyvuose dokumentuose.

Tyrimo tikslas - sukurti programą (programinį jutiklį), gebančią realio laiku įvertinti biomasės koncentraciją, naudojant reikiamus realio laiku išmatuojamus dydžius. Pačios programos veikimo patikrinimui, naudojami eksperimentiniai duomenys su nerealiu laiku išmatuotomis biomasės koncentracijomis. Atlikti sukurtų programinių jutiklių veikimo testavimą, esant įvairioms realaus proceso sąlygoms.

Programos kūrimui reikia sukurti matematinius modelius svarbiems proceso aeracijos sistemos išvestiniams dydžiams skaičiuoti, eksperimentinių duomenų apdorojimui, išmatuotų rezultatų interpoliavimui. Tam pasitelkiamas Matlab programavimo paketas, kuriame įgyvendinamos, pateiktos užduotys, (Matlab programos kodas pateiktas prieduose).

2.1. Pagrindiniai tiesiogiai matuojami kintamieji bioprocese

Pagrindiniai programai (programiniam jutikliui) įgyvendinti būtina, ganėtinai daug realių laiku matuojamų parametru, be kurių būtų neįmanoma įvertinti biomasės koncentracijos, pasirinktais metodais.

Programoje realizuojami, tiesiogiai išmatuojami kintamieji, tokie kaip:

- Temperatūra,
- Laikas,
- Deguonies sklendės atidarymo eiga,
- Dozuojamas rūgšties kiekis,
- Dozuojamas putojimo slopinimo skysčio kiekis,
- Dozuojamo šarmo kiekis,
- Dozuojamų pamaitinimo medžiagų kiekis,
- Dozuojamų dujų deguonies koncentracija,
- Išeinančių dujų deguonies srautas,
- Išeinančių dujų anglies dioksido srautas,
- Deguonies ir anglies dioksido slėgis.

Visi šie parametrai yra naudojami biomasės koncentracijos ir tarpinių parametru skaičiavimui, ką pamatysime tolimesnėje darbo eigoje (taip pat programos kode, esančiame prieduose.

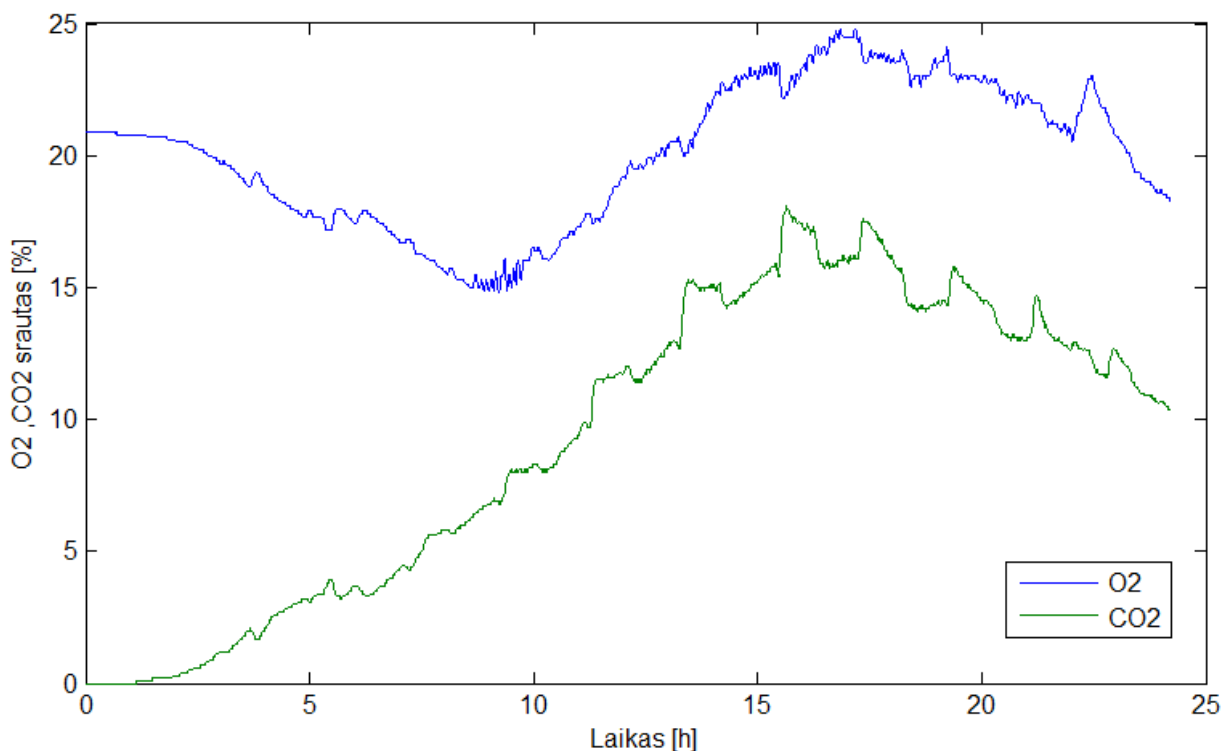
2.2. Parametrų matavimas, skaičiavimas, įvertinimas

Biomasės koncentracijos įvertinimui pasitelkiama eilė skaičiuojamų parametrų ir matematinių modelių, balanso lygčių, kurių aprašymai ir skaičiavimai pateikiami žemiau.

2.2.1. Deguonies ir anglies dioksido išeinančių dujų srautai

Keletas iš būtinų parametrų yra CO₂ ir O₂ išeinančių dujų koncentracijos, jos gaunamos matuojant realiu laiku išeinančias dujas.

Analizuojant duomenis ir atlikus eksperimentą, gaunamas deguonies ir anglies dioksido išeinančių dujų srautas 2.1 pav. Iš grafikų galime stebėti jog deguonies ir anglies dioksido išeinančių dujų koncentracijos yra skirtingos, iš to galima spręsti, kiek yra sunaudojama deguonies ir kiek išskiriama anglies dioksido. Anglies dioksido koncentracija, reakcijos eigoje visada yra didesnė. Kaip matome grafikuose, 10 valandų reakcijos tarpsnyje deguonies dujų koncentracija mažėja, priešingai nei anglies dioksido, vėliau dujų koncentracijų intensyvumai susilygina.

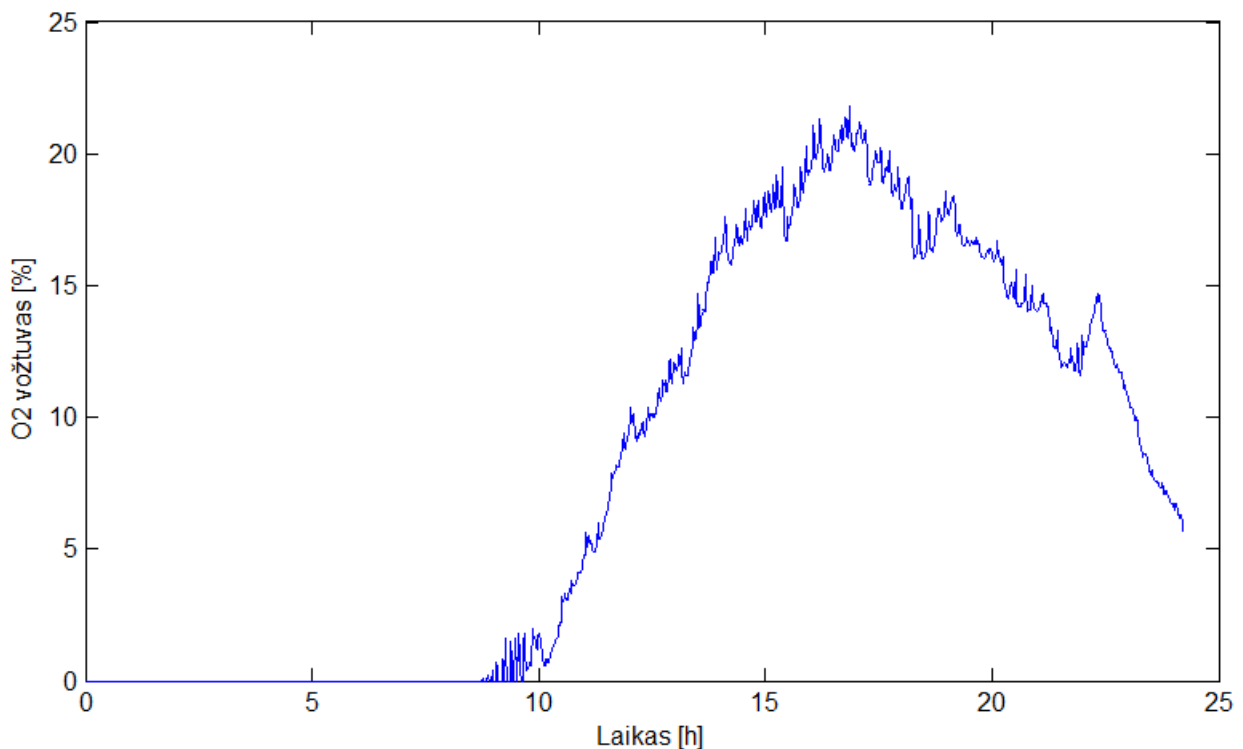


2.1 pav. CO₂ ir O₂ išeinančių dujų srautai

2.2.2. Apskaičiuojama deguonies sklendės atidarymo eiga

Programoje naudojama deguonies sklendės atidarymo eiga kintant laikui. Problema tame, jog teoriškai sklendės eigos kitimas, kinta netiesiškai jos pralaidumui. Programos kode (pateikta prieduose) yra įvertinama tai, todėl galima tiksliai apskaičiuoti deguonies pralaidumą, kompensuojant ir interpoliuojant sklendės netiesiškumus.

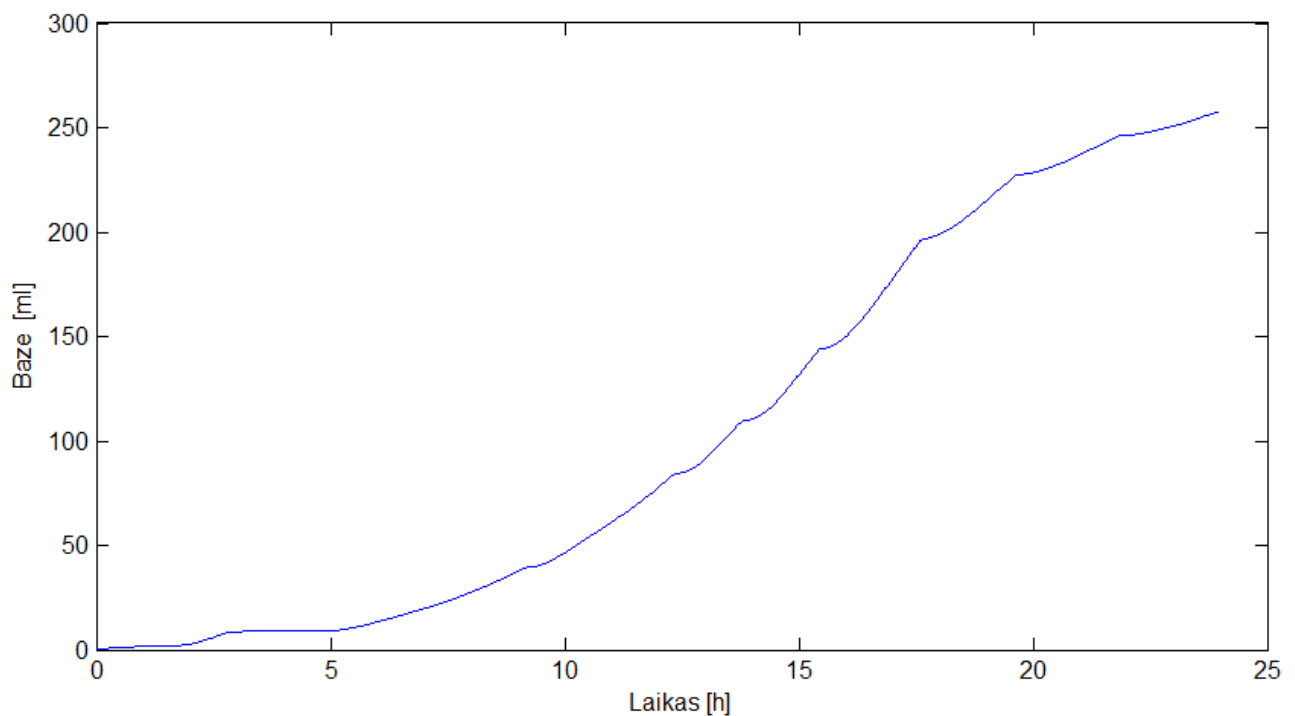
Atliktame eksperimente, gaunama deguonies sklendės eigos kitimas 2.2 pav. Kaip matome iš grafiko apie 10 valandų procese, deguonies sklendė uždaryta, kol biomasės koncentracijos augimas nepradeda greitėti, tol papildomos deguonies nereikia. Reakcijai įsibėgėjus, sparčiai padidėja deguonies poreikis, tad deguonies sklendė po truputį atidarinėjama iki kol galiausiai deguonies poreikio pakanka ir reakcijai baigiantis, lėtėjant, sklendė atvirkščiai yra uždarinėjama.



