RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE
Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte
Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūts

Oskars GRĪGS
Doktora studiju programmas «Vispārīgā ķīmijas tehnoloģija» doktorants

UZ MODELI BĀZĒTA BIOMASAS IZNĀKUMA OPTIMIZĀCIJA UN KONTROLE *E. coli* BL21 (DE3) HEPATĪTA B-KORANTIGĒNA (HBcAg) FERMENTĀCIJAS PROCESAM AR PIEBAROŠANU

Promocijas darbs

Zinātniskais vadītājs
Asoc. profesors *Dr. sc. ing.*
J. VANAGS

Konsultants
Profesors *Dr. sc. ing.*
V. GALVANAUSKAS

Rīga 2016

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūtā laika periodā no 2010. līdz 2015. gadam. Daļa promocijas darba pētījumu veikti ar ESF projekta nr. 2009/0207/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/128 «Latvijas starp-augstskolu starp-discilplinārās zinātniskās grupas izveide sistēmbioloģijā» finansējumu.

Promocijas darba vadītājs

Asoc. profesors *Dr. sc. ing.*

Juris Vanags (Vispārīgā ķīmijas tehnoloģijas katedra, Rīgas Tehniskā universitāte).

Konsultants

Profesors *Dr. sc. ing.*

Vytautas Galvanauskas (Automatizācijas katedra, Kauņas tehnoloģiju universitāte).

2016. gadā iesniegts aizstāvēšanai Rīgas Tehniskās Universitātes Ķīmijas inženierzinātnes nozares Promocijas padomē P–02.

PATEICĪBA

Izsaku pateicību promocijas darba zinātniskajam vadītājam profesoram *Dr. sc. ing.* Jurim Vanagam par promocijas darba tematiku, darba izstrādei nepieciešamās infrastruktūras nodrošināšanu un atbalstu. Izsaku pateicību Kauņas Tehnoloģiju Universitātes Automatizācijas katedras profesoram, *Dr. sc. ing.* Vytautam Galvanauskam par nesavtīgu dalīšanos ar vērtīgo pieredzi, konsultācijām darba problemātikas risināšanā un ilgstošu sadarbību un draudzību.

Vēlos pateikties RTU Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātes Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūta direktorei profesorei *Dr. sc. ing.* Līgai Bērziņai-Cimdiņai par padomiem zinātniskā darba izstrādē, doto iespēju strādāt RTU Rūdolfa Cimdiņa biomateriālu inovāciju un attīstības centrā. Sirsnīga pateicība pāragri mūžībā aizgājušajam profesoram – Rūdolfam Cimdiņam – par doto iespēju sākt darba gaitas RTU Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas katedrā. Paldies RTU VĶTI/RCBIAC kolektīvam par konsultācijām un atbalstu promocijas darba izstrādes laikā.

Īpaši liels paldies maniem kolēģiem no LV Koksnes ķīmijas institūta Bioinženierijas laboratorijas. Konstantīnam Dubencovam par ilgstošu sadarbību, par vērtīgajiem padomiem un pašaizliedzīgu asistēšanu zinātniskajā un praktiskajā laboratorijas darbā. Lienei Kungai, Anitai Trubačai un Artūram Šuleiko par ieguldīto darbu, asistēšanu zinātniskajā un praktiskajā darbā. Paldies Valērijai Stepanovai, Madarai Liepiņai un Elīnai Didrihsonei par zināmā laika nogrieznī ieguldīto darbu.

Sirsnīgs paldies profesorei *Dr. chem.* Ērikai Bizdēnai par dāvāto iespēju studiju pirmsākumos un to laikā praktizēties RTU Bioloģiski aktīvo savienojumu ķīmijas tehnoloģijas laboratorijā. Pēc profesores piedāvājuma aizsākās manas gaitas bioprocesu inženierijas jomā Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, liels paldies par to.

Paldies Biomedicīnas pētījumu un studiju centra Rekombinantu biotehnoloģijas grupai par ievirzīšanu mikrobioloģijas un fermentācijas procesu izpētes jomā, personīgi Andrim Dišleram, Ivaram Petrovskim, Ievai Bērzai un Inārai Akopjanai.

Paldies LU Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas institūta vadošajam pētniekam *Dr. biol.* Armandam Vīgantam, kā arī Ritai Šķerbakai par sadarbību analītisko mērījumu veikšanā.

Vislielākais paldies manai ģimenei par sapratni un atbalstu.

ANOTĀCIJA

FERMENTĀCIJAS PROCESS AR PIEBAROŠANU, ESCHERICHIA COLI, BIOREAKTORI, FERMENTĀCIJAS PROCESA MODELĒŠANA, UZ MODELI BĀZĒTA KONTROLE

Promocijas darba ietvaros, izmantojot matemātisko modelēšanu, tika noteikti dažāda veida un trajektorijas (substrāta) piebarošanas profili rekombinanta *Escherichia coli* BL21 (DE3) pBR327 hepatīta B kor-antigēna producenta biomasas ieguves fermentācijas procesam. Iegūtie piebarošanas profili paredzēti dažāda biomasas augšanas ātruma un iznākuma ieguvei dotajam procesam. Darba ietvaros ieviestas un aprobētas iepriekšnoteikto piebarošanas profilu izmeklētas piebarošanas ātruma tiešsaistes kontroles metodes – kontrole pēc pO_2, un uz modeli bāzēta kontrole ar prognozi, kur abas metodes nodrošina augstāku procesa drošību un atkārtojamību, kas vēlamas GMP tipa procesiem.

Darba izstrādes laikā tika realizēti priekš-eksperimenti kolbās, fizikālķīmisko parametru temperatūras un pH ietekmes noteikšanai uz biomasas iznākumu, kā arī veikti biomasas mērījuma precizitātes un kļūdu aprēķini. Piebarošanas profilu aprēķinam tika veikta fermentācijas procesu modelēšana, sākotnēji lietojot kolbu eksperimentu datus, tad modelējot fermentācijas procesus ar piebarošanu 5 l bioreaktora procesam. Tika identificēti 2 dažādas sarežģītības fermentācijas procesa modeļi kolbu un bioreaktora mērogiem, kur sarežģītākā modeļa gadījumā tika ņemta vērā acetātu uzkrāšanās. Identificētais vienkāršotais matemātiskais modelis, kurā netiek ņemta vērā acetātu ietekme, tika lietots uz modeli bāzētai piebarošanas ātruma kontrolei ar prognozi, realizācijai.

Literatūras apskatā apkopota un izvērtēta informācija par laika periodu no 1949. gada līdz 2016. gadam.

Promocijas darbs uzrakstīts latviešu valodā, tā apjoms 114 lpp. Darbs satur 24 attēlus, 16 tabulas, 1 pielikumu, un tajā izmantoti 148 literatūras avoti.

ANNOTATION

FED-BATCH FERMENTATION PROCESS, ESCHERICHIA COLI, BIOREACTORS, FERMENTATION PROCESS MODELING, MODEL BASED CONTROL

Within doctoral work were evaluated and applied various type and trajectory (substrate) feeding profiles for recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) pBR327 hepatitis B core antigen producer biomass production fermentation process. Evalutaed feeding profiles are devised to be aplicable for the various biomass growth rate and yield fermentation proceses provission. Were introduced and aprobed evaluated feeding profile advanced on-line control methods – control depending on pO_2 signal, and model predictive control, where both methods ensure higher process sfety and reproducibility standarts, desirable for GMP processes.

Prior flask experiments were realized to detect temperature and pH influence on biomass yield, as well as to calculate biomass measurement precision and errors. The fermentation process modeling was made for the fed-batch profile calculations, where for the initial model identification, were used the data from flask experiments, and later for model re-identification the data from the 5 l bioreactor fed-batch fermentation proceses were used. Two models with different complexity were identified for flask and 5 l bioreactor scales, where in the more complex model, the accumulation of the acetate was taken into consideration. The identified simplified mathematical model, where no acetate influence was taken in to account, was used for realization of feeding profile model predictive control.

In the review of the literature, the summarized and analyzed information correspond to sources published from year 1949 till 2016.

The theses are written in Latvian language, the volume of 114 pp. Thesis contains 24 figures, 16 tables, 1 attachment and 148 sources of used literature.

SATURS

1. IEVADS 12

2. LITERATŪRAS APSKATS 15

2.1. Principiāli mikroorganismu kultivēšanas un fermentācijas procesu ar piebarošanu kontroles aspekti 15

2.2. *Escherichia coli* biotehnoloģija 18

2.2.1. Rekombinanto olbaltumvielu sintēze 18

2.2.2. Kultivēšanas process 20

2.3. Bioreaktori 22

2.4. Fermentatīvo kultivēšanas procesu modelēšana 25

2.4.1. Pirmās kārtas modeļi 28

2.4.2. Hibrīdie modeļi 29

2.5. Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole (kontrole ar atgriezenisko saiti) 31

2.5.1. Sensori 33

2.5.2. Pastarpināta piebarošanas ātruma kontrole pēc kāda no procesa parametriem 39

2.5.3. Uz modeli bāzēta piebarošanas ātruma kontrole ar prognozi 41

2.6. Literatūras apskata kopsavilkums 42

3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA 45

3.1. Iakārtas un aprīkojums 46

3.1.1. Laboratorijas bioreaktors EDF-5.4/BIO-4 46

3.1.2. Vienreiz lietojamais laboratorijas bioreaktors CellVessel 5.7 48

3.1.3. Papildaprīkojums 48

3.2. Kultivēšana 49

3.2.1. Mikroorganismu kultūra 49

3.2.2. Kultivēšanas apstākļi 49

3.2.3. Piebarošanas ātruma aprēķins un kontrole 50

3.3. Analītiskie mērījumi 52

3.4. Procesu modelēšana 52

3.4.1. Modeļi un modeļa parametri 52

3.4.2. Modeļu precizitātes aprēķināšana 54

3.4.3. Diferenciālvienādojumu integrēšana 54

3.5. Biomasas veidošanās limitējošo faktoru novērtējums 54

3.5.1. Kolbu eksperimenti 54

3.5.2. Bioreaktora eksperimenti 57

3.6. Kontroles algoritmi 58

3.6.1. Piebarošanas ātruma pastarpināta kontrole pēc pO_2 59

3.6.2. MPC kontrolieris un piebarošanas ātruma kontroles algoritms 61

4. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS 66

4.1. Biomasas optimizācijas pētījums *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kolbu mērogam 66

4.1.1. Procesa un sistēmas iepazīšanas priekšeksperimenti 66

4.1.2. Optimizācija 67

4.2. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru piemeklēšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 partijas tipa kultivēšanas procesam kolbās 69

4.3. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru piemeklēšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 bioreaktora partijas procesam ar piebarošanu 77

4.3.1. Piebarošanas procesa modelis ar kinētiskiem un masas līdzsvara X, S, V un A vienādojumiem 78

4.3.2. Piebarošanas procesa modelis ar kinētiskiem un masas līdzsvara X, S un V vienādojumiem 83

4.4. Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole pēc pO_2 *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam 88

4.5. Izmeklēta, uz modeli bāzēta piebarošanas ātruma kontrole *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam ar prognozi pēc references profilu datiem 90

4.5.1. Automātiska piebarošanas sākšana 91

4.5.2. Biomasas profila tiešsaistes kontrole 92

SECINĀJUMI 97

LITERATŪRA 98

DARBA APROBĀCIJA 111

DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI UN APZĪMĒJUMI

AB	Augsta biomasas iznākuma procesi;
ANN	Mākslīgie neironu tīkli;
BL21 (DE3)	*Echerichia coli* celma veids;
CER	Oglekļa dioksīda izdalīšanās ātrums, g/kg/h;
CIP	Sterilizēšana uz vietas;
DNS	Dezoksiribonukleīnskābe;
GMP	Laba ražošanas prakse;
H	Henrija konstante, Pa;
HBcAg	Hepatīta B kor-antigēns;
HBV	Hepatīta B vīruss
J	Kontroles novērtēšanas funkcija, g;
MPC	Uz modeli bāzēta kontrole/kontrolieris ar prognozi;
OD	Optiskais blīvums, rel. vien.;
OTR	Skābekļa pārneses ātrums, g/kg/h;
OUR	Skābekļa uzņemšanas ātrums, g/kg/h;
PAT	Procesu analītiskās tehnoloģijas;
pBR327	Plazmīdas veids;
pH	Ūdeņraža jonu aktivitātes negatīvais logaritms;
PID	Proporcionālais, Integrālais un Atvasinātais koecicienti PID tipa kontrolierim;
PLC	Programmējams loģiskais kontrolieris;
RE	Rauga ekstrakts;
RQ	Elpošanas koeficients, g/g;
R^2	Korelācijas kvalitāte;
Q^2	Prognozes kvalitāte;
T	Temperatūra, ºC;
t	Procesa laiks, h;
t_H	Kontroles horizonta laiks, h;
t_{RE}	Rauga ekstrakta uzņemšanas laiks, h;
VLB	Vienreiz lietojamais bioreaktorus;
VLP	Vīrusiem līdzīgās daļiņas;
F_{ac}	Skābes padošanas ātrums, pie pH regulācijas, l/h;

F_{af}	Pretputu līdzekļa padošanas ātrums, l/h;
F_b	Bāzes padošanas ātrums, pie pH regulācijas, l/h;
F_c	CO_2 Masas zudumu , l/h;
F_{iztv}	Iztvaikošanas ātrums, g/h;
F_{par}	Paraugu ņemšanas daudzums, g/h;
F_s	Substrāta piebarošanas ātrums, g/h;
F_{sRef}	References piebarošanas ātruma profils, g/h;
k_La	Tilpuma masas pārneses koeficients priekš O_2, 1/h;
n	Maisītāja apgriezienu ātrums, apgr./min.;
pCO_2	Izšķīdušā CO_2 parciālais spiediens, %;
pO_2	Izšķīdušā skābekļa parciālais spiediens, %;
p, P	Gāzu parciālais spiediens, Pa;
q	Specifiskais reakcijas / komponenta koncentrācijas izmaiņas ātrums, g/g/h;
a, A	Acetātu koncentrācija, g/l;
o_2, O_2	Skābekļa koncentrācija, g/l;
c_p, C_p	Produkta koncentrācija, g/l;
s, S	Substrāta koncentrācija, g/l;
x, X	Biomasas koncentrācija, g/l;
s_f	Substrāta koncentrācija piebarojamajā, g/l;
c, C	Koncentrācija, g/l;
o_2	Skābekļa koncentrācija, g/l;
$o_š$	Skābekļa šķīdība, g/l;
Y_{ij}	Komponenta *i* iznākums no komponenta *j*, g/g;
Y_{xa}	Biomasas iznākums no acetātiem gadījumam, kad netiek sintezēti acetāti, g/g;
Y_{xar}	Biomasas iznākums no acetātiem gadījumam, kad tiek sintezēti acetāti, g/g;
m	Biomasas fizioloģisko funkciju uzturēšanai nepieciešamā enerģija, g/g/h;
K_s	Mono konstante substrāta uzņemšanai, g/kg;
K_{O2}	Mono konstante skābekļa uzņemšanai, g/kg;
$K_{i,s}$	Substrāta inhibīcijas konstante, g/kg;
$K_{i,a}$	Acetātu inhibīcijas konstante, g/kg;
K_{ra}	Acetātu uzņemšanas represijas konstante, g/kg;
K_{xMax}	Procesa laikā maksimāli sasniedzamā biomasa, g/l;
q_{ar}, q_{au}	Specifiskie acetātu rašanās/uzņemšanas ātrumi, g/g/h;
$K_{r,a}$	Acetātu uzņemšanas represijas konstante (raksturo substrātu konkurenci), g/kg;

$K_{x,au}$	Biomasas inhibēšana acetātu uzņemšanā, g/kg;
XV	Kultūras masa, g;
V	Kultūras tilpums, tilpums, l;
(t)	Laika profils;
α_{O2}	O_2 masas daļa gaisā;
μ	Īpatnējais biomasas augšanas ātrums, g/l;
Θ	Pielāgojamo (identificējamo) modeļa parametru vektors;
r_i	Modelētā *i* komponenta relatīvā novirze no eksperimentālajiem datiem izteikta %; *i* komponenta relatīvā novirze no eksperimentālajiem vai modelētajiem datiem, %.

Apakšraksts:

$_{0}$ – sākotnējā vērtība;

$_{a, A}$ – acetāts;

$_{o, o2, O, O2}$ – skābeklis;

$_{H2O}$ – Ūdens;

$_{p, P}$ – produkts;

$_{s, S}$ – substrāts;

$_{x, X}$ – biomasa;

$_{b}$ – bāze;

$_{c}$ – Ogleklis, oglekļa dioksīds;

$_{af}$ – pretputu līdzeklis;

$_{Min}$ – minimālā vērtība;

$_{Max}$ – maksimālā vērtība;

$_{Kr}$ – kritiskā vērtība;

$_{end}$ – beigu vērtība;

$_{est}$ – novērtētā vērtība;

$_{exp}$ – eksperimentāla vērtība;

$_{progn}$ – prognozētā vērtība;

$_{ref}$ – references vērtība;

1. IEVADS

Mikroorganismu fermentācijas procesos ar piebarošanu, ko realizē bioreaktoros, iegūst unikālus produktus, kam ir liela nozīme un pieprasījums pasaules tautsaimniecībā. Šādos procesos būtiska loma ir precīzai substrāta piebarošanas ātruma kontrolei (piebarošanas profilam), kas tiešā mērā jutīgi ietekmē biomasas augšanas ātrumu un tās iznākumu procesa beigās. Iepriekšminētajam ir izšķirīga nozīme biomasas sintezētā mērķa produkta ieguvē ar maksimālu iznākumu un kvalitāti.

Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs ir izstrādājis *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 hepatīta B kor-antigēna (HBcAg) producentu, kur HBcAg tiek intensīvi pētīts vakcīnas ieguvei pret hepatīta B vīrusu kā līdzeklis dažādu hepatīta B stadiju diagnostikā un kor-antigēna kapsīdu struktūras izmantošanā kā dažādu imunoloģisko epitopu un poli-/oligonukleotīdu gēnu un imūnsistēmu stimulējošo sekvenču nesējs. Aktuāla ir šā producenta kultivēšanas procesa pārnese no kolbu (0,5 l) uz laboratorijas bioreaktora (5 l) mērogu, kas ir starpposms no procesa mērogošanas līdz 5–10 m^3 apjomiem. Viens no būtiskākajiem šā procesa mērogošanas uzdevumiem ir atbilstoša piebarošanas ātruma profila izraudzīšanās un tā kontrole procesa laikā, lai nodrošinātu kontrolētu un optimālu biomasas pieaugumu.

Izaicinājumu piebarošanas ātruma kontrolē fermentācijas procesos rada apstāklis, ka procesa laikā pie izteikti mainīga īpatnējā substrāta uzņemšanas ātruma (*E. coli* glikozes uzņemšanas gadījumā tas ir robežās 0,5–1,0 g-substrāta/g-šūnu/h), ko ietekmē šūnu fizioloģiskais stāvoklis, fizikālķīmiskie un tehnoloģiskie parametri, piebarojamā substrāta koncentrācija fermentācijas vidē nepārtraukti jāuztur šaurās, zemas koncentrācijas robežās, kas tipiski *E. coli* procesiem ar glikozes piebarošanu ir ar kārtu 10^{-2}–10^{-4} g/l. Realizējot šādus nosacījumus, iespējams nodrošināt biomasas augšanas ātruma kontroli vēlamajās 0,20–0,45 g-šūnu/g-šūnu/h robežās, pie kuras nenotiek nevēlama blakusprodukta – acetātu – uzkrāšanās.

Atbilstošu substrāta piebarošanas ātruma kontroli iespējams nodrošināt, veicot uz modeli bāzētu piebarošanas ātruma profila aprēķinu un to kombinējot ar izmeklētām piebarošanas ātruma kontroles metodēm. Šim nolūkam ir nepieciešams precīzs fermentācija procesa modelis, ar kuru iespējams modelēt procesa stāvokļa mainīgos – biomasas (x), substrāta (s) un acetātu (a) koncentrācijas. Vienkāršots procesa modelis, bez acetātu ietekmes modelēšanas, var tikt lietots uz modeli bāzētā piebarošanas ātruma kontrolē ar prognozi (MPC). Šāda tipa procesu kontrolē lietderīgi lietojama arī izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole pēc kāda no sensoru (pH vai pO_2) tiešsaistes rādījumiem.

Aizstāvamās tēzes

1. Augstu biomasas produktivitāti, kam ir būtiska loma rekombinanto olbaltumvielu ieguves procesos, iespējams nodrošināt tikai ar kontrolētu substrāta piebarošanu.
2. Kontrolētu substrāta piebarošanu iespējams nodrošināt veicot fermentācijas procesa matemātisko modelēšanu, kā arī pielietojot izmeklētas piebarošanas ātruma kontroles metodes.

Promocijas darba mērķis: ir, lietojot uz modeli bāzētu fermentācijas procesa aprēķinu un izmeklētu piebarošanas ātruma kontroli, iegūt piebarošanas profilu un to kontrolēt *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 fermentācijas procesā optimāla un kontrolēta biomasas iznākuma ieguvei procesa beigās.

Promocijas darbā izvirzītā mērķa sasniegšanai izvirzīti sekojoši uzdevumi:

1. Veikt biomasas optimizācijas pētījumu.
2. Dažādas sarežģītības kultivēšanas modeļu un modeļa parametru noteikšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 partijas procesam kolbās.
3. Dažādas sarežģītības kultivēšanas modeļu un modeļa parametru noteikšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 bioreaktora partijas procesam ar piebarošanu.
4. Izmeklētas piebarošanas ātruma kontroles pēc pO_2 aprobācija.
5. Izmeklētas uz modeli bāzētas piebarošanas ātruma kontroles ar prognozi realizācija un aprobācija.

Darba zinātniskā novitāte

1. Jauna un unikāla rekombinanta *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 hepatīta B kor-antigēna producenta (Latvijas Biomedicīnas pētījumumu un studiju centrs) uz modeli bāzēta biomasas ieguves fermentācijas procesa optimizācija, kuras ietvaros noteikti procesam optimālie piebarošanas ātruma ($F_s(t)$) un biomasas ($x(t)$) profili, un realizēta doto profilu izmeklēta kontrole tiešsaistes režīmā.
2. Analizēta *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 fermentācijas procesa stāvokļa mainīgo – biomasas (x), substrāta (s) un acetāta (a) aprakstošo matemātisko modeļu precizitāte un atbilstošajiem modeļiem noteikti specifiskie/unikālie modeļa parametri.

Darba praktiskā nozīme

1. Noteiktie optimālie piebarošanas un biomasas augšanas profili kombinācijā ar aprobētajām izmeklētajām piebarošanas ātruma kontroles metodēm var tikt lietoti rekombinantā *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 hepatīta B kor-antigēna ieguves fermentācijas procesa mērogošanai un kontrolei pilota/ražošanas procesiem.
2. Aprakstītā modeļa un modeļa parametro noteikšanas metodoloģija var tikt lietota līdzīgu fermentācijas procesu modeļu un modeļa parametru noteikšanai.
3. Izmeklētās piebarošanas ātruma kontroles metodes realizētas un aprobētas A/S «Biotehniskais centrs» komerciālās bioreaktoru kontroles sistēmās.

Darba aprobācija

Par promocijas darba zinātniskiem sasniegumiem un galvenajiem rezultātiem ziņots 11 starptautiskās zinātniskās konferencēs, piecās pilna teksta zinātniskās publikācijās un trīs recenzētās konferenču tēzēs. Autora publikāciju saraksts publicēts darba beigās.

2. LITERATŪRAS APSKATS

2.1. Principiāli mikroorganismu kultivēšanas un fermentācijas procesu ar piebarošanu kontroles aspekti

Pasaules tautsaimniecības un sociālajai izaugsmei būtisku devumu dod biotehnoloģiski realizētie mikroorganismu fermentatīvie kultivēšanas procesi bioreaktoros. Biosintēzes un biokonversijas rezultātā šādus procesus realizē, kāda mērķa produkta ieguvei. Nozares tendences iezīmē patstāvīgu pieprasījumu pēc produktiem, kā biofarmācijas preparāti (antibiotikas, rekombinantās olbaltumvielas, hormoni, monoklonālās antivielas u. c.), analogi savienojumi ķīmiskajā rūpniecībā iegūstamajiem (enzīmi, organiskās skābes, ogļhidrāti, polimērmateriāli u. c.), pārtikas industrijā lietojamie savienojumi u. c. [1–5]. Līdz ar rekombinantās DNS tehnoloģijas attīstību, fermentācijas tehnoloģija ievērojami attīstījās rekombinanto olbaltumvielu ieguves jomā, pielietojot dažādas baktēriju, raugu, dzīvnieku šūnu un mikroorganismu kultūras. Savu devumu mikroorganismu biotehnoloģiskā pielietojuma veicināšanā, sekmējuši sasniegumi šūnu metabolisma inženierijas jomā [6, 7]. Medicīnas un slimību diagnostikas attīstība, kā arī slimību cēloņu izzināšana, sekmē to, ka pēdējās desmitgades ietvaros ar biotehnoloģijas metodēm iegūstamo rekombinanto olbaltumvielu un ar to ieguvi saistīto procesu skaits pārsniedz 200 [8]. Sakarā ar infekcijas slimību ierosinātāju pakāpenisku noturības veidošanos pret medicīnas praksē kādu laiku jau lietotām antibiotikām, ir nepieciešamība tās uzlabot un aizstāt [9, 10]. Latvijā un pasaulē ievērojami pētījumi norit vīrusiem līdzīgo daļiņu (VLP), tajā skaitā rekombinantā hepatīta B kor-antigēna (HBcAg) ieguves jomā [11–15]. Interesi par hepatīta B vīrusa (HBV) gēnu klonēšanu un ekspresiju rada perspektīva *E. coli* fermentācijas procesā iegūt vakcīnas pret HBV, līdzekļus dažādu hepatīta B stadiju diagnostikā, kā arī kor-antigēna kapsīdu struktūras izmantošana, kā dažādu imunoloģisko epitopu un poli-/oligonukleotīdu gēnu un imunistēmu stimulējošo sekvenču nesēju [16–19]. Tiek intensīvi pētīta HBcAg un tā paveidu ieguve ar *Echerichia coli (E. coli), Saccharomyces cerevisiae (S. cerevisiae)* un *Pichia pastoris (P. pastoris)* mikroorganismu kultūrām.

Stingras prasības biofarmācijas produktu ieguvē un realizācijai attiecīgajos reģionos, atbilstoši labas ražošanas prakses (GMP) vadlīnijām, noteikušas Eiropas Savienība [20], ASV [21] un citas attīstītās valstis. Produkta ieguves galvenā stadija notiek bioreaktoros, pēc kuras seko produkta izdalīšana un attīrīšana. Līdzās tradicionālo nerūsējošā tērauda bioreaktoru pielietošanai fermentācijas procesa realizācijai, pēdējās desmitgades laikā pielietojumu ir

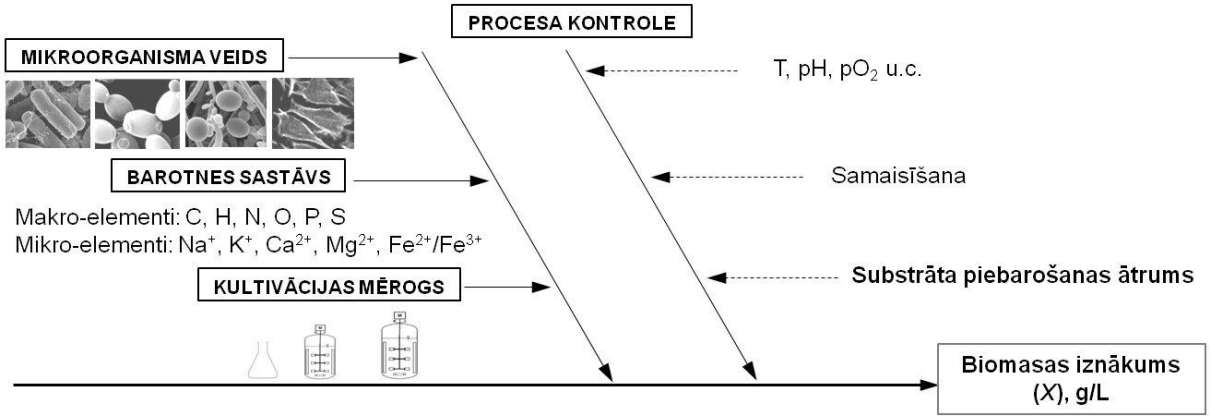
radušas vienreiz lietojamās, no polimērmateriāliem veidotās, bioreaktoru sistēmas [22]. Ar to palīdzību iespējams uzsākt ražošanu ar mazākiem kapitālieguldījumiem, vienkāršot ražošanas rutīnas darbības, kā arī būtiski atvieglot ražošanas validāciju atbilstoši GMP prasībām.

Biofarmācijas industrijā dominē mikroorganismu kultivēšanas procesi ar piebarošanu, ar kuru palīdzību iespējams iegūt augstāku produktivitāti dēļ ievērojami augstākiem biomasas koncentrācijas (X) iznākumiem procesa beigās, salīdzinājumā, piemēram, ar periodiskiem (partijas) tipa procesiem. Mazāk, bet tiek pielietoti arī perfūzijas (ar filtrāciju) un nepārtrauktie procesi [23, 24]. Tomēr procesi ar piebarošanu ir sarežģītāk izstrādājami un kontrolējami, jo pamatā šādos procesos jānodrošina limitēta substrāta koncentrācija kultūras vidē dēļ apstākļa, ka substrāta koncentrāciju kultūras vidē, variējot piebarošanas ātrumu atkarībā no optimālā mikroorganismu specifiskā augšanas un substrāta patēriņa ātruma, nepārtraukti jāuztur šaurās, zemas koncentrācijas robežās, kas tipiski izmantojamo substrātu un mikroorganismu gadījumā ir ar kārtu 10^{-2}–10^{-4} g/l [25, 26]. Piebarošanas ātrums tiešā mērā jutīgi ietekmē biomasas un produkta veidošanos ar augstu produktivitāti, kas ir būtisks apstāklis, nosakot produkta cenu un tā konkurētspēju tirgū. Tādēļ viens no industriālās biotehnoloģijas lielākajiem stūrakmeņiem, it īpaši rekombinanto olbaltumvielu ieguvē, ir saistīts ar precīzi kontrolētas substrāta piebarošanas nodrošināšanu, kā rezultātā iespējams iegūt optimālu biomasas pieaugumu, kas tieši ietekmē katra konkrēta tehnoloģiskā procesa produktivitāti (skat. 2.1. att.).

Limitēta substrāta kontrolei, dinamiski mainīgs piebarošanas ātruma profils atkarībā no procesa laika $F_s(t)$ (kontrole bez atgriezeniskās saites) var tikt izraudzīts, vai arī piebarošanas ātruma kontrole atkarībā no kāda procesa tiešsaistes sensoru mērījumiema, vai arī procesa sensoru mērījumu sasaistīšana ar biomasas augšanas ātrumu, F_s (*procesa parametrs*), var tikt izraudzīta limitētai substrāta kontrolei ar atgriezenisko saiti. Pieaugot šūnu koncentrācijai uz tilpuma vienību, kā arī ņemot vērā to, ka procesa laikā mainās maksimālais substrāta uzņemšanas ātrums (q_{sMax}) ar kādu mikroorganismi spēj uzņemt nepieciešamo substrātu biomasas vai mērķa produkta veidošanai, nepieciešams nodrošināt atbilstošu, laikā mainīgu substrāta padevi, tādējādi procesa gaitā pielāgojoties specifiskajām procesa prasībām. Izraugoties kontroli bez atgriezeniskās saites, mikrobioloģisko procesu jūtības dēļ, tajā skaitā sakarā ar dažādiem procesa mainīgajiem apstākļiem, piemēram, tādiem, kā atšķirīga biomasas/substrāta procesa sākuma koncentrācija, īslaicīgas novirzes no uzstādītajiem procesa vadības fizikāli ķīmiskajiem parametriem, jaunas barotnes izejvielu partijas lietošana u. c., biomasas augšanas ātrums var novirzīties no iepriekš noteiktā, kā rezultātā var notikt nevēlama "pārbarota" vai pretēji – limitēta mikroorganismu augšana [27]. Tas var novest pat

pie partijas zuduma, ja vien neseko tūlītēja, atbilstoša manuāla vai automātiska piebarošanas ātruma korekcija. Šī apstākļa dēļ, piebarošanas ātruma kontrole ar atgriezenisko saiti, pielietojot izmeklētas piebarošanas ātruma kontroles, tajā skaitā uz modeli bāzētās, metodes, sekmē GMP prasībām atbilstošas kontroles nodrošināšanu.

Izmeklētu piebarošanas ātruma kontroles metožu pielietošana, savukārt prasa zināmas modelēšanas iemaņas, kā arī specifiska, bieži vien sarežģīta un dārga aprīkojuma pielietošanu. Sterilitātes nodrošināšana veicot analītiskos mērījumus, kā arī sensoru funkcionalitātes (t.i. kalibrācijas) saglabāšanās pēc sterilizācijas un sensoru materiālu savietojamība ar kultivācijas vidi. Šīs prasības izteikti ierobežo biotehnoloģijā izmantojamo sensoru klāstu. Līdz ar to praksē trūkst pietiekami aprobētas tiešās biomasas un substrāta koncentrācijas noteikšanas metodes tiešsaistes režīmā, atgriezeniskās saites nodrošināšanai piebarošanas ātruma kontroles vajadzībām. No tehnoloģijas realizācijas aspektiem, katrai atsevišķai kontroles metodei jābūt pietiekami efektīgai, tajā pašā laikā tā nedrīkst būt arī pārāk sarežģīta, kas iespējami apgrūtinātu tās ieviešanu un validāciju.



2.1. attēls. Biomasas iznākumu ietekmējošie faktori

Optimālā piebarošanas profila aprēķinam, lietderīgi veikt procesa matemātisko modelēšanu [28], tādējādi ar noteiktu precizitāti kvalitatīvi un kvantitatīvi aprakstot biomasas, substrāta, un produktu koncentrāciju, kā arī kultūras tilpuma maiņas dinamiku, kas dod iespēju ar zināmu precizitāti izvēlēties atbilstošu, dinamiski mainīgu, substrāta piebarošanas ātruma profilu kā referenci, kas pie nepieciešamības var tikt koriģēta pielietojot izmeklētas piebarošanas ātruma kontroles metodes kā piebarošanas pastarpināta kontrole pēc izšķīdušā skābekļa parciālā spiediena (pO_2, uz modeli bāzēta piebarošanas ātruma kontrole ar prognozi u. c.). Tādējādi, matemātiskā modeļa noteikšna, kas ietver būtiskāko procesu aprakstošo kinētisko un masas līdzsvara vienādojumu sastādīšanu, kā arī šo vienādojumu (modeļa) parametru optimizāciju, ir procedūra, kas jāveic, lai iegūtu labu modeļa sakritību ar

eksperimentālajiem datiem un realizētu precīzu uz modeli bāzētu kontroli. Modeļa atkārtotu noteikšanu jeb uzlabošanu, ja modelētie lielumi nepietiekami labi apraksta eksperimentālos rezultātus, var veikt secīgi no eksperimenta uz eksperimentu. Fermentācijas procesa matemātiskā modelēšana nodrošina padziļinātāku un uz aprēķiniem balstītu procesa izpratni, kas var ievērojami samazināt tehnoloģijas izstrādes laiku un izmaksas, dēļ labāk plānotiem eksperimentiem, kā arī sekmējot procesa validācijas un biežo re-validācijas procedūru veikšanu [20, 21]. Tas dod iespēju arī industrijā pielietot piebarošanas ātruma uz modeli bāzētu kontroli ar prognozi [29, 30].

2.2. *Escherichia coli* biotehnoloģija

2.2.1. Rekombinanto olbaltumvielu sintēze

E. coli ir baktērijas, kas parasti sastopamas siltasiņu dzīvnieku (ieskaitot cilvēku) zarnu traktā. Tās ir gram-negatīvas, sporas neveidojošas un nosacīti anaeroba baktērijas. Tām ir nūjiņveida forma ar ieapaļiem galiem, 2,5 μm garumā un 0,8 μm platumā. Šūnai augot, tā paliek garāka un tad vidusdaļā dalās uz pusēm. *E. coli* ir viens no biotehnoloģijā visbiežāk lietotajiem saimniekorganismiem ar pieejamām dažādām ekspresijas sistēmām rekombinanto olbaltumvielu ekspresijai [31, 8]. Tomēr *E. coli* pielietojumam olbaltumvielu ieguvē ir arī zināmi praktisi ierobežojumi. Piemēram, *E. coli* nav piemērots daudzu lielu un kompleksu olbaltumvielu, sintēzei, kas satur disulfītu saites, vai proteīnus, kam nepieciešamas pēctranslācijas modifikācijas. Svešu olbaltumvielu stabilitāte *E. coli* var būt vāja dēļ proteolitiskās degradācijas, kā arī, ja olbaltumvielas sintezētas lielā daudzumā, bieži vien veidojas kā ieslēguma ķermeņi (*inclusion bodies*), kurus pēc tam nepieciešams ar dārgām un sarežģītām metodēm denaturēt un mainīt to struktūru, lai iegūtu to funkcionējošas formas. Vairums paņēmienu, kas ietver dažādu promoteru un saimniekorganismu pielietošanu, šaperonu (*chaperone*) ko-ekspresiju un kultivācijas vides apstākļu maiņu, tika pielietotas, lai risinātu dažas no šīm problēmām. Papildus, zinātnieki izstrādājuši dažādas metodes, lai novadītu rekombinanto olbaltumvielu sintēzi dažādos šūnu nodalījumos [32]. *E. coli* sastāv no iekšējās un ārējās membrānas, kas norobežo tās organisma trīs sadaļas: citoplazmu, periplazmu un ārpusšūnas telpu. Rekombinantās olbaltumvielas var tikt novirzītas uz vienu no šīm sadaļām. Ekspresijas sistēmas izvēle augsta līmeņa olbaltumvielu sintēzei ir atkarīga no faktoriem, kā šūnu augšanas raksturs, ekspresijas līmenis, iekššūnas vai ārpusšūnas biosintēze, un mērķa olbaltumvielas bioloģiskā aktivitāte. Papildus, katra ekspresijas sistēma

prasa specifiskas izmaksas, kas saistās ar procesa izstrādi un ekonomiskiem aprēķiniem. Lēmums par rekombinantās olbaltumvielas novirzīšanu uz citoplazmu, periplazmu vai ārpušūnas vidi, balstās uz katras atsevišķas ekspresijas sistēmas iespējām, priekšrocībām un trūkumiem. Gadījumos, kad par olbaltumvielas ekspresijas vietu izvēlēta citoplazma, olbaltumvielu uzkrāšanās lielos daudzumos bieži realizējas ar ieslēguma ķermeņu veidošanos. Ieslēguma ķermeņu veidošanās notiek līdz ar to, ka tie ir šūnai vieglāk sintezējami starpprodukti nekā dabīga, neiepakota proteīna veidošana. Vispārīgi pieņemts, ka augsta nedabīgu olbaltumvielu ekspresija (vairāk par 2 % no kopējā šūnu proteīna) un augsti hidrofobas olbaltumvielas īpašības, būs pakļautas biosintēzei ieslēguma ķermeņu veidā [33]. Daži ekspresijas paņēmieni izstrādāti, lai sekmētu natīvu struktūru veidošanos citoplazmā. Šīs metodes ietver molekulāro šaperonu (*chaperone*) ko-ekspresiju, tioredoksīna (*thioredoxin*) nepietiekošu saimniekorganismu lietošana, lai nodrošinātu vēlamu redoks-potenciālu, olbaltumvielu sintēzes ātruma samazināšana, kultivēšanas temperatūras samazināšana, un augsti šķīstosu sasaistes polipeptīdu pielietošana. Tomēr, lai gan dažu olbaltumvielu monomēru un multimēru ieguves iznākumi tika palielināti, dažādu biosontēzes uzlabošanas metožu priekšrocības ir sintezējamās olbaltumvielas specifiski. Piedevām, šķīstošo mērķa olbaltumvielu attīrīšana no citoplazmas olbaltumvielām ir relatīvi sarežģīta, jo citoplazma satur lielāko vairumu no visām šūnas olbaltumvielām. Pretstatā tam, bioloģiski aktīvu olbaltumvielu iegūšanai no ieslēguma ķermeņiem, ir atsevišķas priekšrocības. Pirmkārt, ieslēguma ķermeņi var tikt akumulēti citoplazmā daudz augstākos daudzumos (ierasti 25 % no kopējā olbaltumvielu daudzuma) nekā šķīstošās olbaltumvielas. Otrkārt, ieslēguma ķermeņi sākotnēji var tikt izdalīti ar augstu tīrības un koncentrētības pakāpi, veicot vienkāršu centrifugēšanu, kas parasti būtiski samazina attīrīšanas procesa prasības, ar kuru palīdzību jāatbrīvojas no saimniekorganisma piemaisījuma olbaltumvielām. Treškārt, ieslēguma ķermeņiem nav bioloģiskās aktivitātes, kas sekmē šūnai svešu olbaltumvielu ekspresiju, kas citādi tām būtu toksiskas *E. coli*. Ceturtkārt, ieslēguma ķermeņi ir noturīgi pret *E. coli* proteolīzi, kas nodrošina augstākus produkta iznākumus. Visbeidzot, gala olbaltumvielu titri *E. coli* var tikt būtiski paaugstināti kultivēšanas procesos ar augstu šūnu iznākumu, kas padara iespējamu iegūt ap 100-200 g šūnu sausnes no litra. Tomēr, sarežģīti un dārgi denaturācijas un dabīgās struktūras iegūšanas starpprocesi bieži nepieciešami šādos gadījumos, lai iegūtu rekombinantās olbaltumvielas dabīgu struktūru. Atsevišķām olbaltumvielām gala šķīstošo frakciju iznākumi var būt samērā zemi, kas padara to iegūšanu no ieslēguma ķermeņiem nepievilcīgu [31].