2.2 pav. deguonies sklendės eigos kitimas

2.2.3. Buferinio šarmo tirpalo (bazės) tiekimas

Biomasės koncentraciją taip pat gali būti įvertinama, pasitelkus buferinio šarmo tirpalo (bazės) sunaudojimo greičio metodą. Šis šarmas dozuojamas siekiant kompensuoti pH pokyčius, atsirandančius dėl kultūros augimo ir pamaitinimo tirpalo tiekimo. Bazės dozavimo kitimą proceso eigoje galime pamatyti 2.3 pav. Grafike matome, jog šarmo dozavimas intensyvumas sąlygoja nuo proceso laiko, bazės tiekimas po truputį didinamas iki reakcijos pabaigos.



2.3 pav. deguonies sklendės eigos kitimas

2.2.4. Tūrio apskaičiavimas, aeracijos srautai

Kadangi periodinio su pamaitinimu proceso metu į reaktorių tiekiami pamaitinimo substratų srautai, o iš reaktoriaus periodiškai ištraukiamas terpės kiekis bandiniams, tai tokiame procese kiekvienai iš modeliuojamų medžiagų galioja (2.2) lygtis, o terpės tūriui – (2.1) lygtis. Svarbu pažymėti, kad realiame procese esant keletui srautų, kuriuose yra skirtingos tam tikrų modeliuojamų medžiagų koncentracijos C_{ini} (2.2) lygtis tampa sudėtingesne - turime modeliuoti ne tik suminį įtekančią srautą F_{in} , bet ir atskirus įtekančius srautus, pvz.: F_{in1} , kuriame yra medžiagos C_1 koncentracija C_{in1} ; F_{in2} , kuriame yra medžiagos C_2 koncentracija C_{in2} ir t.t. Be to, įvertinus, kad

modeliuojame n koncentracijų, o santykinius reakcijų greičius užrašome pirmosios koncentracijos atžvilgiu, gausime tokią lygčių sistemą:

$$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F_{out}. \quad (2.1)$$

$$\frac{dC_1}{dt} = q_1 C_1 + \frac{F_{in}}{V} (C_{in1} - C_1), \quad (2.2)$$

$$\frac{dC_1}{dt} = q_1 C_1 + \frac{F_{in1}}{V} C_{in1} - \frac{F_{in}}{V} C_1, \quad (2.3)$$

...

$$\frac{dC_i}{dt} = q_i C_1 + \frac{F_{ini}}{V} C_{ini} - \frac{F_{in}}{V} C_i,$$

...

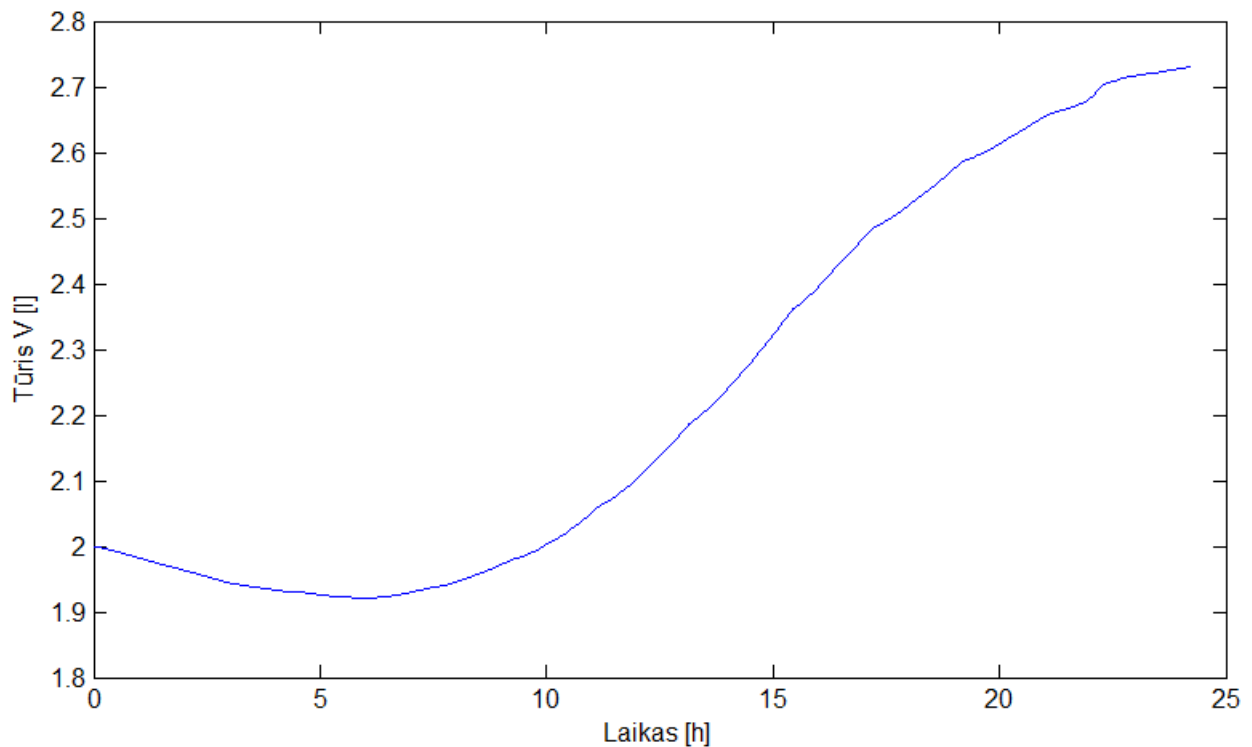
$$\frac{dC_n}{dt} = q_n C_1 + \frac{F_{inn}}{V} C_{inn} - \frac{F_{in}}{V} C_n,$$

$$F_{in} = \sum_{i=1}^n F_{ini},$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F_{out}.$$

Vadovaujantis aukščiau pateiktais samprotavimais yra akivaizdu, kad F/V daugikliuose prie C_{ini} koncentracijų (2.3) naudojamas atitinkamas srautas F_{ini} , o daugiklyje prie C_i koncentracijų (2.3) naudojamas suminis srautas F_i .

Atliktame eksperimente apskaičiuojamas tūris 4 pav. Iš grafiko matome, jog pradinis tūris yra 2 l, kuris iš pradžių vykstant reakcijai, po truputį mažėja, bet vėliau pradeda stabiliai didėti, iki kol procesas baigiasi.



2.4 pav. apskaičiuojamas tūris

2.2.5. Įvertinamas OUR ir CPR

Dujų analizės metodo esmė labai paprasta, todėl jis labai plačiai taikomas – matuojama deguonies koncentracija į bioreaktorių tiekiamose ir iš jo ištekančiose dujose; deguonies masių balansą galima užrašyti lygtimi $F_{O_2}^{in} - F_{O_2}^{out} - V \cdot OUR = 0$, Čia $F_{O_2}^{in}$ ir $F_{O_2}^{out}$ – moliniai deguonies srautai, matuojami bioreaktoriaus įėjime ir išėjime, o V – bioreaktoriaus tūris; atitinkamai apskaičiuojamas CPR.

Pirmiausia apskaičiuojamas tiekiamos deguonies srautas Q_{O_2T} , standartiniais litrais per minute (slpm).

$$Q_{O_2T} = V_{O_2} \cdot Q_{O_2} \cdot 100\% \quad (2.4)$$

Čia V_{O_2} - deguonies vožtuvo atidarymo dydis, Q_{O_2} - deguonies srautas

Po to apskaičiuojamas tiekiamo oro srautas Q_{AirT} , standartiniais litrais per minute (slpm).

$$Q_{AirT} = (1 - V_{O_2} \cdot 100\%) \cdot Q_{Air} \quad (2.5)$$

Čia Q_{Air} - oro srautas.

Vėliau apskaičiuojamas RQ_{Cor} respiracijos koeficiento korekcija, kur įvertinamas galimas skirtumas tarp įeinančių ir išskiriamų dujų iš bioreaktoriaus.

skirtumas santykis tarp tiekiamo deguonies ir panaudojamo anglies dioksido:

$$RQ_{Cor} = \frac{N_{Air} \cdot Q_{Air T}}{(Q_{Air T} + Q_{O_2 T}) \cdot (100 - O_{2 OFF} - CO_{2 OFF}) \cdot 100\%} \quad (2.6)$$

Čia N_{Air} – dydis iš oro (100%) atėmus deguonies ir anglies dioksido koncentracijas, $O_{2 OFF}$ – išeinančių dujų deguonies koncentracija, $CO_{2 OFF}$ – išeinančių dujų anglies dioksido koncentracija.

Galiausiai apskaičiuojamas bendras tiekiamos deguonies srautas $Q_{O_2 ALL}$, standartiniais litrais per minute (slpm).

$$Q_{O_2 ALL} = (Q_{Air T} + Q_{O_2 T} \cdot O_{2 mix}) \cdot 100\% \quad (2.7)$$

Čia $O_{2 mix}$ – Faktinė dujų mišinio koncentracija bioreaktoriaus įėjime.

Toliau programoje yra apskaičiuojamas deguonies sunaudojimo greitis (OURV) gramais per valandą [g/h], pasinaudojant šiomis skaičiavimo formulėmis:

$$OURV = \frac{(Q_{O_2 ALL} - (Q_{Air T} + Q_{O_2 T}) \cdot O_{2 OFF} \cdot RQ_{Cor} \cdot 100\%)}{V_m \cdot Mr_{O_2} \cdot 60} \quad (2.8)$$

Čia V_m – Avogadro konstanta, Mr_{O_2} – deguonies molinė masė.

Toliau yra apskaičiuojamas anglies dioksido išsiskyrimo greitis (CPRV) gramais per valandą [g/h], pasinaudojant šiomis skaičiavimo formulėmis:

$$CPRV = \frac{(-Q_{Air T} \cdot CO_{2 Air} - Q_{O_2 T} + (Q_{Air T} + Q_{O_2 T}) \cdot CO_{2 OFF} \cdot RQ_{Cor} \cdot 100\%)}{V_m \cdot Mr_{CO_2} \cdot 60} \quad (2.9)$$

Čia $CO_{2 Air}$ – anglies dioksido koncentracija ore, Mr_{CO_2} – anglies dioksido molinė masė.