Olbaltumvielas gala pielietojums ir svarīgs apstāklis plānojot tās ražošanu, jo tas noteiks nepieciešamo produkta tīrību un ar tās ražošanu saistītās izmaksas. Piemēram, enzīmiem, kas lietoti cietes pārstrādē, jābūt ražotiem lielā daudzumā, un to tīrības pakāpe var nebūt augsta. Savukārt medicīnā pielietotām olbaltumvielām cilvēka slimību apkarošanā, nepieciešami mazi daudzumi, bet uz tām attiecas striktas prasības pret produkta tīrību un sekvenču autentiskumu. Svarīgi ir lielu vērību pievērst arī visiem ražošanas procesa aspektiem, ietverot kodējošā gēna autentiskumu, uzticamu transkripciju un translāciju, šūnu kultivēšanu, šūnas pēc-translācijas modifikācijas, proteīnu attīrīšanas un produkta kvalitātes kontroli. Salīdzinājumā ar citiem biotehnoloģijā pielietotajiem mikroorganismiem, *E. coli* rod pielietojumu olbaltumvielu sintēzē, kurām nav nepieciešamas pēc-translācijas modifikācijas. Vēl joprojām saglabājas izaicinājumi, lai izstrādātu pilnīgāku *E. coli* saimniekorganisma sistēmu. Izstrādājot *E. coli* metaboliskās un šūnu inženierijas stratēģijas, kas padara iespējamu glikolīzes un citas pēc-translācijas modifikācijas, precīzu olbaltumvielu struktūru veidošanos (īpaši sarežģītas struktūras olbaltumvielām), labāk regulētu gēnu ekspresiju, un olbaltumvielu augsta iznākuma sekrēciju, ir patreiz aktuāli jautājumi.

2.2.2. Kultivēšanas process

Kad ekspresijas sistēma ir izveidota, augsta biomasas iznākuma procesi (AB) tiek realizēti, lai iegūtu augstus olbaltumvielu titrus. Pētījumi ir parādījuši, ka barības vielu sastāvs, barības vielu piebarošanas stratēģija un fermentācijas mainīgie, kā temperatūra, pH un izšķīdušā skābekļa līmenis pO_2 var ietekmēt transkripciju, translāciju, proteolītisko aktivitāti, sekrēciju, produkta līmeni un tā stabilitāti. Šiem parametriem savukārt jābūt optimizētiem priekš augsta līmeņa vēlamās rekombinantās olbaltumvielas sintēzes. Kultūrām ar augstu šūnu blīvumu ir atsevišķas iezīmes, kas ietver izšķīdušā O_2 limitu, oglekļa dioksīda uzkrāšanos lielos daudzumos, kas samazina augšanas ātrumu un stimulē acetātu veidošanos, samazinātu maisīšanās efektivitāti bioreaktorā, un siltuma izdalīšanos [34]. Piedevām, ir zināms, ka rekombinanto olbaltumvielu specifiskā produktivitāte, kas iegūta ar augstiem šūnu iznākumiem, pamatā ir zemāka kā iegūtā no kolbu kultūrām. Dažādu promoteru, saimniekorganismu, piemērotākās piebarošanas stratēģijas un ar skābekli bagātināta ieejas gaisa pielietošana, var uzlabot olbaltumvielas specifisko produktivitāti [35, 31]. Atbilstošiem apstākļiem augsta šūnu blīvuma ieguves procesiem jābūt izstrādātiem pie mērogošanas, jo pastāv siltuma un masas pārneses grūtības liela mēroga fermentatoros. 100 g sausu šūnu ieguvi no 1 litra laboratorijas mēroga procesa bieži vien ir sarežģīti atkārtot liela mēroga bioreaktoros. Veiksmīgos AB procesos, kas dod vēlamo olbaltumvielas produktivitāti,

piebarošanas stratēģijas izvēlei ir kritiska nozīme, jo tā ietekmē metaboliskās plūsmas, un tādējādi ietekmē maksimāli iegūstamo šūnu koncentrāciju, rekombinantās olbaltumvielas specifisko produktivitāti un blakusproduktu veidošanos. Vienkāršas piebarošanas stratēģijas, kā piebarošana ar nemainīgu, pakāpienveidīgi, lineāri vai eksponensiāli pieaugošu piebarošanas ātrumu, veiksmīgi pielietotas, lai iegūtu *E. coli* biomasu ar augstiem iznākumiem. Eksponensiāla piebarošanas stratēģija vairākumos gadījumu ļauj šūnām augt ar konstantu specifisko augšanas ātrumu izmantojot glikozi (vai citu oglekļa avotu), kā augšanu limitējošu barības vielu [36–38].

Vienu no biotehnoloģijā visplašāk izmantoto *E. coli* BL21 un K-12 celmu metabolisma pētījumi [39] rādījuši, ka augstāka gēnu ekspresija, kas atbild par acetātu metabolismu un, kas iesaistīti glikolāta pārmijā, novērojama vairāk BL21 šūnās nekā K-12. Šajā gadījumā minēto celmu atšķirīgā acetātu metabolisma kontrole, izskaidro zemāku acetātu veidošanos BL21 kultivēšanas procesos salīdzinājumā ar K-12 celmiem. Atsevišķas, atšķirīgas taukskābju vai glikozes metabolisma iezīmes, rada arī atšķirības starp dotajiem celmiem. Iespējams dēļ citādāk regulēta glikozes transporta, *E. coli* BL21 celmi var sasniegt augstākus biomasas iznākumus un augstākus augšanas ātrumus salīdzinājumā ar *E. coli* K-12 celmiem.

Partijas procesos, kur glikozes uzņemšana norit nelimitēti, acetātos pārvēršas līdz 9±1 % no oglekļa, kas uzņemts ar glikozi [40]. Etiķskābes jeb acetātu veidošanās var tikt samazināta, kontrolējot specifisko augšanas ātrumu zem noteiktas vērtības (piemēram, 0,2 un 0,35 h^{-1} lietojot kompleksu vai minimālu barotni). Tādā veidā kontrolējot acetātu koncentrāciju zem nevēlamās, kas ir aptuveni 1,5–2 g/l [41]. Piedevām, pie eksponensiālas piebarošanas, glikozes koncentrācija kultūras vidē tiek uzturēta tuvu nullei bez svārstībām, tādējādi minimizējot šūnas oglekļa metabolisma svārstības. Citas substrāta piebarošanas metodes ar atgriezenisko saiti ir izstrādātas, jo tām ir priekšrocība novērst substrāta pārbarošanu, kas padara tās pievielcīgas *E. coli* AB procesiem [29, 36, 42, 43]. Tiek uzskatīts, ka acetātu veidošanās notiek dēļ substrāta uzņemšanas un tā anabolisko/katabolisko disbalansu tās metabolisma laikā [44]. Ir parādīts, ka acetāti, kas uzkrājās kultūras vidē, inhibē dažas *E. coli* fizioloģiskās īpašības. Ir pierādījumi, ka acetāti darbojas kā protonus atbrīvojošs spēks *E. coli*. Tā protonētā forma difundē caur lipīdu membrānu, un citoplazmā difundē, samazinot tās pH [45]. Zināms arī, ka augstas barības vielu koncentrācijas, glikozei 50 g/l, amonijam 3 g/l, dzelzim 1,15 g/l, magnijam 8,7 g/l, fosforam 10 g/l un cinkam 0,038 g/l, inhibē *E. coli* augšanu [41].

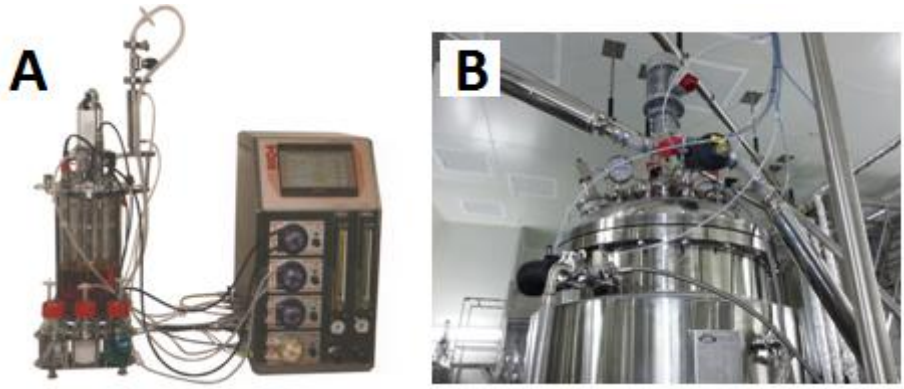
Rekombinanto olbaltumvielu ieguvē, izmanotojot inducējamas ekspresijas sistēmas, nozīme ir arī optimālai pēc-indukcijas piebarošanas stratēģijas izvēlei [46, 47]. Rekombinanto

olbaltumvielu produktivitāte variē atkarībā no *E. coli* saimniekorganisma celma un iegūstamās rekombinantās olbaltumvielas veida. Jāatzīmē, ka nav vispārīgas likumsakarības, pēc kuras izraudzīties atbilstošu piebarošanas stratēģiju noteiktas olbaltumvielas iegūšanai, lai garantētu tās maksimālu produktivitāti. Dažas piebarošanas metodes ietverot kombinētus paņēmienus, kas balstās uz mēģināšanas-un-kļūdas paņēmienu, lai gan nav vienkāršas, tomēr nav grūti veicamas. *E. coli* K12 un tā daudzie paveidi ir ierasti saimnieka organismi daudzu rekombinanto olbaltumvielu ieguvē. *E. coli* B un tā paveidi arī ir bieži lietoti. Šīs divas celmu grupas uzrāda dažādus augšanas raksturus. Viena no būtiskākajām iezīmēm AB procesos ir, ka *E. coli* B saražo daudz mazāk acetātus nekā K12 celmi, pat gadījuos ar glikozes pārpalikumu vidē [48]. Maksimālā *E. coli* produktivitāte AB procesos bieži tiek iegūta, kad augšanas un produkta sintēzes fāzes ir nodalītas. Procesos ar piebarošanu divu fāžu nodalīšana var tikt realizēta ar indukcijas laika pārcelšanu līdz šūnu blīvums sasniedz piemērotu vērtību. Daudzi inducējami promoteri ir izstrādāti, kas var tikt inducēti pēc dažādiem mehānismiem kā temperatūras vai pH maiņa, ķīmiska induktora pievienošana. Līdzās šīm inducējamām sistēmām, *T7* vai *lac*-bāzēti promoteri (*tac, trc, lac, lacUV5-T7hybrid,* u. c.), kas var tikt efektīvi inducēti ar izopropil-β-D-tiogalaktopiranozīdu (IPTG), ir vieni no visvairāk lietotajiem. AB rekombinantā *E. coli* olbaltumvielu pārekspresija bieži noved pie paaugstinātas stresa atbildes, šūnu šķiedrošanās, un pat augšanas pārtraukšanās. Šūnu šķiedrošanās attiecīgi samazina gala sasniedzamo šūnu koncentrāciju un mērķa olbaltumvielas produktivitāti. Ziņots, ka šūnu augšanas un produktivitātes rādītāji var tikt paaugstināti samazinot šūnu šķiedrošanos [49].

2.3. Bioreaktori

Produkta biosintēze notiek fermentācijas procesa laikā, tikai pēc tās, nākošajās stadijās seko iegūtā produkta izdalīšana un attīrīšana. Fermentācijas procesus veic bioreaktoros. Tā ir atslēgas iekārta veiksmīgai fermentācijas procesa realizācijai [50, 51]. Bioreaktora konfigurācija var atšķirties atkarībā no kultivācijas procesa prasībām, no izvēlētās procesa stratēģijas un plānotā procesa apjoma. Izvēloties bioreaktoru, nopietna uzmanība jāpievērš kultūras fizikālajām īpašībām. Piemēram, salīdzinot baktēriju un šūnu kultūru procesus, var teikt, ka šūnu kultūru procesi ir mazāk noturīgi pret mehānisku ietekmi (t.i. intensīvu kultūras maisīšanu). Šo apstākli attiecīgi jāņem vērā izstrādājot bioreaktora tehniskos mezglus un kontroli [52, 53].

Bioreaktors sastāv no nerūsējošā tērauda vai laboratorijas bioreaktoru gadījumā pamatā no stikla, reaktora trauka/rezervuāra, kurā ar mikroorganismu vai ar to radīto bioloģiski aktīvo substanču – fermentu palīdzību nodrošina biosintēzes vai biokonversijas procesu (skat. 2.2. att.). Bioreaktori parasti ir cilindriskas formas un pēc mēroga iedalās laboratorijas (līdz 15 l), pilota (15–100 l) un ražošanas mēroga reaktoros. Ražošanas procesos, kuros svarīgi iegūt augstu biomasu iznākumus, tajā skaitā rekombinanto olbaltumvielu ieguves procesos, izmanto biomasas/ sējmateriāla ieguves bioreaktorus, no kuriem sējmateriāls attiecīgi tiek pievadīt pēc tilpuma 7–15 reizes lielākam ražošanas bioreaktoram.



2.2. attēls. Laboratorijas EDF-5.4 (A) un ražošanas mēroga (B) bioreaktori

Bioreaktora pamata uzdevums ir nodrošināt piemērotu bioloģisko vidi, kurā mikroorganisms var efektīvi sintezēt mērķa produktu. Precīza temperatūras, pH un izšķīdušā skābekļa parciālā spiediena pO_2 kontrole aerobiem procesiem ir priekšnosacījums aerobo fermentācijas procesu realizācijā [54]. Maisīšanas ātrums, skābekļa masas pārnese uz kultūras vidi, oglekļa dioksīda aizvadīšana, putu veidošanās, augšanas ātrums, uztura bagātība, gaisma (procesiem ar fotosintēzi), sterilizācija un sterilie apstākļi, reoloģiskie parametri un šūnu morfoloģiskās īpašības (tie nosaka šūnu deformējamību, kas atkarīga no maisītāja veida un tā rotācijas ātruma) ir svarīgi papildus nosacījumi reaktora izvēlē [55–57].

Pamata sensori, kurus uzstāda industriālajos bioreaktoros un kuriem jāatbilst sterilitātes nosacījumiem ir: temperatūra, pH, izšķīdušā skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas reakcijas vidē, biomasas un spiediena sensori. Papildu informācija par mikroorganisma metabolisko stāvokli var tikt iegūta no skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrāciju mērījumiem izejas gāzēs [51] ar vienkāršiem gāzu analizatoriem. Masas spektrometrija tiek lietota kompleksai gāzu analīzei fermentācijas procesos [58]. Līdz ar iespējamiem reaktora infekcijas riskiem, biofarmaceitiskajā ražošanā ražotāji sliecas ierobežot sensoru skaitu un

savienojumu vietas, tādējādi samazinot sterilitātes riskus un izmaksas, kas saistītas ar papildu sensoru validāciju [59, 60].

Biotehnoloģiskajā ražošanā aizvien vairāk tiek pielietotas vienreiz lietojamās tehnoloģijas, ar kuru palīdzību kļuvis iespējams aizstāt pat visus biotehnoloģiskās ražošanas mezglus un daļas, kurām ir kontakts ar produktu (bioreaktori, centrifūgas, filtri, attīrīšanas kolonnas u. c.). Patreiz tirgū pieejami rezervuāra vai maisa tipa vienreiz lietojamie polimērmateriālu bioreaktori. Maisa tipa vienreizējā bioreaktora samaisīšanai un masas pārneses no gāzes fāzes nodrošināšanai izmanto viļnveida kratītājus, pneimatisko sajaukšanu (gāzes burbuļu padeve) vai mehāniskos maisītājus (maisu ievietojot speciālā turēšanas rezervuārā). Biežāk pieminētās vienreiz lietojamo tehnoloģiju priekšrocības salīdzinājumā ar standarta tērauda bioreaktoriem ir mazgāšanas, sterilizācijas un citu apkalpes procedūru samazināšanās, minimizēts infekcijas risks ražotnē, paralēli veicot arī citu mikroorganismu kultivēšanas procesus, ātrāka katra nākošā periodiskā procesa palaišana, vienreiz lietojamo tehnoloģiju elastīgums, veicot tehnoloģiskā procesa pārkonfigurāciju, sistēmu mobilitāte, kā arī ātrāki termiņi, kuros iespējams palaist ražotni. Izmaksu priekšrocības var tikt iegūtas klīniskās izstrādes un produkta ražošanas sākuma stadijā dēļ vienreiz lietojamo tehnoloģiju ātrākas palaišanas darbībā, kā arī to zemākas cenas dēļ salīdzinājumā ar tērauda bioreaktoru un to daļu iegādei nepieciešamajiem izdevumiem. Ir noteikts, ka projektējot jaunu ražotni, pielietojot vienreiz lietojamās tehnoloģijas, iespējams samazināt kapitālos ieguldījumus līdz pat 40 %, salīdzinājumā, ja tiek lietotas ierastās tērauda sistēmas. Pie vienreiz lietojamo bioreaktoru trūkumiem un limitējošiem faktoriem var pieminēt, iespējamos sūču un daļu atvienošanās gadījumus, sākotnējās investīcijas stacionārā aprīkojuma iegādei, patreiz limitējošie tilpumi līdz 2 000 l, limitēts piegādātāju skaits, augstā cena, vienotu piegādātāju standartu iztrūkums un cieto atkritumu veidošanās no vienreiz lietojamajā aprīkojuma [61, 62, 22].

Bioreaktoru mērogošanas solis, procesiem līdz 100 000 l, parasti ir 1:10, zemāku attiecību 1:5 lieto drošākai mēroga pārejai, lai samazinātu riskus, kas saistīti ar neprognozējamo procesa realizāciju veicot mērogošanu ar lielāku soli. Ražošanas tilpums rekombinanto mikroorganismu procesos ir ap 10 000 l, kas tradicionāli ir pilota mērogs citu produktu ieguves procesiem. Pielietotā mērogošanas metodoloģija (pēc trauku ģeometrijas, maisītāja lāpstiņu kustības ātruma/bīdes, reaktoram pievadītā maisītāja jaudas uz tilpumu u. c.) lielā mērā ir atkarīga no procesa mērogošanas stadijas un vai ir pieejami izejas dati mēroga pārejai. Mērogošanu ietekmē bioloģiskie faktori, kā mikroorganismu ģenerāciju skaits sējmateriāla pagatavošanas un ražošanas stadijās, mutēšanas iespējamība, noturība pret citu

kultūru kontamināciju, agregātu veidošanās un izvēlētais spiediens; ķīmiskie faktori, kā pH kontroles substances veids un koncentrācija, barotnes komponentu ūdens tīrība, ogļhidrātu/slāpekļa/fosfora avotu koncentrācijas, produkta koncentrācijas, redoks potenciāls un putu veidošanās līdz ar virsmas spraiguma maiņu; un fizikālie faktori kā reaktora tvertnes konfigurācija, aerācija, maisīšana, virsspiediens un hidrostatiskais spiediens, barotnes sterilizēšana, temperatūras kontrole/siltuma pārnese un aizvadīšana [34, 63]. Veicot mērogošanu lieto arī liela mēroga imitāciju mazā mērogā, jeb *scale-down* [64].

Bioreaktoru ražotāji ierasti izstrādā un piedāvā pašu radītu bioreaktoru kontroles sistēmu. Pamata uzdevums bioreaktoru kontroles sistēmai ir nodrošināt apstākļus, kas nodrošina optimālu kultūras augšanu fermentācijas procesa laikā. Atkarībā no bioloģiskās sistēmas, bioreaktora tipa/tilpuma un izvēlētās procesa stratēģijas (partijas, partijas ar piebarošanu, nepārtraukts), tiek izvēlēts atbilstošs bioreaktora kontrolieris, pie nepieciešamības to kombinējot ar atbilstošiem izmeklētiem bioreaktora kontroles rīkiem, kā sensori, kontrolieri un algoritmi izmeklētai procesa kontroles nodrošināšanai. Vienkāršai parametru kontrolei (temperatūra, pH, pO_2 u. c.) lieto PID kontroli. Rūpnieciskajos procesos melnās kastes modeļus ierasti lieto kontroliera izveidošanai dēļ nepilnīgi definētas procesa dabas, kas padara procesa mehānisku modelēšanu ļoti dārgu. Melnās kastes modeļi ir rādījuši savietojamību rezultātu paredzēšanā un atbilstošas darbības veikšanā. Lineāras pārneses funkcijas un laika profili ir populāras modeļa formas lietotas kontroles sistēmu izstrādē dēļ labi attīstītas lineāru sistēmu teorijas. Tomēr, pieaug kontrolieru pielietojums, kuros ir izmantotas laikā nelineāras funkcijas, kā arī uz neironu tīkliem bāzēti modeļi, kas paredz sistēmas nelinearitātes. Efektīva metode ir pielietot adaptīvu procesa kontroles pieeju. Šajā gadījumā lineāra modeļa parametri tiek patstāvīgi atjaunoti, lai atspoguļotu vadāmā procesa gaitu [65, 66]. Kontroliera uzstādījumi jeb PID parametri var tikt nepārtraukti atjaunoti atkarībā no procesa raksturlielumu maiņas. Šādas ierīces tādējādi sauc par pašregulējošiem vai adaptīviem kontrolieriem. Lietojot uz modeli bāzētu izmeklētu procesa kontroli, katrai atsevišķai mikroorganismu kultūrai nepieciešams identificēt korektu, konkrēto procesu aprakstošo modeli un modeļa parametrus. Modeļa parametru skaitliskās vērtības var ietekmēt arī procesa mēroga maiņa.

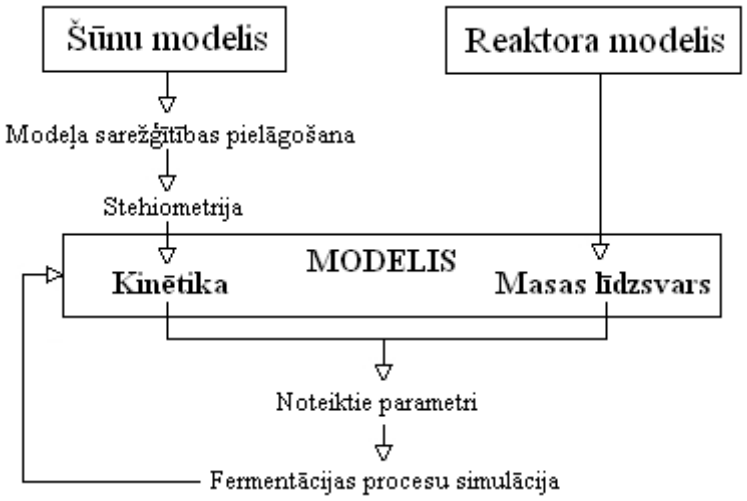
2.4. Fermentatīvo kultivēšanas procesu modelēšana

Fermentatīvā kultivēšanas procesa modelēšana ir atslēgas apstāklis bioreaktora darba optimizācijai, kas ļauj detalizētāk izprast pašu procesu un virzīt to vēlamajā virzienā.

Nepieciešamo modeļa sarežģītību nosaka optimizācijas uzdevuma mērķis. Tādējādi pirmais solis bioreaktora darbības optimizācijā ir definēt procesa mērķi un izvēlēties piemērotu procesa produktivitāti raksturojošu indikatoru. Šādam indikatoram jābūt kvantitatīvi definētam, pēc kura var izlemt, cik lielā mērā izmaiņas procesā noved pie uzlabojumiem. Par cik bioprocesos iegūst noteiktus produktus, vienkāršākais procesa snieguma rādītājs ir produkta masas daudzums, kas iegūts definētā ražošanas laika periodā. Šim produktam jāatbilst arī noteiktai tīrībai. Tomēr, bieži vien vissvarīgāk, pie noteiktiem nosacījumiem, kā, piemēram, pieejamais izejas materiāls vai aprīkojums, produktam jābūt iegūtam pie minimālām izmaksām. Tādējādi procesa snieguma indikators var būt samērā komplicēta izteiksme.

Nozīmīgākie soļi fermentācijas procesu modelēšanā aizsākās ar Mono demonstrēto matemātisko sakarību kā biomasas augšanas ātrums (dx/dt) un biomasas īpatnējais augšanas ātrums (μ) saistīti ar substrāta uzņemšanas ātrumu (ds/dt) un biomasas iznākumu uz substrāta vienību (Y_{xs}) [67, 68]. Leudekings un Pirets aprakstīja produkta sintēzes ātrumu kā funkciju no biomasas augšanas ātruma un biomasas koncentrācijas [69]. Pirts izstrādāja metodi uzturēšanas enerģijas (m) aprēķinam lietojot masas līdzsvara vienādojumus, uzturēšanas enerģiju saistot ar biomasas iznākumu un augšanas ātrumu. Vēlāk tika demonstrēta biomasas augšanas ātruma un substrāta uzņemšanas nozīmīgā ietekme uz sekundāro metabolītu sintēzi [70, 71]. Augstāk minētie sasniegumi attiecas uz mehānistisku fermentācijas procesu modelēšanu. Paralēli attīstījās arī heuristiskās, uz zināšanām par procesu balstītas modelēšanas metodes, kas individuāli vai kombinācijā ar mehānistisko modelēšanu, tika pielietotas fermentācijas procesu aprēķinam.

Fermentācijas procesa modeļa struktūras un noteikšanas principiāla diagramma parādāita 2.3. attēlā. Izvēloties modeli, viens no stūrakmeņiem ir precizēt modeļa sarežģītību. Tas ir ļoti atkarīgs no darba mērķa, kādam nolūkam modelis tiks izmantots. Mehānistiska modeļa sarežģītības noskaidrošana ietver modelī ietilpstošo reakciju apzināšanu un šo reakciju stehiometrisku analīzi. Kad modeļa sarežģītība ir noskaidrota, modelī ietilpstošās šūnu reakcijas tiek raksturotas ar matemātiskām izteiksmēm, jeb lielumus izsaka kā funkcijas mainīgos – proti, substrātu (citos gadījumos metabolisko produktu) koncentrācijās. Kopš šīs funkcijas raksturo modeļa reakciju kinētiku, tās parasti atbilst kinētiskām izteiksmēm. Tas ir svarīgs solis visā modelēšanas ciklā un daudzos gadījumos dažādas kinētiskas izteiksmes tiek analizētas pirms iegūta pietiekama modeļa un eksperimentālo datu atbilstība. Izmantojot heuristiskus modeļus, modeļa sarežģītību novērtē ar parametru saistību un to ietekmes uz procesu noskaidrošanu.



2.3. attēls. Fermentācijas procesa modeļa struktūra un noteikšana

Nākošais solis mehānistiskās modelēšanas gaitā ir kinētisko modeļu kombinēšana ar fermentatīvajām reakcijām, kas noris fermentācijas procesa gaitā. Šāds modelis norāda, kā mainās substrātu, biomasas un metabolisko produktu koncentrācijas, mainoties laikam, un plūsmām, kas ieiet un iziet no fermentiera. Bioreaktora modelis parasti attēlo vienkāršu masas līdzsvaru visā bioreaktorā, bet daudz smalkāki reaktora modeļi var tikt izmantoti, ja fermentācijas vides nehomogenitāte rada kādu ietekmi [72].

Kinētiskā un bioreaktora modeļa kombinēšana dod pilnīgu fermentācijas procesa matemātisko aprakstu, un šis modelis var tikt izmantots fermentācijas procesu simulācijā pie dažādiem procesa mainīgajiem lielumiem kā, piemēram, substrātu un produktu koncentrācijas. Uzsākot tā pielietošanu svarīgi ir noteikt procesa modeļa parametrus. Daži no šiem parametriem ir darba parametri, kas atkarīgi no procesa vadības, piemēram, tilpuma plūsmas uz un no fermentiera. Turpretī, piemēram, biomasas specifiskais augšanas ātrums (μ) un biomasas iznākums no substrāta (Yxs), ir saistīti ar šūnas sistēmu. Veicot modeļa simulācijas datu salīdzināšanu ar eksperimentālajiem datiem, un pie nepieciešamības šo procedūru atkārtojot, iespējams izraudzīties parametru kopumu, kas dod labāko modeļa un eksperimentālo datu saderību. Modeļa saderības novērtējums ar eksperimentālajiem datiem var tikt veikts ar vienkāršu vizuālu saderības pārbaudi, bet pamatā priekšroka tiek dota daudz racionālākai procedūrai kā, piemēram, modeļa un eksperimentālo datu kvadrātisko kļūdu summas minimizēšana. Ja modeļa simulācija reprezentē eksperimentālos datus pietiekami labi, modelis ir akceptējams. Turpretī, ja saderība ir vāja (jebkuram no parametriem), tad nepieciešams modeli pārskatīt un atkārtoti atgriezties pie modelēšanas cikla [28].

Biotehnoloģisko procesu komplicētības dēļ, vienkāršotu modeļu pielietojums ir ierobežots. Modeļi satur dažus brīvos parametrus, kuriem jābūt noteiktiem no procesa

mērījumu datiem. Rūpniecisko procesu kontrolē pielietotajiem modeļiem, jābūt arī validētiem. Izplatītākais veids, lai noskaidrotu modeļa atbilstību, ir tā testēšana, lietojot aktuālā procesa datus, jeb citiem vārdiem, procesa datus, kas netika lietoti sākotnējā modeļa izstrādē [73].

2.4.1. Pirmās kārtas modeļi

Fermentācijas procesa modelēšana primāri ir bāzēta uz masas un enerģijas nezūdamības likumiem, kas sastāda bioķīmiskajā inženierijā pielietoto modeļu pamatstruktūru [51, 28, 74, 75]. Bioreaktoru veiktspējas uzlabošanai, modeļos ietilpstošie reakciju vienādojumi var saturēt vienkāršo informāciju par bioreaktorā notiekošajiem konversijas procesiem. Pirmkārt, ar tiem iespējams noteikt procesa laikā būtiski mainīgās komponentu koncentrācijas (c_i). Otrkārt, tie satur informāciju par dažādu procesa raksturlielumu, i, iznākumiem (Y_{ij}), kuri var būt attiecināti pēc kāda iesaistītā references raksturlieluma, j. Bioķīmiskās reakcijas sistēma tiek izteikta ar vektoru c, kas sastāv no visu parametru koncentrācijām c_i. Šie stehiometriskie modeļi var tikt papildināti ar enerģijas un citu fizikālo lielumu līdzsvaru, kā, piemēram, vides reducētības pakāpi [28]. Lielākoties biotehnoloģikajās sistēmās realizējas kompleksas komponentu koncentrācijas izmaiņas laikā. Tādējādi, līdzās iegūstamajai informācijai no reakciju stehiometrijas, nepieciešami papildus dinamiskie modeļi, kuros ņemta vērā reakciju specifika. Papildu informāciju iespējams iegūt izsakot komponentu koncentrāciju izmaiņas ātrumus (q). Pretstatā informācijai, ko iespējams iegūt no reakciju stehiometrijas, q izteiksmes, kas raksturo bioķīmisko kinētiku, pamatā ar pietiekami augstu precizitāti neizceļas. Šeit vienkārši, pamatā heuristiski paņēmieni pielietojami, ar kuriem nepieciešamos parametrus nosaka eksperimentāli. Zināmam q, var izteikt sekojošu vienkāršu masas līdzsvara vienādojumu:

$$\frac{dc}{dt} = q + \sum_t \frac{F_s}{t}(c_f - c), \tag{2.1}$$

kur F_s (ml/min) reprezentē substrāta piebarošanas ātrumu bioreaktorā, ar koncentrāciju c_f. Summēšana vienādojumā (1) paredz, ka var realizēties vairāku substrātu piebarošana. Industriālajā praksē, c parasti ir izteikts ar relatīvo masu, kas mērīta gramos uz katru kultūras kilogramu vai kilogramos uz katru kultūras tonnu. Industrijā daudzi bioķīmiskie ražošanas procesi tiek veikti ar piebarošanu. Tādējādi kultūras masa XV mainās laikā līdz ar reaktora piebarošanu un masas zudumiem no sistēmas:

$$\frac{d(XV)}{dt} = \sum_t F_t, \tag{2.2}$$

Vienādojumi 1 un 2 pirmajā brīdī šķiet samērā vienkārši diferenciālvienādojumi, kuru atrisinājumu iegūšanai nevajadzētu sagādāt grūtības. Tomēr, ātruma q izteiksmes parasti saistās ar stingrām nelinearitātēm starp dažādiem tās komponentiem un to aprakstošajiem vienādojumiem. Šī saistība ir būtiska līdz ar uzspiestajiem iesaistīto bioķīmisko reakciju nosacījumiem, kurus ietekmē reakcijās iesaistīto substanču koncentrāciju izmaiņas; saistību nelinearitāte veidojas dēļ sistēmas komponentu koncentrāciju izmaiņas kinētisko ātrumu nelineārās dabas. Par cik reakcijas ātrumi q nevar tikt modelēti pielietojot pirmās kārtas izteiksmes, šīs izteiksmes parasti tiek aproksimētas ar korelācijām, kas bāzētas uz vienkāršiem pieņēmumiem par dominējošiem reakciju mehānismiem attiecīgajā bioķīmiskajā sistēmā. Vienkāršs piemērs, kur nelineāri ir saistīts biomasas augšanas ātrums q_x ar biomasu (X) un substrātu (S), ir Mono izteiksme [67]:

$$q_x = \mu X = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} X, \tag{2.3}$$

Parametri μ_{max} un K_s nevar tikt noteikti *a apriori*, tos jānovērtē eksperimentālo datu analīzes gaitā. Tādējādi, bioķīmisko reakciju kinētisks apraksts parasti saistās ar nelineāru modelēšanu pēc melnās-kastes principa. Vienkāršās Mono izteiksmes paplašinājumi pieejami literatūrā, kas paredz citu faktoru ietekmi uz biomasas augšanas ātruma samazinājumu līdz ar metabolītu represiju, kā arī citām inhibējošām un limitējošām parādībām [76]. Šie faktori būtiski ietekmē gan mikroorganismu augšanu, gan produkta veidošanos, kas kopumā ietekmē bioreaktora sniegumu. Atkarībā no sistēmas sarežģītības, dažādu efektu modelēšanai var tikt lietotas vienkāršas racionālas funkcijas vispārīgā formā $f(x) \propto K_x /(K_x +x)$, $f(x) \propto x/(K_x +x)$ vai $f(x) \propto (1+x/K_x)$, kur x – ietekmējošais parametrs; K_x – ietekmējošā parametra skaitliska (robež)vērtība. Lai gan šāda veida izteiksmes ir labi savietojamas ar kinētiskajām ātruma izteiksmēm, tās nevar nodrošināt detalizētu ātruma vienādojumu reprezentēšanu, lai globāli aprakstītu dažādus efektus. Iepriekšminētais trūkums var tikt risināts ar daudz plašāku un efektīvāku kinētisko īpašību izteiksmju izraudzīšanos, kā piemēram, lietojot hibrīdos modeļus.

2.4.2. Hibrīdie modeļi

Modelēšanas rezultāti lietojot klasiskās kinētiskās izteiksmes, kā piemēram, lietojot Mono, ir samērā labi. Tomēr, modeļa neobjektivitāte atsevišķos gadījumos, var limitēt modeļa

kvalitāti. Šādiem gadījumiem nepieciešamas alternatīvas. Kad kādas parādības pietiekami precīzu matemātisku aprakstu vairs nav iespējams veikt ar mehāniskiem modeļiem, jāraugās pēc pietiekami elastīgu un efektīvu melnās-kastes tipa modeļu pielietošanas. Tiek atzīts, ka relatīvi kompleksas nelineāras funkcijas, ietverot kinētiskās izteiksmes, var tikt attēlotas ar mākslīgiem neironu tīkliem (ANN) [77]. Šādiem neironu tīkliem ir izteikti definētas nelineāras saistības. To struktūra raksturojas ar zināmu nodu skaitu un atbildes funkcijām caur kurām šīs nodas atbild uz to vidējām ievad-vērtībām. Daži autori demonstrējuši vienkāršus prognozējošus neironu tīklus ar vienu slēpto slāni un neliela nodu skaitu [78], un norādījuši, kā pietiekamus vairākumiem praktisku gadījumu. Parametri šajās izteiksmēs tiek saukti par svariem, par cik tos lieto, lai skaitļotu vidējās svērtās nodu ievad-vērtības. Kā citos melnās kastes modeļos, šiem parametriem jābūt noteiktiem ar modeļa un eksperimentālo datu saderības pārbaudi. Salīdzinājumā ar citām modelēšanas metodēm, ANN daudz vienkāršāk ļauj jebkuru mainīgo, kam ir būtiska ietekme uz procesa rezultātu, ņemt vērā to vienkārši pievienojot pie ievad-vērtību mainīgajiem.