Dabar apskaičiuojamas RQ respiracijos koeficientas, santykis tarp tiekiamo deguonies ir panaudojamo anglies dioksido, įvertinant deguonies ir anglies dioksido molines mases.

$$RQ = \frac{CPRV}{OURV \cdot Mr_{CO_2} \cdot Mr_{O_2}} \quad (2.10)$$

Po to apskaičiuojamas masės praradimo srautas F_{cl} , kilogramai per valandą [kg/h]. Masės praradimo srautas pagrindžiamas tuo, jog įeinanti į reaktorių deguonies molinė masė yra mažesnė nei anglies molinė masė, todėl vykstant procesui ir išsiskiriant anglies atomams įvyksta masės praradimas:

$$F_{cl} = (CPRV - OURV) \cdot 1000 \quad (2.11)$$

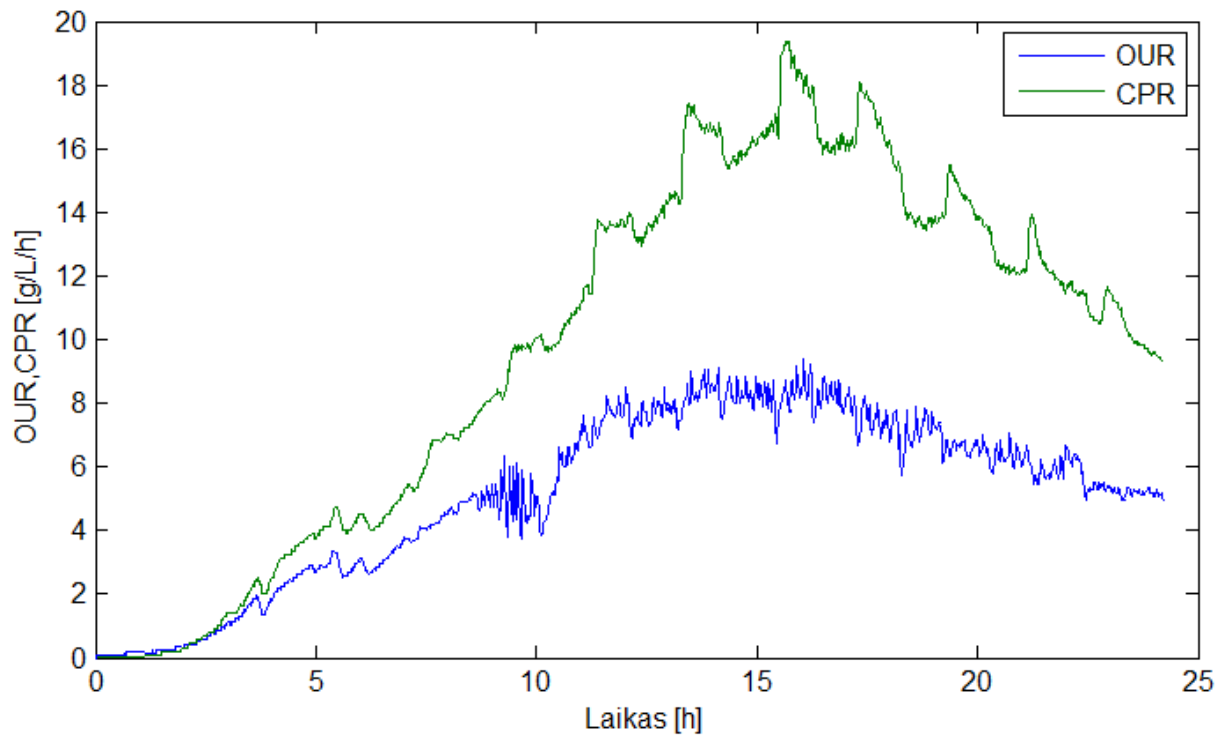
Galiausiai apskaičiuojamas deguonies tiekimo greitis (OUR) ir CPR specifinis anglies gamybos greitis vienam reaktoriaus tūrio vienetui [g/L/h]:

$$OUR = \frac{OURV}{V} \quad (2.12)$$

$$CPR = \frac{CPRV}{V} \quad (2.13)$$

Čia V - reaktoriaus tūris

Viename iš atliktų eksperimentų apskaičiuojami ir atvaizduojami OUR ir CPR rezultatai 2.4 pav. Iš grafiko matome deguonies sunaudojimo greičio kitimą ir anglies dioksido išsiskyrimo greičio kitimą. Anglies dioksido išsiskyrimo greitis visos reakcijos metu yra ženkliai didesnis nei deguonies. Abiejų medžiagų t.y. CPR ir OUR išsiskyrimo ir sunaudojimo greičių kitimas didėjimas vyksta iki 15 valandų, vėliau pradeda mažėti, kai proceso augimas pradeda lėtėti.



4.3 pav. Viename eksperimente įvertintas deguonies sunaudojimo greičio (OUR) kitimas ir anglės dioksido išsiskyrimo greičio (CPR) kitimas

3. REZULTATAI, REZULTATŲ PALYGINIMAS

Rezultatuose pateikiami, jau biomasės koncentracijos įvertinimui reikalingi skaičiavimai, naudojamos balanso lygtys, atvaizduojami gauti grafikai, skaičiuojamos paklaidos. Šioje dalyje taip pat identifikuojami modelio parametrai, palyginami gauti rezultatai.

Biomasės įvertinimo skaičiavimui pagal OUR ir CPR matavimus, pirminiai naudojami modelio parametrai paimti iš literatūros [6].

3.1. Netiesioginis biomasės įvertinimas pagal OUR matavimus

Biomasės koncentracija apskaičiuojama naudojantis deguonies sunaudojimo greičio matavimų rezultatais. Proceso metu deguonis sunaudojamas auginimui ir gyvybinėms funkcijoms palaikyti, gali būti apskaičiuojamas pagal (2.1):

$$OUR = \gamma_1 \mu x + \gamma_2 x. \quad (3.1)$$

Įstačius šią išraišką į biomasės balanso lygtį, gaunama:

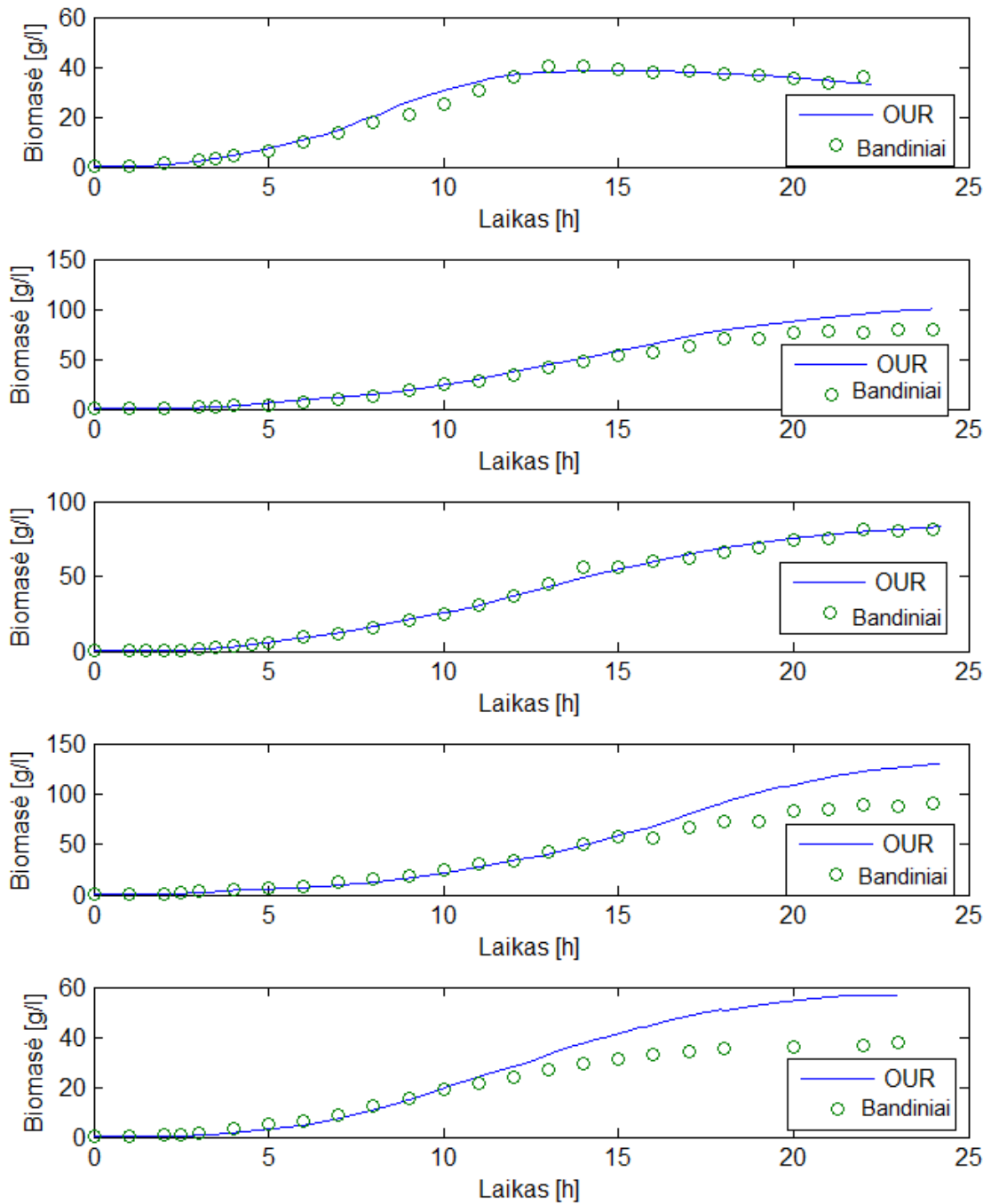
$$\frac{dx}{dt} \mu x - \frac{F}{w} x = \frac{OUR - \gamma_{12} x}{\gamma_{11}} - \frac{F}{w} x = BIR \quad (3.2)$$

Sprendžiant diferencialinę lygtį (2.2) Oilerio metodu, gaunama biomasės koncentracija laiku t_i :

$$x_{OUR}(t_i) = x_{OUR}(t_0) + \sum_{i=1}^n BIR(t_{i-1}) \Delta t_i \quad (3.3)$$

Biomasės įvertinimas penkiuose skirtinguose eksperimentuose atvaizduojamas 3.1 pav. Grafike atvaizduojamas modeliuojamas biomasės koncentracijos įvertinimas, naudojant deguonies sunaudojimo greičio (OUR) matavimus. Taip pat grafike rezultatai palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis, matavimas atliekamas imant bandinius. Grafike galime matyti programos (programinio jutiklio) modeliavimo kokybę. Apskaičiuojamos vidutinės santykinės modeliavimo paklaidos, atitinkamai kiekvienam eksperimentui – 5,9%; 15,5%; 3,36%, 26,6%; 34,1%. Iš modeliavimo paklaidų matome, jog modeliavimo kokybė,

priklausomai nuo eksperimento ganėtinai gera. Kadangi, kai kurie eksperimentai buvo sunkiau modeliuojami, gavosi didesnės paklaidos. Naudojami modelio parametrai $\lambda_1 = 0,45$; $\lambda_2 = 0,8$;



- 3.1 pav. Biomasės koncentracijos įvertinimas pagal deguonies sunaudojimo greitį (OUR), rezultatai palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis