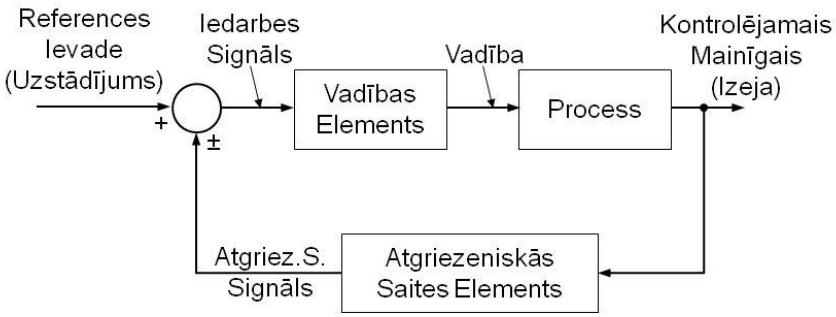
Sastādot ANN, konsekventi jāidentificē, kuras ievad-vērtības būtiski ietekmē modeļa kvalitāti. Lineārām sistēmām ir izplatīti pielietot vienkāršas statistiskas metodes, lai analizētu formālu sakarību starp dažādiem mērītiem lielumiem. Nelinearitātes gadījumā, kas tomēr ir daudz izplatītāka bioloģiskām kultivācijas sistēmām, situācija ir daudz sarežģītāka. Daži autori stādījuši priekšā lineārām sistēmām labi pielāgoto principiālo komponentu analīzes metodes (PCA) paplašinājumu, ar mērķi to pielāgot nelineārām sistēmām [79]. Piedāvāts tiešs paņēmiens šādas iedarbes ietekmes analīzei ar datoru, kas bāzēta uz neironu tīklu trenēšanas metodēm [80]. Piedāvāts, ka ANN var tikt lietoti, lai modelētu visu procesu. Tomēr, ANN visefektīvākā pielietošana realizējas, kad tie pielietoti to daļu modelēšanai, kas nevar tikt modelētas mehānistiski. Līdz ko procesa komponenti var tikt izteikti ar fizikāli iegūtiem matemātiskiem modeļiem, kas bāzēti uz dzelžainām zināšanām, jāpielieto attiecīgie matemātiskie modeļi. Pretējā gadījumā ANN būtu nepieciešams papildu brīvi parametri, kas tādējādi samazinātu modeļa kvalitāti. Tādējādi, vairākumos gadījumu, sākumā pareizāk sadalīt procesa modeli daļās, kas var tikt modelētas mehānistiskā veidā un pārējās daļas heuristiskā veidā, kas apraksta aspektus, kas nav pilnībā izprasti. Šāda divu modelēšanas metožu kombinēšana, galarezultātā dod, tā saukto, hibrīdo modeli. Kamēr modeļa noteikšana ir vienkārša, tīkla komponentu trenēšana ir kaut kas daudz sarežģītāks. Būtisks melnās-kastes modeļu un it īpaši mākslīgo neironu tīklu trūkums ir, ka to pielietošana ekstrapolēšanai ārpus reģioniem, kuriem tie ir bijuši validēti, faktiski ir nepiemērota. Citiem vārdiem, ANN ar

pārliecību var tikt lietoti stāvokļa apgabalos, kuros iegūtie dati neironu tīklu trennēšanai un validācijai ir pietiekami detalizēti.

Kad vien iespējams, piemērotas zināšanas par procesu var tikt ietvertas modelī, pat ja šīs zināšanas, nevar tikt formulētas ar modeļiem, kas bāzēti uz tīri mehānisku procesa izpratni. Uz zināšanām bāzētas ekspertu sistēmas un faziloģika lietotas reāla laika datorkontrolētās fermentācijas sistēmās trauksmju/kļūdu diagnosticēšanai, inteliģentai procesa novērošanai/kontrolei, kvalitātes kontrolei un dinamiskam procesa aprakstam [81]. Faziloģika ar labiem panākumiem lietota tiešai piebarošanas ātruma kontrolei, procesa parametru novērtēšanai, un kombinēšanai ar ekspertu sistēmām un ANN [82].

2.5. Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole (kontrole ar atgriezenisko saiti)

Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole [51, 75] paredz pielietot analītiskos un instrumentālos rīkus, procesos ar limitētu substrāta padevi kultūras vidē. Ar limitējošo substrātu saprot mikroorganismu barotnes pamatkomponentu, kas ir arī oglekļa avots, un no kura pamatā tiek veidota mikroorganismu biomasa un produkti. Šajos procesos galvenais manipulējamais lielums ir limitējošā substrāta piebarošanas ātrums, kur substrāta padevi parasti veic ar peristaltiskajiem sūkņiem. Procesa uzlabojumus var realizēt pielietojot kontroli ar atgriezenisko saiti (skat. 2.4. att.). Atgriezeniskās saites ideja ir izlabot procesa novirzes no nevēlamajām trajektorijām, kas var notikt reālos ražošanas procesos. Ar drošu atgriezeniskās saites kontroli procesu bieži var vadīt apgabalā ar augstāku produktivitāti, bet tas var būt nedroši dēļ lielākas procesa nestabilitātes varbūtības, kuru var radīt īslaicīgas procesa novirzes. Šādas nestabilitātes var rasties gadījumos, kad bioreaktorā veidojies lielāks biomasas daudzums, kuru pielietotā bioreaktoru sitstēma nevar nodrošināt ar pietiekamu skābekļa līmeni. Šajā gadījumā pielieto analītiskos mērījumus, kas nodrošina atgriezenisko saiti un dod informāciju par kultūras vidē atlikušā substrāta, biomasas vai produkta/blakusproduktu daudzumiem. Informācija par augstākminētajiem parametriem var papildināt viena otru, un kopumā iezīmē kultūras augšanas rādītājus un fizioloģisko stāvokli. Piebarošanas ātrums var tikt koriģēts atkarībā no tādiem parametriem kā kultūras vidē atlikušā substrāta koncentrācija, biomasas/ produkta/ blakusproduktu koncentrācijas, biomasas specifiskais augšanas ātrums u. c.



2.4. attēls. Kontroles ar atgriezenisko saiti principiāla blokshēma

References ievade (uzstādījums) – procesa laikā kontrolējāmā parametra uzstādītā vērtība; iedarbes signāls – kontrolējamā parametra vadības elementa vadības signāls; vadība – kontrolējamā parametra vadība; kontrolējamais mainīgais (izeja) – kontrolējamā parametra vērtība pēc vadības elementa iedarbes; atgriezeniskās saites signāls – sensoru, tajā skaitā uz-modeli bāzēto sensoru, nomērītā kontrolējamā parametra vērtība.

Realizējot limitētu substrāta kontroli, jāievēro daži aspekti. Kad subtrāts tiek pielietots reizē arī kā induktors, biomasas specifiskais augšanas ātrums (μ) nevar tikt samazināts pielietojot subtrāta limitēšanas paņēmienu, jo subtrāta koncentrācija nedrīkst nokristies zem indukcijai nepieciešamā līmeņa [47]. Nav iespējams arī samazināt biomasas augšanas ātrumu ar paausgtinātu substrāta koncentrāciju, izmantojot subtrāta inhibējošo efektu, jo pie augstām substrāta koncentrācijām līdz ar kultūras viskozitātes pieaugumu būtiski samazinās skābekļa pārneses ātrums. Zināms, ka arī pārlieku augstas substrāta koncentrācijas rezultātā, radušies blakusprodukti, kā acetāti *Escherichia coli* kultivēšanas procesos, samazina produkta sintēzes ātrumu un kvalitāti [83]. Tādējādi specifiskais augšanas ātrums jākontrolē citos veidos. Kad iepriekš apspriestā kontrole ar atgriezenisko saiti nepietiekami samazina procesa limitējošos faktorus dēļ ierobežotās bioreaktora skābekļa pārneses kapacitātes, procesa darbības režīmam jābūt mainītam. Ierasta pieeja, kas bieži tiek pielietota industriālajā praksē, ir periodiska fermentācijas procesa papildināšana ar substrāta piebarošanu un fermentācijas vides noliešanu. Šīs idejas pamatā ir procesa realizācija ar optimālu specifisko augšanas ātrumu un daļas no kultūras noņemšanas un aizvietošanas ar svaigu barotni un ar piebarošanu pēc iepriekš noteikta profila.

Atgriezensikā saite, lai noteiktu substrāta un biomasas daudzumus, kā arī to patēriņa un pieauguma rādītājus, respektīvi, var būt gan tieša, gan pastarpināta. Ar tiešo atgriezenisko saiti saprot tiešu parametru koncentrāciju mērījumus tiešsaistē ar *in-situ* [84, 85] vai *at-line* [86–88] analīzes metodēm, vai tos manuāli analizējot bezsaistē. Patreiz ir ierobežota *in-situ* substrāta noteikšanas sensoru pieejamība dēļ atbilstošu tehnoloģiju trūkuma. *At-line* substrāta noteikšanas metožu trūkums ir zināma laika nobīde mērījuma ieguvei. Bezsaistes manuālu

mērījumu trūkums ir laika nobīde ar kādu veic noņemtā parauga analīzi un atbilstošas kontroles realizāciju. Pastarpinātu atgriezenisko saiti ar kultūras augšanas un substrāta uzņemšanas raksturlielumiem iespējams iegūt tos saistot ar tādiem procesa raksturlielumiem kā skābekļa uzņemšanas/pievadīšanas ātrumi (OUR, OTR), CO_2 izdalīšanās ātrums (CER), elpošanas koeficients (RQ), pH, pO_2 signāli u. c. Balstoties uz šo mērījumu rezultātiem un to novirzes no procesa uzstādījumiem, tiek realizēta kontrole, lai noturētu substrāta/acetātu koncentrācijas drošās robežās zem paaugstināta substrāta līmeņa [89–91, 40], un pārāk samazināta līmeņa, kas palēnina biomasas pieaugumu paildzinot procesa laiku [83, 92]. Pamata priekšrocības pastarpinātai atgriezeniskai saitei ir ātrums ar kādu var tikt iegūts ar biomasas vai substrāta koncentrāciju saistīts mērījums, bet pamata trūkumi ir, ka šie mērijumi var būt procesa vai mikroorganismu specifiski, kas tādējādi var prasīt papildu laika un naudas izdevumus konkrētās metodes pielāgošanai specifiskam procesam. Vairāku procesa raksturlielumu mērījumi procesa laikā var dot labāku substrāta koncentrācijas kontroli un palīdzēt samazināt blakusproduktu veidošanos.

Biežāk lietotās izmeklētās bio-farmācijas procesu automatizācijas metodes ietver procesa pārraudzību (uz modeli bāzēti programsensori, neironu tīkli, principiālo komponentu analīze), vadības kontroli (procesa gaitas manuāla vai automātiska novērošana un koriģēšana), adaptīvu kontroli, inteliģentu kontroli, uz modeli bāzētu kontroli u. c., kas aprobētas un ieviestas rūpnieciskajā biotehnoloģijā [29, 30, 93, 94].

2.5.1. Sensori

Būtiskākie jautājumi realizējot fermentācijas procesu ir saistīti ar mikroorganismu šūnu fizioloģisko stāvokli un vides nosacījumiem mikroorganismu pilnvērtīgu funkciju veikšanai. Mikroorganismi pamatā tiek raksturoti ar: (i) struktūras esamību; (ii) ģenētiskās informācijas maiņu; (iii) metabolismu, vai funkcionālo aktivitāti, un (iv) spēju vairoties un augt. Pieejamas dažādas in-situ un at-line bioprocesu raksturlielumu noteikšanas fizikāli ķīmiskās metodes no kurām nozīmīgākās ir elektroķīmiskās, optiskās un elektrovadāmības analīzes metodes. Procesa raksturlielumu noteikšanai tiek lietotas arī uz modeli bāzētās metodes jeb program-sensori, lietojot ar izejas gāzu analīzi iegūstamos datus, multi-parametru regresijas metodes, mākslīgosneironu tīklus (ANN) u. c. Pie svarīgākajiem procesu raksturojošiem parametriem var pieskaitīt temperatūru, pH, biomasas, substrātu, kā glikoze, glutamīna un skābekļa, metabolītu, kā laktātu, amonija, glutamāta, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas. Balstoties uz procesu raksturojošajiem analītiskajiem mērījumiem, veic atbilstošu procesa kontroli. Šim nolūkam izmanto dažāda veida sensorus vai parauga ņemšanas tehnoloģijas.

Kritisks apstāklis „rokas” paraugu analīzēs, īpaši biomasas paraugiem, vienmēr ir sterilās barjeras pārkāpšana un sterilitātes nodrošināšana. Šajā gadījumā, alternatīva ir lietot vajadzīgo parametru tiešus mērījumus reaktora vidē (*in-situ*), vai pastarpināti automātiski analizējot noņemtos kultūras paraugus vai izejas gāzu sastāva maiņu (*at-line*). Cits svarīgs faktors procesa analītiskās tehnoloģijas izvēlē ir pieļaujamā laika nobīde analītiskā mērījuma ieguvei. Piemēram, ātri augošu prokariotu kultūru gadījumā, mērījumus jāiegūst ar daudz lielāku ātrumu nekā tas ir eikariotu gadījumā. *In-situ* un *at-line* analīžu gadījumā, salīdzinājumā ar manuālu parauga noņemšanu un analīzi, analītiskos mērījumus iespējams iegūt daudz ātrāk. Būtiski ir, lai sensoru dinamiskās jutības intervāls nodrošinātu vēlamā parametra iespējamo vērtību mērījumus visā procesa gaitā.

Vēl joprojām zināma problēma fermentācijas procesu kontrolē ir tiešsaistes instrumentu trūkums ar kuru palīdzību droši un uzticami noteikt biomasas, substrāta un produkta koncentrācijas/kvalitāti u. c. Šīs analīzes bieži tiek veiktas, kā laboratorijas analīzes, kas noved pie atgriezeniskās saites ar zemu frekvenci un laika nobīdi, kas apgrūtina procesa automatizāciju. Netieša parametru noteikšana vai novērtēšana ar programsensoriem ir metode, kas izveidota, lai risinātu iepriekšminētās problēmas. Program-sensori ir virtuāli sensori, kuri rēķina nepieciešamo mainīgo no tam saistītā fizikālā mērījuma. Parasti, mērāmie mainīgie ir viegli mērāmi lielumi, kurus matemātiski ir iespējams saistīt ar mērķa parametru. Informatīvs program-sensors ir elpošanas koeficients (RQ-vērtība), kas raksturo kultūras fizioloģisko stāvokli. Tādi ar procesu saistīti parametri kā temperatūra, hidrostatiskais spiediens, komponentu plūsmas u. c., arī var tikt izmatoti kā indikatori produkta kvalitātes maiņas novērošanai. Tātējādi, novērojot piemērotus otršķirīgos mainīgos, bieži iespējams iegūt kvalitatīvu vai kvantitatīvu informāciju.

Plaša pielietojuma analītiskos instrumentus sniedz spektroskopiskās metodes, ar kurām analītisko informāciju iegūst uz paraugu iedarbojoties ar elektromagnētisko starojumu. Pēc iedarbes ar paraugu tiek analizēta parauga vai starojuma avota elektromagnētiskā starojuma īpašību maiņa. Viļņa garumu diapozons elektromagnētiskajam starojumam pielietojamajās metodēs ir no 10 nm līdz 1m. Šīs metodes ir ne-invazīvas, jo nekāda paraugu noņemšana un citu reaģentu izmantošana nav nepieciešama, tajā pašā laikā tos var sterilizēt. Citas spektroskopisko metožu priekšrocības ietver iespēju nodrošināt nepārtrauktu elektromagnētiskā lauka intensitāti. Dažādus procesa raksturlielumus iespējams noteikt arī paralēli, un līdz ar mērījuma nepārtrauktību, mērījumus iespējams veikt reālā laikā. Spektroskopisko sensoru pielietošana klasiskajos vai vienreiz lietojamos reaktoros var būt realizēta caur vienkāršu caurspīdīgu novērošanas logu, kas uzrāda noteikta viļņa garuma

gaismas filtrēšanas īpašības. Optisko šķiedru pielietošana, lai savienotu sensoru ar detektoru, sekmē abu šo komponenšu atdalīšanu, kas ļauj atkārtotu dārgās detektēšanas sistēmas izmantošanu, ja nepieciešama gaismas avota maiņa. Lietojot vienreizējo optisko logu, kas saistīts ar optisko šķiedru, spektroskopisko mērījumu var lietot vienreiz lietojamos bioreaktoros ar saprātīgām izmaksām. Atkarībā no mērījuma principa, varētu rasties nepieciešamība, lai izvairītos no iedarbēm, kā burbuļi vai gaismas izkliede, un gaismas absorbcija vai izkliede uz mirušajām šūnu paliekām. Sānu trokšņi spektroskopiskajām metodēm tradicionāli ir daudz lielāki nekā tas ir citām metodēm [84, 95].

Biomasas sensori

Biomasas koncentrācija ir viens no būtiskākajiem biotehnoloģiskā procesa stāvokli raksturojošajiem parametriem. Šī lieluma precīza novērtēšana ir svarīga izmeklētu procesa kontroles metožu pielietošanā, kas tādējādi nodrošina arī augstu procesa produktivitāti. Dažādas biomasas noteikšanas metodes apskatītas literatūrā, vairākums no kurām bāzētas uz fizikālo lielumu noteikšanu, kā optiskais blīvums, fluoriscence un elektrovadāmība.

Šūnu augšanas un biomasas koncentrācijas mērījumiem, tiešsaistes vai bez-saistes režīmos, kā references metodi lieto optiskā blīvuma (*OD*) mērījumus. *In situ* optiskos biomasas sensorus parasti limitē mērīšanas diapozons. Dažāds šūnu veids un kultūras ar mainīgu morfoloģiju un šūnu agregāciju dod mērījumu izkliedi. Optiskā blīvuma sensori ir izteikti jutīgi arī no kultūras un tajā esošo gāzes burbuļu kustības ātruma, ko ietekmē kultūras maisīšanas un aerācijas ātrumi. Mērījuma atkārtojamība un ilgums vienmēr nav apmierinoši dēļ biomasas un olbaltumvielu veidotā adhezīvā slāņa uz sensora stikliņa, kuru šķērso gaismas stars. Papildus, augsti duļķaina reakcijas vide var radīt mērījuma neprecizitāti. Gaismas izkliede un absorbcija ir nelineāri atkarīgas no šūnu blīvuma, kas prasa atbilstošu signāla linearizāciju atkarībā no šūnu blīvuma. Cits šīs metodes trūkums ir nespēja izšķirt dzīvotspējīgās šūnas no mirušajām un kultūras vidē esošajām daļiņām [84, 96].

Ir pieejami komerciāli *in-situ* optiskie sensori, lai tieš-saistē nepārtraukti mērītu mikroorganismu augšanu ar gaismas absorbciju (duļķainību) vai izkliedi (nefelometriju) redzamajā un tuvajā infrasarkanajā (NIR) diapozonā. Šīm metodēm var būt zināmas problēmas mērot dažādas koncentrācijas, tipa un morfoloģijas šūnas. Mērījuma atkārtojamība un ilgums vienmēr nav apmierinoši dēļ biomasas un olbaltumvielu veidotā adhezīvā slāņa uz sensora stikliņa, kuru šķērso gaismas stars. Papildus, augsti duļķaina kultūras vide var radīt problēmas, un kultūras duļķainība tādējādi var mainīties ievērojami. Gaismas izkliede un

absorbcija ir nelineāri atkarīga no šūnu blīvuma, kas prasa atbilstošu signāla linearizāciju atkarībā no šūnu blīvuma. Cits šīs metodes trūkums ir nespēja izšķirt dzīvotspējīgās šūnas no mirušajām un kultūras vidē esošajām daļiņām [85].

Tiešsaistes šūnu populācijas raksturošana bioreaktoros var tikt veikta arī ar *in-situ* mikroskopiju, kas var tikt lietota šūnu koncentrācijas mērījumiem. Mikroskops var tikt uzstādīts tieši bioreaktora portā, lai ar pulsējošu gaismu iegūtu *in-situ* attēlus no maisāmās kultūras. Šī metode veiksmīgi pielietota mikroorganismu kultivācijā un ar to iespējama kultūras morfoloģisko parametru noteikšana tiešsaistē [97, 98]. Šūnu tilpuma noteikšana [99].

Metaboliski aktīvā baktērijā līdz ar baktērijas elpošanu vai ATP hidrolīzi, uz tās plazmas membrānas veidojas elektroķīmiskais potenciāls. Tas nodrošina selektīvu bioloģiskās membrānas katjonu un anjonu caurlaidību, kas veido atšķirīgu elektrisko pontenciālu membrānas šķērsgriezumā. Iekšienē šūna ir lādēta negatīvi salīdzinājumā ar ārieni, un membrānas potenciāls spēlē centrālo lomu dažādos šūnas dzīves cikla procesos, kā ATP sintēzē, aktīvajā transportā, mobilitātē, intracelulārā pH regulācijā u. c. Elektriskā sprieguma jūtīgas krāsvielas izstrādātas, lai mērītu membrānas polarizāciju. Atkarībā no krāsvielas lādiņa, tā piesaista vai nu polarizētas vai depolarizētas šūnas. Specifiskā šūnu piesaiste var tikt tieši saistīta ar šūnas metabolismu [100–102].

Tiešsaistē nosakāmais oglekļa uzņemšanas ātrums (CPR) un skābekļa uzņemšanas ātrums (OUR), ir signāli, kuri atspoguļo biomasas augšanas dinamiku bioreaktorā. Pirmais un vienkāršākais veids kā sekot līdzi CPR un OUR, ir mērīt gāzu tilpuma frakcijas reaktora gāzu izejas līnijā.

Substrāta un produktu sensori

Substrāti un produkti pamatā nosakāmi tiešsaistē vai bezsaistē lietojot atbilstošus sensorus, standarta ekspresanalīzes, kā arī hromatogrāfiskas metodes. Par standarta mērījumu uzskatāms pO_2 signāls. Kā arī ne tik sen pieejams pCO_2 mērījums [103]. Tomēr tiešas un nepārtrauktas substrāta un produktu koncentrācijas, vai ar tām saistītu lielumu, noteikšanas metodes kultūras vidē ir ierobežotas dēļ analītisko instrumentu trūkuma.

Viens no izplatītākajiem substrātiem, kuru pielieto mikroorganismu kultūru piebarošanā ir glikoze. Dažādi glikozes sensori (tiešsaistes un bezsaistes) ir pieejami, bet šo sensoru stabilitāte, kalibrācija un validācija ir apgrūtinoša. Piemērs PAT metodes pielietojumā glikozes noteikšanai ar nepārtrauktu plūsmas injekciju analīzi, bāzētu uz ķīmisko luminiscenci [104]. Izplatīta glikozes koncentrācijas noteikšanas metode ir tās enzimātiska sadalīšana ar

glikozes oksidāzi, kurā nosaka izdalīto siltuma daudzumu, kas ir proporcionāls glikozes koncentrācijai. Šo metodi pielieto analizējot glikozes līmeni asins plazmā. Zināmi pielietojumi *at-line* glikozes koncentrācijas noteikšanai bioreaktoros (Aplikon, Sartorius). Glikozi iespējams oksidēt arī elektroķīmiski, tomēr salīdzinājumā ar enzimātisku glikozes sadalīšanu, elektroķīmiskā metode ir mazāk selektīva un cēlmetālu elektrodu aktivitāte mazinās līdz ar glikozes sadalīšanās produktu un Cl^- jonu neatgriezenisku adsorbciju uz elektroda virsmas. Glikozes sadalīšanās kinētika uz klasiskajiem elektroķīmiskajiem sensoriem ir arī gausa [105, 106]. *At-line* metodes, lai noteiktu glikozes, piemēram, kā arī glutamāta, prolīna, laktātskābes, amonjaka un izšķīdušā oglekļa dioksīda koncentrācijas ir fotometriska infrasarkanās (IR) un tuvās infrasarkanās (NIR) spektroskopijas metodes, kas abas atbilst PAT nosacījumiem [107, 108]. Infrasarkanās spektroskopijas metodes trūkums ir iespējama blakus-komponentu ietekme [84].

Atsevišķa sadaļa ir optiskie biosensori, kur bioloģiskais receptors (kā enzīms, mikroorganisms vai antiviela) rada optisko signālu (kā ķīmiskā luminiscence vai NADH fluoriscence). Šis signāls ar elektrisko devēju tiek pārvērsts elektriskā signālā [109]. Ir arī izveidoti bioluminiscences sensori, kas sastāv no bioluminiscentā enzīma un optiskā devēja. Optiskie biosensori nodrošina ātru un augsti selektīvu noteikšanas sistēmu. Tomēr vairākumos gadījumu analīzēm jābūt veiktām ārpus reaktora, jo sensora bioloģiskā komponente nav sterilizējama. Tādējādi sterila parauga noņemšana no bioreaktora ir nepieciešama. Kā biosensoru trūkumus var pieminēt to, ka tie ir invazīvi, atkarīgi no temperatūras, tie mēdz aizaugt, kā arī tos nepieciešams bieži pārkalibrēt un reģenerēt. Signāla novirzes nosaka šo sensoru nedrošumu. Arī enzīmu stabilitāte ir limitēta. Vairākums biosensoru vienlaicīgi var mērīt tikai vienu substanci, bet kombinācijā ar vairākiem biosensoriem, dažādas substances, kā glikoze, amojaks u. c., var tikt mērīti paralēli.

NIR spektroskopija var tikt lietota, lai mērītu atsevišķus organiskus savienojumu pat kompleksā vidē. Bioloģiski svarīgas saites, kā alifātiskās C–H, aromātiskās vai alkēnu C–H, amīnu N–H un hidroksil O–H, absorbē NIR diapozona gaismu no 2.0 līdz 2.5 μm. Katra ķīmiskā struktūra ir saistīta ar specifisku analizējamā parauga ķīmisko grupu novietojumu, formu un izmēru. Dēļ absorbcijas grupu līdzības, izmeklēti datu analīzes algoritmi nepieciešami, lai iegūtu uzticamu analītisko informāciju. Multivariāciju kalibrācijas modeļi, kas veidoti izmantojot mazāko kvadrātu regresijas (PLS) analīzi, nodrošina analītisko informāciju no NIR mērījumiem. Datu priekšapstrāde, piemēram, ar digitālo Furjē filtru, uzlabo rezultātus, un ar šo metodi, glikoze, glutamīns, amonjaks, laktāti un glutamāti ūdens šķīdumos var tikt mērīti paralēli [110, 111].

Vienkāršāko fluoriscences sensoru darbības princips balstās uz fluoriscences mērījumu, kur izmanto nikotinamīda adenīna dinukleotīda reducēto formu [NAD(P)H]. NAD(P)H atkarīgā fluoriscence pie 450 nm tiek mērīta pēc ierosināšanas pie 360 nm. Šūnas metabolisms arī var ietekmēt izmaiņas NAD(P)H-atkarīgā fluoriscencē. Tādējādi šādu sensoru pielietojums ir limitēts fermentācijas procesiem ar labi definētu barotni un pamatā tie ir ierobežoti īpašam pielietojumam. Vairāk informācijas var tikt iegūta no *in-situ* fluorimetrijas. Fluoriscences mērījumi dažām iekššūnas un ārpussūnas fluoroforām ir iespējami lietojot dažādus ierosināšanas un emisijas viļņa garumus, kas piedāvā veikt divu dimensiju (2D) fluoriscences spektroskopiju. Zināms skaits fluoroforu (kā aminoskābes, vitamīni) var tikt noteikti paralēli. Ir izveidoti fluoriscences spektrofotometri *Cyathus striatus, Eurotium cristatum* un *Crinipellis stipitaria* fermentācijas procesu analīzei tiešsaistē. Ierosināšanas un emisijas viļņa garumi ir uzstādīti netakarīgi lietojot diodes priekš fluoriscences noteikšanas. Bija iespējams noteikt dažas fluoroforas, ieskaitot aromātiskās aminoskābes, NAD(P)H un policikliskos aromātiskos ogļūdeņražus (PAHs), *in-situ* un tiešsaistē. Fluoriscences spektrofotometrs tika lietots, lai mērītu kopējo fluoriscenci [112]. Spektrofotometrs tika pievienots bioreaktoram ar dakšveida gaismas novadītāju pa šķidrumu, kura viens gals tika ievietos spektrofotometra kivetē, bet otrs gals 25 mm standarta reaktora portā ar kvarca lodziņu. 2D fluoriscences sensors ar dažādiem ierosināšans un emisijas viļņa garumiem tika izstrādāts [113].

Proteīniem afinitātes sensori (optiskie biosensori), alternatīva ELISA metodēm. Šī metode pašreiz ir viena no iecienītākajām starp ātrajām produktu koncentrācijas noteikšanas ekspressmetodēm industriālajā un akadēmiskajā pielietojumā [33]. Specifiskie rekombinanto olbaltumvielu titri kompleksās vidēs bioprocesu laikā, kas iepriekš balstījās uz laika ietilpīgām un dārgām analītiskām metodēm, tagad ir iespējamas kā ļoti ātras tiešsaistes kvantitatīvas analīzes. Noteikšanas metodes nav invazīvas, un var mērīt kompleksu savienojumu daudzumu. Sensoru virsma nodrošina platformu uz kuras ligandi tiek imobilizēti. Kamēr gēnu ekspresijas profilu noteikšanas metodes balstās uz apjomīgu informāciju par nukleīnskābju noteikšanu, novērojama pieaugoša interese pēc līdzīgām, ātrām, jutīgām un tiešām olbaltumvielu analīzes metodēm. Tradicionālos ligandus nukleīnskābju saistīšanai satur antivielas. Arī oligonukleotīdi tiek izvēlēti no plaša oligonukleotīdu klāsta, kuru trīsdimensionālā struktūra saista mērķa proteīnu ar augstu afinitāti [114, 115]. Šādi aptamēri var uzrādīt antivielu īpašības vairākos pielietojumos, kā ELISA [116] un imūnvielu ekspresanalīzēs [117], šūnu atlasīšanā [118], fluoriscences mikroskopijā [119], *Westernblot* analīzē [115], afīnajos slāņos biosensoriem vai

mikroshēmām [120–122]. Salīdzinājumā ar antivielām kā molekulu saistītājam biosensoros, mazajiem aptamēru receptoriem ir virkne priekšrocību. Dēļ to mazajiem izmēriem, blīvāks receptoru slānis var tikt veidots, kas uzlabo receptoru afinitāti un paaugstina slāņu jutīgumu. Dēļ aptamēru receptoru vienkāršās struktūras, sensora slānis var tikt reģenerēts daudz vieglāk nekā antivielu slānis, aptamēru slānis ir daudz noturīgāks pret noārdīšanos un denaturāciju [123].

Aerobos procesos, jeb procesos, kur limitējošā oglekļa avota uzņemšana ir stehiometriski saistīta ar sābekļa uzņemšanu, kura relatīvs mērījums izteikts procentos no kalibrētā maksimālā skābekļa parciālā spiediena (pO_2), pO_2 ir standarta un uzticams *in-situ* mērījums, kuru pielieto limitējošā oglekļa avota kontrolē.

2.5.2. Pastarpināta piebarošanas ātruma kontrole pēc kāda no procesa parametriem

Pastarpināta Fs kontrole pēc pO2 un pH

pH un pO_2 statēšanas metodes ir bāzētas uz pH un pO_2 izmaiņas novērojumiem, kad limitējošais oglekļa avots kultūras vidē izsīcis. Kad pH un pO_2 sāk paaugstināties līdz ar oglekļa avota izsīkumu, iepriekš noteikts piebarojamā daudzums tiek padots bioreaktorā. Šādas kontroles metodes ar atgriezenisko saiti dod priekšrocību izvairīties no barības vielu pārbarošanas, kas padara tās par plaši pielietotām *E. coli* fermentācijas procesos ar augstu biomasas iznākumu [42, 43]. Arī optimālas piebarošanas stratēģijas izvēle pēc indukcijas fāzei ir svarīgs apstāklis efektīvai rekombinanto proteīnu ieguvei inducējamās ekspresijas sistēmās [46, 47]. pO_2 statēšanas metode bāzēta uz pO_2 strauju pieaugumu, kad substrāta saturs barotnē izsīcis. Tādējādi substrāta koncentrācija var tikt turēta vēlamā limita robežās automātiski pievienojot iepriekš noteiktu substrāta daudzumu, kad pO_2 vērtība paaugstinās virs iepriekš definētās vērtības. pH stata metode balstās uz pH novērojumiem, kad limitējošā oglekļa avota saturs barotnē izsīcis. Šajā gadījumā pH sāk pieaugt, pamatā dēļ amonija jonu sekrēcijas reakcijas vidē. Definetā barotnē pO_2 statēšana reaģē daudz ātrāk nekā pH statēšana. Kad kompleksa oglekļa-slāpekļa barotne tiek lietota, kā, piemēram, rauga ekstrakts vai peptons kopā ar ogļhidrātu avotu, pO_2 izmaiņa nav tik izteikta pie limitējošā oglekļa avota izsīkuma, jo šūnas turpina uzņemt komplekso substrātu. Tādējādi pH statēšanas metode ir daudz piemērotāka gadījumos, kad daļēji definēta vai kompleksa barotne tiek lietota [124–126]. pO_2 statēšanu pielieto, gan pO_2 kontroles vajadzībām, gan, pamatā, procesa beigu fāzē, lai automātiski kontrolētu limitētu substrāta piebarošanu. Šīs kontroles priekšrocība ir, ka

izmantojot pO_2 mērījumu, kas ir standarta tiešsaistē pieejams mērījums bioreaktoru kontrolē, iespējams tiešsaistes režīmā automātiski kontrolēt limitētu substrāta piebarošanu.

Fs kontrole, lai nodrošinātu eksponenciālu šūnu augšanu (μ statēšana)

Eksponensiāli augošas šūnas, kas tiek barotas ar konstantu piebarošanas ātrumu, tiek pārbarotas fermentācijas agrā stadijā un ne līdz galam piebarotas vēlīnajā stadijā. Pieejamās glikozes pārpalikums, piemēram, kā *E. coli* un *S. cerevisiae* [40, 127] agrā konstantas piebarošanas fāzē, noved pie pārplūstoša metabolisma. Abi, pārplūstošais metabolisms sākuma fāzēs un oglekļa uzglabāšana vēlīnajās fāzēs, var negatīvi ietekmēt rekombinanto gēnu ekspresiju [128, 129]. Savukārt, glikozes piebarošana ar eksponensiālu ātrumu, kas atspoguļo kultūras augšanu, var minimizēt pārplūstošo metabolismu ar šūnām pielāgotu piebarošanas ātrumu visā procesa nogrieznī [130, 37, 131].

Pastarpināta Fs kontrole pēc RQ

Aerobos procesos augšanas gaitā šūnas uzņem O_2 un ražo CO_2, un uzņemtā skābekļa ātrums (OTR), kā arī oglekļa dioksīda izdalīšanās ātrums (CER) tuvināti ir tieši proporcionāls oglekļa avota uzņemšanas ātrumam. Tādējādi substrāta piebarošanas ātrums var tikt kontrolēts atkarībā no OTR un CER datiem, kurus iespējams aprēķināt, lietojot O_2 un CO_2 koncentrāciju mērījumus izejas gāzēs.

Daudzos industriālos procesos tiek analizēts izejas gāzu sastāvs. Šīs procedūras priekšrocība ir mērījumu veikšana izejas gāzu līnijā, kas nav invazīva metode, un tas, ka šādi nosakot šūnu elpošanas koeficientu (RQ), iespējams novērtēt šūnu metabolisko stāvokli. Papildu ar šiem mērījumiem iespējams novērtēt skābekļa pārneses limitēšanu. Elpošanas koeficients tiek definēts kā molārā attiecība starp uzņemto O_2 un izdalīto CO_2 dadzumu. RQ noteikšanai nav nepieciešams zināt biomasas koncentrāciju un kultūras tilpumu, kā arī aeracijas daudzumu. RQ var tikt aprēķināts pa tiešo no izejas gāzu sastāva mērījumiem. Veicot RQ aprēķinu jāņem vērā vides pH, jo tas ietekmē CO_2 šķīdību kultūras vidē, un tādējādi arī CO_2 sastāvu izejas gāzēs. RQ pielietojums piebarošanas procesu kontrolē tika demonstrēts uz *S. cerevisiae* kultūru [132]. Piebarošanas ātrums tika kontrolēts, lai uzturētu nemainīgu RQ=1,0-1,2. Citos procesos RQ tika izmantots, lai kompensētu piebarošanas ātrumu, ja RQ rādījums iziet ārpus noteiktā diapazona, jeb fizioloģiskā stāvokļa. Šajos procesos piebarošanas ātrums tika kontrolēts pēc CER un/vai OTR datiem [133]. Ņemot vērā, ka OTR/CER informācija labi reprezentē lēni augošas kultūras pieaugumu, un to ka RQ labi

apraksta kultūras stāvokli, kad tā ātri uzņem pieejamo substrātu, substrāta piebarošanas ātrums var tikt kontrolēts bāzējoties uz OTR/CER aprēķinu ar pašregulējošu kontroli, lai uzturētu specifisku RQ vērtību. Tā, piemēram, *S. cerevisiae* kultivēšanas procesā [134], etanola biosintēze notiek pie RQ>1, oksidatīva augšana pie RQ=0,9–1,0, cukuru un etanola oksidācija pie RQ=0,6–0,9, bet etanola oksidācija pie RQ<0,6. Atbilstoši piebarošanas ātruma koriģēšana tika veikta, lai noturētu RQ rādījumu, kas atbilst vēlamam kultūras fizioloģiskajam stāvoklim.

2.5.3. Uz modeli bāzēta piebarošanas ātruma kontrole ar prognozi

Procesa atkārtojamības nodrošināšana var būt risināta pielietojot dažādus analizatorus, kuri nodrošina informāciju par procesa statusu un tā kritiskajiem parametriem reālā laikā. Doto informāciju pielieto iestatot nepieciešamos kvalitatīvos rādītājus visā procesa garumā. Literatūrā pieminēti procesa atkārtojamību kontrolējoši algoritmi, kas piemēroti rekombinanto olbaltumvielu ieguves procesos [27, 135]. Tie atšķiras ar sarežģītību ar kādu *a priori* zināšanas pielietotas, lai koriģētu novirzes no uzstādītajiem procesu profiliem. Patreiz aktuāli kompleksu procesu kvalitātes uzlabošanai, pielietot uz modeli bāzētu kontroli ar prognozi [81, 136]. Tomēr šai metodei nepieciešami pietiekami izsmalcināti modeļi, lai precīzi prognozētu procesa nākotnes gaitu, un lai no izdarītajām prognozēm būtu iespējams realizēt atbilstošu kontroli. Šīs metodes realizācija ir arī cilvēkresursu ietilpīga, jo prasa zinoša un kvalificēta personāla iesaisti. Arī validācija komplicētai kontrolei ar atgriezenisko saiti var būt sarežģīta.

Tādējādi, vienkāršu un uzticamu metožu izstrāde priekš rekombinanto olbaltumvielu ieguves procesa, saglabājas svarīgs uzdevums. Piemēri ir kontroles metodes, kurās izmato biomasas specifiskā augšanas ātruma profilu procesa laikā kā kontrolējamo parametru [27, 29]. Šīs metodes ideja ir, ka specifiskā augšanas ātuma profils kultivācijas procesa laikā var garantēt procesa stabilitāti un atkārtojamību. Dažas grūtības veidojas praktiski realizējot specifiskā augšanas ātruma kontroli. Analītiski jānosaka biomasas augšanas ātrums, kā arī potenciālas īslaicīgas specifiskā augšanas ātruma novirzes, kas var radīt neatgriezeniskas biomasas augšanas ātruma novirzes, kas savukārt var novest pie lielām no procesa uz procesu un produktivitātes variācijām. Vienkārša praktiska alternatīva, lai izvairītos no iepriekšminētajiem trūkumiem, ir procesam izvēlēties noteiktu specifiskā augšanas ātruma profilu un, zinot sākuma biomasas koncentrāciju, aprēķināt nepieciešamo biomasas augšanas profilu.

Uz modeli bāzētas kontroles ar prognozi realizācijai, vienkāršus standarta procesu aprakstošos matemātiskos modeļus [28, 131, 29] var izmantot priekš kontrolēta parametru

aprēķina reālā laikā ar nākotnes prognozi. Tādējādi šis piegājiens varētu būt vienkāršāk realizējams nekā pielietot metodes ar modeļu „trenēšanu" kā tas ir pielietojot mākslīgos neironu tīklus (ANN) vai fazioloģisko kontroli [82, 137]. Gadījumos, ja mainīgie procesu apstākļi rada būtiskas aprēķinu kļūdas, procesa laikā vēlama ir modeļa re-identifikācija. Tādiem parametriem kā biomasas iznākumam (Y_{xs}) un maksimālajam specifiskajam substrāta patēriņa ātrumam (q_{sMax}) ir ieteicama reidentifikācija [29]. Priekš modeļa reidentifikācijas, nepieciešams izmantot uzticamas metodes tisešsaistē vai bezsaistē novērtējot biomasu (X), substrātu (S) un kultūras tilpumu (V). Biomasas un substrāta modelēšanas rezulātus būtiski ietekmē tilpuma noteikšanas precizitāte. Kultūras tilpuma noteikšanai tiešsaistē var pielietot, piemēram, tādu metodi kā tiešu reaktora svēršanu, izmantojot līmeņa sensorus, kā arī tilpuma aprēķināšanu balstoties uz pieejamo informāciju par iesūknētajiem tilpumiem un modelētajām plūsmām uz un no reaktora. Zināmas arī tādas metodes, kurās kultūras līmeņa noteikšanai lieto hidrostatisko spiedienu, vadītspējas sensorus un akustiskos sensorus (ultraskaņas viļņi).

Lai nodrošinātu procesa optimālu norisi, tiek pielietots piebarošanas profils, kas dod iespēju kontrolēt substrāta patēriņa ātrumu tuvu tā kritiskajai vērtībai, tādejādi saglabājot maksimālo biomasas augšanas ātrumu. Tiek ņemts vērā, ka substrāta patēriņa ātruma kritiskās vērtības pārsniegšana ir nevēlama, jo tad sākas ievērojama blakusproduktu, piemēram, kā acetātu sintēze, kura uzkrāšanās inhibē biomasas augšanu. Tāpēc, drošākai procesa kontrolei, ieteicams izmantot nedaudz samazinātu q_{sMax}, kas procesa iznākumu būtiski neietekmē [11]. Šādos gadījumos būtu vēlama uz modeli bāzēta procesa optimizācija [12].

2.6. Literatūras apskata kopsavilkums

Veicot mikroorganismu fermentācijas procesus bioreaktoros, biotehnoloģiski iegūst sabiedrībā plaši patērētus produktus, lietotus medicīnā, pārtikas rūpniecībā, sadzīves pateriņam un citos rūpnieciskajos procesos. Lielā vairumā rūpnieciskajos fermentācijas procesos, īpaši rekombinanto olbaltumvielu un citu medicīnā lietojamo preparātu ieguvē, lieto procesa laikā nepārtrauktu, substrāta limitētu mikroorganismu piebarošanu ar substrātu. Tā rezultātā iespējams iegūt augstāku procesa produktivitāti dēļ augstākas šūnu biomasas un uzlabota produktu iznākuma. Fermentācijas procesa modelēšanu lieto substrāta piebarošanas profila *Fs(t)* aprēķiniem pirms procesa, kā arī tā kontrolei procesa laikā. Fermentācijas procesu izstrādi parasti sāk laboratorijas mēroga iekārtās, kolbās/bioreaktorā, un tehnoloģijas pārnesei uz ražošanas mērogu izmanto mērogošanas soli 1:5 vai 1:10. Pretstatā tradicionālo

tērauda bioreaktoru izmantošanai, pēdējās desmitgades laikā aktuāla kļuvusi vienreiz lietojamo bioreaktoru lietošana.

Latvijā un pasaulē ievērojami pētījumi norit vīrusiem līdzīgo daļiņu (VLP), tajā skaitā rekombinantā hepatīta B kor-antigēna (HBcAg) ieguves jomā. Interesi par hepatīta B vīrusa (HBV) gēnu klonēšanu un ekspresiju rada perspektīva *E. coli* fermentācijas procesā iegūt vakcīnas komponentu pret HBV un līdzekļus dažādu hepatīta B stadiju diagnostikā, kā arī kor-antigēna kapsīdu struktūras izmantošana, kā dažādu imunoloģisko epitopu un poli-/oligonukleotīdu gēnu un imunistēmu stimulējošo sekvenču nesēju. Tiek intensīvi pētīta HBcAg un tā paveidu ieguve *E. coli*, *S. cerevisiae* un *P. pastoris* mikroorganismu kultūru fermentācijas procesos. Iegūstamais biomasas daudzums šāda tipa *E. coli* augstu biomasas koncentrācijas fermentācijas procesos, neizmantojot kultūras diafiltrāciju, ir līdz 150 g(šūnu sausnes)/l. Savukārt rekombinanto olbaltumvielu iznākumi šāda tipa *E. coli* procesos ir 0,1–50 g no litra kultūras. HBcAg ekspresijai, lietojot *E. coli*, izmanto limitētu glikozes piebarošanas procesu, kur glikozes koncentrāciju kultūras vidē jāuztur 0,005–0,5 g/l robežās, lai būtu iespējams kontrolēt biomasas augšanas ātrumu un nepieļaut nevēlama blakusprodukta, kā acetātu, uzkrāšanos. Acetātu uzkršanās vidē virs 1,5–2 g/l sāk negatīvi ietekmēt biomasas augšanu un produkta veidošanos. Zināms, ka acetātu veidošanās notiek dēļ nesabalansēta substrāta metabolisma, kad daļa no uzņemtā substrāta tiek pārstrādāta acetātos un tie tiek ekskretēti kultūras vidē. Šo nesabalansēto metabolismu ietekmē paaugstināta substrāta koncentrācija, kas paaugstina glikozes uzņemšanas ātrumu. Pārsniedzot glikozes kritisko uzņemšanas ātrumu, kas procesa laikā parasti samazinās no 1,2 līdz 0,5 g (glikoze)/g (biomasa)/h, sākas acetātu uzkrāšanās kultūras vidē [28, 40].

Kinētiskā un bioreaktora modeļa kombinēšana dod pilnīgu fermentācijas procesa matemātisko aprakstu, un šis modelis var tikt izmantots fermentācijas procesu simulācijai. Pirms modeļa lietošanas, svarīgi ir izraudzīties piemērotākos pieejamos vai zināmos modeļa parametrus. Daži no šiem parametriem ir darba parametri, kas atkarīgi no procesa vadības, piemēram, tilpuma plūsmas uz un no bioreaktora. Turpretī tādi parametri kā biomasas specifiskais augšanas ātrums (μ) un biomasas iznākums no substrāta (Yxs), ir saistīti ar šūnu fizioloģiju. Biotehnoloģisko procesu dažādības dēļ procesa modelis un modeļa parametri jāidentificē katram konkrētam mikroorganismu kultivēšanas procesam. Procesu kontrolē lietotajiem modeļiem un algoritmiem jābūt arī validētiem.

Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole paredz lietot analītiskos un instrumentālos rīkus procesos ar limitētu substrāta padevi kultūras vidē. Atgriezensikā saite, lai noteiktu fermentācijas vidē esošos substrāta un biomasas daudzumus, kā arī to patēriņa un pieauguma

rādītājus, var būt gan tieša, lietojot tiešus substrāta un biomasas tiešsaistes vai bezsaistes mērījumus, gan pastarpināta, lietojot parametrus, piemēram, kā pO_2, pH, uzņemtais/izdalītais O_2/CO_2 u. c. Tieša substrāta noteikšana no reakcijas vides ar sensoriem ir ierobežota dēļ sensoru/tehnoloģiju trūkuma. Pastarpiānātu substrāta noteikšanas metožu trūkums ir zināma laika nobīde mērījuma ieguvei. Procesa raksturlielumu noteikšanai tiek lietotas arī uz modeli bāzētās metodes jeb programsensori.

Fermentācijas procesu ar piebarošanu, atkārtojamības nodrošināšanai lieto uz modeli bāzētas kontroles metodes ar prognozi (MPC). To priekšrocība ir relatīvi vienkāršu matemātisko modeļu lietošana biomasas pieauguma prognozēšanai, un atbilstoša piebarošanas profila aprēķinam, ņemot vērā laikā mainīgās procesa izmaiņas.

3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

Promocijas darbā izvirzītās pamatproblēmas, t. i., optimāla *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 biomasas iznākuma ieguvei ar optimāla piebarošanas profila lietošanu (skat. 3.1. att.), tika risināti sekojošie uzdevumi:

1. Sistēmas un analītisko mērījumu pārbaude, veicot biomasas optimizācijas pētījumu *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kolbu mērogā: mikroorganismu kultūras pārbaude, kultivēšanas apstākļu un atkārtojamības pārbaude, biomasas mērījuma precizitātes noteikšana pie zemām biomasas koncentrācijām, kultivēšanas temperatūras un pH procesa sākumā ietekmes uz biomasas iznākumu, novērtēšana.

2. Fermentācijas procesu modelēšana.

2.1. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru identificēšana partijas procesam kolbās *E. coli* BL21 (DE3) pBR327: relatīvi vienkārša kultivēšanas modeļa sastādīšana un modeļa parametru identificēšana kultivācijas procesiem kolbu mērogā.

2.2. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru identificēšana partijas procesam bioreaktorā ar piebarošanu *E. coli* BL21 (DE3) pBR327: kultivēšanas procesa ar piebarošanu, modeļa sastādīšana un modeļa parametru identificēšana.

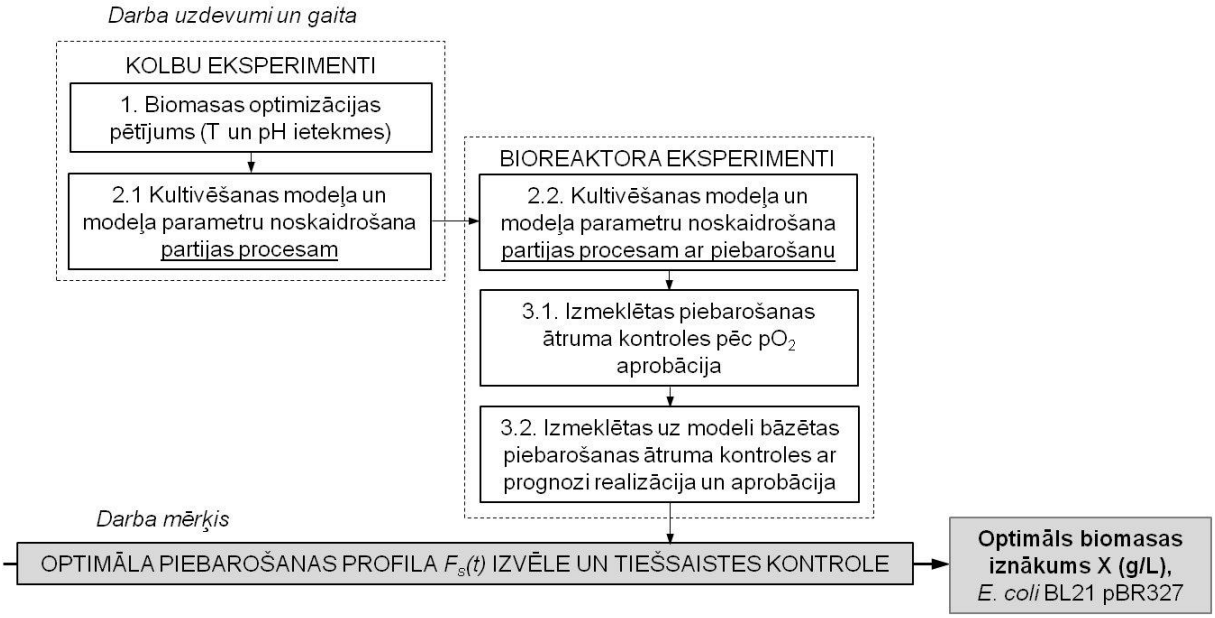
3. Procesa kontrole tiešsaistē.

3.1. Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam atkarībā no tiešsaistes pO_2 rādījuma: piebarošanas ātruma automātiska kontrole procesa otrajā stadijā.

3.2. Procesa modelēšana un modeļa parametru identificēšana tiešsaistē: procesa modelēšana atkarībā no procesa aktuālā stāvokļa, piebarošanas ātruma korekcijas aprēķins balstoties uz biomasas un glikozes koncentrāciju bezsaistes (rokas) mērījumiem.

3.3. Ar modeli prognozējoša piebarošanas ātruma kontrole, lai nodrošinātu biomasas augšanu pēc uzstādītā references biomasas profila: procesa atkārtojamības nodrošināšana, procesa automatizācija.

Veikta biomasas koncentrācijas, fermentācijas procesa beigās, optimizācija, optimizācijas kritērijs ir biomasas koncentrācija X, g/l.

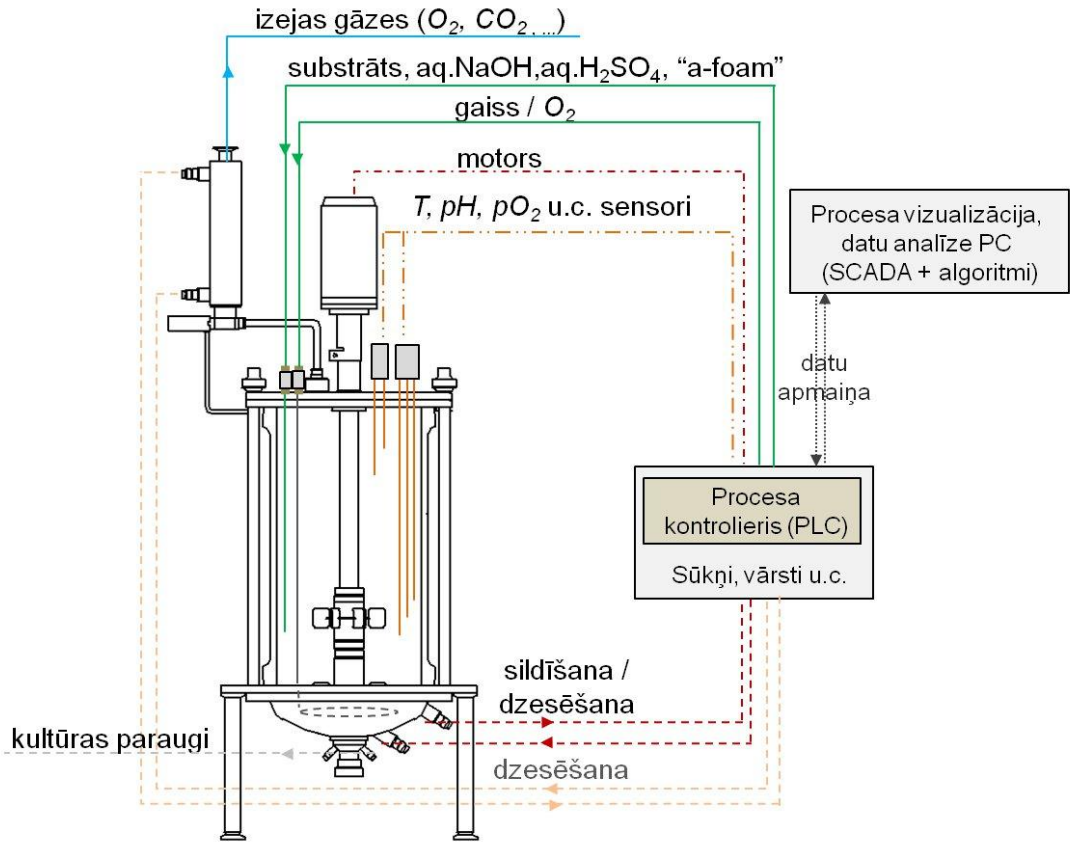


3.1. attēls. Promocijas darbā risināmās pamata problēmas saistība ar risinātajām apakšproblēmām

3.1. Iakārtas un aprīkojums

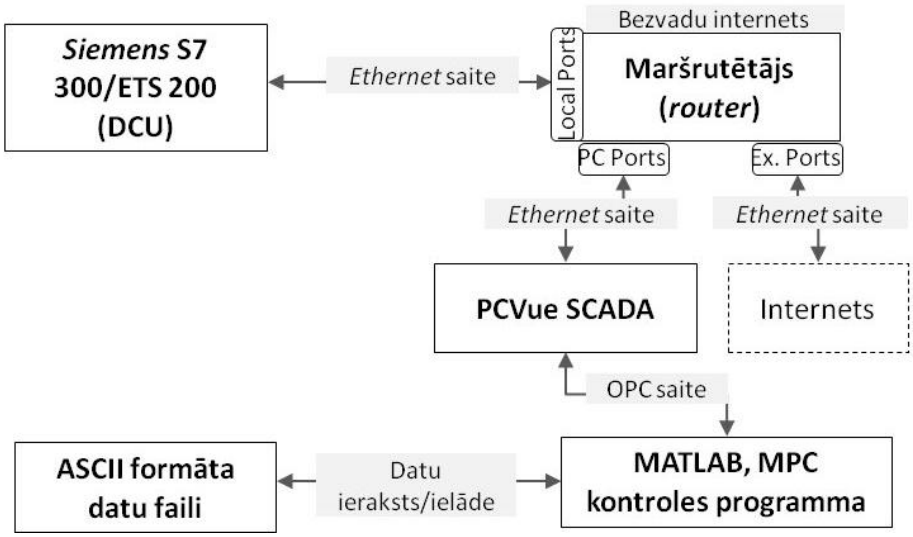
3.1.1. Laboratorijas bioreaktors EDF-5.4/BIO-4

Fermentācijas procesi veikti laboratorijas bioreaktorā EDF-5.4/BIO-4 (Rīga, Latvija). (attēls 2.2. A). EDF-5.4/BIO-4 sastāv no 5,4 l stikla reaktora, kura darba tilpums ir 2–4 l, divām standarta Ruštona turbīnām, izejas gāzu kondensatora un bioprocesu kontroliera BIO-4. EDF-5.4/BIO-4 uzbūves un komunikācijas sistēmas principiālas shēmas attēlotas attiecīgi 3.2. un 3.3. attēlos. Procesa laikā bez standarta temperatūras, pH, pO_2 un putu līmeņa mērījumiem un kontroles iespējām, papildu iespējams mērīt O_2 un CO_2 koncentrācijas izejas gāzēs, kā arī noteikt kultūras duļķainību ar biomasas sensoru. Eksperimentu gaitā piebarojamo šķīdumu padeva periodiski (EDF-5.4 standarta komplektācijā ietilpstošais sūknis) vai ar nepārtrauktas darbības peristaltisko sūkni (*Longer-Pump*, BT100–2J, *Baoding, Hebei*, Ķīna).



3.2. attēls. EDF-5.4 bioreaktora principiāla uzbūve

Galvenās tā daļas sastāv no (1) reaktora trauka, (2) sensoriem (T, pH, pO_2), (3) procesa kontroliera, (4) procesa izpildes elementiem (maisītāja motors, termostats, peristaltiske sūkņi šķīdumu padevei reaktorā, vārsti gaisa/O_2 padevei), (5) procesa vizualizācijas un izmeklētiem kontroles algoritmiem (SCADA un *Matlab* algoritmi)



3.3. attēls. BIO-4 kontroles sistēmas principiāla shēma

3.1.2. Vienreiz lietojamais laboratorijas bioreaktors CellVessel 5.7

Vienreiz lietojamais CellVesel 5.7 (*CerCell*, Holte, Dānija) polikarbonāta bioreaktors tika savietots ar BIO-4 kontrolieri. Tā kopējais tilpums ir 5,7 l ar darba tilpumu 2–4,5 l. Tam ir četras standarta Ruštona tipa turbīnas un izejas gāzu kondensators. Reaktoru EDF-5.4 un CellVesel 5.7 daži raksturlielumi ir apkopoti 3.1. tabulā.

3.1. tabula

EDF-5.4 un CellVesel 5.7 reaktoru raksturlielumi

Raksturlielums	EDF-5.4	CellVesel 5.7
Trauka materiāls	Sikls (borsilikāts), nerūsējošais tērauds (316L)	Polikarbonāts
Trauka iekšējais augstums (m)	0,32	0,35
Trauka iekšējais diameters (m)	0,14	0,15
Turbīnas (skaits)	2	4
Trauka tilpums līdz 1. turbīnai (l)	0,7	0,8
Trauka tilpums līdz 2. turbīnai (l)	2,0	1,4
Trauka tilpums līdz 3. turbīnai (l)	—	2,1
Trauka tilpums līdz 4. turbīnai (l)	—	2,9
Turbīnas lāpstiņas (skaits)	6	6
Turbīnas lāpstiņu laukums (cm2)	3,4	0,8
Atsitēji (skaits)	3	3
Atsitēju augstums (m)	0,28	0,34
Atsitēju platums (m)	0,018	0,017

3.1.3. Papildaprīkojums

Sensori

Bioreaktoru kontrolē izmantoja sekojošus sensorus: pH (*Ingold*, Toledo 405-DPAS SC K85/120), pO_2 (*Ingold*, Toledo InPro 6800), O_2 un CO_2 koncentrācijas izejas gāzē (*Bluesens*, *BlueInOneFerm*, CO_2: 0–25 Tilp.%, O_2: 0,1–25 Tilp.%), biomasa (*Optek*, ASD19-EB-01).

Inkubators

Sējmateriāla sagatavošanai iesēšanai bioreaktorā, kā arī kolbu eksperimentu veikšanai izmantoja orbitālo kratītāju/inkubatoru ES-20 (*Biosan*, Rīga, Latvija).

Kolbas

Biomasas iznākuma optimizācijas eksperimentos (4.1. nod.) lietoja standarta 250 ml Erlenmeijera kolbas ar sākuma darba tilpumu 50 ml. Pārējos kolbu eksperimentos lietoja standarta 500 ml Erlenmeijera kolbas ar sākuma darba tilpumu 100 ml.

3.2. Kultivēšana

3.2.1. Mikroorganismu kultūra

E. coli BL21 (DE3) (*ATCC, American Tupe Culture Collection*) rekombinantais celms satur pBR327 plazmīdu hepatīta B kor-antigēna ekspresijai (Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs).

3.2.2. Kultivēšanas apstākļi

Kolbu un bioreaktora eksperimentos izmantoja barotni un piebarošanas šķīdumu, kādi aprakstīti R. Baipaja pētījumā [36] (skat. 3.2. tabulu). Šāda tipa, līdzīga barotne lietota *E. coli* B un K-12 celmu salīdzināšanas pētījumā [39], kas norāda par tās universālu pielietojumu attiecīgo *E. coli* celmu pietiekamas barības bāzes nodrošināšanai biomasas augšanas vajadzībām.

Kā sējmateriāls tika sagatavoti 100 ml pirmskultūras, kas audzēta kolbā, sākotnējās vides (*batch*) barotnē (14–16 h, OD_{560}=4,0–4,5). pH vērtība 7,0±0,2 tika kontrolēta, izmantojot 30 % nātrija hidroksīda un 20 % sērskābes šķīdumus, temperatūra tika uzturēta pie 37,0±0,2 ˚C. pO_2 vērtība 40±5 %, sasniedzot uzstādītās vērtības apakšējo robežu, tika kontrolēta palielinot maisītāja rotācijas ātrumu līdz pieļaujamajam maksimumam un tad bagātinot ieejas gaisu ar tīru skābekli. Skābekļa bagātināšanas impulsa garums tika izteikts procentos no perioda T=20 s. Gaisa plūsma procesā bija 1,7 l/min, savukārt skābekļa plūsma impulsa brīdī 0,33 l/min. pO_2 kaskādes kontrolē lietoto izpildes elementu augšējās un apakšējās robežas norādītas 3.3. tabulā. Mitruma kondensēšanai no izejas gāzēm, tika izmantots kondensators. Putu līmenis tika kontrolēts pievienojot pretputu līdzekli A (*Sigma*).

3.2. tabula

Sākotnējās vides un piebarošanas šķīdumu sastāvi *E. coli* procesos

Komponents	Sākotnējā vide	Piebarošanas šķīdums
glikoze	5,0 g/l	400 g/l
rauga ekstrakts	5,0 g/l	—
$(NH_4)_2SO_4$	3,5 g/l	94 g/l
KH_2PO_4	5,6 g/l	—
K_2HPO_4	0,45 g/l	—
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,35 g/l	5,54 g/l
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,0 mg/l	1,33 g/l
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	17,0 mg/l	—
$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$	6,5 mg/l	—
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	6,0 mg/l	—
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	6,0 mg/l	—
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	3,0 mg/l	—
H_3BO_3	3,0 mg/l	—
B_1 vitamīns	3,0 mg/l	—

3.3. tabula

pO_2 kaskādes kontroles izpildes elementu augšējās un apakšējās robežas

Maisītājs		Bagātināšana ar O_2		Automātiska piebarošana	
n_{min}	350 apgr./min	Q_{O2min}	0 %	Q_{Fmin}	0.00 ml/min
n_{max}	800 apgr./min	Q_{O2max}	20 %	Q_{Fmax}	6,00 ml/min

3.2.3. Piebarošanas ātruma aprēķins un kontrole

Kultūras piebarošanai ar substrātu, nepieciešams aprēķināt substrāta piebarošanas profilu, lai nodrošinātu ar glikozi limitētu un kontrolētu biomasas augšanu. Šim nolūkam izmantoja vienādojumu:

$$F_s = \frac{1}{s_f}\left(\frac{\mu_s}{Y_{xs}} + m_s\right) \cdot V_0 \cdot x_0 \cdot e^{\mu_{(izv)}(t-t_0)} \tag{3.1}$$

kur F_s – substrāta piebarošanas ātrums, ml/min; x_0 – biomasa piebarošanas sākumā, g/l; V_0 – tilpums piebarošanas sākumā; $\mu_{(iztv)}$ – izvēlētais šūnu īpatnējā augšanas ātruma profils, 1/h; s_f – substrāta koncentrācija piebarošanas šķīdumā, g/l; Y_{xs} – biomasas iznākums pēc substrāta, g/g; m – biomasas uzturēšanas enerģija, g/g/h; t – procesa laiks, h; t_0 – procesa laiks piebarošanas sākumā.

Piebarošanas profila kontrole atsevišķos bioreaktora fermentācijas eksperimentos, atkarībā no konkrētajā eksperimentālajā stadijā pieejamā tehniskā risinājuma un aprīkojuma, tika kontrolēta sekojošā veidā:

1. Substrāta piebarošana ar impulsiem (ieslēgšanās/izslēgšanās periods 10 s) un soļveida piebarošanas profila punktu aproksimāciju, kur piebarošanas profila punkti aprēķināti no formulas 3.2, kā arī koriģēti eksperimentālo datu modelēšanas gaitā. Atsevišķos procesos realizēta piebarošanas ātruma (F_s) kontrole pēc pO_2. Šādu kontroli realizēja sadaļās 4.3.1 (Piebarošanas procesa modelis ar kinētiskiem un masas līdzsvara *X, S, V* un *A* vienādojumiem) un 4.4 (Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole pēc pO_2 *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam) aprakstītajos eksperimentos.
2. Apkopojot informāciju par būtiskākajām vielu plūsmām uz un no bioreaktora fermentācijas procesa beigās (skat. 4.8. att.) b-2 eksperimentam, kas uzskatāms par vidējo gadījumu starp pārāk limitētu un pārāk pārbarotu procesu, var secināt, ka vislielāko tilpuma daļu procesa beigās sastāda pievienotais substrāts (40,7 %), noņemtie kultūras paraugi (14,1 %), pievienotie pretputu līdzeklis (11,3 %) un bāze (7,9 %). Mazāku ietekmi uz tilpuma maiņu procesa gaitā atstāja tilpuma zudumi līdz ar CO_2 izdalīšanos (3,7 %) un šķidruma iztvaikošanu (1,1 %).
3. Nepārtraukta substrāta piebarošana ar lineāru piebarošanas profila punktu aproksimāciju, kur piebarošanas profila punkti aprēķināti no formulas 3.2., kā arī koriģēti eksperimentu laikā un eksperimentālo datu modelēšanas gaitā. Šādu kontroli realizēja sadaļā 4.3.2 (Piebarošanas procesa modelis ar kinētiskiem un masas līdzsvara *X, S* un *V* vienādojumiem) aprakstītajos eksperimentos.
4. Nepārtraukta substrāta piebarošana ar lineāru piebarošanas profila punktu aproksimāciju, kur piebarošanas profila punkti aprēķināti no formulas 3.2., kā arī koriģēti eksperimentu laikā un eksperimentālo datu modelēšanas gaitā ar izstrādāto uz modeli bāzēto biebarošanas ātruma kontroles (MPC) sistēmu. Šādu kontroli realizēja sadaļā 4.5 (Izmeklēta uz modeli bāzēta piebarošanas ātruma kontrole *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam ar prognozi pēc references profilu datiem) aprakstītajos eksperimentos.

Augstāk minētās piebarošanas ātruma kontroles metodes un algoritmi sīkāk aprakstīti sadaļā 3.6 – Kontroles algoritmi.

3.3. Analītiskie mērījumi

E. coli BL21 (DE3) pBR327 biomasas augšanai procesa laikā tika sekots līdzi manuāli mērot optisko blīvumu (*OD*) pie viļņa garuma 560 (Jenway, 6300, Essex, England). Biomasas koncentrācija aprēķināta reizinot *OD* ar iepriekš noteiktu korelācijas koeficientu 0,45. Glikoze mērīta enzimātiski (*AccuChek ACTIVE, Roche,* Bāzele, Šveice). Acetātu koncentrācija tika noteikta ar HPLC (*Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA,* ASV, *Agilent 1100,* stacionārā fāze: *Aminex HPX*).

3.4. Procesu modelēšana

3.4.1. Modeļi un modeļa parametri

Darbā aprakstīto fermentācijas procesu modelēšanu veica ar mehānistiskiem matemātiskiem modeļiem (referencei skat. 3.4. tab. norādītos modeļa parametru izcelsmes avotus). Katrā atsevišķā eksperimentālajā stadijā izmantotie matemātiskie modeļi, kā arī to izcelsme, aprakstīti rezultātu sadaļā. Modeļa parametru vērtības, apkopotas no literatūras, pieejamas 3.4. tabulā. Vidējās parametru vērtības, noteiktās no literatūras datiem, tika lietotas kā izejas parametru vērtības kolbu un bioreaktora eksperimentu modelēšanai. Šo parametru manuāla koriģēšana veikta modelēšanas kvalitātes uzlabošanai. Rezultātu sadaļā apkopotas noteikto parametru vērtības.

3.4. tabula

Modeļa parametri no literatūras

Param.	**Vien.**	***E. coli* K-12**	**Avots**	***E. coli* BL21**	**Avots**	**Vidējā vērtība**
Y_{xs}	g/g	0,51 0,52	(40) (28)	0,46 0,50	(138) (139)	0,50
Y_{ox}	g/g	0.54*	(40)	—	—	0.54
Y_{xa}	g/g	0,4 0,26	(40) (28)	0,56	(140)	0,41

Y_{xar}	g/g	0,25	(141)	—	—	0,25
Y_{as}	g/g	0,67 0,994	(40) (28)	—	—	0,832
q_{sMax}	g/g/h	1,35 2,125	(40) (28)	1,60 1,68	(138) (139)	1,69
q_{aMax}	g/g/h	0,15 0,10	(40) (28)	0,21	(140)	0,153
q_{sKr}	g/g/h	0,39* 0,99* 1,49*	(40) (28) (36)	—	—	0,96
K_s	g/kg	0,05 0,119	(40) (28)	0,003 0,15	(138) (139)	0,081
K_a	g/kg	0,05	(40)	—	—	0,05
K_{O2}	g/kg	$3{,}2*10^{-6}$	(142)	—	—	$3{,}2*10^{-6}$
$K_{i,a}$	g/kg	4 17,64	(40) (28)	—	—	10,82
m_s	g/g/h	0,04 0,0089	(40) (28)	0,0242	(138)	0,024
m_{o2}	g/g/h	0,018*	(40)	—	—	0,018
Papildu parametri, kas lietoti bioreaktora procesu modelēšanai						
$K_{i,s}$	g/kg	—	—	93,8 16,50	(138) (139)	55,15
$K_{r,a}$	g/kg	3,6* (143)				3,6
$K_{x,au}$	g/kg	Modeļa parametrs noteikts eksperimentāli.				
K_{xMax}	g/kg	86*	(38)	86*	(38)	86
Y_{xRE}	g/g	0,51*	(144)			
Y_{bx}	g/g	Modeļa parametrs noteikts eksperimentāli.				
t_{RE}	h	Modeļa parametrs noteikts eksperimentāli.				
q_{sKr1}	g/g/h	Modeļa parametrs noteikts eksperimentāli.				

*: Parametrs noteikts no raktsā pieejamajiem datiem

3.4.2. Modeļu precizitātes aprēķināšana

Modeļu precizitāti izteica kā eksperimentālo datu un modelēto datu vidējo standartnoviržu kvadrātu summu attiecinātu pret eksperimentālo datu vidējo vērtību, rezultātā iegūstot modeļa relatīvo novirzi no eksperimentālajiem datiem, izteiktu procentos:

$$x_s = \sqrt{\frac{\sum\left(x_{i,exp} - x_{i,mod}\right)^2}{n}} \tag{3.2}$$

$$\bar{x}_{exp} = \frac{\sum x_{i,exp}}{n} \tag{3.3}$$

$$r_x = \frac{x_s}{\bar{x}_{exp}} \cdot 100\% \tag{3.4}$$

kur x_s – modelētā x komponenta standartnovirze no eksperimentāli noteiktā x; $x_{i,exp}$ – eksperimentāli noteiktais x punktā i; $x_{i,mod}$ – modelētais x punktā i; n – eksperimentālo mērījumu skaits; $\bar{x}_{exp}$ – eksperimentālo mērījumu vidējā vērtība; r_x – modelētā x modeļa relatīvā novirze no eksperimentālajiem datiem izteikta %.

Vienādojumu 3.4 lietoja biomasas (r_x), substrāta (r_s) un acetātu (r_a) modelēšanas precizitātes aprēķinos.

3.4.3. Diferenciālvienādojumu integrēšana

Diferenciālvienādojumu integrēšanu veica *Matlab* vidē ar standarta diferenciālvienādojumu risināšanas funkciju *ode15s* (mainīgās kārtas metode sarežģītu diferenciālvienādojumu sistēmu risināšanai).

3.5. Biomasas veidošanās limitējošo faktoru novērtējums

Pirms kultivēšanas modeļu sastādīšanas, veica biomasas augšanas limitējošo faktoru novērtēšanu, tādējādi iezīmējot potenciāli modelējamos parametrus, kritiskās parametru vērtības, un novērtējot iespējamo biomasas pieaugumu.

3.5.1. Kolbu eksperimenti

Pirms kolbu eksperimentu veikšanas bija zināms, ka (1) biomasas pieaugumu kolbu mērogos limitēs pieejamais barības vielu daudzums, kas eksperimentu laikā papildus netiks

pievadīts, tādēļ teorētiskais biomasas iznākuma novērtējums ir iespējams, zinot oglekļa avota (glikozes) koncentrāciju, kā arī papildu pievienotā rauga ekstrakta koncentrāciju; (2) jānovērtē potenciālais skābekļa limits, kam ir būtiska loma biomasas veidošanā, un, kuru visbūtiskāk ietekmē tādi raksturlielumi, kā kolbu kratītāja orbitālais griešanās ātrums (*n*), kolbas forma/tilpums/darba tilpums, kolbu noslēgu veids u. c.; (3) acetātu inhibīcija un mazāk efektīva biomasas augšana no neoksidatīvi uzņemtās glikozes produktiem; (4) limitētais fermentācijas procesa laiks, 7 h.

Barības vielu limits

Ņemot vērā ierobežoto glikozes un rauga ekstrakta piedevas pievienotos daudzumus procesa sākumā, un, ka šie komponenti papildus procesa laikā netiks pievienoti, iespējams novērtēt teorētisku biomasas iznākumu, patērējot dotos komponentus. Glikozes un rauga ekstrakta koncentrācijas procesa sākumā ir 5 g/l katram komponentam. Bimasas iznākums no glikozes Y_{xs} ir 0,50 (tabula 3.4). Ņemot vērā tikai glikozes ietekmi, teorētisks biomasas iznākums no šāda glikozes daudzuma ir $x=5*0,5=2,5$ g/l. Zināms [144], ka rauga ekstrakts darbojas kā papildu substrāts, kas paaugstina biomasas augšanas ātrumu un biomasas iznākumu no glikozes līdz pat divām reizēm. Tādējādi ņemot vērā arī rauga ekstrakta ietekmi uz biomasas veidošanos, iegūst $x=5*0,5*2=5,0$ g/l.

Skābekļa limits

Skābekļa pārneses no gāzes uz šķidro fāzi, efektivitāti raksturo tilpuma masas pārneses koeficients (k_La). Līdzīgiem kolbu eksperimentiem, kādus veica šī darba ietvaros, šī koeficienta vērtību var atrast literatūrā k_La=0,013 s^{-1} (46,8 h^{-1}) [145]. O_2 šķīdības, masas pārneses ātruma OTR, uzņemšanas ātruma un biomasas augšanas ātruma aprēķiniem izmantoja vienādojumus 3.5–3.8.

$$o_s = C_{H2O} P\, \alpha_{O2}/H \tag{3.5}$$

$$OTR = (o_s - o_2)k_L a \tag{3.6}$$

$$OUR = Y_{ox}\mu_s x + m_{o_2} x \tag{3.7}$$

$$\mu_1 = ln\frac{x_1}{x_0}/(t_1 - t_0) \tag{3.8}$$

kur o_s – skābekļa šķīdība, g/l; o_2 – skābekļa koncentrācija, g/l; C_{H2O} – šķīdinātāja (ūdens) koncentrācija, g/l; P – gāzu parciālais spiediens šķīdumā, Pa; α_{O2} – O_2 masas daļa gaisā; H –

Henrija konstante, Pa; *OTR* – specifiskais skābekļa pārneses ātrums, g/kg/h; *OUR* – specifiskais skābekļa uzņemšanas ātrums, g/kg/h; x – biomasas konecentrācija, g/l; x_0 – biomasas koncentrācija laika momentā t_0, *g/l*; x_1 – biomasa koncentrācija laika momentā t_1, g/l; μ_1 – šūnu īpatnējais augšanas ātrums ar kādu uzkrājās biomasa $\Delta x_1=x_1-x_0$, 1/h. k_La – tilpuma masas pārneses koeficients priekš O_2, 1/h; μ_s – specifiskais biomasas augšanas ātrums, 1/h; Y_{ox} – skābekļa patēriņš uz biomasas vienību, g/g; m_{o2} – nepieciešamais skābekļa daudzums biomasas uzturēšanai, g/g/h.