3.2. Netiesioginis biomasės įvertinimas pagal CPR matavimus

Biomasės koncentracija taip pat analogiškai kaip ir pagal OUR matavimus gali būti apskaičiuojama naudojantis CPR specifinio anglies gamybos greičio matavimų rezultatais, pagal (3.4):

$$CPR = \gamma_1 \mu x + \gamma_2 x. \quad (3.4)$$

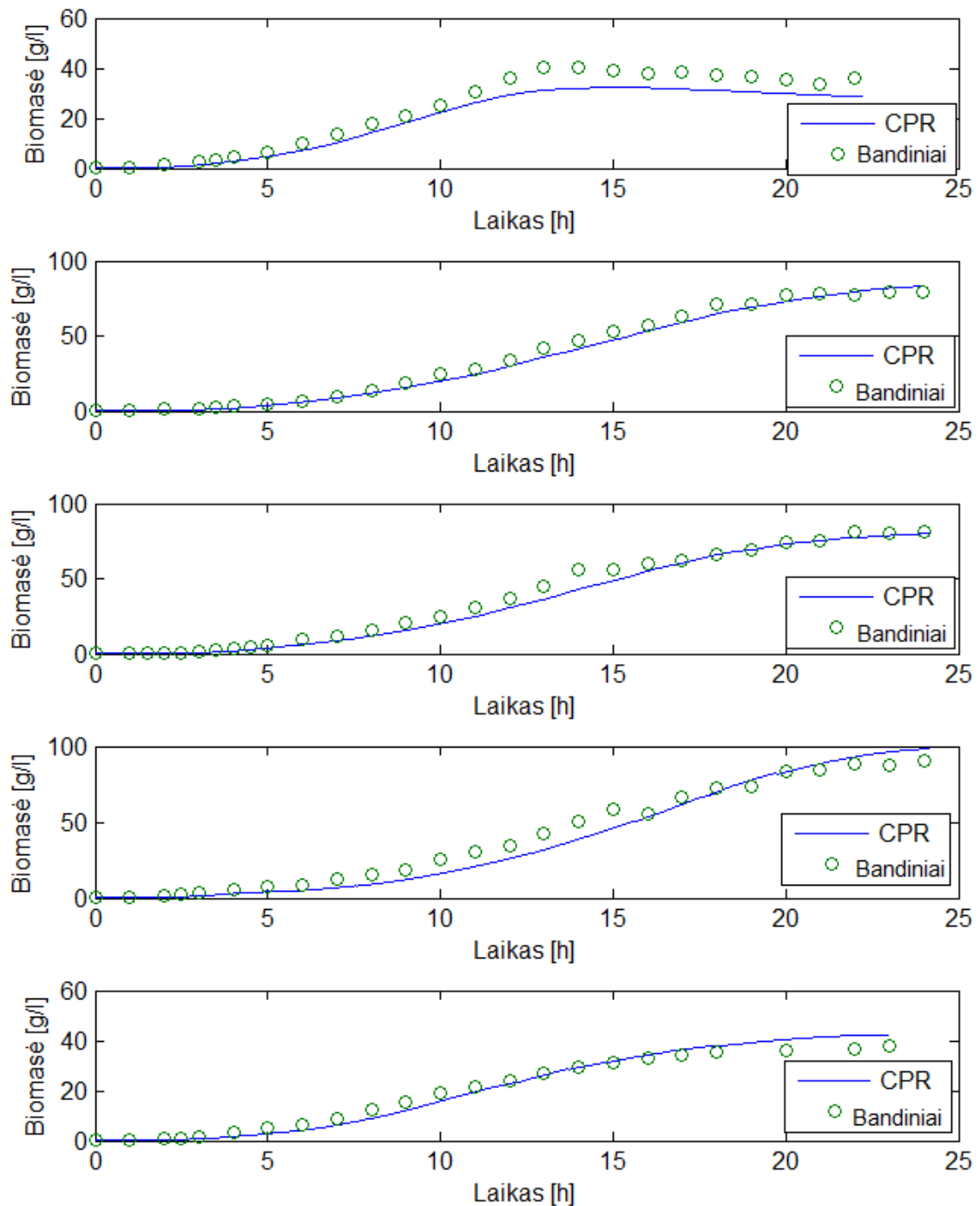
Ištačius šią išraišką į biomasės balanso lygtį, gaunama:

$$\frac{dx}{dt} \mu x - \frac{F}{w} x = \frac{CPR - \gamma_{22} x}{\gamma_{21}} - \frac{F}{w} x = BIR \quad (3.5)$$

Sprendžiant diferencialinę lygtį (2.5) Oilerio metodu, gaunama biomasės koncentracija laiku t_i :

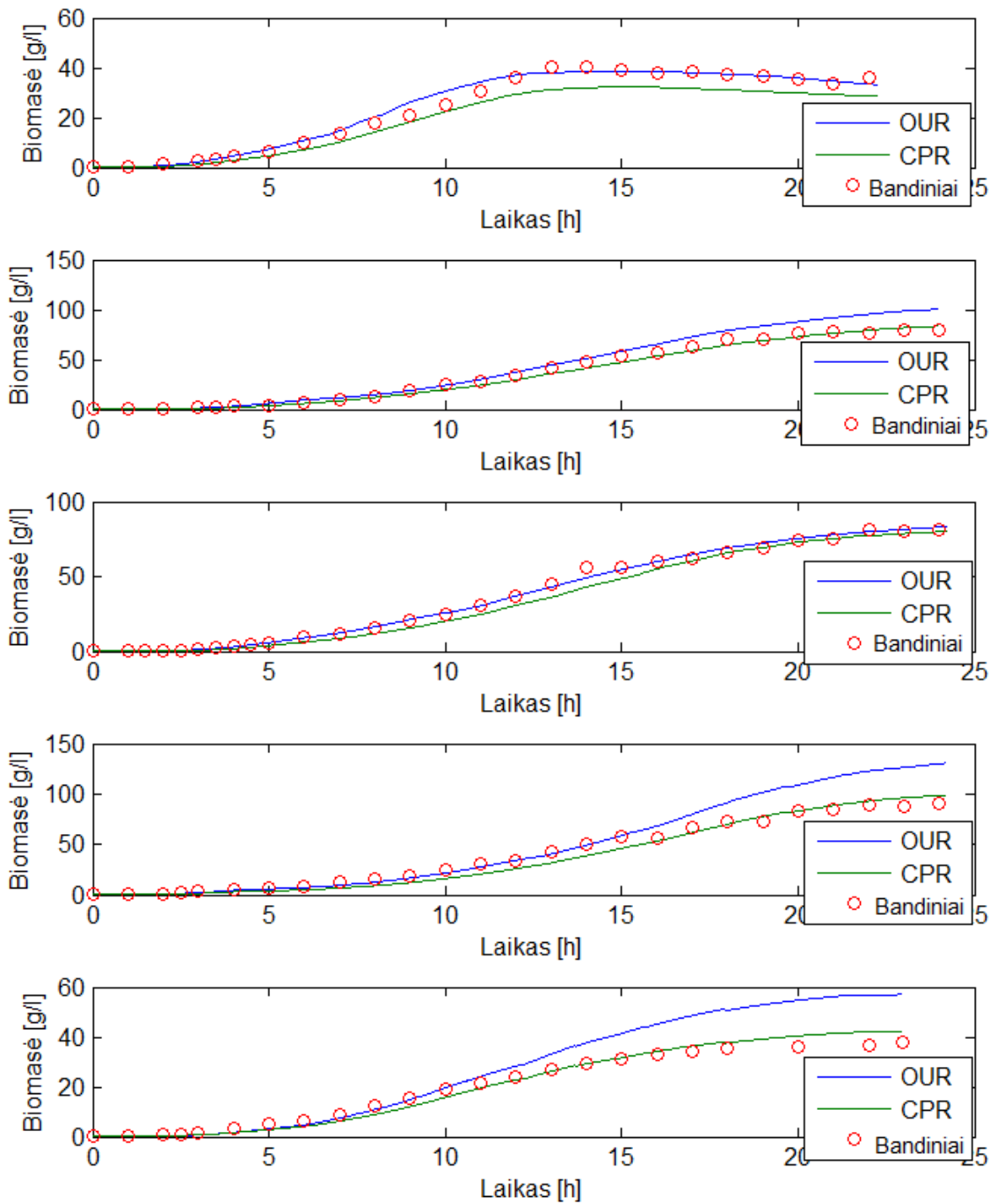
$$x_{CPR}(t_i) = x_{CPR}(t_0) + \sum_{i=1}^n BIR(t_{i-1}) \Delta t_i \quad (3.6)$$

Analogiškai kaip ir praeitame brėžinyje, biomasės įvertinimas penkiuose skirtinguose eksperimentuose atvaizduojamas 3.2 pav. Grafike atvaizduojamas modeliuojamas biomasės koncentracijos įvertinimas, pasitelkiant anglies dioksido gamybos greičio (CPR) matavimus. Grafike taip pat rezultatai palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis, matavimas atliekamas imant bandinius. Grafike galime matyti programos (programinio jutiklio) modeliavimo kokybę. Apskaičiuojamos vidutinės santykinės modeliavimo paklaidos, atitinkamai kiekvienam eksperimentui – 18,1%; 8,1%; 8,4%, 13,1%; 10,5%. Iš modeliavimo paklaidų matome, jog modeliavimo kokybė, priklausomai nuo eksperimento ganėtinai gera. Kadangi, kai kurie eksperimentai buvo sunkiau modeliuojami, gavosi didesnės paklaidos. Naudojami modelio parametrai $\lambda_1 = 0,1$; $\lambda_2 = 1,55$;



3.2 pav. Biomasės koncentracijos įvertinimas pagal anglies dioksido gamybos greitį (CPR), rezultatai palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis

Palyginimui pateikti rezultatai įvertinant biomasės koncentraciją abiem metodais 3.4 pav. Iš grafikų, taip pat iš skaičiuojamų modeliavimo santykinųjų paklaidų galima teigti, jog tikslesnis biomasės koncentracijos įvertinimas, taikant anglies dioksido gamybos greičio CPR metodą.



3.3 pav. Biomasės koncentracijos įvertinimas lyginant abu metodus OUR ir CPR, taip pat rezultatai palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis

3.3. Biomasės įvertinimas pagal buferinio tirpalo sunaudojimo greičio matavimus

Tyrimo užduotyje pagrindinis tikslas yra įvertinti biomasės koncentraciją pagal OUR ir CPR matavimus, bet palyginimui ir tikslesniam modelio sukūrimui buvo panaudotas ir buferinio tirpalo sunaudojimo greičio metodas.

Biomasės koncentracijos įvertinimas atliekamas pagal proceso metu naudojamo buferinio šarmo tirpalo sunaudojimo greitį BCR (angl. *base consumption rate*). Šarmas dozuojamas bandant kompensuoti pH pokyčius, atsirandančius dėl kultūros augimo ir pamaitinimo tirpalo tiekimo. Gaunama šarmo sunaudojimo greičio išraiška:

$$BCR = \lambda_1 \mu x + \lambda_2 x \frac{F}{W} \quad (3.7)$$

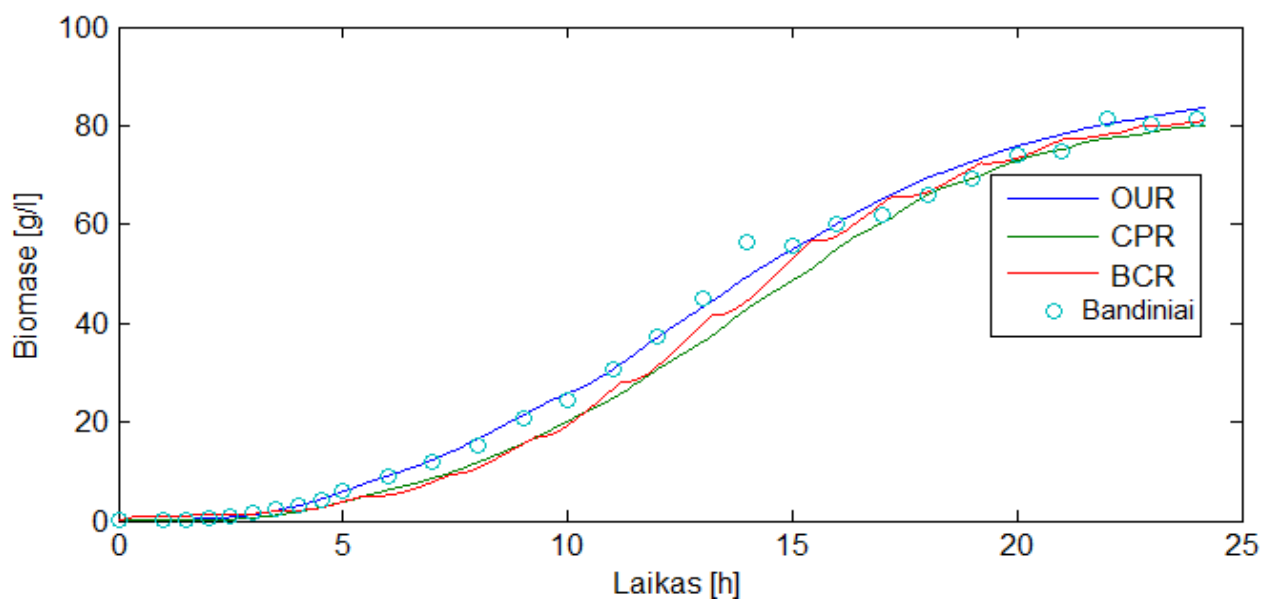
Kuri įstatoma į biomasės balanso lygtį:

$$\frac{dx}{dt} \mu x - \frac{F}{W} x = \frac{BRC - \lambda_2 \cdot \frac{F_s}{W}}{\lambda_1} - \frac{F}{W} x = BIR. \quad (3.8)$$