Konstantes:

$C_{H2O}=1000$ *g/kg;*

$P=101300$ *Pa;*

$\alpha_{O2}=0,2095$;

$H= 3,15*10^9$ *Pa, pie T=37°C;*

$Y_{ox}=0,54$ *g/g;*

$m_{O2}=0,018$ *g/g/h .*

Aprēķini:

$os=1000*101300*0,2095/3,15*10^9=0,0067$ *g/kg;*

$OTR=0,0067*46,8=0,314$ *g/kg/h.*

Biomasas specifiskais augšanas ātrums 4 h: $\mu_4=ln(1,04/0,57)/(4-3)=0,60$ *1/h.*

Specifiskais skābekļa uzņemšanas ātrums 4 h:

$OUR=0,54*0,60*1,04+0,018*1,04=0,3564$ *g/kg/h.*

Starpība starp skābekļa piegādes un patēriņa ātrumiem 4 h:

$OTR-OUR=0,314-0,3564= -0,0424$ *g/kg/h.*

3.5. tabula

Skābekļa limita novērtējums no pieejamajiem kolbu eksperimentu datiem

t, h	x, g/l	s, g/l	μ, 1/h	OTR-OUR, g/kg/h
0	0,03	5,26	—	—
1	0,08	5,08	0,98	0,2702
2	0,19	4,75	0,86	0,2218
3	0,57	4,10	1,10	-0,0344
4	1,04	2,95	0,60	-0,0424

5	1,43	0,99	0,32	0,0424
6	1,60	0,29	0,11	0,1881
7	1,67	~0	0,04	0,2453

No aprēķiniem var secināt, ka kolbu eksperimentos iespējams skābekļa limits, kas var samazināt biomasas augšanas ātrumu. Var novērtēt, ka precīzākai biomasas augšanas ātruma modelēšanai, matemātiskais modelis, kas apraksta divu, būtiski svarīgu substrātu biomasas veidošanai [146], limita ietekmi uz biomasas augšanu, iespējams, ka jāņem vērā.

Acetātu inhibīcija un glikozes nelietderīga konversija acetātos

Acetātu koncentrācija virs 2 g/l inhibē biomasas augšanu. Daļa no glikozes konversijas acetātos, un acetātu atkaluzņemšana, pēc glikozes utilizācijas, rezultējas papildu oglekļa un enerģētiskajos zudumos, kas kopumā var samazināt biomasas iznākumu no glikozes.

Limitētais fermentācijas procesa laiks

Lietojot vienādojumu 3.8., iespējams aprēķināt 7 h laikā teorētiski iespējamo biomasas pieaugumu. Zinot biomasas augšanas ātruma kritisko vērtību $\mu_{Kr}=0,99*0,5=0,495\ h^{-1}$(tabulas 3.4 dati), un aptuvenu biomasas koncentrāciju procesa sākumā $x_0=0,03$±0,09 g/l, teorētiski iespējams biomasas pieaugums $x=0,12*e^{0,495*7}=3,84\ g/l$.

3.5.2. Bioreaktora eksperimenti

Pirms bioreaktora eksperimentu veikšanas bija zināms, ka biomasas pieaugumu bioraktora eksperimentos nelimitēs pieejamais substrāta daudzums, jo bioreaktora eksperimentos fermentācijas procesu laikā, pēc barotnē sākotnēji pieejamās glikozes uzņemšanas, papildu tiks piebarots (pievadīts) glikozes substrāta šķīdums; teorētisks biomasas iznākuma aprēķins iespējams, ņemot vērā teorētiski piebarojomo glikozes substrāta daudzumu; (2) jānovērtē potenciālais skābekļa limits, kuru ietekmē bioreaktora konfigurācija; (3) eksperimenta laiks būs limitēts līdz 24 h.

Skābekļa limits

Dažādas k_La vērtības atrodamas literatūrā 5 l mēroga bioreaktoriem. Atkarībā no reaktora konfigurācijas, noteikšanas metodes un apstākļiem, rakstos publicētās k_La vērtības

šim mērogam variē samērā plašās robežās. Literatūras avotos [35, 51] minēta k_La vērtība ap 1000 h^{-1}, *E. coli* fermentācijas procesu aprēķiniem/modelēšanai 10–15 l laboratorijas bioreaktoros. Tipisks *E. coli* biomasas augšanas ātrums biomasas ieguves stadijā pie limitētas, bet tajā pašā laikā pietiekamas, substrāta piebarošanas ir ap 0,35–0,45 h^{-1}. Lietojot sadaļā 3.5.1 (Kolbu eksperimenti) aprakstītos vienādojumus un atsevišķas konstantes, aprēķina teorētisko skābekļa pārneses ātrumu OTR un iegūstamo biomasu pie nosacījuma, ka pie maksimālā skābekļa patēriņa, viss vidē padodamais skābeklis tiek uzņemts (OUR=OTR): $OTR=0,0067*1000=6,7\ g/kg/h;\ x_{O2Lim}=6,7/(0,54*0,45+0,018)=25,7\ g/kg.$

Limitētais fermentācijas procesa laiks

Zināms, ka standarta fermentācijas procesos ar glikozes piebarošanu, maksimāli iegūstamā *E. coli* biomasa ir ap 140 g/l [41, 38]. Lietojot vienādojumu 3.8, iespējams novērtēt teorētisko biomasas specifisko augšanas ātrumu teorētiski maksimālā rezultāta sasniegšanai ierobežoto 24 h laikā. Bioreaktora procesa sākumā, aptuvena biomasas koncentrācija būs $x_0=(0,1ml*2g/l)/2l=0,1\ g/l$, tad maksimālā biomasas iznākuma iegūšanai, specifiskajam biomasas augšanas ātrumam jābūt $\mu=ln(140/0,1)/(24-0)=0,302\ h^{-1}$. Šāds specifiskais biomasas augšanas ātrums, vismaz procesa sākumā, ir zem kritiskā $\mu_{Kr}=0,99*0,5=0,495\ h^{-1}$(tabulas 3.4 dati), pie kuras iespējama acetātu uzkrāšanās.

Acetātu inhibīcija un glikozes nelietderīga konversija acetātos

Bioreaktora eksperimentos glikozes piebarošanu kontrolēja, lai nepārsniegtu kritisko glikozes uzņemšanas ātrumu pie, kura sākas acetātu sintēze. Acetātu biosintēze iespējama procesa sākumā, kad glikozes koncentrācija 5 g/l, un biomasa tādos nosacījumos aug nelimitēti un sintezē acetātus.

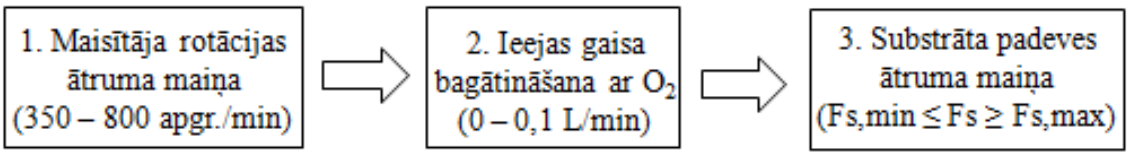
3.6. Kontroles algoritmi

Šajā sadaļā aprakstīta EDF-5.4/BIO-4 bioreaktora vadībības sistēma un tajā ietvertie kontroles algoritmi, kas izmantoti darba uzdevumu risināšanai. Standarta T, pH un pO_2 kontroles algoritmus izstrādājuši A/S «Biotehniskais centrs» inženieri. Izmeklētos piebarošanas ātruma MPC kontroles un datu apstrādes algoritmums *Matlab* vidē izstrādājis profesors *Dr. sc, ing. Vytautas Galvanauskas* (Kauņas Tehnoloģiju Universitāte, Automatizācijas katedra). Darba autors veicis iepriekšminēto kontroles algoritmu kontroles

parametru konfigurāciju, tos specifiski pielāgojot *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas procesam.

3.6.1. Piebarošanas ātruma pastarpināta kontrole pēc pO_2

pO_2 kaskādes kontrolē izmantoja sekojošas iedarbes (skat. 3.4. att.): maisītāja griešanās ātruma regulēšanu, ieejas gaisa impulsveida bagātināšanu ar O_2 un piebarošanas ātruma kontroli. pO_2 kaskādes regulāciju veic tiešsaistes režīmā automātiski mērot pO_2 un palaižot/regulējot katru no atbilstošajiem izpildes elementiem.



3.4. attēls. Lietotā pO_2 kaskādes kontroles struktūra un īpašības

Kaskādes regulācija darbojas saskaņā ar sekojošiem principiem:

1. Pirms procesa sākšanas tiek nodefinēts, kuras kaskādes un kādā secībā piedalīsies pO_2 regulācijā. pO_2 vadība sākas ar pirmo kaskādi. Process attiecīgajā kaskādē tiek kontrolēts tik ilgi, kamēr netiek sasniegta regulējošā elementa limitējošā vērtība. Ja tiek sasniegta regulējošā vērtība, tad notiek pāreja uz nākošo vai iepriekšējo kaskādi, atkarībā no tā, kura, minimālā vai maksimālā, limitējošā vērtība sasniegta. Pāreja uz citu kaskādi notiek pēc noteikta aiztures laika. Pāreja uz nākošo kaskādi nevar notikt, ja tekošā kaskāde ir pēdējā.

2. Katra kaskāde var tikt apstādināta vai pārtraukta. Ja kaskāde tiek pārtraukta, tad tiek „iesaldēts" vadāmā elementa stāvoklis, un, atjaunojot procesa regulāciju, tā sākas no tā izpildelementa stāvokļa, kur tā tika apstādināta. Ja kaskādes regulācija tiek pārtraukta, tad regulāciju atjaunojot, tā sākas no jauna ar pirmo kaskādi.

3. Regulācija konkrētā kaskādē sākas ar noteiktu izpildelementa stāvokli. Šis stāvoklis atbilst kādai no limitējošām vērtībām. Sasniedzot limitējošo vērtību, notiek pāreja uz nākošo vai iepriekšējo kaskādi. Izpildelements turpina darboties nākošajā kaskādē ar tā pēdējo stāvokli.

Detalizēts pO_2 kaskādes kontroles principa apraksts:

1. Maisītāja griešanās ātruma regulēšana. pO_2 regulēšana tiek veikta, mainot maisītāja griešanās ātrumu saskaņā ar esošo pO_2 vērtību, uzstādīto pO_2 vērtību, mirušo zonu un PID algoritmu (eksperimentu gaitā piemeklētie PID parametri norādīti 3.6. tabulā). Ja pO_2 vērtība atrodas diapazonā (uzstādītā vērtība – mirusī zona) < uzstādītā vērtība < (uzstādītā vērtība + mirusī zona), tad maisītāja griešanās ātrums nemainās un PID kontrole nav pārtraukta. pO2 variēšana tiek ierobežota ar minimālo un maksimālo maisītāja griešanās ātrumu. Ja pO_2 vērtība ir mazāka nekā (uzstādītā vērtība – mirusī zona), tad maisītāja griešanās ātrums pieaug saskaņā ar PID parametriem, ņemot vērā maksimālo maisītāja ātrumu. Ja pO_2 vērtība ir lielāka nekā (uzstādītā vērtība + mirusī zona), tad maisītāja griešanās ātrums samazinās saskaņā ar PID parametriem, ievērojot minimālo maisītāja griešanās ātrumu. Svarīgi ir ņemt vērā, ka maisītāja griešanās ātrums nevar palielināties, ja barotnē parādās putas.

2. Ieejas gaisa impulsveida bagātināšana ar O_2. Šis pO_2 kontrolēšanas veids ir balstīts uz ieejas gaisa impulsveida bagātināšanu ar O_2 saskaņā ar skābekļa padeves vārsta impulsiem, saskaņā ar pO_2 vērtību, uzstādītās O_2 vērtības, mirušās zonas un PID algoritmu. Gaisa plūsma paliek konstanta, to uzstāda manuāli un kontrolē ar ventiļa un rotometra palīdzību. O_2 vārsta perioda impulsa aptuvenā vērtība ir viena sekunde. Impulsa ilgums mainās saskaņā ar PID parametriem. pO_2 regulēšanu ierobežo minimālais un maksimālais O_2 vārsta atvēršanās laiks. Skābekļa vārsta atvēršanas laika ilgums kontrolierī tiek uzstādīts procentos no impulsa perioda. Ja pO_2 atrodas diapazonā (uzstādītā vērtība – mirusī zona) < uzstādītā vērtība < (uzstādītā vērtība + mirusī zona), tad O_2 vārsta atvēršanās laiks nemainās, un PID kontrole nav pārtraukta. Ja pO_2 ir mazāks nekā (uzstādīta vērtība – mirusī zona)", tad O_2 vārsta atvēršanās laiks palielinās saskaņā ar PID parametriem, ņemot vērtā maksimālo vārsta atvēršanās laiku. Ja pO_2 ir lielāks nekā (uzstādītā vērtība + mirusī zona), tad O_2 vārsta atvēršanās laiks samazinās saskaņā ar PID parametriem, ņemot vērā minimālo uzstādīto vārsta atvēršanās laiku.

3. Piebarošanas kontrole (substrāta padeves sūknis). Šajā gadījumā pO_2 kontrole tiek veikta balstoties uz substrāta padeves sūkņa ražīguma izmaiņām saskaņā ar pO_2 vērtību, uzstādīto vērtību, mirušo zonu un PID algoritmu. Substrāta padeves sūkņa ražīgums ir proporcionāls analogam izejas signālam. Ja pO_2 atrodas diapazonā (uzstādītā vērtība – mirusī zona) < uzstādītā vērtība < (uzstādītā vērtība + mirusī zona), tad substrāta padeves sūknis neizmaina savu ražīgumu, lai arī PID kontrole ir nepārtraukta. pO_2 izmaiņas ierobežo minimālais un maksimālais substrāta padeves sūkņa ražīgums. Kad pO_2 vērtība sasniedz

vērtību, kas atrodas ārpus uzstādīto vērtību diapazona, tad turpmākā darbība ir atkarīga no PID parametriem. PID kontrole nozīmē pO_2 vērtību vadīšanu, mainot substrāta padeves sūkņa ražīgumu. Jebkura substrāta padeves sūkņa ražīguma palielināšanās (tiešais PID) vai samazināšanās (atgriezeniskais PID) atkarīga no pO_2 lieluma. Tiešā PID gadījumā, ja pO_2 vērtība ir mazāka nekā (uzstādīta vērtība – mirusī zona), tad sūkņa ražīgums palielinās saskaņā ar PID parametriem, ņemot vērā maksimālo sūkņa ražīgumu. Ja pO_2 ir lielāka nekā (uzstādītā vērtība + mirusī zona), tad substrāta padeves sūkņa ražīgums samazinās saskaņā ar PID parametriem, ņemot vērā minimālo sūkņa ražīgumu. Atgriezeniskā PID gadījumā, ja pO_2 ir augstāks nekā (uzstādītā vērtība- mirusī zona), tad substrāta padeves sūkņa ražīgums palielinās saskaņā ar PID parametriem, ņemot vērā maksimālo sūkņa ražīgumu. Ja pO_2 ir zemāks nekā (uzstādītā vērtība + mirusī zona), tad sūkņa ražīgums samazinās saskaņā ar PID parametriem, ņemot vērā minimālo sūkņa ražīgumu.

3.6. tabula

Piemeklētie pO_2 kaskādes PID parametri

	pO_2– maisītītājs	pO_2–O_2 bagātināšana	pO_2–Pieb. periodiski (ieslēdz/izslēdz)	pO_2–Pieb. nepārtraukti
Prop gain	150	95	180	60
Integr gain	50	50	125	30
Deriv gain	100	50	250	30
Period	30,0	90.0	600	15
Min action	Nav pielietots	Nav pielietots	Nav pielietots	Nav pielietots
Com gain	1,00	1,00	1,00	1,00
DIR/REV	n/a	n/a	REV	REV

3.6.2. MPC kontrolieris un piebarošanas ātruma kontroles algoritms

BIO-4 īstenotais MPC princips [29] ir balstīts uz piebarošanas ātruma kontroli, lai nodrošinātu procesa biomasas profila XV_{proc} kontroli minimizējot tā novirzes no references biomasas profila XV_{ref}. $X(t)$, $S(t)$ un $V(t)$ references profili katram atsevišķam procesam atbilst modelētajām trajektorijām un tiek izraudzīti/novērtēti modelēšanas procedūras laikā. Pēc tam procesa laikā šis modelis tiek pielāgots aktuālam procesam, lai ar zināmu precizitāti izraudzītos piebarošanas ātrumu, iepriekš izraudzītā biomasas references profila sasniegšanai. Vispārinātā dinamiskā biomasas modeļa forma, kas lietota MPC algoritmā norādīta vienādojumā 3.9. Pielietotjamās MPC sistēmas mērķis (novērtēšanas funkcija) ir definēta, kā

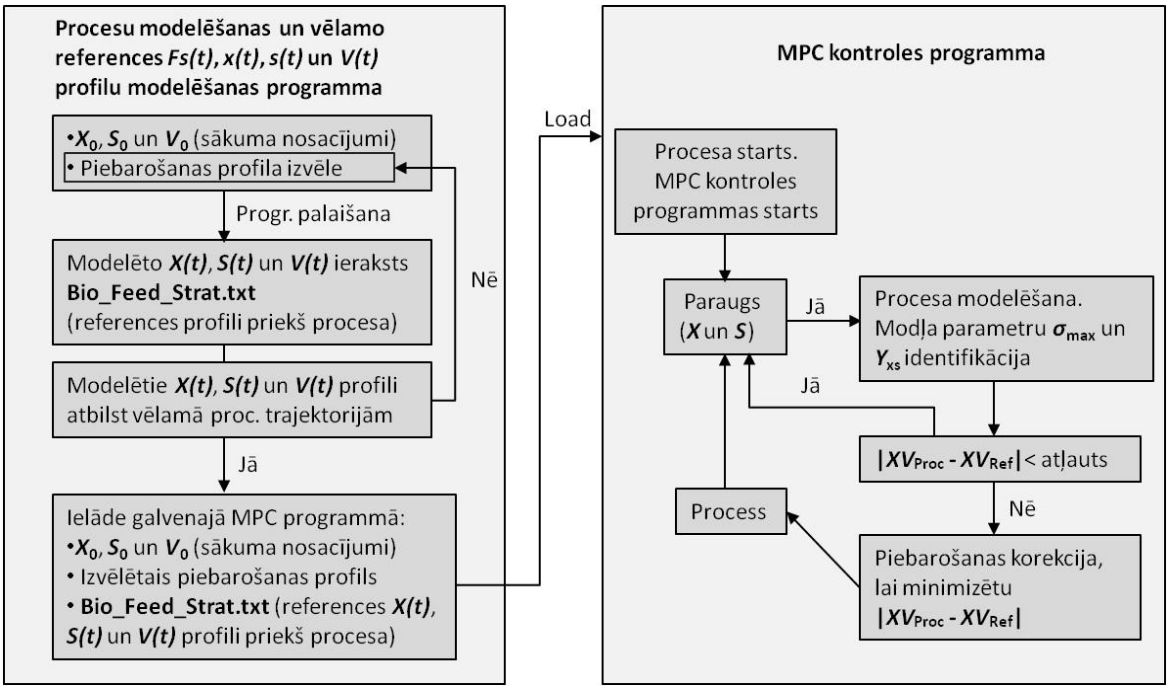
eksperimenta biomasas augšanas profila sekošanas problēma references biomasas profilam (skat. vienād. 3.10), citiem vārdiem sakot, atšķirību minimizēšana starp references un novērtētās biomasas profiliem variējot ar substrāta piebarošanas ātrumu noteiktās robežās (skat. 3.11. vienād.). Pēc modeļa parametru identifikācijas no eksperimentālajiem datiem, tālākas rutīnas procedūras procesa modelēšanai, saistas ar procesa sākotnējo nosacījumu (X_0, S_0 and V_0) definēšanu un tāda piebarošanas profila izvēli, ar kuru var sasniegt vēlamo biomasas augšanas ātrumu pie kontrolētas/limitētas substrāta uzkrāšanās (skat. 3.5. attēlu). Palaižot modelēšanas programmu, modelētie *X(t)* un *V(t)* references profili tiek ierakstīti *Matlab* datu failā priekš lasīšanas/lejuplādēšanas MPC kontroles algoritmā, kas atbildīgs par piebarošanas ātruma kontroli procesa laikā.

$$\frac{dX}{dt} = f(t, X(t), F_s(t), \Theta) \tag{3.9}$$

$$J\big(F_s(t), X(t_0)\big) = \sum_{t_i=t_1}^{t_H} \Big[\Big(X_{progn}(t_i)V_{progn}(t_i) - X_{ref}(t_i)V_{ref}(t_i)\Big)\Big]^2 \rightarrow min \tag{3.10}$$

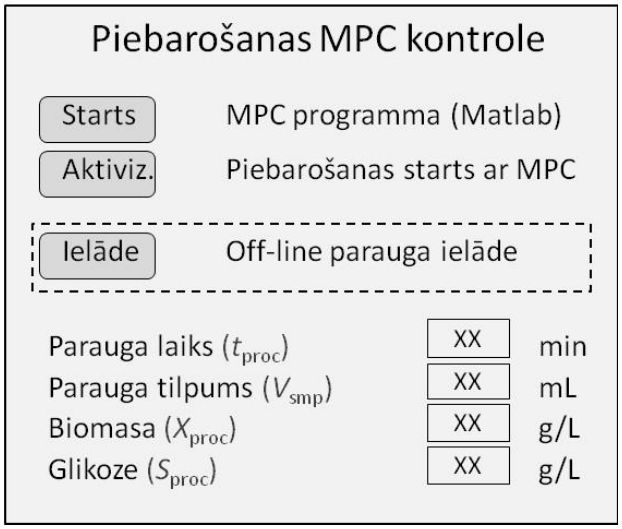
$$F_{s,min} \leq F_s(t) \leq F_{s,max} \tag{3.11}$$

kur J – kontroles novērtēšanas funkcija, g; X – biomasas koncentrācija, g/l; X_{progn} – prognozētā biomasas koncentrācija, g/l; X_{ref} – modelētā references biomasas koncentrācija, g/l; V_{progn} – prognozētais kultūras tilpums, l; V_{ref} – modelētais references kultūras tilpums, l; F_s – substrāta piebarošanas ātrums (kontroles mainīgais), l/h; $F_{s,min}$ – minimālais substrāta padeves ātrums, l/h; $F_{s,max}$ – maksimālais substrāta padeves ātrums, l/h; t – procesa laiks, h; t_0 – 0, h (procesa sākums); t_i– procesa laiks punktā i, h; t_1– sākuma laiks MPC programmai, h; t_H– kontroles horizonta laiks, h; Θ – pielāgojamo (identificējamo) modeļa parametru vektors.

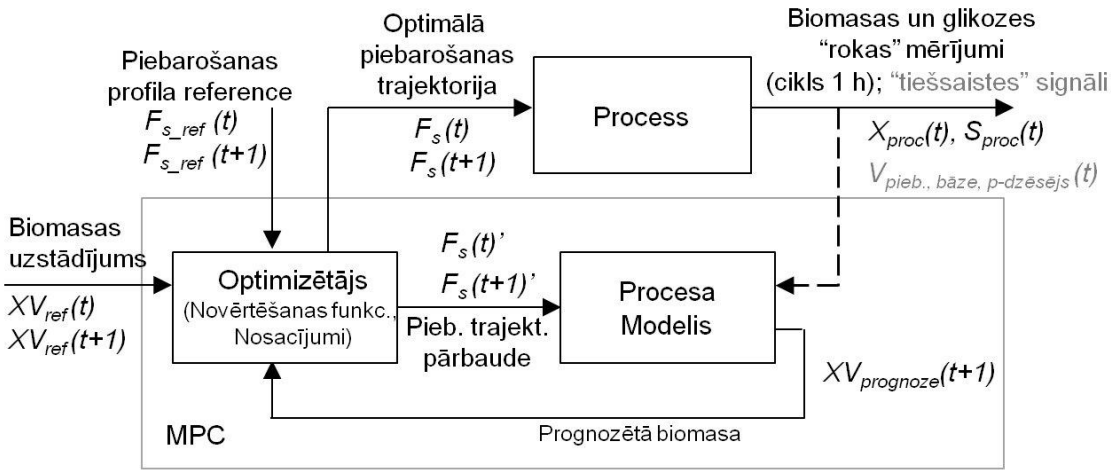


3.5. attēls. MPC piebarošanas profila izvēles un kontroles algoritma pārskats

Dotajā gadījumā piebarošanas profils sastāv no 20 piebarošanas ātruma un atbilstošajiem laika punktiem. Interpolācijai starp šiem punktiem izmantots lineārs tuvinājums. Atkarībā no procesa fāzes, laika intervāli starp šiem punktiem bija 30, 60 vai 120 min. Procesa sākumā tika izvēlēti īsāki laika intervāli, bet vēlāk – garāki. Piebarošanas sākuma laiks tika automātiski aprēķināts balstoties uz pieejamajiem bezsaistes (rokas) biomasas/glikozes mērījumiem un *a priori* vaļējas-cilpas modelēšanas aprēķiniem, lai aktivētu piebarošanas režīmu pie iepriekš noteikta biomasas daudzuma – 5 g. Šajā gadījumā tika pielietots noklusētais iepriekš noteiktais piebarošanas sākuma laiks 210 min (procesa laiks), kuru nepieciešamības gadījumā, lai nodrošinātu procesa biomasas pieaugumu atbilstoši uzstādītajai referencei, sistēma koriģēja uz agrāku vai vēlāku laiku.



3.6. attēls. Ekrānšāviņš no SCADA piebarošanas konroles loga



3.7. attēls. Lietotās MPC sistēmas principiāla diagramma

MPC algoritma programma palaižama vienlaikus ar procesa sākšanos. Pēc tam, kad bezsaistes biomasas un limitējošā substrāta koncentrācijas mērījumi ir ievadīti SCADA programmā (skat. 3.6. att.), datus nolasa MPC algoritms. Pēc noteikta skaita ievadītajiem paraugiem (3–5 mērījumi), tiek uzsākta procesa modeļa parametru (Y_{xs} and q_{sMax}) reidentifikācija. Y_{xs} un q_{sMax} modeļa parametru identifikāciju veica noteiktā ± 30 % diapozonā priekš Y_{xs} un ± 30 % priekš q_{sMax}, tā lai iegūtu labāko modeļa sakritību ar procesa tekošo biomasas augšanas profilu. Pēc tiešsaistes modeļa identifikācijas, tiek veikta biomasas (*XV)* trajektorijas "vienu soli uz priekšu" prognozēšana. Šajā solī tiek izpildīta uz modeli bāzēta optimizācija, skat. 3.7. att. Optimizācijas mērķis ir aprēķināt/labot optimālo piebarošanas ātrumu nākamajam kontroles periodam tādā veidā, lai novirzes no vēlamās references un prognozētās biomasas daudzuma trajektorijas būtu minimālas. Optimizācija notiek katru reizi,

kad tiek veikti *off-line* biomasas un substrāta mērījumi un modeļa parametri ir reidentificēti. Optimizācijas laikā pieļaujamā piebarošanas korekcija bija ± 10 %. Gadījumos, kad prognozes norāda uz to, ka ± 10 % korekcija varētu būt nepietiekama, lai izvairītos no būtiskas substrāta uzkrāšanās, tiks veikta atbilstoša piebarošanas samazināšana pārsniedzot 10 % (pēdējais gadījums tālāk tiek attiecināts kā būtiska substrāta uzkrāšanās). Bezsaistes, tiešsaistes, kā arī modelēšanas dati tiek saglabāti ASCII formāta failos. Lai nodrošinātu drošāku MPC kontroliera darbību, tika izveidots inteliģents filtrs, kas izslēdz būtiski kļūdainus datu lasījumus no SCADA. Kļūdu noteikšanas algoritms balstās uz notiekošā procesa mainīgo vērtību, kā arī to maiņas ātrumu analīzes.

References profila izvēle, modelēšana un uzlabošana

Ja piebarošanas modelis un tā parametri vēl nav eksperimentāli noteikti, tad ieteicams sākumā izvēlēties samazinātu piebarošanas profilu, kuru, nebūtiskas substrāta uzkrāšanās gadījumā, būtu iespējams soli pa solim palielināt un atbilstoši pārveidot, lai uzlabotu procesa produktivitāti. Modeļa parametrus šīs procedūras laikā var identificēt pielāgojot modeli atbilstošajiem eksperimentālajiem datiem. Pēc tam, kad ir veikta parametru indentificēšana, tehnologam jāizvēlas vēlamais biomasas augšanas profils pie noteikta īpatnējā augšanas ātruma, pie kura modelis neuzrāda būtisku inhibējošās substances uzkrāšanos. Pēdējais gadījums ir sīkāk apskatīts rezultātu daļā (skat. nodaļu 4.5.2. Biomasas profila tiešsaistes kontrole).

Lai salīdzinātu aprēķināto procesa biomasu (XV_{est}) ar references profilu (XV_{ref}), un panāktu atbilstošu piebarošanas ātruma kontroli, tika izmantoti biomasas un glikozes „rokas" mērījumi un tilpuma aprēķini. Tilpuma aprēķini tika veikti, izmantojot kalibrēto peristaltisko sūkņu signālus (piebarošanas šķīdumam, bāzei un pretputu līdzekim), ņemot vērā oglekļa zudumus pēc izejas gāzu analīzes datiem, kā arī empīriski novērtējot fermentācijas vides iztvaikošanas ātrumu (1,5 g/h) un paraugu ņemšanas ātrumu 15 g/h. Skābes pievienošana šajā gadījumā netika realizēta.

Pēc biomasas un glikozes koncentrāciju „rokas" mērījumu paraugu ievadīšanas SCADA programmā, un pēc tam sekojošās Y_{xs} un q_{sMax} modeļa parametru identifikācijas, algoritms aprēķina 40 iespējamos piebarošanas ātruma profilus un izvēlas to, kurš vienu soli uz priekšu prognozē mazākās atšķirības starp XV_{est} atbilstošo $XV_{ref.}$ Kontroles horizonta intervāls atbilst laikam starp punktiem piebarošanas profilā. Veiktajos eksperimentos šis laiks bija 60–120 min.

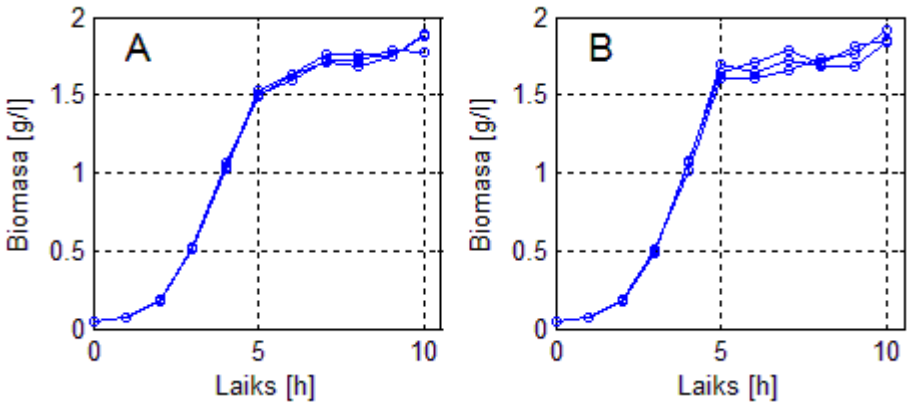
4. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

4.1. Biomasas optimizācijas pētījums *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kolbu mērogam

E. coli BL21 (DE3) pBR327 biomasas ieguves procesa optimizācijas pētījumu uzsāka kolbu mērogā, lai ātrāk iepazītu sistēmu un izvairītos no iespējami nevajadzīgu eksperimentu veikšanas bioreaktora mērogā, kas kopumā ļāva ietaupīt laika un finanšu resursus. Lai samazinātu eksperimentu skaitu, sasniegtu maksimālo mērījumu precizitāti no maza eksperimentu skaita un konstatētu optimālos pētījuma norises apstākļus kolbu mērogā, izmantoja eksperimentu plānošanu. Optimizācijas sākumā izraudzījās plānu, kas deva iespēju iegūt pēc iespējas vairāk informācijas par biomasas iznākumu visvairāk ietekmējošiem faktoriem. Biomasas koncentrācija fermentācijas procesa beigās (x_{beigu}) tika izvēlēts kā optimizācijas kritērijs, kura iznākumu maksimizēja. Pēc optimizācijas tika veikta robustuma pārbaude, kurā konstatēja, cik spēcīgi dažādas faktoru novirzes no optimālām parametru vērtībām spēj ietekmēt x_{beigu} rezultātu. Arī tādi nekontrolējami faktori, kā, piemēram, apkārtējās vides temperatūra, spiediens, mitrums, izejvielu dažādu partiju sajaukšana var ietekmēt rezultātu precizitāti. Kā pēdējais šīs eksperimentu sērijas uzdevums bija biomasas iznākuma mehāniska modelēšana atkarībā no T un pH. Optimizācijas procesā iegūtie rezultāti tika attēloti ar 2D atsauces virsmas grafikiem. Pēc eksperimentu sērijas veikšanas tika iegūts modelis un konstatēti faktori, kas visvairāk ietekmē modeli. Detalizētāka informācija par šajā nodaļā aprakstītajiem eksperimentiem un iegūtajiem rezultātiem, pieejamami A. Trubačas bakalaura darbā «Eksperimentu plānošanas principa pielietojums fermentācijas procesu optimizācijā», Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte, RTU, 2013.g.

4.1.1. Procesa un sistēmas iepazīšanas priekšeksperimenti

Pirms optimizācijas eksperimentu veikšanas tika veikti procesa/sistēmas iepazīšanas priekšeksperimenti. Šajos priekšeksperimentos novērtēja kolbu noslēgu, vates vai folijas veida ietekmi uz biomasas iznākumu un biomasas mērījumu izkliedi, veicot paralēlus mērījumus. Tika noteiktas biomasas mērījumu kopējās kļūdas dažādos laikos ņemtiem biomasas paraugiem. Šie eksperimenti ļāva arī secināt par procesa iespējamību pie izvēlētajām fizikālķīmisko parametru vērtībām T=37°C un pH=7, kas ir zināmi, kā standarta apstākļi *E. coli* kultivēšanai.



4.1. attēls. Biomasas augšanas izkliede lietojot dažāda veida kolbu noslēgus

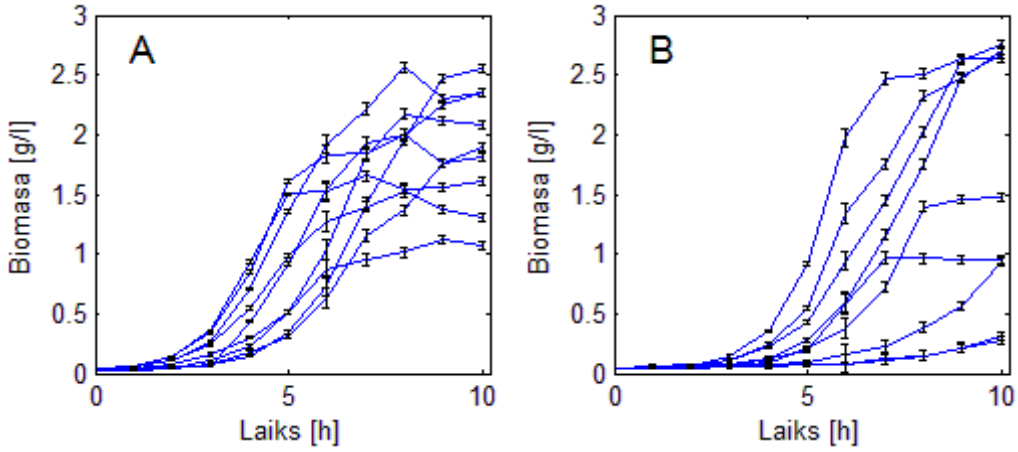
(A) follijas noslēgi, (B) vates noslēgi

Paralēlo eksperimentu dati rādīja (skat. 4.1. att.), ka kolbās ar folijas un vates noslēgiem biomasas augšanas raksturs un atkārtojamība ir tuvi, tomēr nedaudz mazāka izkliede redzama folijas noslēgu gadījumā. Tika izlemts turpmākajos kolbu eksperimentos lietot folijas noslēgus. Biomasas mērījuma vidējā kļūda, ņemot vērā biomasas mērījuma gadījuma kļūdu, pipetes, svaru un spektrofotometra kļūdas, sastādīja 0,09 g/l.

4.1.2. Optimizācija

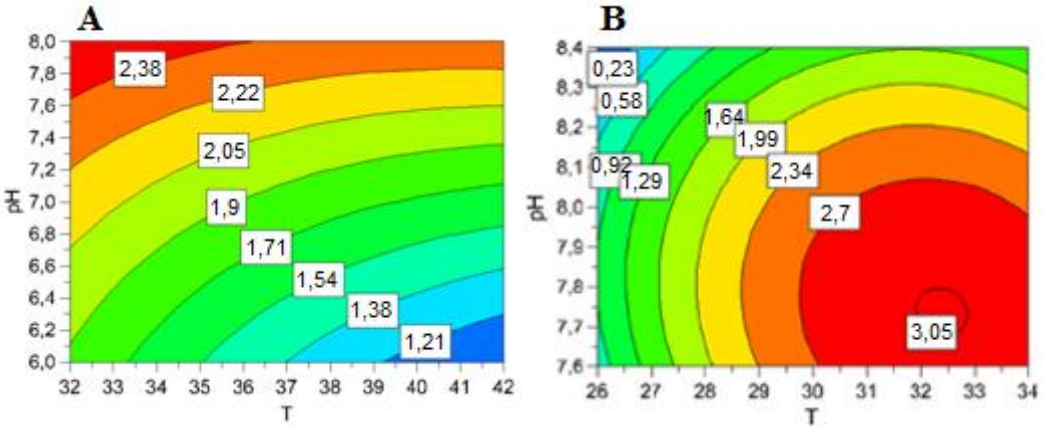
Balstoties uz priekšeksperimentu rezultātiem, literatūras apskatu un *a priori* pieņēmumiem, optimizācijas procedūras sākumā tika izvēlēti sekojoši T un pH parametru vērtību izmaiņu diapazoni: T_{min}=32 ^{o}C, T_{max}=42°C, pH_{min}=6, pH_{max}=8. Optimālu kultivēšanas apstākļu iegūšanai 2 faktoru gadījumā tika izvēlēts pilnu faktoru eksperimentu (PFE) plāns 3. līmeņiem. 2 faktoriem PFE plāns 3 līmeņos, izmantojot mainīgo faktoru maksimālo un minimālo vērtību visas iespējamās kombinācijas, sastāvēja no 12 eksperimentiem, no kuriem 3 bija centrālo punktu eksperimenti. Eksperimenti tika veikti gadījuma secībā. Pēc dotā PFE plāna *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 šūnu kultivēšanu veica līdzīgi, kā sistēmas iepazīšanas eksperimentos. Par kolbu noslēgtiem šajos eksperimentos kalpoja folija. Nepieciešamo pH vērtību 6, 7 vai 8 ieguvei, pievienotie 30 % NaOH daudzumi bija atbilstoši 0 ml, 0,175 ml un 0,325 ml. Šīs eksperimentu sērijas biomasas augšanas un 2D virsmas atsauces raksturlīknes parādītas 4.2. A un 4.3. A attēlos. Secinot, ka no 2D virsmas atsauces raksturlīknēm, nav iespējams apgalvot, ka iegūtais x_{beigu} ir maksimālais iespējamais, tika nolemts veikt atkārtotu optimizāciju citā parametru diapazonā. Otrai biomasas iznākuma optimizācijai pēc optimālā apgabala gradienta virziena definēšanas, intuitīvi tika izvēlēti parametru jaunu vērtību izmaiņu diapazoni: T_{min}=26°C, T_{max}=34°C, pH_{min}=7,6, pH_{max}=8,4. Identiski kā pirmajā

optimizācijā optimālā punkta iegūšanai 2 faktoru gadījumā tika izvēlēts PFE plāns 3 līmeņos. Nepieciešamo pH vērtību 7,6, 8,0 vai 8,4 iegūšanai, pievienoja attiecīgi 0,225 ml, 0,325 ml un 0,375 ml 30 % NaOH šķīdumu. Otrās optimizācijas eksperimentu sērijas rezultāti apkopoti 4.2. B un 4.3. B attēlos.