Sprendžiant diferencialinę lygtį (2.8) Oilerio metodu, gaunama biomasės koncentracija laiku t_i :

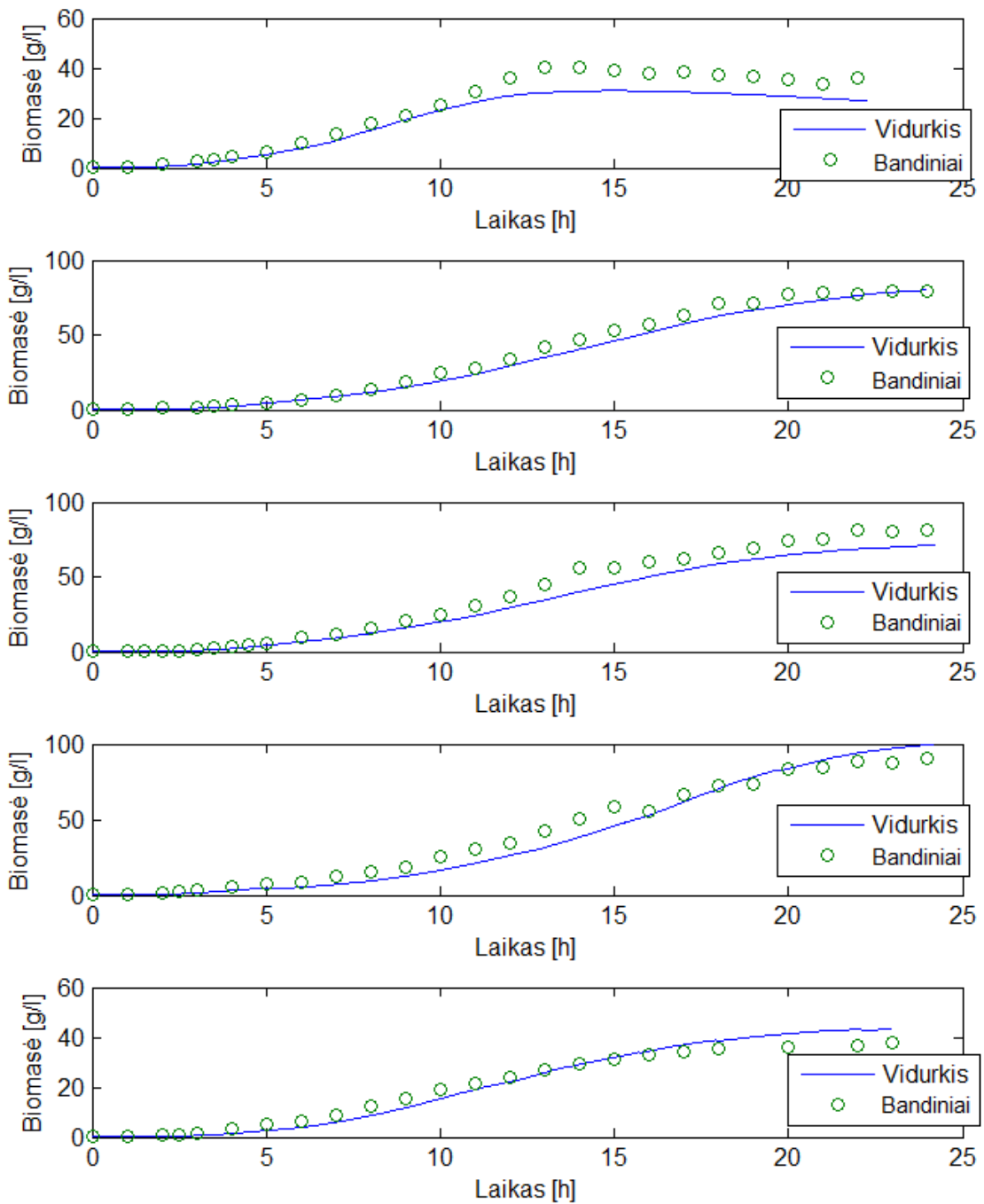
$$x_{BCR}(t_i) = x_{BCR}(t_0) + \sum_{i=1}^n BIR(t_{i-1}) \Delta t_i \quad (3.9)$$

Papildomai pasirinkus vieną eksperimentą buvo sumodeliuojamas ir įvertinamas biomasės koncentracijos programinis jutiklis, gebantis koncentraciją išmatuoti pagal buferinio šarmo tirpalo sunaudojimo greitį (BCR), kuris atvaizduotas 3.4 pav. Palyginimui, grafike taip pat pateikiami ir kiti to eksperimento įvertinimo metodai, bei rezultatai palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis



3.4 pav. Biomasės koncentracijos įvertinimas pagal šarminio tirpalo sunaudojimo greitį (BCR), palyginimas su kitais įvertinimo metodais

Praktikoje neturint pakankamai duomenų apie procesą ir nežinant koks metodas tiksliau įvertintų biomasės koncentraciją, galimą naudoti abu CPR ir OUR matavimais paremtus metodus ir iš jų gauti vidurkį 3.5 pav. Grafike galime matyti programos (programinio jutiklio) modeliavimo kokybę, taikant abu metodus ir išvedant vidurkį. Apskaičiuojamos vidutinės santykinės modeliavimo paklaidos, atitinkamai kiekvienam eksperimentui – 9,6%; 6,5%; 5,8%, 17,9%; 20,1%. Iš modeliavimo paklaidų matome, toks biomasės įvertinimo tipas gali duoti net geresnius matavimo rezultatu, nei bet kuris kitas, bet tai priklauso nuo turimo eksperimento.



3.5 pav. Biomės koncentracijos įvertinimas, taikant CPR ir OUR matavimais paremtus metodus ir iš jų gaunant vidurkį, taip pat rezultatai palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis

3.4. Modelio parametru identifikavimas

Siekiant pagerinti programinio jutiklio tikslumą, kitaip tariant padidinti biomasės koncentracijos matavimo tikslumą, naudojame modelio parametru identifikavimo algoritmą paremtą Chemotaxis, atsitiktinės paieškos metodu. Būtina pabrėžti, kad netgi naudojant paprasčiausius atsitiktinės paieškos algoritmus, biotechnologinių procesų modelių parametru sprendinius galima rasti pakankamu tikslumu. Kita svarbi identifikavimo algoritmu ypatybė – jų veiksmingumas labai priklauso nuo pradinių parametru pasirinkimo. Todėl turint *apriori* informacijos apie galimas modelio parametru reikšmes, tikslinga ją panaudoti.

Procedūros pradžioje naudojamos pradinės modelio parametru reikšmės, paimtos iš literatūros. Taip pat įkraunami eksperimentiniai biomasės matavimų duomenys. Identifikuojant modelį, gaunamos naujos modelio parametru reikšmės;

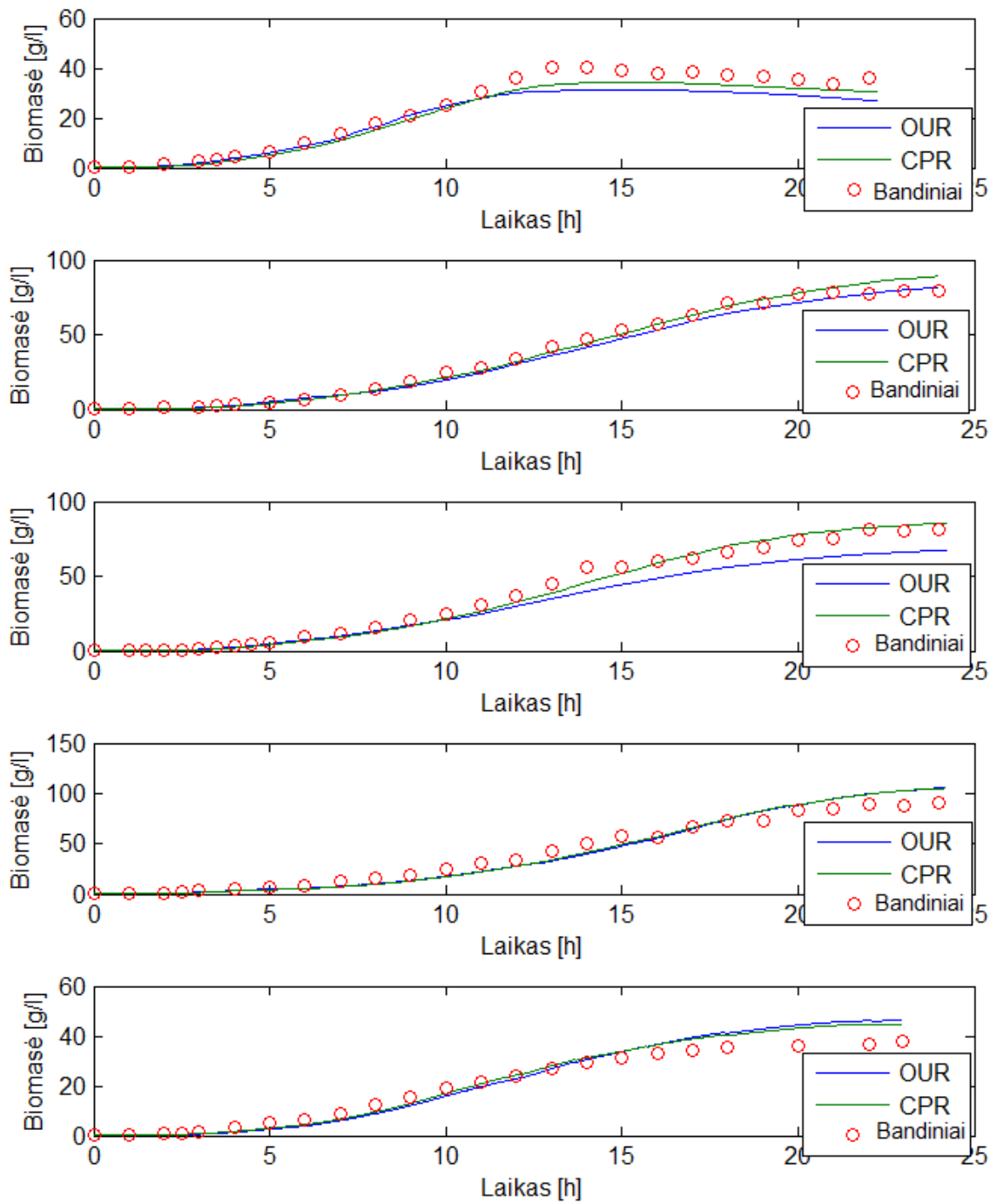
Taikant deguonies sunaudojimo greičio (OUR) matavimų metodą:

$$\lambda_1 = 0,558; \lambda_2 = 0,992;$$

Taikant anglies dioksido gamybos greičio (CPR) matavimų metodą:

$$\lambda_1 = 0,0945; \lambda_2 = 1,4642;$$

Naudojant naujus modelio parametrus, gauti nauji tikslesni modeliavimo rezultatai 3.6 pav. Taikant deguonies sunaudojimo greičio (OUR) matavimų metodą, apskaičiuojamos vidutinės santykinės modeliavimo paklaidos, atitinkamai kiekvienam eksperimentui – 16,8%; 7,1%; 17,7%, 14,0%; 16,2%, ir taikant anglies dioksido gamybos greičio (CPR) matavimų metodą atitinkamai kiekvienam eksperimentui – 12,7%; 6,2%; 8,1%, 13,7%; 13,1%. Iš modeliavimo paklaidų galima spręsti, jog taikant modelio parametru identifikavimą, modeliavimo tikslumas pagerėjo, paklaidos sumažėjo.



3.6 pav. Biomasės koncentracijos įvertinimas lyginant abu OUR ir CPR matavimų metodus ir taikant naujas identifikuotų parametru reikšmes, taip pat rezultatai palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis

4. IŠVADOS

1. Atlikus literatūros analizę, įsigilinus į problemą bei pasitelkus literatūroje naudojamus matematinius modelius, balanso lygtis, ištirta šiuolaikinė pramoninė bioreaktoriaus aeravimo sistema ir sukurti programiniai jutikliai biomasės koncentracijai įvertinti pagal išeinančias ir tiekiamas į bioreaktoriaus dujų analizės rezultatus.

2. Apžvelgtoje literatūroje aprašomi biotechnologinio proceso kintamųjų matavimo metodai, aprašytos biotechnologinio proceso parametrų savybės, pateikti jų matavimui, įvertinimui naudojami metodai.

3. Tyrimams buvo pasirinktas realiai veikiantis bioprocetas, kuris naudoja periodinio veikimo su pamaitinimu bioreaktorių. Buvo atlikti 5 pilno bioproceso eksperimentai iš kurių surinkti dujų koncentracijų, srautų duomenys, taip pat įvairių į bioreaktorių tiekiamų medžiagų kiekiai, bei imant bandinius buvo surinkti (*off-line*) ne realiu laiku išmatuoti biomasės koncentracijos duomenys.

4. Naudojantis eksperimentiniais duomenimis buvo sukurtas programinis jutiklis - programa, sugebanti netiesiogiai įvertinti biomasės koncentraciją pagal realiu laiku išmatuojamus parametrus, naudojant deguonies sunaudojimo greičio (OUR) matavimų, anglies dioksido gamybos greičio (CPR) matavimų paremtais metodais. Taip pat palyginimui, ištirtas vienas eksperimentas biomasės koncentracijos įvertinimui pagal buferinio tirpalo (šarmo) sunaudojimo greitį (BCR). Programinio jutiklio modeliavimo kokybei patikrinti, rezultatai buvo palyginami su (*off-line*) ne realiu laiku išmatuotais biomasės koncentracijos duomenimis.

5. Programos modeliuojamų rezultatų kokybės įvertinimui apskaičiuotos santykinės paklaidos. Naudojant deguonies sunaudojimo greičio (OUR) matavimų metodą gautos 3,4% - 34% paklaidos, priklausomai nuo eksperimento. Naudojant anglies dioksido gamybos greičio (CPR) matavimų metodą gautos 8,1% - 18,1% atitinkamai nuo eksperimento. Tai pat buvo išvestas vidurkis iš abiejų naudojamų metodų gautų rezultatų, paklaidos gautos 5,8% - 20,1%. Gautų paklaidų dydis priklauso nuo atlikto eksperimento, kai kuriuose eksperimentuose gautos didesnės paklaidos, dėl matavimo paklaidų, bioprocese pasitaikančių netikėtų klaidų ar kitų problemų.

6. Atliktas modelio parametrų identifikavimas, suprantamas kaip nežinomų netiesinio dinaminio modelio parametrų paieška, pasitelkiant skaitmenines *Chemotaxis* atsitiktinės paieškos procedūras. Parametrų identifikavimas, leido dar labiau patikslinti gaunamus biomasės įvertinimo rezultatus, atitinkamai užtikrina naudojamų metodų veiksmingumą. OUR ir CPR matavimų metodais gautos paklaidos yra - 7,1% - 14,0% ir 6,2% - 13,1% .

5. LITERATŪRA

1. **B. Warth, G. Rajkai, C.F. Mandenius.** Evaluation of software sensors for on-line estimation of culture conditions in an Escherichia coli cultivation expressing a recombinant protein. Mokslinis straipsnis.
2. **M. Pohlscheidt, S. Charaniya, C. Bork, M. Jenzsch, T. L. Noetzel, A. Luebbert,** Bioprocess and fermentation monitoring.
http://lifescience.roche.com/wcsstore/CBCatalogAssetStore/Articles/2013_Encyclopedia.pdf (žiūrėta internete 2014 06 02).
3. **E. Skibsted , C. Lindemann , C. Roca , Lisbeth Olsson.** On-line bioprocess monitoring with a multi-wavelength fluorescence sensor using multivariate calibration. Mokslinis straipsnis.
4. **C.F. Mandenius.** Recent developments in monitoring, modelling and control of biological production systems. Mokslinis straipsnis
5. **Ghasem D. Najafpour.** Biochemical Engineering and Biotechnology. Professor of Ghasem D. Najafpour - Chemical Engineering Noshirvani Institute of Technology University of Mazandaran Babol, Iran. Knyga.
6. **V. Galvanauskas, D. Levišauskas.** Biotechnologinių procesų modeliavimas, optimizavimas ir valdymas. Mokomoji knyga.
7. **M. Jenzsch, R. Simutis, G. Eisbrenner, I. Stuckrath, A. Luebbert.** Estimation of biomass concentrations in fermentation processes for recombinant protein production. Mokslinis straipsnis.
8. **V. Galvanauskas, R. Simutis, R. Luebbert.** Direct comparison of four different biomass estimation methods against conventional dry weight measurements. Mokslinis straipsnis.
9. **M. Pohlscheidt, S. Charaniya, C. Bork, M. Jenzsch, T. L. Noetzel, ir A. Luebbert .** Bioprocess and fermentation monitoring. Mokslinis straipsnis.
10. **F. Garcia-Ochoa, E. Gomez, V. E. Santosa, J. C. Merchuk.** Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. Mokslinis straipsnis.

11. **F. Hoppe¹, C. Rebnegger ir M. Maurer.** On-line biomass estimation of yeast fed batches using off gas analysis of carbon dioxide and oxygen.
Mokslinis straipsnis.
12. **Kęstutis Jonelis.** Control algorithms and systems of biotechnological wastewater treatment processes.
Daktaro disertacija.
13. **Artur Kuprijanov.** Pažangių valdymo sistemų bandomiesiems bioreaktoriams kūrimas ir taikymas.
Daktaro disertacija .
14. **P. Kadleca, B. Gabrys, S. Strandtb.** Data-driven Soft Sensors in the process industry.
Mokslinis straipsnis.
15. **Vytautas Galvanauskas, Donatas Levišauskas.** Biotechnologinių procesų modeliavimas, optimizavimas ir valdymas
16. **M.Navratila, A. Norbergb, L. Lembrenb, C.F. Mandeniusa.** On-line multi-analyzer monitoring of biomass, glucose and acetate for growth rate control of a *Vibrio cholerae* fed-batch cultivation
Mokslinis straipsnis.

Priedai

Matlab programos kodas

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
close all;
clear all;
clc

Performindexa=10^24;
par = [0.045 0.8 ]
para=par; dpar=par.*[0.01,0.01];
ntrials=1; fprintf('Random Search with %5i Trials\n\n',ntrials)
  for i=1:ntrials % Make a loop of N trials

      % Define the search interval for parameter 1
      % Initial value for the performance index

      parr=para+dpar.*(2*rand(1)-1); % Random choice of mumax
      YmXO = parr(1,1);
      YrXO = parr(1,2);
      r=[ 0 1 2 0 3 4 0 5 0 0];
      x=[ 0 0.01 1 0 0.1 0.9 0 1 0 0];
      for ii = [ 2 3 5 6 8 ]

          Wgh = x(ii);
          l = r(ii);

          ma = load(['online_',num2str(ii),'.txt']);
          mb= load(['offline_',num2str(ii),'.txt']);

          Laikas = mb(:,1); % Hours
          Biomase = mb(:,2); % [g/l]
          Glukoze = mb(:,3); % [g/l]

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Define initial conditions of the process for each run
% according to real measurements!!!

      % c0=[X; S; V];

      c0(1:2,1)=mb(1,2:3);
      c0(3,1)=2;

%      c0=[0.11;... % biomass, X, [g/l]
%          4.82;... % glucose, S, [g/l]
%          2.00]; % volume, V, [l]

%--- Other initial conditions -----
      Fmax = 4; % [ml/min] Maximal feed rate
      SF = 400; % [g/l] Glucose conc. in feeding solution

% Average sampling rate [kg/h]
      Fsmp=length(mb(:,1))/mb(end,1)*15/1000;

% Evap. rate calculated from the glycerol absorb. dif. [kg/h]
```

```

Fe = 0.0015;

% Recalculation constants
Perc2Frac=1/100; mL2L=1/1000; L2mL=1000; g2kg=1/1000; kg2g=1000; min2h=1/60;
sec2min=1/60; h2min=60; min2sec=60; sec2h=1/3600; h2sec=3600; bar2Pa=100000;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Chemical constants
Mr_O2=32;           % [g/mol]
Mr_CO2=44;          % [g/mol]
Vm=22.4;            % [L/mol] under stand. cond. 0C, 1atm.
dil_fact=0.935;    % Correction factor for CO2 meas., void
C_H2O=1000;        % [g/L]
alpha_O=0.2095;    % []
He= 3.15e9;        % Henry's constant [Pa] at T=37C

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Model parameters/costants
% YmXO=0.045; YrXO=0.8;
% YmXO=0.0642; YrXO=0.8683;
  YmXC=0.1; YrXC=1.55;
% YmXC=0.0975;   YrXC=1.4723;

YrXB=0.0009;
Xmax=200; kLamax=2000;

simax0=1.05; Yxs0=0.53;
% om=YmXO; Yox=YrXO; Ybx=0.0009;

% Weighting for various methods for the average estimated biomass
% (from OUR, CER, BASE, OPTEK)
WX= [1; 1; 0.30; 0.00];

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Correction of P and T influence of molar flow rate
% Standard conditions 0C (273.15K) and 101.325kPa as per ISO 10780
Temp_std=273.15;   % K
Press_std=101325;  % Pa
Temp_amb=20;       % Ambient temperature C
Vmin=1.0;          % Volume, L

O2_air= 0.2095;    % %/
CO2_air= 0.0003;   % %/
N2_air= 1-O2_air-CO2_air; % %/

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

Time      = ma(:,1); % min
Temp      = ma(:,2); % 0C
pH         = ma(:,3); % %

```

```

pO2          = ma(:,4);  % %
Stirrer      = ma(:,5);  % rpm
Feed         = ma(:,6);  % ml/min
Base_pump    = ma(:,7);  % ml
Acid_pump    = ma(:,8);  % ml
Antifoam_pump= ma(:,9);  % ml
Air_valve    = ma(:,10); % %
O2_off_gass  = ma(:,11); % %
CO2_off_gass = ma(:,12); % %
Feed_pump    = ma(:,13); % %
QAir         = ma(:,14); % slpm
QO2          = ma(:,15); % slpm
O2_Valve     = 100.-Air_valve;%ma(:,16); % % !!!!!!!

```

```

Time=Time./60;      % min. to h.

```

```

Fs_on_mLmin=Feed;  %[ml/min]  ? feed
Ws_on_mL=Feed_pump; %[ml]      ? feed pump ml
Wb_on_mL=Base_pump; %[ml]      ? base pump
Wac_on_mL=Acid_pump; %[ml]     ? acid pump
Waf_on_mL=Antifoam_pump; %[ml] ? antifoam pump
O2Enr_on_perc=O2_Valve; %[%]   ? o2 valve % !!!!!!!
O2_on_perc=O2_off_gass; %[%]   +
CO2_on_perc=CO2_off_gass; %[%] +
pO2_on_perc=pO2; %[%]         +
QAir_slpm_rot=QAir ; %[slpm]   +
QO2_slpm_rot=QO2; %[slpm]     +
STIRR=Stirrer; %[rpm]         +
Press_Air=0.1; %[bar]         ?
Press_O2=0.1; %[bar]         ?

```