4.2. attēls. Biomasas rezultātu izkliede *E .coli* BL21 (DE3) pBR327 kolbu procesam optimizācijas procedūras gaitā

(A) Eksperimentālie rezultāti pie pirmās optimizācijas, (B) eksperimentālie rezultāti pie otrās optimizācijas



4.3. attēls. Biomasas optimizācijas rezultāti *E .coli* BL21 (DE3) pBR327 kolbu procesam izteikti ar 2D atsauces virsmas grafikiem

(A) Eksperimentālie rezultāti pie pirmās optimizācijas, (B) eksperimentālie rezultāti pie otrās optimizācijas, ņemot vērā visus regresijas koeficientu vērtības

Veicot visus otrās optimizācijas plāna eksperimentus, tika iegūts modelis 4.1 ar korelāciju R^2=0,93 un prognozi Q^2=0,39. Statistisko un mērījumu eksperimentālo kļūdu 0,09 g/l aprēķināja no četros eksperimentos (trīs no tiem centrālo punktu eksperimenti) iegūtajiem rezultātiem punktā T=30° C, pH=8. Savukārt, ja regresijas vienādojumu vienkāršoja, izslēdzot

mazāk būtiskos faktorus modelī 4.2, samazinājās modeļa korelācija R^2=0,86, bet paaugstinājās tā prognozējamības Q^2=0,67 kvalitāte.

$$x = -275{,}3 - 0{,}0522T^2 - 3{,}328pH^2 + 4{,}1384T + \cdots$$

$$\ldots + 54{,}616pH - 0{,}0968pH \cdot T \qquad (4.1)$$

$$x = -49{,}215 + 4{,}0224T - 1{,}511pH - 0{,}06328T^2 \qquad (4.2)$$

Gadījumā, kad pie regresijas vienādojuma iegūšanas tika ņemti vēra visi regresijas koeficienti (modelis 4.1), konstatēja maksimālu biomasas prognozi 3,06±0,09 g/l pie T=32,4 ^{o}C, pH=7,7. Eksperimentāli šajā punktā ieguva 2,92±0,09 g/l, kas kļūdu robežās sakrita ar prognozēto. Savukārt, ja regresijas vienādojumu vienkāršoja, izslēdzot mazāk būtiskos faktorus (modelis 4.2), ieguva maksimālo biomasas prognozi 3,22±0,09 g/l pie T=31,6 ^{o}C un pH=7,6. Šajā gadījumā eksperimentāli ieguva 2,98±0,09 g/l, kas no prognozētā kļūdu robežās atšķiras par 1,9 %, tomēr tas tika atrasts kā augstākais (optimālais) biomasas iznākums. Ja procentuāli salīdzina atšķirības starp prognozētajām un reāli iegūtajām x_{beigu} vērtībām, var secināt, ka prognozējamība ir labāka tad, kad pie regresijas modeļa iegūšanas ņem vērā visus faktorus. Tādejādi prognozes koeficienta vērtības Q^2 palielināšanās 4.2. modeļa gadījumā neveicināja labāku korelāciju starp eksperimentāli iegūto un paredzēto x_{beigu} vērtību.

4.2. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru piemeklēšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 partijas tipa kultivēšanas procesam kolbās

Lai sākotnēji novērtētu *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kultūras augšanas rādītājus un matemātiskā modeļa struktūru, kas potenciāli vislabāk aprakstītu biomasas un substrāta dinamiku laikā, veica atsevišķi plānotus kolbu eksperimentus. Izraudzītais mehānistiskais modelis sastāvēja no četriem masas līdzsvara vienādojumiem un atsevišķām kinētiskām izteiksmēm, kas raksturo būtiskāko vides komponentu rašanās/uzņemšanas ātrumus atkarībā no atsevišķo komponentu koncentrācijas. Izvēlētie masas līdzsvara vienādojumi apraksta biomasas (x), glikozes (s), acetātu (a) un skābekļa (o_2) koncentrāciju, kā arī tilpuma (V) maiņu laikā (vienādojumi no 4.18 līdz 4.22). Modeļa struktūras un tā parametru noskaidrošana tika veikta, pamatojoties uz literatūrā pieejamo informāciju par līdzīgu procesu modelēšanu [28]. Izdalīti četri dažādi modeļa sarežģītības gadījumi: pirmajā gadījumā (a) substrāta uzņemšanas ātruma izteiksmē ņemta vērā tikai substrāta koncentrācijas ietekme (Mono kinētika) [67];

otrajā gadījumā (b) substrāta uzņemšanas ātruma izteiksmē papildu ņemta vērā procesa laikā radušos acetātu ietekme uz glikozes un acetātu uzņemšanas ātrumu un biomasas veidošanos [40]; trešajā gadījumā (c) b gadījums papildināts ar skābekļa limita, kā konkurējošā substrāta ietekmi uz glikozes uzņemšanas ātrumu [146]; ceturtajā (d) gadījumā a gadījums papildināts ar skābekļa limita, kā konkurējošā substrāta ietekmi uz glikozes uzņemšanas ātrumu. Sastādot modeļa kinētiskās izteiksmes tika definēti sekojoši pieņēmumi dažādiem modeļa sarežģītības gadījumiem:

a gadījums

1. Pamata produkti, kas veidojas procesa laikā ir biomasa, CO_2 un ūdens. Ievērojamos daudzumos neveidosies citi metabolīti, kas ietekmētu biomasas augšanu.
2. Substrāts – glikoze var tikt metabolizēts gan aerobi, gan anaerobi. Atbilstošie ātrumi un ražības ir atšķirīgas. Pamatā glikoze tiek uzņemta oksidatīvi, un tās uzņemšanu var aprakstīt ar Mono kinētiku.
3. Variācijas šūnu augšanas ātrumā būtiski neizmaina biomasas elementāro sastāvu.
4. Biomasas veidošanās ir atkarīga no glikozes un rauga ekstrakta uzņemšanas. Jāņem vērā arī šūnu uzturēšanai nepieciešamo enerģiju.

b gadījums (a gadījuma papildinājums)

5. Pie atsevišķiem nosacījumiem, kā blakusprodukts veidosies acetāti. Izņemot acetātus, neviens cits metabolīts, kas ietekmētu biomasas augšanu, neveidosies ievērojamos daudzumos.
6. Glikozes oksidatīvajā uzņemšanā jāņem vērā glikozes ietekmi uz šūnas metabolismu. Kad glikozes uzņemšanas ātrums pārsniedz kritisko vērtību, tā vietā, lai turpinātu oksidēties par CO_2, daļa no glikozes plūsmas tiek pārvērsta acetātos. Acetātu veidošanās ātrums tiek pieņemts, ka ir tieši proporcionāls glikozes uzņemšanas ātrumam.
7. Kad šūnas aug ar ātrumu, kurā glikozes uzņemšanas ātrums ir mazāks par kritisko vērtību, acetāti tiek uzņemti biomasas veidošanai; kāda daļa no acetātiem metabolizējas par CO_2.
8. Biomasas veidošanās ir atkarīga no rauga ekstrakta uzņemšanas.

c gadījums (a un b gadījuma papildinājums)

9. Jāņem vērā skābekļa limita ietekme uz glikozes uzņemšanas ātrumu.
10. Jāņem vērā skābekļa limita ietekme uz kritisko glikozes uzņemšanas ātrumu.

d gadījums (a gadījuma papildinājums ar skābekļa limitu)

11. Jāņem vērā skābekļa limita ietekme uz glikozes uzņemšanas ātrumu.

4.1. tabulā norādīta modeļos izmantoto kinētisko izteiksmju pielietošanas secība atkarībā no katra atsevišķa iepriekšminētā gadījuma.

4.1. tabula

Darbā lietoto modeļu apzīmējumi atkarībā no dažādas sarežģītības substrātu uzņemšanas modeļu lietojuma

Modeļa apzīmējums	**Substrāta uzņemšanas modeļi**			**Kinētisko vienādojumu numuri**
	q_s, K_s	q_{ar}, q_{au}, $K_{i,a}$	q_{O2}, K_{O2}	
a	*S* uzņemšana	—	—	4.3, 4.15
b	*S* uzņemšana; *A* rašanās, inhibīcija un uzņemšana		—	4.5, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 4.13, 4.14, 4.16, 4.17
c	*S* uzņemšana; *A* rašanās, uzņemšana un inhibīcija; O_2 limita ietekme uz *S* uzņemšanu			4.6, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.16, 4.17
d	*S* uzņemšana	—	O_2 limita ietekme *S* uzņemšanā	4.4, 4.15

Modeļos pielietoja sekojošus kinētiskos vienādojumus,
specifiskais glikozes uzņemšanas ātrums:

$$q_s = q_{sMax}\frac{s}{K_s + s} \tag{4.3}$$

$$q_s = q_{s_{O2Max}}\frac{s \cdot o_2}{(s + K_s)\left(o_2 + K_{o_2}\right)} \tag{4.4}$$

$$q_s = q_{sMax}\frac{s}{K_s + s} \cdot \frac{K_{i,a}}{K_{i,a} + a} \tag{4.5}$$

$$q_s = q_{s_O2Max}\frac{s \cdot o_2}{(s + K_s) \cdot \left(o_2 + K_{o_2}\right)} \cdot \frac{K_{i,a}}{K_{i,a} + a} \tag{4.6}$$

kritiskais substrāta uzņemšanas ātrums:

$$q_{sKr} = const \tag{4.7}$$

$$q_{sKr} = q_{sKr}\frac{o_2}{K_{o_2} + o_2} \tag{4.8}$$

specifiskais acetātu rašanās ātrums:

$$q_{ar} = Y_{as}(q_s - q_{kr}), \qquad ja\ q_s \geq q_{sKr} \tag{4.9}$$

$$q_{ar} = 0.0, \qquad ja\ q_s < q_{sKr} \tag{4.10}$$

specifiskais acetātu uzņemšanas ātrums:

$$q_{au} = q_{auMax} \cdot \frac{a}{a + K_a}, \qquad ja\ q_s < q_{sKr} \tag{4.11}$$

$$q_{au} = 0.0, \qquad ja\ q_s \geq q_{sKr}\ vai\ a = 0 \tag{4.12}$$

specifiskie skābekļa pārneses un uzņemšanas ātrumi:

$$OTR = (o_s - o_2) \cdot k_L a \tag{4.13}$$

$$OUR = Y_{ox}\mu_{s,a}x + m_{o_2}x \tag{4.14}$$

specifiskais biomasas augšanas ātrums:

$$\mu_s = q_s \cdot Y_{xs} - m \tag{4.15}$$

$$\mu_{s,a} = q_s \cdot Y_{xs*} + q_{ar}Y_{xar} - m, \qquad ja \quad q_s \geq q_{sKr} \tag{4.16}$$

$$\mu_{s,a} = q_s \cdot Y_{xs} + q_{au}Y_{ax} - m, \qquad ja \quad q_s < q_{sKr} \tag{4.17}$$

kur s – substrāta koncentrācija, g/l; a – acetātu koncentrācija, g/l; o_2 – skābekļa koncentrācija, g/l; o_s – skābekļa šķīdība, g/l; μ_s – specifiskais biomasas augšanas ātrums uzņemot glikozi, 1/h; $\mu_{s,a}$ – specifiskais biomasas augšanas ātrums uzņemot glikozi un acetātus, 1/h; Y_{xs} – biomasas iznākums no substrāta, g/g; Y_{xa} – biomasas iznākums no acetātiem gadījumam, kad nenotiek acetātu sintēze, g/g/h; Y_{xar} – biomasas iznākums no acetātiem gadījumam, kad notiek acetātu sintēze, g/g/h; Y_{ox} – skābekļa patēriņš uz biomasas vienību, g/g; m – uzturēšanas enerģija, g/g/h; m_{o2} – nepieciešamais skābekļa daudzums biomasas uzturēšanai, g/g/h; K_s – Mono konstante substrāta uzņemšanai, g/kg; $K_{i,s}$ – substrāta inhibīcijas konstante, g/kg; $K_{i,a}$ – acetātu inhibīcijas konstante, g/kg; K_{ra} – acetātu uzņemšanas represijas konstante (raksturo substrātu konkurenci), g/kg; q_s – specifiskais glikoses uzņemšanas ātrums, g/g/h; q_{sMax} – maksimālais specifiskais substrāta uzņemšanas ātrums, g/g/h; q_{sKr} – kritiskais substrāta uzņemšanas ātrums, g/g/h; q_{ar}, q_{au} – specifiskie acetātu rašanās/uzņemšanas ātrumi, g/g/h; q_{auMax} – maksimālais specifiskais acetātu uzņemšanas ātrums, g/g/h; OTR – specifiskais skābekļa pārneses ātrums, g/kg/h; OUR – specifiskais skābekļa uzņemšanas ātrums, g/kg/h; k_La – tilpuma masas pārneses koeficients priekš O_2, 1/h.

Augstāk aprakstītās kinētiskās izteiksmes lietotas partijas tipa kultivēšanas procesu sekojošo masas līdzsvara vienādojumos:

$$\frac{dx}{dt} = (\mu_s + q_{au}Y_{ax})x \tag{4.18}$$

$$\frac{ds}{dt} = -\left(q_s + \frac{q_{ar}}{Y_{as}}\right)x \tag{4.19}$$

$$\frac{da}{dt} = (q_{ar} - q_{au})x \tag{4.20}$$

$$\frac{dV}{dt} = -F_{par} \tag{4.21}$$

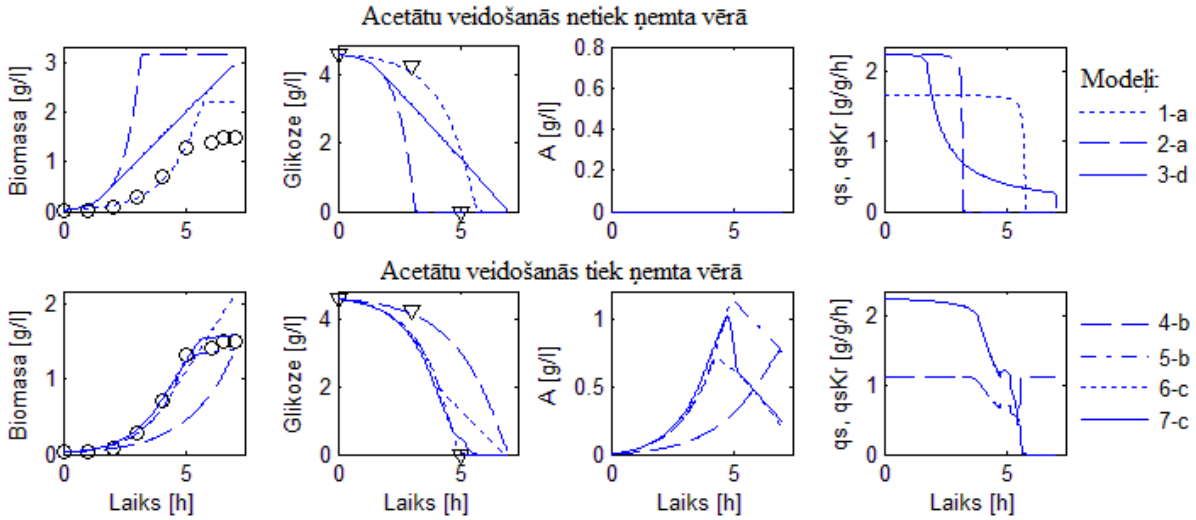
$$\frac{do_2}{dt} = OTR - OUR \tag{4.22}$$

kur x – biomasas koncentrācija, g/l; s – substrāta koncentrācija, g/l; a – acetātu koncentrācija, g/l; q_{ar}, q_{au} – specifiskie acetātu rašanās/uzņemšanas ātrumi, g/g/h; Y_{xa} – biomasas iznākums pēc acetātiem, g/g; Y_{as} – acetātu iznākums pēc substrāta, g/g; F_{par} – paraugu ņemšanas daudzums, l/h; V – kultūras tilpums, l; t – procesa momentānais laiks, h.

Dažādas sarežģītības modeļu novērtēšana veikta procesa iepazīšanas nolūkos, kas nepieciešama tālākai, uz izpratni balstītai, procesa mērogošanai laboratorijas bioreaktora mērogā. 4.4. attēlā un 4.2. tabulā apkopoti modelēšanas rezultāti (modeļi: 1-a, 2-a, 3-d, 4-b, 5-b, 6-c, 7-c) kolbu eksperimentam ar rauga ekstrakta sākuma koncentrāciju 5 g/l. Dotā pētījuma rezultāti rāda, ka biomasas pieauguma un substrāta patēriņa modelēšanas rezultāti, būtiski atšķiras līdz ar lietotajiem dažādas sarežģītības modeļiem, mainītām būtiskāko modeļa parametru vērtībām, kā arī modeļu un modeļa parametru kombinācijām.

Var izdalīt divus gadījumus, kad acetātu uzkrāšanās netiek ņemta vērā (modeļi: 1-a, 2-a, 3-d), un, kad acetātu koncentrācija tiek ņemta vērā (modeļi: 4-b, 5-b, 6-c, 7-c). 1-a gadījumā lietots klasiskais Mono modelis glikozes uzņemšanai, un modeļa parametri izraudzīti, kā vidējās vērtības no literatūrā apkopotajiem parametriem *E. coli* BL21 un RB791 (K-12 izcelsme) celmiem (skat. 3.4. tabulu). Šajā gadījumā iegūta laba biomasas augšanas modeļa sakritība ar eksperimentālajiem datiem līdz procesa 5 h (biomasas eksponensiālās augšanas fāzes beigas), glikozes gadījumā šī sakritība izpaužas labāka. Modelēšanas rezultātu neprecizitāte pēc procesa 5 h skaidrojama ar to, ka 5 h modelis uzrāda glikozes esamību

barotnē (1–2 g/l), lai gan pēc eksperimentu datiem 5 h glikozes koncentrācija ir 0. Ņemot vērā rauga ekstrakta ietekmi uz biomasas iznākuma no substrāta (*Yxs*) un biomasas maksimālā uzņemšanas ātruma (q_{sMax}) palielināšanos attiecīgi par apmēram 40 % un 35 % [144], ieguva krietni neprecīzāku modelēšanas rezultātu (modelis 2-a). Ņemot vērā glikozes un O_2, kā divu būtisku svarīgu biomasas augšanai, konkurējošu substrātu, uzņemšanas kinētiku [146], ieguva modeli 3-d. Tas pēc precizitātes ir starp modeli 1-a un 2-a.



4.4. attēls. Modelēšanas rezultāti dažādas sarežģītības modeļiem

Kolbu eksperiments ar rauga ekstrakta sākuma koncentrāciju 5 g/l. *A* – acetātu koncentrācija; q_s – specifiskais substrāta (glikozes) uzņemšanas ātrums; q_{sMax} – maksimālais specifiskais substrāta (glikozes) uzņemšanas ātrums. Eksperimentāli mērītie lielumi: biomasas (apļi) un glikozes (kvadrāti) koncentrācijas. Līnijas atbilst modelētajām trajektorijām

Papildinot augstāk aprakstītos modeļus (1-a, 2-a, 3-d) ar acetātu rašanās un inhibīcijas ietekmi, ieguva attiecīgi modeļus 4-b, 5-b un 6-c. No šiem modeļiem būtiski augstāku precizitāti uzrādīja modelis 5-b. Papildinot 6-c modeli ar skābekļa limita ietekmi uz kritisko substrāta uzņemšanas ātrumu (q_{sKr}), ieguva modeli 7-c, kas pēc precizitātes ir tuvs 5-b modelim.

4.2. tabula

E. coli BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas modeļu pilnveidošanas gaita kolbu kultivēšanas procesiem, RE 5 g/l

Modelis	Modeļu pilnveidošanas gaita	Kinētisko vienād. numuri	Modeļa precizitāte	
			r_x, %	r_s, %
1-a	**S uzņemšana**, vid. param no lit. (skat. 3.4. tabulu)	4.3, 4.15	58,9	36,2
2-a	Mainīti modeļa 1-a parametri (ņemta vērā rauga ekstrakta ietekme): **Yxs=1,40*Yxs'; qsMax=1,35*qsMax'**		213,8	64,3
3-d	Modelis 2-a papildināts ar **O2 limita ietekmi** uz S uzņemšanu	4.4, 4.13, 4.14, 4.15	115,0	38,1
4-b	Modelis 1-a papildināts ar **A rašanās, uzņemšana un inhibīcija**, vid. param no lit. (skat. 3.4. tabulu)	4.5, 4.7, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.16, 4.17	54,2	59,6
5-b	Modelis 2-a papildināts ar **A rašanās, uzņemšana un inhibīcija**, vid. param no lit. (skat. 3.4. tabulu)	4.5, 4.7, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.16, 4.17	9,6	13,2
6-c	Modelis 3-d papildināts ar **A rašanās, uzņemšana un inhibīcija**	4.6, 4.7, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.16, 4.17	32,5	28,0
7-c	Modelis 6-c papildināts ar **O2 limita ietekmi uz qs_Kr**	4.6, 4.84.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.16, 4.17	8,7	17,0

': parametri no literatūras

Lai pētītu rauga ekstrakta ietekmi uz Y_{xs} un q_{sMax}, veica 2 kultivēšanas papildu eksperimentus, kur vienā eksperimentā rauga ekstrakts tika pievienots koncentrācijā 2 g/l, bet otrā eksperimentā to nepievienoja. 4.5. attēlā un 4.3.–4.4. tabulās apkopoti šo eksperimentu,

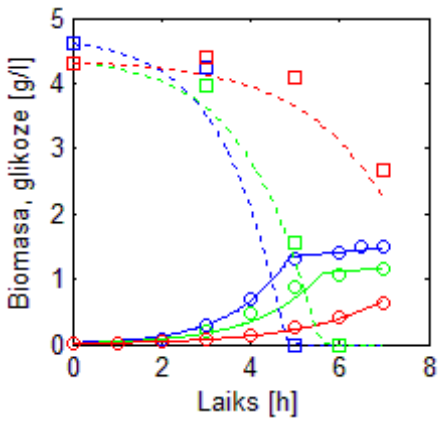
kā arī uzlaboti modeļa 5-b parametri gadījumam ar rauga ekstrakta sākuma koncentrāciju 5 g/l, modelēšanas rezultāti, lietojot izejas modeļa 5-b parametru Y_{xs}, Y_{xa} un q_{sMax} korekciju.

4.3. tabula

E. coli BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas modeļu pilnveidošanas gaita kolbu kultivēšanas procesiem, RE 5, 2 un 0 g/l.

Modelis	Modeļu pilnveidošanas gaita	Kinētiskie vienādojumi	Modeļa precizitāte	
			r_x, %	r_s, %
5-b_1	Mainīti modeļa 5-b parametri, procesam ar RE=5 g/l: Yxs=1,34*Yxs'; Yxa=1,25*Yxa'; qsMax=1,35*qsMax'.	4.5, 4.7, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.16, 4.17	4,5	13,5
5-b_2	Mainīti modeļa 5-b parametri, procesam ar RE=2 g/l: Yxs=1,16*Yxs'; Yxa=1,25*Yxa'. qsMax=1,35*qsMax'.		18,1	8,1
5-b_3	Mainīti modeļa 5-b parametri, procesam ar RE=0 g/l: Yxs=0,98*Yxs'; Yxa=1,25*Yxa'; qsMax=0,65*qsMax'.		13,3	8,8

': parametri no literatūras



4.5. attēls. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 biomasas augšanas raksturs pie dažādām rauga ekstrakta sākuma vērtībām

Sarkanā krāsa atbilst eksperimentam ar rauga ekstrakta sākuma vērtību 0 g/l, zaļā – 2 g/l, zilā – 5 g/l. Eksperimentāli mērītie lielumi: biomasas (apļi) un glikozes (kvadrāti) koncentrācijas. Līnijas atbilst modelētajām trajektorijām

4.4. tabula

Identificētās parametru vērtības kolbu eksperimentiem ar dažādu rauga ekstrakta koncentrāciju procesa sākumā; salīdzinājums ar pieejamajiem parametriem no literatūras (ar *bold* iekrāsotas pielāgotās parametru vērtības)

			E. coli BL21 (DE3) pBR327, kolbas		
Param.	Vien.	Lit. dati (3.4. tabula)	RE 5 g/l	RE 2 g/l	RE 0 g/l
Y_{xs}	g/g	0,50	**0,67**	**0,58**	**0,49**
Y_{xa}	g/g	0,41	**0,507**	**0,507**	**0,507**
Y_{xar}	g/g	0,25	0,25	0,25	0,25
Y_{as}	g/g	0,832	0,832	0,832	0,832
q_{sMax}	g/g/h	1,69	**2,29**	**2,29**	**1,49**
q_{aMax}	g/g/h	0,153	0,153	0,153	0,153
q_{sKr}	g/g/h	1,13	1,13	1,13	1,13
K_s	g/kg	0,081	0,081	0,081	0,081
K_a	g/kg	0,05	0,05	0,05	0,05
K_{O2}	g/kg	$3{,}2*10^{-6}$	$3{,}2*10^{-6}$	$3{,}2*10^{-6}$	$3{,}2*10^{-6}$
$K_{i,a}$	g/kg	10,82	10,82	10,82	10,82
m	g/g/h	0,024	0,024	0,024	0,024

Šis pētījums rādīja, ka rauga ekstraktam ir būtiska ietekme uz Y_{xs} un q_{sMax}, kas jāņem vērā precīzai procesa modelēšanai. Parametru piemeklēšanas gaitā tika paaugstināta arī Y_{xa}vērtība. Pieļaujams, ka Y_{xa} vērtību ietekmēja rauga ekstrakta klātbūtne barotnē. Kopējā biomasas un substrāta modelēšanas precizitāte kolbu eksperimentiem (RE 5, 2 un 0 g/l) noteikta attiecīgi 4,5–18,1 % un 8,1–13,5 % robežās.

4.3. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru piemeklēšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 bioreaktora partijas procesam ar piebarošanu

Piebarošanas profila aprēķinam, kā arī uz modeli bāzētai piebarošanas profila kontrolei ar prognozi laboratorijas bioreaktora procesa laikā, nepieciešama bioreaktora fermentācijas procesa matemātiskā modeļa identificēšana. Bioreaktora fermentācijas modeļa identificēšanai

sākumā izmantoja modeli un modeļa parametrus, kas noskaidroti no kolbu eksperimentiem (skat. nodaļu 4.2.: Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru piemeklēšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 partijas tipa kultivēšanas procesam kolbās). Tālāk modeli un modeļa parametrus papildināja un koriģēja atbilstoši, lai uzlabotu modeļa sakritību ar eksperimentāli iegūtajiem datiem, kur modelis paredz ņemt vērā acetātu ietekmi uz substrāta uzņemšanu un biomasas veidošanos. Turpmāk arī identificēts vienkāršāks un universālāks fermentācijas procesa matemātiskais modelis lietošanai uz modeli bāzētai piebarošanas ātruma kontrolei ar prognozi (MPC).

Galvenās bioreaktora eksperimentu atšķirības salīdzinājumā ar kolbu eksperimentiem bija: (1) procesa pH un pietiekamas izšķīdušā skābekļa (pO_2) uzstādītās vērtības uzturēšana visā procesa garumā; (2) kultūras papildu piebarošana ar glikozes/sāļu substrātu; (3) dinamiski mainīgs kultūršķīduma tilpums; (4) procesa laiks līdz 24 h.

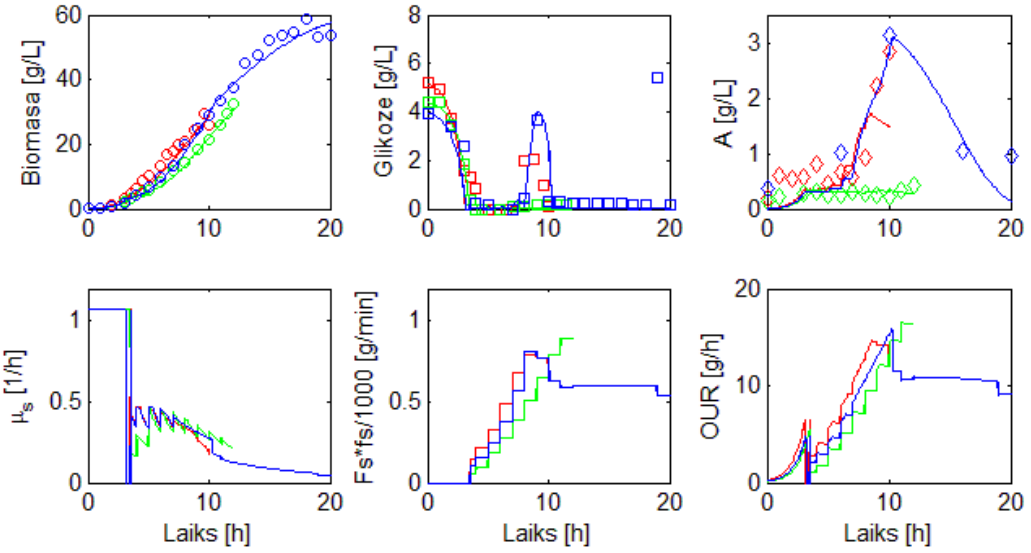
4.3.1. Piebarošanas procesa modelis ar kinētiskiem un masas līdzsvara *X, S, V* un *A* vienādojumiem

Piebarošanas ātruma aprēķināšanai (vienādojums 3.1.) nepieciešamie Y_{xs} un m_s parametri pirmajam no trim a sērijas bioreaktora eksperimentiem noteikti iepriekš veiktajos kolbu eksperimentos; pārējās parametru vērtības norādītas 4.5. tabulā. Kultūras augšanas modelēšanu ar aprēķināto piebarošanas profilu sākotnēji veica ar kolbu eksperimentu modelēšanas gaitā iegūto modeli 5-a_1, dēļ tā uzrādītās visaugstākās precizitātes. Šo modeli papildināja ar rauga ekstrakta ietekmi uz Y_{xs}, kā arī glikozes inhibējošo ietekmi uz q_s (vienādojumi 4.23. un 4.26). Procesa laikā pO_2 kontrolēja ap 40 % no maksimālā kalibrētā skābekļa piesātinājuma (skat. sadaļu 3.6.1. Piebarošanas ātruma pastarpināta kontrole pēc pO_2), tādēļ pO_2 ietekme uz glikozes un acetātu oksiditatīvu uzņemšanu tika ierobežota līdz minimumam.

4.5. tabula

Parametru vērtības piebarošanas profila aprēķinam eksperimentiem 1, 2 un 3

	x_0, g/l	V_0, l	μ, 1/h	s_f, g/l	F_s,max, ml/min	t - t_0, h
Eksp. 1	3,5	2,00	0,50	200	—	10 – 3,5
Eksp. 2	3,5	2,00	0,45	180	—	12 – 3,5
Eksp. 3	3,5	2,00	0,5	400	3,0	20 – 3,5



4.6. attēls. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 piebarošanas proces un modelēšanas rezultāti ņemot vērā acetātu rašanos/uzņemšanu

Eksp. a-1 (sarkans), eksp. a-2 (zaļš), eksp. a-3 (zils). Eksperimentālie mērijumi (apļi, kvadrāti, rombi), modelētie lielumi (līnijas)

Modeļa parametru identificēšana veikta no 3 a eksperimentu sērijas eksperimentālo datu analīzes (skat. 4.6. att. un 4.6. tabulu). Piebarošanas profils konkrētajā gadījumā, izteikts ar glikozes piebaroto daudzumu g/min (F_s*f_s/1000), jo šajos eksperimentos tika izmanti piebarošanas šķīdumi ar dažādu glikozes koncentrāciju. Procesu a-1 izvēlējās veikt ar μ=0,5 1/h, lai pārbaudītu acetātu iespējamo rašanos. Realizējot šādu piebarošanas profilu, notika acetātu uzkrāšanās līdz 2,9 g/l. Eksperimentos a-2 un a-3 novēroja, ka attiecīgi 8 h (x=14,5 g/l, OUR~9 g/h) un 6 h (x=10,0 g/l, OUR~9 g/h) pēc maisītāja maksimālā ātruma sasniegšanas (800 apgr./min) tika sasniegts skābekļa pārneses (OTR) limits (šo procesu tiešsaistes datu līknes pievienotas pielikumā 1). OTR limita sasniegšana pie zemākas biomasas koncentrācijas a-3 eksperimentā salīdzinājumā ar a-2 eksperimentu skaidrojama ar augstāku šūnu specifisko augšanas ātrumu konkrētajā brīdī, kas arī prasa augstāku skābekļa patēriņu. Modelētie OUR laika momentos, kad sasniegti maksimālie apgriezieni, ir tuvi teorētiski aprēķinātajam maksimālajam OTR (6,7*2=13,4 g/h), ņemot vērā, ka kultūras tilpums ir ap 2 l. Atšķirības šajos rādītājos, skaidrojamas ar to, ka momentos, kad šajos procesos tika sasniegti maksimālie maisītāja apgriezienu ātrumi, un, kad sākas pO_2 samazināšanās, OUR neatspoguļo maksimālo OTR. To ilustrē fakts, ka procesā a-2 pēc maksimālo maisītāja apgriezienu sasniegšanas, biomasa turpināja augt ar nemainīgu ātrumu, neskatoties uz to, ka pO_2 sāka samazināties (4.6. att. un pielikuma 1 dati). No tā var secināt,

ka augstāka biomasas pieauguma nodrošināšanai, kontrolējot pO_2 nepieciešamajā 40 ± 5 % diapozonā, nepieciešams vai nu ieejas gaisu papildus bagātināt ar skābekli vai lietot pO_2 kontroli ar piebarošanu, tādejādi paaugstinot OTR vai limitējot šūnu augšanas ātrumu ar pieejamo substrātu. Ieejas gaisa bagātināšanu ar skābekli un piebarošanas ātruma kontroli atkarībā no pO_2 realizēja a-3 procesā.

Iegūtie līdzīgie eksperimentālie rezultāti, veicot līdzīgu procesu a-1 un a-3 kontroli, liecina par labu procesa un analītisko mērījumu atkārtojamību. No eksperimenta a-3 redzams, ka līdz F_s kontroles pēc pO_2 sākšanos (procesa ~10 h), kas vairāk limitē kultūrai pieejamo substrāta daudzumu, kultūra sāka uzņemt vidē uzkrājušos acetātus. Tika sasniegta maksimālā biomasas koncentrācija 58,6 g/l. Tika konstatēta maksimālā acetātu koncentrācija 3,13 g/l. Identificētās parametru vērtības apkopotas 4.7. tabulā. Tika iegūts modelis, kas deva a-3 eksperimenta modelēšanas precizitāti biomasai 11,1 %, substrātam 129 % un acetātiem 93,4 %.

4.6. tabula

E. coli BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas modeļu pilnveidošanas gaita bioreaktora kultivēšanas procesam ar piebarošanu

Modelis	Eksperimentu un modeļu pilnveidošanas gaita	Kinētiskie vienādojumi	Modeļa precizitāte		
			r_x, %	r_s, %	r_a, %
5-b_1_1	a-1 eksperiments, pēc 5-b_1 modeļa papildināšanas ar RE ietekmi (Y_{xRE}=0,18; t_{RE}=3,5 h) un glikozes inhibejošo ietekmi uz *qs*.	4.23, 4.7,4.9, 4.10, 4.11 4.12 4.24 4.25, 4.26, 4.35- 4.40	26,2	54,8	326
5-b_1_2	a-1 eksperiments, pēc parametru korekcijas (Y_{xRE}=0,54; q_{sMax}=1,49; Y_{xs}=0,42; Y_{xar}=0,1; K_a=3,41).		10,1	51,6	120
5-b_1_2	a-2 eksperiments (bez iepriekšējas modeļa uzlabošanas).		12,4	12	31,7
5-b_1_2	a-3 eksperiments (bez iepriekšējas modeļa uzlabošanas).		16,7	142	127
5-b_1_3	a-3 eksperiments, pēc parametru un modeļa korekcijas (Y_{as}=0,667; K_{ai} = 3,45; q_{aMax}=0,14).	4.9,4.10 4.114.124.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.35-4.40	11,1	129	93,4

4.7. tabula

No bioreaktora eksperimentiem identificēto parametru, kas paredz acetātu ietekmes ņemšanu vērā, salīdzinājums ar pieejamajiem parametriem no literatūras (ar *bold* iekrāsotas pielāgotās parametru vērtības)

Param.	**Vien.**	**Literatūras dati** (tabula 3.4)	**Identificētie param. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 bioreakt. proc.**
Y_{xs}	g/g	0,50	**0,42**
Y_{xa}	g/g	0,41	0,41
Y_{xar}	g/g	0,25	**0,1**
Y_{as}	g/g	0,832	**0,667**
q_{sMax}	g/g/h	1,69	**1,49**
q_{aMax}	g/g/h	0,153	**0,140**
q_{sKr}	g/g/h	1,13	**1,19**
K_s	g/kg	0,081	**0,005**
K_a	g/kg	0,05	**3,41**
$K_{i,a}$	g/kg	10,82	**3,45**
m	g/g/h	0,024	**0,037**
Papildparametri bioreaktora modelēšanai			
Y_{xRE}	g/g	—	**0,504**
Y_{bx}	g/g	—	**0,001**
t_{RE}	h	—	**3,5**
$K_{x,au}$	g/kg	—	**27,21**
$K_{i,s}$	g/kg	55,15	**60**
$K_{r,a}$	g/kg	3,6	**0,001**
q_{sKr1}	g/g/h	—	**1,52**

Zemāk norādītas papildinātās kinētiskās izteiksmes modelēšanas sākumā un modeļa uzlabošanas gaitā; specifiskais substrāta uzņemšanas ātrums:

$$q_s = q_{sMax} \frac{s}{K_s + s} \cdot \frac{K_{i,a}}{K_{i,a} + a} \cdot \frac{K_{i,s}}{K_{i,s} + s} \tag{4.23}$$

specifiskais biomasas augšanas ātrums un biomasas iznākums no substrāta:

$$\mu_{s,a} = q_s \cdot Y_{xs*} + q_{ar} Y_{xar} - m, \qquad ja \quad q_s \geq q_{sKr*} \qquad (4.24)$$

$$\mu_{s,a} = q_s \cdot Y_{xs*} + q_{au} Y_{ax} - m, \qquad ja \quad q_s < q_{sKr*} \qquad (4.25)$$

$$Y_{xs*} = Y_{xs} + Y_{xRE,} \qquad ja \qquad t > t_{RE,} \qquad (4.26)$$

$$ja\ t \leq t_{RE} \quad Y_{xs*} = Y_{xs}\ .$$

kritiskais substrāta uzņemšanas ātrums (q_{sKr*}) un specifiskais acetātu rašanās ātrums (q_{ar}):

$$q_{sKr*} = q_{sKr1} \frac{K_{x,au}}{K_{x,au} + x}\ , \qquad (4.27)$$

$$ja \quad q_{sKr*} > q_{sKr}\ , \quad q_{sKr*} = q_{sKr}$$

$$q_{ar} = (q_s - q_{sKr*}) \cdot Y_{as}\ , \qquad ja \qquad q_s \geq q_{sKr}$$

$$q_{ar} = 0.0, \qquad ja \qquad q_s < q_{sKr}$$

acetātu uzņemšanai:

$$q_{au} = q_{auMax} \cdot \left(1 - \frac{q_s}{q_{sKr*}}\right) \cdot \frac{a}{a + K_a} \cdot \frac{K_{r,a}}{K_{r,a} + s}, \qquad ja\ q_s < q_{sKr*} \qquad (4.28)$$

$$q_{au} = 0.0, \qquad ja\ q_s \geq q_{sKr*} \quad vai \quad a = 0 \qquad (4.29)$$

kur s – substrāta koncentrācija, g/l; a – acetātu koncentrācija, g/l; μ_s – īpatnējais šūnu augšanas ātrums uzņemot glikozi, 1/h; Y_{xs} – biomasas iznākums no substrāta, g/g; Y_{xa} – biomasas iznākums no acetātiem gadījumam, kad nenotiek acetātu sintēze, g/g/h; Y_{xar} – biomasas iznākums no acetātiem gadījumam, kad notiek acetātu sintēze, g/g/h; Y_{xRE} – biomasas iznākums no rauga ektrakta, g/g; m – uzturēšanas enerģija, g/g/h; K_s – Mono konstante substrāta uzņemšanai, g/kg; $K_{i,s}$ – substrāta inhibīcijas konstante, g/kg; $K_{i,a}$ – acetātu inhibīcijas konstante, g/kg; $K_{r,a}$ – acetātu uzņemšanas represijas konstante (raksturo substrātu konkurenci), g/kg; $K_{x,au}$ – biomasas inhibēšana acetātu uzņemšanā, g/kg; q_s – specifiskais substrāta uzņemšanas ātrums, g/g/h; q_{sMax} – maksimālais specifiskais substrāta uzņemšanas ātrums, g/g/h; q_{sKr}, q_{sKr*} – kritiskie substrāta uzņemšanas ātrumi, g/g/h; q_{sKr1} – kritiskais substrāta uzņemšanas ātrums vienādojumam 4.27, g/g/h; q_{ar}, q_{au} – specifiskie acetātu rašanās/uzņemšanas ātrumi, g/g/h; q_{auMax} – maksimālais specifiskais acetātu uzņemšanas ātrums, g/g/h; t – procesa laiks, h; t_{RE} – rauga ekstrakta uzņemšanas laiks, h.