```

%t_est_hv=[t_est_hv; t_est_h];
%Fs_on_mLminv=[Fs_on_mLminv; Fs_on_mLmin];

```

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```

% Recalculation of lows from lpm into slpm
Temp=Temp_std+Temp_amb;
%PT_corr=(Press/Press_std)*(Temp_std/Temp); % Not used as the flows are
in slpms

```

```

V(1,1)=2;
tOTRV(1,1)=0;
tCERV(1,1)=0;
kLa(1,1)=0;
Xest_OTR=[];
Xest_CER=[];
Xest_BCR=[];
Xest_AVG=[];
Xest_OTR(1,1)=c0(1,1);
Xest_CER(1,1)=c0(1,1);
Xest_BCR(1,1)=c0(1,1);

```

```

% naujas

```

```

%
for a1=2:length(ma)
    dt_est=(Time(a1)-Time(a1-1));
    Q_O2_enr(a1,1)=O2Enr_on_perc(a1,1)*QO2_slpm_rot(a1,1)*Perc2Frac; % !!!
Bio-4 O2 mixing
    QAir_on_slpm(a1,1)=(1 -
O2Enr_on_perc(a1,1)*Perc2Frac)*QAir_slpm_rot(a1,1); % !!! Bio-4 air mixing
    RQ_corr(a1,1)= N2_air * QAir_on_slpm(a1,1) / (QAir_on_slpm(a1,1) +
Q_O2_enr(a1,1)) / ...
        (100.-O2_on_perc(a1,1)-CO2_on_perc(a1,1)) / Perc2Frac;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

    % Correction of the flows when the enrichment is switched on
    % T_period=15; % [s]
    Valve_stroke=[0 5 10 15 20 25 30 100]; % [%]
    O2_test_out=[O2_air*100 26.50 29.84 33.45 37.0 40.78 44.6 100]; % [%]

    ValveStr_ind=find(Valve_stroke<=O2Enr_on_perc(a1,1));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

    % Actual concentration of the gas mix at the bioreactor input [%]
    if ValveStr_ind(end)== length(Valve_stroke),
        O2_mixed(a1,1)=O2_test_out(end);
    else
        O2_mixed(a1,1)=(O2Enr_on_perc(a1,1)-
Valve_stroke(ValveStr_ind(end)))*...
        (O2_test_out(ValveStr_ind(end)+1)-
O2_test_out(ValveStr_ind(end)))/...
        (Valve_stroke(ValveStr_ind(end)+1)-
Valve_stroke(ValveStr_ind(end)))+...
        O2_test_out(ValveStr_ind(end));
    end

    Qtotal_O2_input(a1,1)=(QAir_on_slpm(a1,1) + Q_O2_enr(a1,1)) *
O2_mixed(a1,1) * Perc2Frac;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

    % Oxygen transfer rate, [g/h] (whole bioreactor)

    OTRV(a1,1)=( Qtotal_O2_input(a1,1) ...
        -(QAir_on_slpm(a1,1) + Q_O2_enr(a1,1))* O2_on_perc(a1,1) *
Perc2Frac * RQ_corr(a1,1)) ...
        / min2h / Vm * Mr_O2;

    if OTRV(a1,1)<=1.e-12, OTRV(a1,1)=1.e-12;end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

    % Carbon evolution rate, [g/h] (whole bioreactor)

    CERV(a1,1)=(-QAir_on_slpm(a1,1) * CO2_air - Q_O2_enr(a1,1) * 0.00 ...

```

```

+ (QAir_on_slpm(a1,1) + Q_O2_enr(a1,1)) * CO2_on_perc(a1,1) *
Perc2Frac * RQ_corr(a1,1) ...
/ min2h / Vm * Mr_CO2;

if CERV(a1,1) <= 1.e-12, CERV(a1,1) = 1.e-12; end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Respiratory quotient, RQ, [mol/mol]
RQ(a1,1) = CERV(a1,1) / OTRV(a1,1) * Mr_O2 / Mr_CO2;

if RQ <= 1.e-12, RQ = 1.e-12; end; if RQ > 2.0, RQ = 2.0; end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Carbon loss flow due to respiration/metabolism, [kg/h]
Fcl = max([ (CERV(a1,1) - OTRV(a1,1)) * g2kg; 0]);

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

V(a1,1) = V(a1-1,1) + ...
( (Ws_on_mL(a1) - Ws_on_mL(a1-1)) + ...
(Wb_on_mL(a1) - Wb_on_mL(a1-1)) + ...
(Wac_on_mL(a1) - Wac_on_mL(a1-1)) + ...
(Waf_on_mL(a1) - Waf_on_mL(a1-1)) - ...
0) * mL2L - ...
(Fcl + Fe + Fsmp) * dt_est;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Oxygen transfer rate OTR [g/L/h] and totalized amount tOTRV [g]
OTR(a1,1) = OTRV(a1,1) / V(a1,1);
tOTRV(a1,1) = tOTRV(a1-1,1) + OTRV(a1,1) * dt_est;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Carbon evolution rate CER [g/L/h] and totalized amount tCERV [g]
CER(a1,1) = CERV(a1,1) / V(a1,1);
tCERV(a1,1) = tCERV(a1-1,1) + CERV(a1,1) * dt_est;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Dissolved oxygen saturation conc. calculation
Press = Press_std + Press_Air * Press_std; %[Pa]
%Maximal solubility of oxygen, [g/l]
Os0 = C_H2O * Press * alpha_O/He; % Initial sensor calibration
Os = C_H2O * Press * alpha_O/He * O2_mixed(a1,1) .* Perc2Frac / O2_air; % Actual
value

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Coefficient of mass transfer from gas to liquid phase kLa [1/h]

```

```

kLa(a1,1)=OTR(a1,1)/(Os - pO2_on_perc(a1,1)*Perc2Frac*Os0);
if kLa(a1,1)<=0, kLa(a1,1)=0; end
if kLa(a1,1)>kLamax, kLa=kLamax; end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Biomass conc. estimated from OTR
miu(a1,1)=(OTR(a1,1)-Xest_OTR(a1-1,1)*YmXO)/(Xest_OTR(a1-1,1)*YrXO);
dX_dt1(a1,1)=miu(a1,1)*Xest_OTR(a1-1,1)-(V(a1,1)-V(a1-
1,1))/dt_est/V(a1,1)*Xest_OTR(a1-1,1);
Xest_OTR(a1,1)=Xest_OTR(a1-1,1)+dX_dt1(a1,1)*dt_est;
if Xest_OTR(a1,1)<0, Xest_OTR(a1,1)=0; end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Biomass conc. estimated from CER
miu2(a1,1)=(CER(a1,1)-Xest_CER(a1-1,1)*YmXC)/(Xest_CER(a1-1,1)*YrXC);
dX_dt2(a1,1)=miu2(a1,1)*Xest_CER(a1-1,1)-(V(a1,1)-V(a1-
1,1))/dt_est/V(a1,1)*Xest_CER(a1-1,1);
Xest_CER(a1,1)=Xest_CER(a1-1,1)+dX_dt2(a1,1)*dt_est;
if Xest_CER(a1,1)<0, Xest_CER(a1,1)=0; end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Biomass conc. estimated from base consumption rate BCR
Xest_BCR(a1,1)=YrXB*Wb_on_mL(a1,1)/V(a1,1)/mL2L;
if Xest_BCR(a1,1)<0, Xest_BCR(a1,1)=0; end

Xest_AVG(a1,1)=(WX(1)*Xest_OTR(a1,1) + WX(2)*Xest_CER(a1,1))/sum(WX);

end
texp=[Laikas] ;
Cexp=[Biomase] ;
% Wgh=1.0;

Cc=[interp1(Time,Xest_OTR,texp)]; % Interpolation of the results

DC=Cc-Cexp; % Deviations Simulation and
Experiment
EC=Wgh.*sum(DC.*DC); % Weighted Mean Square Value of
DC
residuum=sqrt(sum(EC)); % New Performance Index
(rms-value)
Performindexn(ii)=sum(residuum.^2)/length(texp); % Determine the
optimization criterion

% figure (ii)

subplot(5,1,1),plot (Time, Xest_OTR,Time, Xest_CER,Laikas, Biomase,'o')
ylabel('Biomasé [g/l]');
xlabel('Laikas [h]');
legend('OUR', 'CPR', 'offline')

end

```



```

Performindexna = sum( Performindexn);
if Performindexna<Performindexa      % Test for the performance index
Performindexa=Performindexna      % Update the current performance
para=parr;

figure (1)
plot (Time, Xest_OTR,Time, Xest_CER,Time, Xest_BCR,Laikas, Biomase,'o')
ylabel('Biomase [g/l]');
xlabel('Laikas [h]');
legend('OTR','CER','BCR','offline')

figure (2)
plot (Time, OTR,Time, CER)
ylabel('OTR,CER [g/L/h]');
xlabel('Laikas [h]');
legend('OTR','CER')

figure (3)
plot (Time, O2_off_gass,Time, CO2_off_gass)
ylabel('O2 off gass,CO2 off gass [%]');
xlabel('Laikas [h]');
legend('O2 off gass','CO2 off gass')

figure (4)
plot (Time, V)
ylabel('Tūris V [l]');
xlabel('Laikas [h]');

figure (5)
plot (Time, O2Enr_on_perc)
ylabel('O2 vožtuvas [%]');
xlabel('Laikas [h]');

figure (6)
plot (Time, Wb_on_mL)
ylabel('Baze [ml]');
xlabel('Laikas [h]');

figure (7)
plot (Time, Xest_AVG, Laikas, Biomase,'o')
ylabel('Vidurkis X [g/l]');
xlabel('Laikas [h]');

end

end

parametras=para

pause

Performindexa=10^24;
par = [0.1 1.55 ]
para=par; dpar=par.*[0.01,0.01];

```

```

ntrials=1; fprintf('Random Search with %5i Trials\n\n',ntrials)
for i=1:ntrials % Make a loop of N trials

    % Define the search interval for parameter 1
    % Initial value for the performance index

    parr=para+dpar.*(2*rand(1)-1); % Random choice of mumax
    YmXC = parr(1,1);
    YrXC = parr(1,2);

    r=[ 0 1 2 0 3 4 0 5 0 0];
    x=[ 0 1 0.3 0 1 0.3 0 0.2 0 0];
    for ii = [ 2 3 5 6 8 ]

        Wgh = x(ii);
        l = r(ii);

        ma = load(['online_',num2str(ii),'.txt']);
        mb= load(['offline_',num2str(ii),'.txt']);

        Laikas = mb(:,1); % Hours
        Biomase = mb(:,2); % [g/l]
        Glukoze = mb(:,3); % [g/l]

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Define initial conditions of the process for each run
% according to real measurements!!!

    % c0=[X; S; V];

    c0(1:2,1)=mb(1,2:3);
    c0(3,1)=2;

%     c0=[0.11;... % biomass, X, [g/l]
%         4.82;... % glucose, S, [g/l]
%         2.00]; % volume, V, [l]

%--- Other initial conditions -----
Fmax = 4; % [ml/min] Maximal feed rate
SF = 400; % [g/l] Glucose conc. in feeding solution

% Average sampling rate [kg/h]
Fsmp=length(mb(:,1))/mb(end,1)*15/1000;

% Evap. rate calculated from the glycerol absorb. dif. [kg/h]
Fe = 0.0015;

% Recalculation constants
Perc2Frac=1/100; mL2L=1/1000; L2mL=1000; g2kg=1/1000; kg2g=1000; min2h=1/60;
sec2min=1/60; h2min=60; min2sec=60; sec2h=1/3600; h2sec=3600; bar2Pa=100000;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Chemical constants
Mr_O2=32; % [g/mol]
Mr_CO2=44; % [g/mol]

```

```

Vm=22.4;           % [L/mol] under stand. cond. 0C, 1atm.
dil_fact=0.935;   % Correction factor for CO2 meas., void
C_H2O=1000;       % [g/L]
alpha_O=0.2095;  % []
He= 3.15e9;       % Henry's constant [Pa] at T=37C

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

YrXB=0.0009;
Xmax=200; kLamax=2000;

simax0=1.05; Yxs0=0.53;
% om=YmXO; Yox=YrXO; Ybx=0.0009;

% Weighting for various methods for the average estimated biomass
% (from OUR, CER, BASE, OPTEK)
WX= [0.35; 0.35; 0.30; 0.00];

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Correction of P and T influence of molar flow rate
% Standard conditions 0C (273.15K) and 101.325kPa as per ISO 10780
Temp_std=273.15;  % K
Press_std=101325; % Pa
Temp_amb=20;     % Ambient temperature C
Vmin=1.0;        % Volume, L

O2_air= 0.2095;  % %/
CO2_air= 0.0003; % %/
N2_air= 1-O2_air-CO2_air; % %/

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

Time      = ma(:,1); % min
Temp      = ma(:,2); % 0C
pH        = ma(:,3); % %
pO2       = ma(:,4); % %
Stirrer   = ma(:,5); % rpm
Feed      = ma(:,6); % ml/min
Base_pump = ma(:,7); % ml
Acid_pump = ma(:,8); % ml
Antifoam_pump= ma(:,9); % ml
Air_valve = ma(:,10); % %
O2_off_gass = ma(:,11); % %
CO2_off_gass = ma(:,12); % %
Feed_pump  = ma(:,13); % %
QAir      = ma(:,14); % slpm
QO2       = ma(:,15); % slpm
O2_Valve  = 100.-Air_valve;%ma(:,16); % % !!!!!!!

```

```

Time=Time./60;      % min. to h.

Fs_on_mLmin=Feed;  %[ml/min]  ? feed
Ws_on_mL=Feed_pump; %[ml]      ? feed pump ml
Wb_on_mL=Base_pump; %[ml]      ? base pump
Wac_on_mL=Acid_pump; %[ml]     ? acid pump
Waf_on_mL=Antifoam_pump; %[ml] ? antifoam pump
O2Enr_on_perc=O2_Valve; %[%]   ? o2 valve % !!!!!!!
O2_on_perc=O2_off_gass; %[%]   +
CO2_on_perc=CO2_off_gass; %[%] +
pO2_on_perc=pO2; %[%]         +
QAir_slpm_rot=QAir ; %[slpm]   +
QO2_slpm_rot=QO2; %[slpm]     +
STIRR=Stirrer; %[rpm]         +
Press_Air=0.1; %[bar]         ?
Press_O2=0.1; %[bar]         ?

%t_est_hv=[t_est_hv; t_est_h];
%Fs_on_mLminv=[Fs_on_mLminv; Fs_on_mLmin];

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Recalculation of lows from lpm into slpm
Temp=Temp_std+Temp_amb;
%PT_corr=(Press/Press_std)*(Temp_std/Temp); % Not used as the flows are
in slpms

V(1,1)=2;
tOTRV(1,1)=0;
tCERV(1,1)=0;
kLa(1,1)=0;
Xest_OTR=[];
Xest_CER=[];
Xest_BCR=[];
Xest_OTR(1,1)=c0(1,1);
Xest_CER(1,1)=c0(1,1);
Xest_BCR(1,1)=c0(1,1);

% naujas

%
for a1=2:length(ma)
    dt_est=(Time(a1)-Time(a1-1));
    Q_O2_enr(a1,1)=O2Enr_on_perc(a1,1)*QO2_slpm_rot(a1,1)*Perc2Frac; % !!!
Bio-4 O2 mixing
    QAir_on_slpm(a1,1)=(1 -
O2Enr_on_perc(a1,1)*Perc2Frac)*QAir_slpm_rot(a1,1); % !!! Bio-4 air mixing
    RQ_corr(a1,1)= N2_air * QAir_on_slpm(a1,1) / (QAir_on_slpm(a1,1) +
Q_O2_enr(a1,1)) / ...
    (100.-O2_on_perc(a1,1)-CO2_on_perc(a1,1)) / Perc2Frac;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```

% Correction of the flows when the enrichment is switched on
% T_period=15; % [s]
Valve_stroke=[0 5 10 15 20 25 30 100]; % [%]
O2_test_out=[O2_air*100 26.50 29.84 33.45 37.0 40.78 44.6 100]; % [%]

ValveStr_ind=find(Valve_stroke<=O2Enr_on_perc(a1,1));

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Actual concentration of the gas mix at the bioreactor input [%]
if ValveStr_ind(end)== length(Valve_stroke),
    O2_mixed(a1,1)=O2_test_out(end);
else
    O2_mixed(a1,1)=(O2Enr_on_perc(a1,1)-
Valve_stroke(ValveStr_ind(end)))*...
(O2_test_out(ValveStr_ind(end)+1)-
O2_test_out(ValveStr_ind(end)))/...
(Valve_stroke(ValveStr_ind(end)+1)-
Valve_stroke(ValveStr_ind(end)))+...
O2_test_out(ValveStr_ind(end));
end

Qtotal_O2_input(a1,1)=(QAir_on_slpm(a1,1) + Q_O2_enr(a1,1)) *
O2_mixed(a1,1) * Perc2Frac;

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Oxygen transfer rate, [g/h] (whole bioreactor)

OTRV(a1,1)=( Qtotal_O2_input(a1,1) ...
-(QAir_on_slpm(a1,1) + Q_O2_enr(a1,1))* O2_on_perc(a1,1) *
Perc2Frac * RQ_corr(a1,1)) ...
/ min2h / Vm * Mr_O2;

if OTRV(a1,1)<=1.e-12, OTRV(a1,1)=1.e-12;end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Carbon evolution rate, [g/h] (whole bioreactor)

CERV(a1,1)=(-QAir_on_slpm(a1,1) * CO2_air - Q_O2_enr(a1,1) * 0.00 ...
+(QAir_on_slpm(a1,1) + Q_O2_enr(a1,1))* CO2_on_perc(a1,1) *
Perc2Frac * RQ_corr(a1,1)) ...
/ min2h / Vm * Mr_CO2;

if CERV(a1,1)<=1.e-12, CERV(a1,1)=1.e-12; end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Respiratory quotient, RQ, [mol/mol]

RQ(a1,1)=CERV(a1,1)/OTRV(a1,1) * Mr_O2/Mr_CO2;

if RQ<=1.e-12, RQ=1.e-12; end; if RQ>2.0, RQ=2.0; end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

% Carbon loss flow due to respiration/metabolism, [kg/h]

```

```
Fcl=max([ (CERV(a1,1)-OTRV(a1,1))*g2kg; 0]);
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
V(a1,1)= V(a1-1,1)+...  
    ((Ws_on_mL(a1)-Ws_on_mL(a1-1)) +...  
    (Wb_on_mL(a1)-Wb_on_mL(a1-1)) +...  
    (Wac_on_mL(a1)-Wac_on_mL(a1-1)) +...  
    (Waf_on_mL(a1)-Waf_on_mL(a1-1)) -...  
    0) *mL2L -...  
    (Fcl+Fe+Fsmpl)*dt_est;
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% Oxygen transfer rate OTR [g/L/h] and totalized amount tOTRV [g]  
OTR(a1,1)=OTRV(a1,1)/V(a1,1);  
tOTRV(a1,1)=tOTRV(a1-1,1)+OTR(a1,1)*dt_est;
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% Carbon evolution rate CER [g/L/h] and totalized amount tCERV [g]  
CER(a1,1)=CERV(a1,1)/V(a1,1);  
tCERV(a1,1)=tCERV(a1-1,1)+CERV(a1,1)*dt_est;
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% Dissolved oxygen saturation conc. calculation  
Press=Press_std+Press_Air*Press_std; %[Pa]  
%Maximal solubility of oxygen, [g/l]  
Os0 = C_H2O*Press*alpha_O/He; % Initial sensor calibration  
Os = C_H2O*Press*alpha_O/He * O2_mixed(a1,1).*Perc2Frac/O2_air; % Actual  
value
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% Coefficient of mass transfer from gas to liquid phase kLa [1/h]  
kLa(a1,1)=OTR(a1,1)/(Os - pO2_on_perc(a1,1)*Perc2Frac*Os0);  
if kLa(a1,1)<=0, kLa(a1,1)=0; end  
if kLa(a1,1)>kLamax, kLa=kLamax; end
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% Biomass conc. estimated from OTR  
miu(a1,1)=(OTR(a1,1)-Xest_OTR(a1-1,1)*YmXO)/(Xest_OTR(a1-1,1)*YrXO);  
dX_dt1(a1,1)=miu(a1,1)*Xest_OTR(a1-1,1)-(V(a1,1)-V(a1-  
1,1))/dt_est/V(a1,1)*Xest_OTR(a1-1,1);  
Xest_OTR(a1,1)=Xest_OTR(a1-1,1)+dX_dt1(a1,1)*dt_est;  
if Xest_OTR(a1,1)<0, Xest_OTR(a1,1)=0; end
```

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
```

```
% Biomass conc. estimated from CER
```

```

        miu2(a1,1)=(CER(a1,1)-Xest_CER(a1-1,1)*YmXC)/(Xest_CER(a1-1,1)*YrXC);
        dX_dt2(a1,1)=miu2(a1,1)*Xest_CER(a1-1,1)-(V(a1,1)-V(a1-
1,1))/dt_est/V(a1,1)*Xest_CER(a1-1,1);
        Xest_CER(a1,1)=Xest_CER(a1-1,1)+dX_dt2(a1,1)*dt_est;
        if Xest_CER(a1,1)<0, Xest_CER(a1,1)=0; end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

        % Biomass conc. estimated from base consumption rate BCR

        Xest_BCR(a1,1)=YrXB*Wb_on_mL(a1,1)/V(a1,1)/mL2L;
        if Xest_BCR(a1,1)<0, Xest_BCR(a1,1)=0; end

        Xest_AVG(a1,1)=(WX(1)*Xest_OTR(a1,1) + WX(2)*Xest_CER(a1,1) + ...
        WX(3)*Xest_BCR(a1,1))/sum(WX);

    end
    texp=[Laikas] ;
    Cexp=[Biomase] ;
%     Wgh=1.0;

    Cc=[interp1(Time,Xest_CER,texp)]; % Interpolation of the results

    DC=Cc-Cexp; % Deviations Simulation and
Experiment % Weighted Mean Square Value of
    EC=Wgh.*sum(DC.*DC); % Weighted Mean Square Value of
DC % New Performance Index
    residuum=sqrt(sum(EC)); % New Performance Index
(rms-value)
    Performindexn(ii)=sum(residuum.^2)/length(texp); % Determine the
optimization criterion

    subplot(5,1,1),plot (Time, Xest_OTR,Time, Xest_CER,Laikas, Biomase,'o')
    ylabel('Biomase [g/l]');
    xlabel('Laikas [h]');
    legend('OUR', 'CPR', 'offline')

    end

    Performindexna = sum( Performindexn);
    if Performindexna<Performindexa % Test for the performance index
    Performindexa=Performindexna % Update the current performance
    para=parr;

    figure (1)
    plot (Time, Xest_OTR,Time, Xest_CER,Time, Xest_BCR,Laikas, Biomase,'o')
    ylabel('Biomase [g/l]');
    xlabel('Laikas [h]');
    legend('OTR', 'CER', 'BCR', 'offline')

    figure (2)
    plot (Time, OTR,Time, CER)
    ylabel('OTR,CER [g/L/h]');

```

```

xlabel('Laikas [h]');
legend('OTR','CER')

figure (3)
plot (Time, O2_off_gass,Time, CO2_off_gass)
ylabel('O2 off gass,CO2 off gass [%]');
xlabel('Laikas [h]');
legend('O2 off gass','CO2 off gass')

figure (4)
plot (Time, V)
ylabel('Tūris V [l]');
xlabel('Laikas [h]');

figure (5)
plot (Time, O2Enr_on_perc)
ylabel('O2 vožtuvas [%]');
xlabel('Laikas [h]');

figure (6)
plot (Time, Wb_on_mL)
ylabel('Baze [ml]');
xlabel('Laikas [h]');

figure (7)
plot (Time, Xest_AVG, Laikas, Biomase,'o')
ylabel('Vidurkis X [g/l]');
xlabel('Laikas [h]');

end

end

parametras=para

```