Tālāk norādīti masas līdzsvara vienādojumi, kas lietoti bioreaktora eksperimentu ar piebarošanu, stāvokļa mainīgo aprēķinam:

$$\frac{dx}{dt} = \left(\mu_s + q_{au}Y_{ax} - \frac{F}{V}\right)x \tag{4.30}$$

$$\frac{ds}{dt} = -\left(q_s + \frac{q_{ar}}{Y_{as}}\right)x - \frac{F}{V}s + \frac{F_s}{V}s_f \tag{4.31}$$

$$\frac{da}{dt} = (q_{ar} - q_{au})x - \frac{F}{V}a \tag{4.32}$$

$$\frac{dV}{dt} = F - F_{par} \tag{4.33}$$

$$F = F_s + F_b + F_{pl} - F_c - F_{iztv} \tag{4.34}$$

$$F_s = f_s(t) \tag{4.35}$$

$$F_b = Y_{bx}\,\mu XV \tag{4.36}$$

$$F_c = 0.000375 \cdot OUR \cdot V \tag{4.37}$$

$$F_{af} = Y_{afx}\mu(X - X_{krit})V \tag{4.38}$$

$$F_{iztv.} = e_1 \tag{4.39}$$

$$F_{par} = \sum m_1 \cdot \frac{1}{\Delta t} \cdot \left[1(t_j) - 1(t_j + \Delta t)\right] \tag{4.40}$$

kur x – biomasas koncentrācija, g/l; s – substrāta koncentrācija, g/l; a – acetātu koncentrācija, g/l; q_{ar}, q_{au} – specifiskie acetātu rašanās/uzņemšanas ātrumi, g/g/h; Y_{xa} – biomasas iznākums pēc acetātiem, g/g; Y_{as} – acetātu iznākums pēc substrāta, g/g; F_s – substrāta piebarošanas ātrums, l/h; F_{par} – paraugu ņemšanas daudzums, l/h; V – bioreaktora darba tilpums, l; s_f – substrāta koncentrācija piebarošanas šķīdumā, g/l; t – procesa momentānais laiks, h. $F = F_s + F_b - F_c - F_{iztv}$, kur F_c – oglekļa zudumi caur izejas gāzēm; F_b – bāzes pievienošanas ātrums; F_{iztv} – iztvaikošanas ātrums.

4.3.2. Piebarošanas procesa modelis ar kinētiskiem un masas līdzsvara *X, S* un *V* vienādojumiem

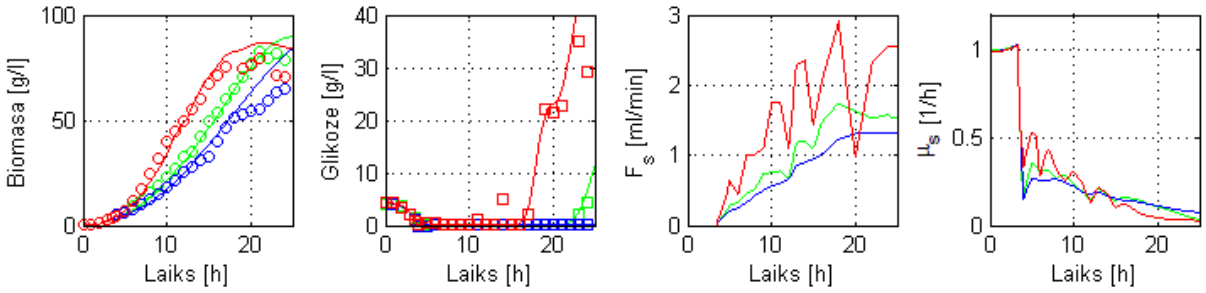
Vienkāršāks un universālāks procesa modelis uz modeli bāzētai piebarošanas ātruma kontroles (MPC) izstrādei var tikt lietots [29] (tabulā 4.8. norādīti šajā modelī ietilpstošo

vienādojumu numuri), ja, ņemot vērā procesa aktuālo biomasas augšanas un substrāta uzņemšanas raksturu, veic modeļa parametru Y_{xs} un q_{sMax} pielāgošanu procesa laikā. Turpmāk realizēja b fermentācijas procesu sēriju, kurā realizēja iepriekš izraudzīta (references) piebarošanas profila uz modeli bāzētu kontroli atkarībā no procesa laikā ņemtajām biomasas un glikozes rokas analīzēm. Šo eksperimentu modelēšanu veica ar vienkāršotu modeli (skat. 4.8. tab.), kurā netika ņemta vērā acetātu rašanās un ietekme uz biomasas augšanu; pieņēma, ka substrāta uzņemšanu ietekmēja tikai glikozes koncentrācija (pēc Mono kinētikas) un glikozes inhibējošais efekts. Iegūtie eksperimentālie un modelēšanas rezultāti parādīti 4.7. attēlā un 4.8. tabulā. No tiem redzams, ka biomasas modelēšanas kvalitāte ir samērā laba biomasas eksponensiālajā augšanas fāzē. Pēc eksponeciālās augšanas fāzes, modeļa precizitāte ir krietni sliktāka. Vidējā biomasas modelēšanas precizitāte (r_x) b sērijas eksperimentiem 29,1 %. Vidējā substrāta koncentrācijas modelēšanas precizitāte b serijas eksperimentiem visā procesa diapozonā (r_s) 100,1 %, vērtējama kā apmierinoša, jo līdzīgs rezultāts iegūts ar iepriekšējā nodaļā aprakstīto fermentācijas procesa modeli. Identificētās modeļa parametru vērtības, kas vislabāk apraksta b eksperimentu sērijas rezultātus, apkopotas 4.9. tabulā.

4.8. tabula

E. coli BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas modeļu pilnveidošanas gaita bioreaktora kultivēšanas procesam ar piebarošanu

Modelis	Eksperimentu un modeļu pilnveidošanas gaita	Kinētiskie vienādojumi	Modeļa precizitāte	
			r_x, %	r_s, %
2-a_1	b-1 eksperiments. Modelēšana ar papildinātu 2-a modeli (no sadaļas 4.2.): papildināts ar RE ietekmi (Y_{xRE}=0,18; t_{RE}=3,5 h), glikozes un biomasas inhibejošo ietekmi uz *qs*. Identificēti modeļa parametri.	4.41, 4.42, 4.43, 4.44, 4.45, 4.34, 4.35- 4.40	22,1	20,8
2-a_1	b-2 eksperiments.		50,5	199,8
2-a_1	b-3 eksperiments.		14,6	79,7



4.7. attēls. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 b sērijas piebarošanas procesu un modelēšanas rezultāti, lietojot vienkāršotu modeli

Eksperiments nr. b-1 (zils), eksperiments nr. b-2 (zaļš), eksperiments nr. b-3 (sarkans). Eksperimentālie mērijumi (apļi, kvadrāti), modelētie lielumi (līnijas)

4.9. tabula

Identificētās parametru vērtības bioreaktora eksperimentiem, salīdzinājums ar pieejamajiem parametriem no literatūras (ar *bold* iekrāsotas pielāgotās parametru vērtības)

Param.	**Vien.**	**Literatūras dati** (tabula 3.4)	**Identificētie param. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 bioreakt. proc.**
Y_{xs}	g/g	0,50	**0,55**
q_{sMax}	g/g/h	1,69	**1,15**
K_s	g/kg	0,081	**0,005**
Papildparametri bioreaktora modelēšanai			
Y_{xYE}	g/g	—	**0,45**
Y_{bx}	g/g	—	**0,001**
t_{YE}	h	—	**3,5**
$K_{i,s}$	g/kg	55,15	**30**
K_{xMax}	g/kg	86	**97,5**

$$q_s = q_{sMax}\frac{s}{K_s + s}\cdot\frac{K_{i,s}}{K_{i,s} + s}\cdot\left(1 - \frac{x}{Kx_{max}}\right) \tag{4.41}$$

$$\mu_s = q_s Y_{xs} - m \tag{4.42}$$

kur s – substrāta koncentrācija, g/l; g/l; μ_s – īpatnējais šūnu augšanas ātrums uzņemot glikozi, 1/h; Y_{xs} – biomasas iznākums no substrāta, g/g; m – uzturēšanas enerģija, g/g/h; K_s – Mono

konstante substrāta uzņemšanai, g/kg; $K_{i,s}$ – substrāta inhibīcijas konstante, g/kg; K_{Xmax} – biomasas inhibīcijas konstante, g/l; q_s – specifiskais substrāta uzņemšanas ātrums, g/g/h; q_{sMax} – maksimālais specifiskais substrāta uzņemšanas ātrums, g/g/h.

Šie specifiskie ātrumi ir izmantoti kultivēšanas procesos ar piebarošanu sekojošo masas līdzsvara vienādojumu aprakstam:

$$\frac{dx}{dt} = \left(\mu_s - \frac{F}{V}\right)x \tag{4.43}$$

$$\frac{ds}{dt} = -q_s x - \frac{F}{V}s + \frac{F_s}{V}s_f \tag{4.44}$$

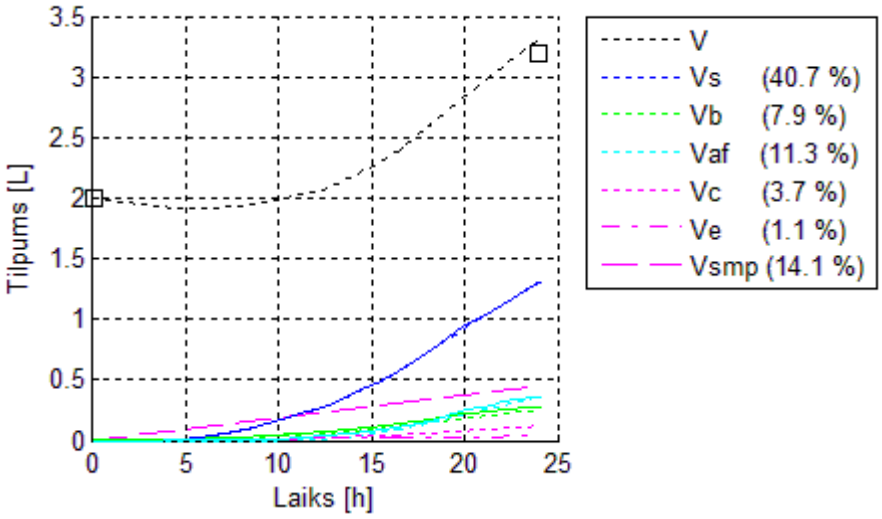
$$\frac{dV}{dt} = F - F_{par} \tag{4.45}$$

kur x – biomasas koncentrācija, g/l; s – substrāta koncentrācija, g/l; F_s – substrāta piebarošanas ātrums, l/h; F_{par} – paraugu ņemšanas daudzums, l/h; V – bioreaktora darba tilpums, l; s_f – substrāta koncentrācija piebarošanas šķīdumā, g/l; t – procesa momentānais laiks, h. $F = F_s + F_b - F_c - F_{iztv}$, kur F_c – oglekļa zudumi caur izejas gāzēm; F_b – bāzes pievienošanas ātrums; F_{iztv} – iztvaikošanas ātrums.

Masas plūsmu analīze

Veicot tiešsaistes režīmā tādu svarīgu fermentācijas procesa raksturlielumu modelēšanu un aprēķinu, kā X, S, C_p, F_s u. c., ar zināmu precizitāti tiešsaistes režīmā nepieciešams zināt kultūras tilpumu V. Šim nolūkam praksē izmanto dažādas metodes, kā kultūras līmeņa mērījumus, reaktora svara izmaiņu mērījumus, pieejamo informāciju par reaktorā iesūknētajām plūsmām, tilpuma modelēšanu u. c. Par cik ar EDF-5.4 nav iespējams tieši mērīt kultūras tilpuma maiņu laikā, šo informāciju iegūs no tiešsaistē pieejamās informācijas par ar peristaltiskajiem sūkņiem reaktorā iesūknētajiem šķīdumu daudzumiem, kā arī no atsevišķu komponentu masas plūsmu modeļiem. *E. coli* procesos ar šiem sūkņiem tika dozēta (1) bāze, (2) pretputu līdzeklis un (3) piebarojamā šķīdums. Aprēķinot masas plūsmas uz un no reaktora, tika ņemti vērā masas zudumi iztvaikojot (F_{iztv}), aizvadot CO_2 (F_c) un ņemot paraugus (F_{par}).

Masas zudumu ātrums no fermentācijas vides, iztvaikojot ūdenim, ir pieņemts kā nemainīgs lielums. Eksperimentāli noteiktā vērtība $e_1 \approx 0{,}004$ *kg/h*. Masas zudumi, ņemot paraugus, bija konstanti ($m_1 = 0{,}012$ *kg/h*). Paraugu ņemšana sākās no procesa nulles stundas.



4.8. attēls. Masas plūsmu salīdzinājums procesam b-2

Raustītās līnijas – modelētie/aprēķinātie lielumi; nepārtrauktās līnijas – ar SCADA reģistrēto iesūknēto daudzumu tilpumi; kvadrāti – ar mērcilindru nomērītie kultūras tilpumi

4.10. tabula

Tabula ar masas plūsmām no dažādiem procesiem

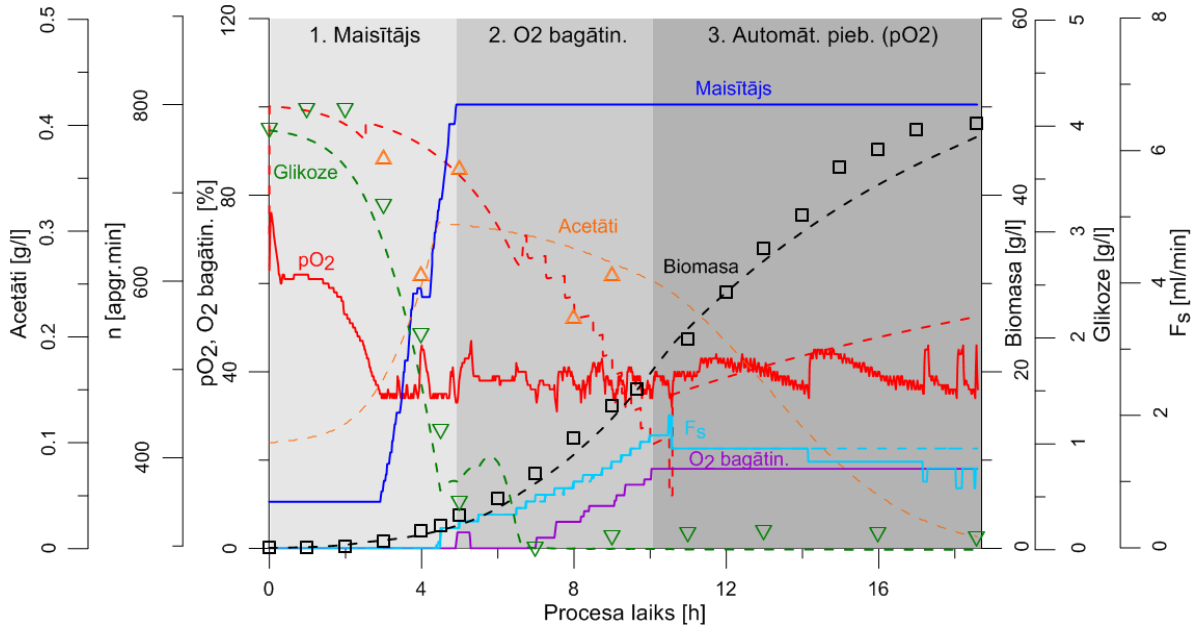
Procesa identifikāc.	Procesa ilgums [h]	Beigu biomasa [g/l]	Y_{xs} (iznākums) [g/g]	V beigu [l]	V_s padotais [l]	V_b padotais [l]	V_{af} padotais (20%) [l]
b-1	24	65,3	0,45	2,75	1,05	0,23	0,18
b-2	24	78,4	0,48	3,20	1,30	0,25	0,36
b-3	24	70,4	0,43	3,97	2,00	0,43	0,5

Apkopojot informāciju par būtiskākajām vielu plūsmām uz un no bioreaktora fermentācijas procesa beigās (skat. 4.8. att.) b-2 ekperimentam, kas uzskatāms par vidējo gadījumu starp pārlieku limitētu procesu un pārlieku pārbarotu procesu, var secināt, ka visbūtiskāk kultūras tilpumu ietekmē piebarojāmā substrāta pievienošana (40,7 %), paraugu ņemšana (14,1 %), pretputu līdzekļa (11,3 %) un bāzes (7,9 %) pievienošana. Mazāku ietekmi uz tilpuma maiņu procesa gaitā atstāj tilpuma zudumi līdz ar CO_2 izdalīšanos (3,7 %) un šķidruma iztvaikošanu (1,1 %). Visu b sērijas eksperimentu masas plūsmas un atsevišķi procesa parametri norādīti 4.10. tabulā.

4.4. Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole pēc pO_2 *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam

Pēc detalizētā (acetātu) modeļa parametru identificēšanas un pO_2 kaskādes kontroles PID parametru piemeklēšanas no priekšeksperimentiem (skat. 4.3.1. nodaļu, atsevišķi dati attēloti 4.6. att.) un procesa piebarošanas profila aprēķina, procesā vēlamo biomasas augšanas (*X*), substrāta (*S*) un acetātu (*A*) trajektoriju nodrošināšanai tika veikts testa eksperiments (4.9. att.). Tā mērķis bija vadīt procesu pēc iespējas tuvāk pirms procesa definētajiem *X, S, A* un pO_2 nosacījumiem, procesa otrajā stadijā izmantojot substrāta piebarošanu atkarībā no pO_2 signāla. Substrāta piebarošana atkarībā no pO_2 procesa otrajā fāzē izraudzīta, lai pārbaudītu šo kontroles principu, kas tiek plaši lietots ražošanas mēroga reaktoros zemāku nekā laboratorijas/pilota mērogos O_2 masas pārneses rādītāju dēļ. Konkrētā metode ir ērta limitēta substrāta piebarošanas procesa nodrošināšanai procesa otrajā fāzē, kad precīzs substrāta piebarošanas profila aprēķins ir sarežģīts dēļ izteikti kompleksiem kultūras nosacījumiem procesa otrajā stadijā. Jāatzīmē, ka lietojot šo principu, mikroorganismu īpatnējais augšanas ātrums tiek limitēts, jo tiek samazināts substrāta piebarošanas ātrums atkarībā no vidē pieejamā O_2.

Kultivēšana sākās ar *batch* (partijas) procesu (0–4,5 h), pēc kura sekoja process ar piebarošanu. Partijas fāzē, jeb fāzē, kurā mikroorganismi aug, patērējot barotnē jau esošās piedevas (bez papildu to pievadīšanas), substrāts tika patērēts un pārvērsts biomasā un nelielos daudzumos acetātos (4.9. att.). Partijas procesa beigās izšķīdušā skābekļa parciālais spiediens pO_2 sasniedza uzstādīto vērtību (40 %) un tika aktivēta maisītāja apgriezienu kaskāde, lai uzturētu uzstādīto pO_2 vērtību. Līdz ar skābekļa patēriņa pieaugumu piebarošanas fāzes sākumā (5 h), maisītāja apgriezienu ātrums sasniedza maksimālo limitu un pO_2 kontrole pārgāja uz otro kaskādi – ieejas gaisa bagātināšana ar O_2. Pirms otrās kaskādes aktivizēšanās tika aktivēta substrāta piebarošana ar optimizētā piebarošanas ātruma profila vaļējas-cilpas kontroli. Tika aprēķināts eksponenciāls piebarošanas ātrums μ_s=0,45 1/h (4,5–10 h), lai nodrošinātu maksimāli augstu specifisko biomasas augšanas ātrumu, bet, kas ir zem kritiskās vērtības, virs kuras tiktu aktivēta acetātu sintēze. Eksperimentālie dati rāda (4.9. att.), ka nekāda tālāka acetātu uzkrāšanās pēc 4,5 h nenotika, un tas līdzās ar glikozi tika pakāpeniski uzņemts. Šī stratēģija nodrošināja to, ka biomasas/substrāta iznākums ir maksimāls līdz 3. kaskādes aktivācijai, pēc kuras, iznākums, kā arī biomasas specifiskais augšanas ātrums, lai gan nedaudz, bet samazinājās.



4.9. attēls. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 eksperiments ar piebarošanu.

Analītiskie mērījumi biomasai, glikozei un acetātiem attēloti kā simboli (attiecīgi □, ▽, un △), un simulāciju rezultāti attēloti ar raustītām līnijām. Procesa tiešsaistes mērījumi attēloti kā līnijas; simulācijas rezultāti (priekšoptimizētais piebarošanas ātrumu profils) attēloti ar raustītu līniju

Sākot no kultivēšanas 10 stundas, kaskāde ar skābekļa bagātināšanu sasniedza uzstādīto maksimālo limitu un pO_2 kontrole tālāk tika realizēta ar trešo kaskādi. Šajā fāzē abi skābekļa kontroles izpildes elementi (maisītāja apgriezieni, bagātināšana ar O_2) sasniedza iepriekš definētos tehnoloģiskos nosacījumus. Lai nodrošinātu pO_2 līmeni virs droša limita, tālāka noteikta skābekļa daudzuma uzturēšana tika realizēta ar piebarošanas ātruma kontroli. Svarīgi ir uzsvērt, ka pO_2 vai skābekļa uzņemšanas ātruma kontrole manipulējot piebarošanas ātrumu ir iespējama vienīgi tad, ja procesu realizē substrāta limita apstākļos, citiem vārdiem, tad ja barotnē neuzkrājas substrāta pārpalikumi. Analizētajā gadījumā substrāta limits iestājās procesa 6,5 h, un tāds saglabājas līdz procesa beigām. Optimizētā piebarošanas stratēģija paredz, ka automātiskā piebarošanas fāzē, piebarošanas ātrums saglabājās konstants un atbilda maksimālajai identificētajai glikozes plūsmas vērtībai, kas dotajos apstākļos bioreaktorā varēja tikt oksidēta. Neskatoties uz iepriekš minēto, reālā sistēmā ir iespējamas nejaušas maksimālās k_La vērtības svārstības. Tādējādi, trešās kaskādes uzdevums ir koriģēt priekš-aprēķināto piebarošanas profilu, lai noturētu pO_2 virs drošā līmeņa, kas definēts ar uzstādīto pO_2 vērtību kontroles sistēmā. Kā to var redzēt 4.9. attēlā, piebarošanas ātruma vērtība samazinās intervālā līdz procesa beigām. Šajā fāzē biomasas augšanas ātrums samazinās (eksperimentālie dati, attēls 4.9. att.). Neskatoties uz to, kultivēšanas beigās tika sasniegts

prognozētais iznākums. Novirze starp prognozēto un nomērīto biomasas koncentrāciju (14–17 h) var būt skaidrojamas ar modeļa un to parametru, kas tika identificēti no priekš-eksperimentiem, zināmu neprecizitāti.

Visā procesa kontroles reģionā (3–19 h) bija iespējams nodrošināt pO_2 vērtības kontroli robežās 39 ± 8 %, kas bija tuvu uzstādītajai 40 ± 5 %.

Optimizētā kontroles stratēģija deva stabilu biomasas augšanu bez ievērojamas acetātu uzkrāšanās piebarošanas fāzē. Procesa beigās tika sasniegta biomasas koncentrācija 48,15 g/l, bet acetātu koncentrācija visā procesa garumā nepārsniedza 0,37 g/l. Izšķīdušā skābekļa parciālā spiediena (pO_2) kaskādes kontrole strādāja nevainojami un nodrošināja pO_2 vērtību ļoti tuvu noteiktajās robežās. Automātiskā piebarošanas fāze nodrošināja robustu pO_2 kontroli un minimālu optimizētā piebarošanas ātruma profila samazinājumu, nodrošinot paredzēto procesa produktivitātes rādītāju, biomasas daudzumu, tehnoloģiski definētajās robežās.

4.5. Izmeklēta, uz modeli bāzēta piebarošanas ātruma kontrole *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam ar prognozi pēc references profilu datiem

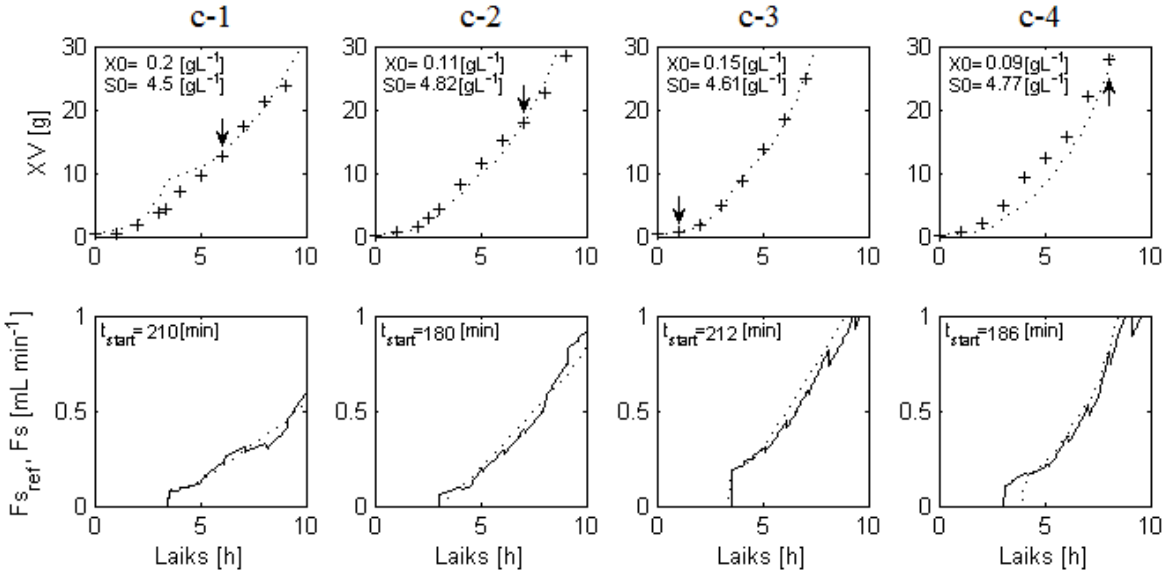
4.3.2. nodaļā identificēto matemātisko modeli tālāk lietoja uz modeli bāzētai piebarošanas ātruma kontroles (MPC) realizācijai. Šim nolūkam veica c eksperimentu sēriju.

Īstenotā MPC pieeja attiecas uz tā saucamo „zelta partijas" biomasas augšanas trajektorijas kontroli. Pētījumā arī metodoloģiski parādīts, kā doto principu var lietot vēlamo references piebarošanas/biomasas augšanas profilu atrašanai. Pirms eksperimenta operatoram jāizvēlas biomasas, substrāta un tilpuma profilus, kurus uzstādīt kā references. Lai aprēķinātu šos references profilus, ir jāzina modeļa parametru skaitliskās vērtības, piemēram, biomasas iznākums no substrāta (Y_{xs}), maksimālais substrāta patēriņa ātrums (q_{sMax}), aptuvena, procesa laikā maksimāli sasniedzamā biomasas koncentrācija (X_{max}). Līdz ar uzkrātās eksperimentālās datubāzes paplašināšanos iespējams veikt precīzāku modeļa parametru identifikāciju. Šajā sadaļā demonstrēta procesa modelēšanas programma, kas ļauj modelēt procesu un izvēlēties modelētās trajektorijas par references profiliem. Šajā programmā var izvēlēties eksperimentu references profilus un sākotnējo piebarošanas ātrumu. Pēc procesa sākšanas MPC kontroles algoritms veic izvēlētā sākotnējā piebarošanas profila kontroli ar mērķi procesa biomasas profilu XV_{proc} virzīt pa references profila XV_{ref} trajektoriju. Vēlamā references profila noteikšanas demonstrējumā parādīts, ka, ja netiek novērota nozīmīga substrāta uzkrāšanās un procesa produktivitāti var palielināt palielinot piebarošanas ātrumu, tad sākotnējais piebarošanas profils nākamajos mēģinājumos var tikt palielināts. Pēdējā darbība var tikt

atkārtota no precesa uz procesu, līdz sasniegti maksimālie biomasas iznākumi. Vēlāk references profili no procesiem ar visaugstāko produktivitāti var tikt izmantoti kā references – "zelta partijas" profili priekš vēlamā procesa realizācijas.

4.5.1. Automātiska piebarošanas sākšana

Sakarā ar fermentācijas procesos novērotajām atšķirīgajām procesa sākotnējās biomasas (X_0) un glikozes (S_0) nosacījumiem, un sub-optimālu procesa kontroli būtiski atšķiras kultūras augšanas profili partijas procesa (pirms papildu piebarošanas) fāzē dažādām procesa partijām pat pie identisku piebarošanas profilu lietošanas. Tas nozīmē, ka šādos procesos atšķirsies laiks kurā tiks uzņemta vidē sākotnēji pieejamā glikoze un, kurā jāsāk kultūras papildu piebarošana. Šajā gadījumā, lai nelimitētu vai nepārbarotu kultūru, piebarošanas fāzes sākumu nepieciešams nobīdīt vienā vai otrā virzienā. Šis princips ieviests izstrādātajā MPC sistēmā.



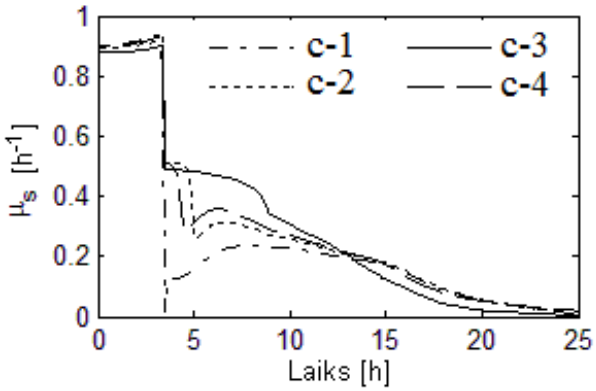
4.10. attēls. Procesa sākuma nosacījumi (X_0, S_0) un piebarošanas sākšanas laiks (t_{start}) procesiem c-1–c-4

(··) Uzstādītie (modelētie) references profili, (+) biomasas novērtējums, (–) realizētais piebarošanas ātrums, (↓) norāde uz laika momentu (punktu), kurā tiek sasniegta reference

Eksperimentālie rezultāti rādīja, ka līdzīgie X_0 un S_0 parametri c-1 un c-3 eksperimentos (skat. 4.10. att.) rezultējās ar piebarošanas uzsākšanu vienādos laikos (210–212 min). Līdzīgi sākotnējie apstākļi tika iegūti eksperimentiem c-2 un c-4, kuros salīdzinājumā ar c-1 un c-3 sākuma X_0 bija zemāks, bet S_0 – augstāks. Tomēr ātrāka biomasas augšanas noveda pie tā, ka piebarošana sākās agrāk, t. i., procesa 180–186 min. Laika atskaites punkti (skat. 4.10. att.), kad biomasa sasniegusi uzstādīto references vērtību, ir norādīti ar bultiņām.

4.5.2. Biomasas profila tiešsaistes kontrole

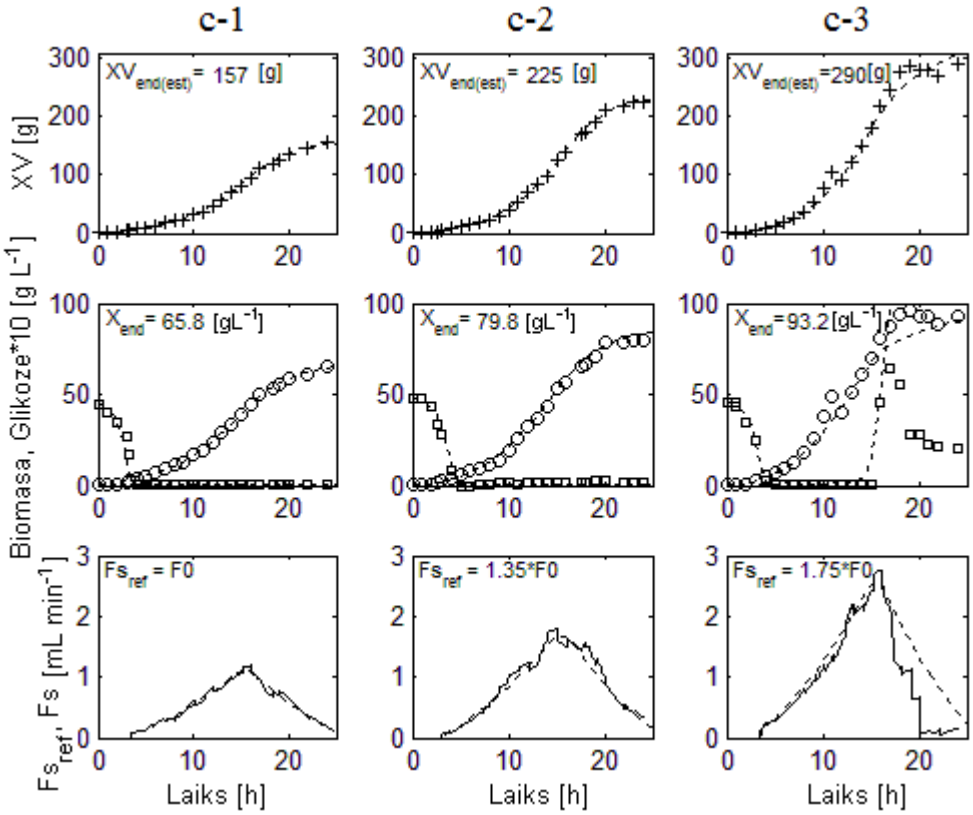
C eksperimentu sērijas procesiem izraudzījās piebarošanas ātrumus, kas deva biomasas eksponenciālu augšanu 0,15–0,50 1/h robežās (skat. 4.11. att.). Šīs eksperimentu sērijas rezultāti parādīti 4.12. un 4.13. attēlos. Eksperimentos c-1–c-4 aprēķinātais biomasas daudzums un koncentrācija procesa beigās attiecīgi bija 157 g (65,8 g/l), 225 g (79,8 g/l), 290 g (93,2 g/l), un 227 g (78,5 g/l). Aprēķinātās biomasas ($XV_{end(est)}$) un eksperimentāli izmērītās biomasas ($XV_{end(exp)}$) atšķirības ($r_{end(est)}$, $r_{end(exp)}$) no references profiliem (XV_{ref}) procesa beigās (24 h) bija attiecīgi 4,6 un 3,8 %. Mazākas XV_{est} novirzes no references profiliem novērotas procesa 20. stundā, kad vidējā atšķirība, aprēķināta no c-1–c-4 eksperimentiem, bija 3,0 %. Šīs atšķirības skaidrojamas ar to, ka ar modeli nebija iespējams pietiekami precīzi modelēt biomasas stacionāro augšanas fāzi. Lai modelētu šo posmu ar augstāku precizitāti, nepieciešams sarežģītāks modelis, kas ņemtu vērā arī iespējamo blakusproduktu (acetātu, olbaltumvielu u. c.) veidošanos [131, 147] un biomasas fizioloģisko stāvokli (šūnu novecošanu, dzīvotspējīgo šūnu attiecību u. c.) [75]. Nepārprotami, arī precizitāte, ar kādu izvēlēts (modelēts) kultūras tilpuma references profils, ietekmēs parametra $r_{end(est)}$ vērtību. Augstāka $r_{end(est)}$ skaitliskā vērtība salīdzinājumā ar $r_{end(exp)}$ norāda uz to, ka biomasas aprēķinu kvalitāti varētu uzlabot, veicot precīzāku tilpuma aprēķināšanu tiešsaistē. Turklāt c-4 rezultāti parāda to, ka modeļa paramteri, kas izmantoti references profila izvēlē, konkrētajā gadījumā nebija optimālie, kad eksponenciālajai augšanas fāzei tika izvēlēts pārlieku paaugstināts piebarošanas profils. Ņemot vērā c-4 sākuma apstākļus (X_0 and S_0), modelis neuzrādīja būtisku glikozes uzkrāšanos procesa 11. stundā.



4.11. attēls. Biomasas specifiskais augšanas ātrums realizētajos c-1–c-4 eksperimentos

Eksperimentos c-1 un c-2 būtiska glikozes uzkrāšanās piebarošanas laikā netika novērota. Savukārt eksperimentā c-3 glikozes uzkrāšanās (6,39 g/l) tika novērota procesa beigu posmā. Tā sākās procesa 16. stundā un turpinājās līdz procesa beigām 4,61 g/l (16 h),

6,39 g/l (17 h), 5,58 g/l (18 h), 2,77 g/l (19 h), 2,79 g/l (20 h), 2,23 g/l (21 h), 2,12 g/l (22 h), un 2,02 g/l (24 h). To var skaidrot ar pārāk augstu references piebarošanas profilu sākot ar procesa 15. stundu. Turklāt šī eksperimenta laikā tika novēroti palielināti/kļūdaini mērījumu rezultāti līdz 12. procesa stundai, kad procesa operatoru nomaiņa tika veikta (ievērojami palielinātas vērtības procesa laikā 9–11 h). Neskatoties uz to, biomasas references profils tika sasniegts 2–3 h pēc precīzāku mērījumu veikšanas. Eksperimentā c-4 piebarošanas profils tika atbilstoši samazināts, un izvēlēti nedaudz palielināti piebarošanas ātrumi references profilu pirmajai daļai, lai pārbaudītu pētāmās kultūras ātrākas augšanas spēju. Rezultātā – pirmajā piebarošanas profila daļā tikai 2 parauga ņemšanas brīžos tika novērota glikozes uzkrāšanās: 1,04 g/l (11 h) un 1,87 g/l (13 h). Atlikušajā procesa piebarošanas fāzē glikozes koncentrācija nepārsniedza 0,26 g/l.

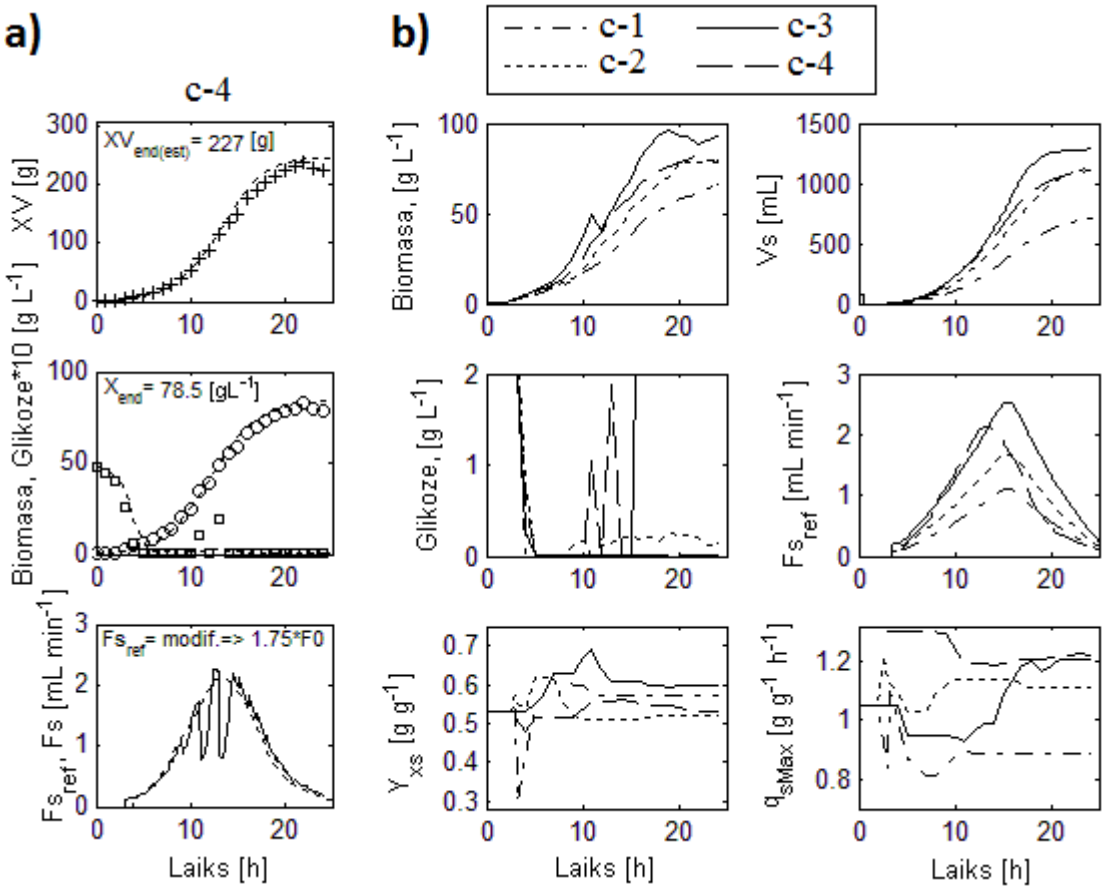


4.12. attēls. Biomasas daudzuma kontroles rezultāti c-1–c-3

(··) Uzstādītie (modelētie) references profili, (+) aprēķināts tiešsaistē, (▫) "rokas" glikozes analīzes, (○) "rokas" biomasas analīzes, (–) realizētais piebarošanas ātrums

No Y_{xs} un q_{sMax} adaptācijas rezultātiem var iegūt vēl papildu informāciju. Biomasas iznākums no substrāta ir parametrs, kas rāda, cik efektīvi galvenais oglekļa avots tiek pārveidots biomasā. Lielāks iznākums norāda uz to, ka patērēts mazāk glikozes nevēlamu blakusproduktu sintēzē. Sākot no procesa 8.–9. stundas, novērota korelācija starp

aprēķinātajām Y_{xs} trajektorijām eksperimentiem c-1–c-4 (skat. 4.13. att. b). Augstākais iznākums procesa beigās tika iegūts eksperimentos ar mazāko un lielāko piebarošanas ātruma profilu, vidēji 0,57 g/g c-1 un 0,60 g/g c-3 eksperimentos. Eksperimentu c-2 un c-4 iznākumos tika novērota relatīvi maza atšķirība – attiecīgi 0,52 g/g un 0,54 g/g. Tas labi korelē ar biomasas daudzumiem procesa beigās (231 g un 247 g), ņemot vērā, ka piebarotā substrāta tilpums (V_s) šajos procesos bija praktiski vienāds. q_{sMax} aprēķinu rezultāti rāda, ka šī parametera identificētā vērtība veiktajos eksperimentos bija atšķirīga un mainījusies 1,05 ± 0,2 g/g/h robežās. Iepriekš minētais varētu būt saistītas ar doto eksperimentu atšķirīgiem substrāta limitējošiem apstākļiem.

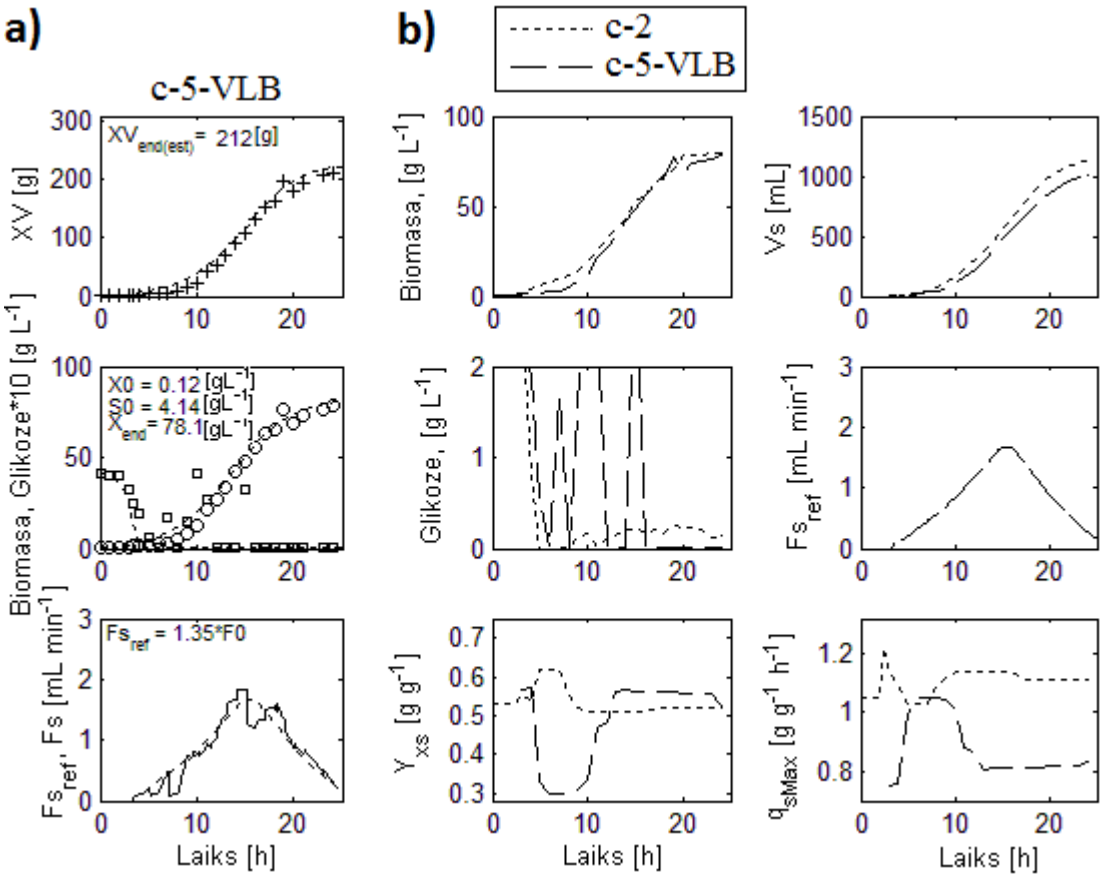


4.13. attēls. Biomasas daudzuma kontroles rezultāti eksperimentam c-4 un apkopots parametru vērtību identificēšanas pārskats eksperimentiem c-1–c-4.

a) (– –) Uzstādītie (modelētie) references profili, (+) aprēķināts tiešsaistē, (▫) «rokas» glikoze analīzes, (○) «rokas» biomasas analīzes, (–) izmantotais piebarošanas ātrums. b) c-1 – c-4 salīdzinājums. Biomasas, glikozes, Y_{xs} un q_{sMax} līknes ir zīmētas un interpolētas starp «rokas» analītiskajiem mērījumiem, kas veikti ik pēc 1–2 h

Lai salīdzinātu MPC kontroles metodes lietojumu citas konfigurācijas reaktorā, tika veikts testa eksperiments vienreizlietojamā laboratorijas bioreaktorā (4.14. att. a un b). Lai nodrošinātu kultūras augšanu bez kritiskas glikozes uzkrāšanās un vienlaikus sasniegtu

salīdzinoši labu biomasas iznākumu, šajā eskperimentā tika izmantots tas pats references piebarošanas profils, kas tika lietots eksperimentā c-2. Biomasas un cukura sākuma koncentrācijas bija līdzīgas kā eksperimentā c-2. Tomēr iespējams, ka atšķirīgo temperatūras kontroles PID parametru dēļ, kurus līdz procesa sestajai stundai nācās koriģēt, procesa sākumā tika novērotas biežas temperatūras svārstības 36,8 ± 0,9 ºC robežās. PID parametru korekcija tika veikta, lai kompensētu reaktoru, galvenokārt siltumapmaiņas elementu un to virsmas laukumu, atšķirības. Visticamāk, tieši šis apstāklis izraisīja ilgāku procesa *lag* fāzi (3-4 stundas) un daudz zemāku procesa biomasu šajā procesa stadijā. Neskatoties uz to, kultūra bija spējīga atgūties un procesa 17. stundā pietuvoties references biomasai (skat. 4.14. att. a). Piebarošana sākās procesa 210 minūtē. Procesa beigās biomasas iznākums bija 212 g (78,1 g/l). Noteiktās biomasas ($r_{end(est)}$) novirze no iepriekš uzstādītās references vērtības procesa beigās bija 4,3 %. Glikozes koncentrācija procesa laikā nepārsniedza 4,1 g/l.



4.14. attēls. Biomasas daudzuma kontroles rezultāti (c-5-VLB) vienreizlietojamajā reaktorā un to salīdzinājums ar c-2

a) (– –) Uzstādītais (modelētais) references profils, (+) aprēķināts tiešsaistē, (▫) off-line glikoze, (○)«rokas» biomasa, (–) izmantotais piebarošanas ātrums. b) c-5-VLB un c-2 salīdzinājums. Biomasas, glikozes, Y_{xs} un q_{sMax} līknes ir zīmētas un interpolētas starp off-line analītiskajiem mērījumiem, kas veikti ik pēc 1- 2 h

Rekombinantā *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 biomasas kultivēšanas procesā parastajā un vienreizlietojamajā bioreaktorā, tika parādīta uz modeli bāzēta piebarošanas profila noteikšanas un uz modeli bāzētas kontroles ar prognozi, lietojums. Labākā sakritība ar references profilu tika novērota procesos, kuros nenotika būtiska glikozes uzkrāšanās, kā arī visos procesos līdz stacionārās augšanas fāzes sākumam ap procesa 20. h. Procesa beigās aprēķinātā biomasas vidējā novirze no uzstādītās references vērtības bija 4,6 %, kas ir tuva eksperimentāli izmērītajiem 3,6 %. Pateicoties secīgi veiktajiem eksperimentiem, bija iespējams pārbaudīt dažāda mēroga un formas piebarošanas profilus, saglabājot eksponenciālu augšanu ar īpanējo augšanas ātrumu 0,2, 0,3 un 0,4 ± 0,05 h^{-1}. Šādā veidā, veicot piebarošanas profila izmaiņas, iespējams iegūt tā saukto "zelta partijas" piebarošanas profilu. Tika realizēts veiksmīgs fermentācijas eksperiments vienreiz lietojamā laboratorijas mēroga bioreaktorā. Noteikta 4,3 % biomasas ($r_{end(est)}$) novirze no iepriekš uzstādītās references vērtības procesa beigās. Īstenoto procesa kontroli un tās izpildi ir iespējams uzlabot. Specifiskāka procesa modeļa pielāgošana priekš *E. coli*, piemēram, ņemot vērā blakusproduktu, kā proteīnu un acetātu sintēzi/patēriņu, un informāciju par biomasas fizioloģisko stāvokli, kā šūnu novecošana, dzīvotspējīgo šūnu attiecība u. c., būtu iespējams uzlabot procesa modelēšanas precizitāti. Precīzāka tilpuma noteikšana, veicot šķīduma pudeles vai reaktora tiešu svēršanu, arī uzlabotu biomasas noteikšanas un tās turpmākās kontroles precizitāti. Ieviestā metode ir īstenota komerciāli pieejamā bioreaktoru sistēmā (A/S «Biotehniskais centrs») un ir paredzēta piebarošanas ātruma kontrolei dažāda veida mikroorganismu kultūru fermentācijas procesos [148].

SECINĀJUMI

1. Pētījumi par piebarošanas ātruma kontroli fermentācijas procesos parādījuši, ka šīs procedūras nodrošināšanai augsta biomasas iznākuma iegūšanai nepieciešama fermentācijas procesa modelēšana un izmeklētu piebarošanas ātruma kontroles metožu lietojums, kur pēdējais apstāklis vēl joprojām ir ierobežots atbilstošu analītisko un instrumentālo rīku trūkuma un pieejamības dēļ.

2. Kolbu eksperimentu pētījumi deva iespēju relatīvi īsā laikā novērtēt *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 augšanas raksturu, biomasas mērījuma precizitāti un fermentācijas procesa izejas modeli, kas tālāk veiksmīgi lietots piebarošanas ātruma aprēķinam bioreaktora eksperimentiem. Izraudzītajā kultivēšanas barotnē noteiktā, maksimāli iegūstamā biomasa kolbu eksperimentos bija 3,5 % no iegūtā maksimālā optimizētā biomasas iznākuma bioreaktora procesam.

3. Maksimālais biomasas iznākums 93,2 g/l iegūts bioreaktora fermentācijas procesā ar kontrolētu biomasas specifisko augšanas ātrumu (μ), kas nav lielāks par 0,45 1/h, un ar zināmu substrāta uzkrāšanos kultūras vidē. Noteikta hepatīta B kor-antigēna (HBcAg) ieguvei vēlamā biomasas koncentrācija līdz 80 g/l, kas iegūstama bez būtiska substrāta uzkrāšanās ar kontrolētu μ, kas nav lielāks par 0,40 1/h.

4. Dažādas sarežģītības matemātiskie modeļi un šo modeļu parametri identificēti *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesa biomasas, substrāta un acetātu modelēšanai. Pētījums parādīja, ka krietni sarežģītāks matemātiskais modelis uzrādīja līdzīgu substrāta un par 2,6 reizēm labāku biomasas modelēšanas kvalitāti salīdzinājumā ar vienkāršoto modeli.

5. Kontrolējot piebarošanas ātrumu pēc pO_2 rādījuma, visā vadības diapazonā tika realizēta stabila pO_2 un substrāta kontrole. Šādā procesā ieguva biomasu, kas bija 0,63 reizes mazāka par maksimāli iegūto. Lietojot šo piebarošanas stratēģiju, iespējams nodrošināt drošu/nepārbarotu *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas procesu, tomēr jāņem vērā, kādu iespaidu uz HBcAg iznākumu var atstāt pazeminātais biomasas iznākums procesa beigās.

6. Uz modeli bāzēta piebarošanas ātruma kontroles sistēma ar prognozi (MPC) tika radīta un aprobēta *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 references piebarošanas un biomasas profila izvēlei, automātiskai piebarošanas uzsākšanai, piebarošanas ātruma un biomasas augšanas ātruma kontrolei procesa laikā. Izmeklētās piebarošanas ātruma kontroles metodes ieviestas un aprobētas komerciālās bioreaktoru sistēmās (A/S «Biotehniskais Centrs»).

LITERATŪRA

1. Demain A.L. Microbial biotechnology// Trends In Biotechnology - 2000. - Vol. 18. – p. 26-31.
2. Demain A.L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery// J Ind Microbiol Biotechnol - 2013. - Vol. 41. - p. 185-201.
3. Straathof A., Panke S., Schmid A. The production of fine chemicals by biotransformations// Current Opinion in Biotechnology - 2002. - Vol. 13. - p. 548–556.
4. Schmid A., Hollmann F., Park J.B., Bühler B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe// Current Opinion in Biotechnology - 2002. - Vol. 13. - P. 359–366.
5. Gavrilescu M., Chisti Y. Biotechnology — a sustainable alternative for chemical industry// Biotechnology Advances - 2005. - Vol. 23. - p. 471-499.
6. Otero J.M., Nielsen J. Industrial Systems Biology// Biotechnol. Bioeng. - 2010. - Vol. 105. - p. 439-460.
7. Kalnenieks U., Pentjuss A., Rutkis R., Stalidzans E., Fell D. Modeling of Zymomonas mobilis central metabolism for novel metabolic engineering strategies// Frontiers In Microbiology. - 2014 - Vol. 5. - p. 1-7.
8. Demain A., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms// Biotechnology Advances - 2009. - Vol. 27. - p. 297-306.
9. Magiorakos A.P., et. all. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance// Clinical Microbiology and Infection - 2012. - Vol. 18(3). - p. 268-281.
10. Pfaller M.A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology// J. Am. J. Med. - 2012. - Vol. 125. - p. S3-S13.
11. Petrovskis I. Rekombinanto olbaltumvielu: cilvēka interleikīna-2, hepatīta B vīrusa kor-antigēna un leikocitārā interferona INFαN ekspresijas optimizācija Escherichia coli šūnās// Doktora disertācija. - Rīga: Latvijas Universitāte, 1979.
12. Pushko P., Pumpens P., Grens E. Development of virus-like particle technology from small highly symmetric to large complex virus-like particle structures// Intervirology - 2013. - Vol. 56. - p. 141-165.

13. Zhao Q., Li, S., Yu H., Xia N., Modis Y. Virus-like particle-based human vaccines: Quality assessment based on structural and functional properties// Trends in Biotechnology - 2013. - Vol. 31. - p. 654-663.

14. Freivalds J., Dislers A., Ose V., Pumpens P., Tars K., Kazaks A. Highly efficient production of phosphorylated hepatitis B core particles in yeast Pichia pastoris// Protein Expression and Purification - 2011. - Vol. 75. - p. 218-224.

15. Dishlers A., Skrastina D., Renhofa R., Petrovskis I., Ose V., Lieknina I., Jansons J., Pumpens P., Sominskaya I. The Hepatitis B Virus Core Variants that Expose Foreign C-Terminal Insertions on the Outer Surface of Virus-Like particles// Molecular Biotechnology - 2015. - Vol. 57. - p. 1038-1049.

16. Pumpens P., Grens E., Nassal M. Molecular epidemiology and imunology of Hepatitis B virus infection// Intervirology - 2002. - Vol. 45. - p. 218-232.

17. Pumpens P., Borisova G.P., Crowther R.A., Grens E. Hepatitis B virus core particles as epitope carriers// Intervirology - 1995. - Vol. 38. - p. 63-74.

18. Pumpens P, Grens E. Artificial genes for chimeric virus-like particles// Khudyakov Y.E., Fields H.A. (Eds.) - Artificial DNA: Methods and Applications - 2002. - p. 249-327.

19. Vīksna L. Vīrushepatīts C: norise, ārstēšana, prognoze, profilakse// Rīga: Nacionālais apgāds, 2003. - 128. lpp.

20. The Commision of the European communities. Laying down the principles and guidelines of good manufacturing practice in respect of medicinal// Official Journal of the European Union. – 2003. - L 262/22 - p. 22-26.

21. ASV Pārtikas un Zāļu Administrācija / Internets. -

    http://www.fda.gov/

22. Eibl R., Löffelholz C., Eibl D. Single-use bioreactors - An overview// Eibl R., Eibl D. (Eds.) Single-Use Technology in Biopharmaceutical Manufacture. - John Wiley & Sons, Inc. - 2011. – p. 33-51.

23. Chu L., Robinson D.K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture// Current Opinion in Biotechnology - 2001. - Vol. 12. - p.180–187.

24. Jianwei Z. Mammalian cell protein expression for biopHarmaceutical production// Biotechnology Advances - 2012. - Vol. 30. - p. 1158–1170.

25. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток// Ред. Работнова И.Л. (пер. с англ. Петровой Т.А., Позмоговой И.Н.). – Мир - 1978. - 330 с.

26. Owens, J.D.,J.D. Legan. Determination of the Monod substrate saturation constant for microbial growth// FEMS Microbiology Reviews - 1987. - Vol. 46. - p. 419-432.

27. Jenzsch M., Gnoth S., Kleinschmidt M., Simutis R., Lübbert A.. Improving the batch-to-batch reproducibility in microbial cultures during recombinant protein production by guiding the process along a predefined total biomass profile// Bioprocess and Biosystems Engineering - 2006. - Vol. 29. - p. 315-321.

28. Galvanauskas V., Simutis R., Volk N., Lübbert A. Model based design of a biochemical cultivation process// Bioprocess Engineering - 1998. - Vol. 18. - p. 227-234.

29. Kuprijanov A., Schaepe S., Simutis R., Lübbert A. Model predictive control made accessible to professional automation - Biosystems and Information Technology - 2013. - Vol. 2. - p. 26-31.

30. Sakato K., Tanaka H. Advanced Control of Glutathione Fermentation Process// Biotechnology and Bioengineering - 1992. - Vol. 40. - p. 904-912.

31. Choi J.H., Keum K.C., Lee S.Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli// Chemical Engineering Science - 2006. - Vol. 61. - p. 876-885.

32. Choi J.H., Lee S.Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coli// Applied Microbiology and Biotechnology - 2004. - Vol. 64. - p. 625-635.

33. Singh S.M, Panda A.K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins// Journal of bioscience and bioengineering - 2005. - Vol. 99. - p. 303-310.

34. Junker B. Scale-Up Methodologies for Escherichia coli and Yeast Fermentation Processes// Journal of bioscience and bioengineering - 2004. - Vol. 97. - p. 347-364.

35. Castan A., Näsman A., Enfors S.O. Oxygen enriched air supply in Escherichia coli processes: production of biomass and recombinant human growth hormone// Enzyme and Microbial Technology - 2002. - Vol. 30. - p. 847-854.

36. Bajpai R. Control of Bacterial Fermentations// Biochemical Engineering - Annals of the New York Academy of Sciences - 1987. - Vol. 506. - p. 446-458.

37. Schulz D.V., Knorre W.A., Pohl H.D., Korz D., Sanders E.A., Ros A., Deckwer W.D. High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate// Journal of Biotechnology - 1991. - Vol. 20. - p. 17-28.

38. Lee, S.Y. High cell density cultivation of Escherichia coli// Trends in Biotechnology - 1996. - Vol. 14. - p. 98-105.

39. Marisch K., Bayer K, Scharl T., Mairhofer J., Krempl P.M., Hummel K., Razzazi-Fazeli E., Striedner G. A Comparative Analysis of Industrial Escherichia coli K–12 and B Strains in High-Glucose Batch Cultivations on Process-, Transcriptome- and Proteome Level// PLoS ONE - 2013. - Vol. 8. - p. 1-16.

40. Xu B, Jahic M., Enfors S.O.. Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of Escherichia coli// Biotechnol. Prog. - 1999. - Vol. 15. - p. 81-90.

41. Shiloacha J., Fass R. Growing E. coli to high cell density—A historical perspective on method development// Biotechnology Advances - 2005. - Vol. 23. - p. 345-357.

42. Chao Y.P., Law W.S., Chen P.T., Hung W.B. High production of heterologous proteins in Escherichia coli using the thermo-regulated T7 expression system// Applied Microbiology and Biotechnology - 2002. - Vol. 58. - p. 446-453.

43. Kleist S., Miksch G., Hitzmann B., Arndt M., Friehs K., Flaschel E. Optimization of the extracellular production of a bacterial pHytase with Escherichia coli by using different fed-batch fermentation strategies// Applied Microbiology and Biotechnology - 2003. - Vol. 61. - p. 456-462.

44. Peebo K., Valgepea K., Nahku R., Riis G., Õun M., Adamberg K., Vilu R. Coordinated activation of PTA-ACS and TCA cycles strongly reduces overflow metabolism of acetate in Escherichia coli// Appl Microbiol Biotechnol - 2014 . - Vol. 98. - p. 5131-5143.

45. Luli G.W, Strochl W.L. Comparison of Growth, Acetate Production, and Acetate Inhibition of Escherichia coli Strains in Batch and Fed-Batch Fermentations// Appl. Environ. Microbiol - 1990. - Vol. 56. - p. 1004-1011.

46. Wong H.H., Kim Y.C., Lee S.Y., Chang H.N. Effect of Post-Induction Nutrient Feeding Strategies on the Production of Bioadhesive Protein in Escherichia coli// Biotechnol. Bioeng. - 1998. - Vol. 60(3). - p. 97-108.

47. Zabriskie D.W., Wareheim D.A., Polansky M.J.. Effects of fermentation feeding strategies prior to induction of expression of a recombinant malaria antigen in Escherichia coli// Journal of Industrial Microbiology - 1987. - Vol. 2. - p. 87-95.

48. Phue J.N, Lee S.J, Kaufman J.B, Negrete A., Shiloach J. Acetate accumulation through alternative metabolic pathways in ackA2 pta2 poxB2 triple mutant in E. coli B (BL21)// Biotechnol. Lett. - 2010. - Vol. 32. - p. 1897-1903.

49. Jeong K.J., Lee S.Y. Enhanced production of recombinant proteins in Escherichia coli by filamentation suppression// Applied and Environmental Microbiology - 2003. - Vol. 69. - p. 1295-1298.

50. Fuld G.J., Dunn C.G. 50-Gallon Pilot Plant Fermentor for Classroom Instruction// Appl. Microbiol. - 1958.- Vol. 6(1). - p. 15–23.

51. Lübbert A., Jørgensen S.B. Bioreactor performance: a more scientific approach for practice// Journal of Biotechnology - 2001. - Vol. 85. - p. 187-212.

52. Birch J., Varley J. Reactor design for large scale suspension animal cell culture// Cytotechnology – 1999. - Vol. 9. - p. 177-205.

53. Junker B., Brix T., Lester M., Kardos P., Adamca J., Lynch J., Schmitt J., Salmon P. Design and Installation of a Next Generation Pilot Scale Fermentation System// Biotechnol. Prog. - 2003. - Vol. 19. - p. 693-705.

54. Takors, R**.** Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions// Journal of Biotechnology -2012. - Vol. 160. - p. 3-9.

55. Junker B.H, Stanik M., Barna C., Salmon P., Paul E., Buckland B.C. Influence of impeller type on power input in fermentation vessels// Bioprocess Engineering - 1998. - Vol. 18. - p. 401-412.

56. Ju L.K., Chase G.G. Improved scale-up strategies of bioreactors// Bioprocess Engineering - 1992. - Vol. 8. - p. 49-53.

57. Junker B. Foam and Its Mitigation in Fermentation Systems// Biotechnol. Prog. - 2007. - Vol. 23. - p. 767-784.

58. Bunge M., et. all. On-Line Monitoring of Microbial Volatile Metabolites by Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry// Applied and Environmental Microbiology - 2008. - Vol. 74. - p. 2179–2186.

59. Junker B. Sustainable Reduction of Bioreactor Contamination in an Industrial Fermentation Pilot Plant// Journal of Bioscience and Bioengineering - 2006. - Vol. 102. - p. 251–268.

60. Gnoth S., Simutis R., Lübbert A. Fermentation process supervision and strategies for fail-safe operation: A practical approach// Eng. Life Sci. - 2011. - Vol. 11, p. 94–106.

61. Shukla A.A., Gottschalk U. Single-use disposable technologies for biopHarmaceutical manufacturing// Trends in Biotechnology - . 2013. - Vol. 31(3). - p. 147-154.

62. Lopes, Adriana G. Single-use in the biopharmaceutical industry: A review of current technology impact, challenges and limitations// Food and bioproducts processing - 2015. - Vol. 93. - p. 98–114.

63. Humphrey A. Shake Flask to Fermentor: What Have We Learned?// Biotechnol. Prog. - 1998. - Vol. - 14, p. 3-7.

64. Bylund F., Guillard F., Enfors S.O., Tragardh C., Larsson G.. Scale down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance// Bioprocess Engineering - 1999. - Vol. 20. - p. 377-389.

65. Valentinottia S., Srinivasana B., Holmbergc U., Bonvina D., Cannizzaro C., Rhielb M., von Stockar U. Optimal operation of fed-batchfermentations via adaptive control of overflow metabolite. Control Engineering Practice// - 2003. - Vol. 11. - lpp. 665–674.

66. Design of a stable adaptive controller for driving aerobic fermentation processes near maximum oxygen transfer capacity. Oliveira R., Simutis R., de Azevedo S.F. Journal of Process Control - 2004. - Vol. 14. - p. 617-626.

67. Monod J. The growth of bacterial cultures// Annu. Rev. Microbiol. - 1949. - Vol. 3. - p. 371-394.

68. Herbert D., Elsworth R., Telling R.C. The Continuous Culture of Bacteria; a Theoretical and Experimental Study// J . Gen. Microbiol. - 1956. - Vol. 1. - p. 601-622.

69. Luedeking R., Piret E.L. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH// J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. - 1959. - Vol. 1(4). p. 393-412.

70. Pirt J.S. The maintenance energy of bacteria in growing cultures// Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. - 1965. - Vol. 163(991). p. 224-31.

71. Righelato R.C., Trinci A.P.J., Pirt S.J. The Influence of Maintenance Energy and Growth Rate on the Metabolic Activity, MorpHology and Conidiation of Penicillium chrysogenum// J. gen. Microbiol. - 1968. - Vol. 50. - p. 399-412.

72. Alvaro R.L, Galindo E, Ramírez O.T, Palomares L.A. Living With Heterogeneities in Bioreactors// Molecular Biotechnology - 2006. - Vol. 34. - p. 355-381.

73. Siemens AG. Validation support manual// Kemper-Masterson Inc. - 1997. - document ID: C79000-G7076-C736-01.

74. Ratledge C. Basic biotechnology// Cambridge: Cambridge University Press. - 2006. - p. 666.

75. Pohlscheidt M., Charaniya S., Bork C., Jenzsch M., Noetzel T.L., Luebbert A. Bioprocess and Fermentation Monitoring// Encyclopedia of Industrial Biotechnology. - 2013. - p. 1469-1491.

76. Zeng A.P., Deckwer W.D. A Kinetic Model for Substrate and Energy Consumption of Microbial Growth under Substrate-Sufficient Conditions// Biotechnol. Prog. - 1995. - Vol. 11. - p. 71-79.

77. Thompson M.L., Kramer M.A. Modeling Chemical Processes Using Prior Knowledge and Neural Networks// AIChE Journal - 1994. - Vol. 40 - p. 1328-1340.

78. Bhat N., McAvoy T.J. Use of neural nets for dynamic modeling and control of chemical process systems// Comp. Chem. Eng. - 1990. - Vol. 14. - p. 573-582.

79. Tham M.T., Montague G.A. Non-linear principal components analysis using genetic programming// Comp. Chem. Eng. - 1999. - Vol. 23. - p. 413-425.

80. Simutis R., Lübbert A. Exploratory analysis of bioprocesses using artificial neural network-based methods// Biotechnol. progr. - 1997. - Vol. 13. - p. 479-487.

81. Junker B.H, Wang H.Y. Bioprocess Monitoring and Computer Control: Key Roots of the Current PAT Initiative// Biotechnology and Bioengineering - 2006. - Vol. 95(2). - p. 226-261.

82. Honda H., Kobayashi T. Fuzzy Control of Bioprocess// Journal of bioscience and bioengineering - 2000. - Vol. 89. - p. 401-408.

83. Schaepea S., Kuprijanova A., Simutis S., Lübbert A. Avoiding overfeeding in high cell density fed-batch cultures of E. coli during the production of heterologous proteins// Journal of Biotechnology - 2014. - Vol. 192. - p. 146–153.

84. Vojinović V., Cabral J.M.S., Fonseca L.P. Real-time bioprocess monitoring Part I: In situ sensors// Sensors and Actuators B - 2006. - Vol. 114. - p. 1083-1091.

85. Beutel S., Henkel S. In situ sensor techniques in modern bioprocess monitoring// Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2011. - Vol. 91. - p. 1493-1505.

86. Zhao L., Fu H.Y, Zhou W., Hu W.S. Advances in process monitoring tools for cell culture bioprocesses// Engineering in Life Sciences – 2015. – Vol. 15(5) – p. 459-468.

87. Macaloney G., Draper I., Preston V., Anderson K.B., Rollins M.J., Thompson B.G., Hall J.W., McNeil B. At-line control and fault analysis in an industrial high cell density Echsrichia coli fermentation, using NIR spectroscopy// Trans IChemE. - 1996. - Vol. 74. - p. 212-220.

88. Akin M, et. all. A new set up for multi-analyte sensing: At-line bio-process monitoring// Biosensors and Bioelectronics - 2011. - Vol. 26. - p. 4532– 4537.

89. Guthke D., Riesenberg R. High-cell-density cultivation of microorganisms// Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. – Vol. 51. – p. 422-430.

90. Mey M., Maeseneire S., Soetaert W., Vandamme E. Minimizing acetate formation in E. coli fermentations// J. Ind. Microbiol. Biotechnol. -. 2007. - Vol. 34. - p. 689-700.

91. Wong M.S., Wua S., Causey T.B., Bennettb G.N., San K.Y. Reduction of acetate accumulation in Escherichia coli cultures for increased recombinant protein production// Metabolic Engineering - . 2008. – Vol. 10. – p. 97–108.

92. Henes B., Sonnleitner B. Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity// Journal of Biotechnology - 2007. - Vol. 132. - p. 118–126.

93. Hosobuchi M., Kurosawa K., Yoshikawa H. Application of Computer to Monitoring and Control of Fermentation Process: Microbial Conversion of ML-236B Na to Pravastatin// Biotechnology and Bioengineering -1993. - Vol. 42. - p. 815-820.

94. Weuster-Botz D., Paschold H., Striegel B., Gieren H., Kula M.R., Wandrey C. Continuous Computer Controlled Production of Formate Dehydrogenase (FDH) and Isolation on a Pilot// Chem. Eng. Technol. - 1994. - Vol. 17. p. 131 – 137.

95. Glindkamp A., Riechers D., Rehbock C., Hitzmann B. Sensors in Disposable Bioreactors// Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology. - 2009. - Vol. 115. - p. 145-169.

96. Marose S., Lindemann C., Ulber R., Scheper T. Optical sensor systems for bioprocess monitoring// Trends. Biotechnol. - 1999. - Vol. 17. - p. 30-34.

97. Suhr H., et.all. In Situ Microscopy for On-Line Characterization of Cell-Populations in Bioreactors, Including Cell-Concentration Measurements by Depth from Focus// Biotechnol. and Bioeng. - 1995. - Vol. 47. – p. 106-116.

98. Klaus J., Frerichs J.G., Konstantinov K., Scheper T. In-situ microscopy: Online process monitoring of mammalian cell cultures// Cytotechnology - 2002. - Vol. 38. - p. 129–134.

99. Camisard V., Brienne J.P., Baussart H., Hamman J., Suhr H. In line caracterization of cell concentration and cell volume in agitated biorectors using in situ microscopy: applicatioon to volume variation induced by osmotic stress// Biotechnology and bioengineering - 2002. - Vol. 78. - p. 75-80.

100. Joux F., Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess pHysiological functions of bacteria at single-cell level// Microbes and Infection - 2000. - Vol. 2. - p. 1523−1535.

101. Lencastre-Fernandes R.., et. all. Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity// Biotechnology Advances - 2011. - Vol. 29. - p. 575–599.

102. Díaz M., Herrero M., García L.A., Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses// Biochemical Engineering - 2010. - Vol. 48. - p. 385-407.

103. Yinliang C., Krol J., Huang W., Cino J.P. DCO2 on-line measurement used in rapamycin fed-batch fermentation process// Process Biochemistry - 2008. - Vol. 43. - p. 351–355.

104. Huang Y.L., Li S.Y., Dremel B.A.A., Bilitewski U., Schmid R.D. On-line determination of glucose concentration throughout animal cell cultures based on chemiluminescent detection of hydrogen peroxide coupled with flow-injection analysis// J. Biotechnol. - 1991. - Vol. 18. - p. 161-172.

105. Wang J. Electrochemical Glucose Biosensors// Chem. Rev. -2008. - Vol. 108. - p. 814−825.

106. Chen C., Xie Q., Yang D., Xiao H., Fu Y., Tan Y. Recent advances in electrochemical glucose biosensors: a review// RSC Advances - 2013. -Vol. 3. - p. 4473-4491.

107. Rathore A.S., Yu M., Yeboah S., Sharma A. Case Study and Application of Process Analytical Technology (PAT) Towards Bioprocessing: Use of On-Line High-Performance Liquid ChromatograpHy (HPLC) for Making Real-Time Pooling Decisions for Process ChromatograpHy// Biotechnology and Bioengineering - 2008. - Vol. 100. - p. 306-316.

108. Rathore A.S. Large Scale Demonstration of a Process Analytical Technology Application in Bioprocessing: Use of On-line High Performance Liquid ChromatograpHy for Making Real Time Pooling Decisions for Process ChromatograpHy// Biotechnol. Prog. - 2010. - Vol. 26. – p. 448-457.

109. Schugerl K., Hitzmann B., Jurgens H., Kullick T., Ulbe R., Weigal B. Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control// Trends In Biotechnology - 1996. - Vol. 14. – p. 21-31.

110. Chung H., Arnold M.A., Rhiel M., Murhammer D.W. Simultaneous Measurements of Glucose, Glutamine, Ammonia, Lactate, and Glutamate in Aqueous Solutions by Near-Infrared Spectroscopy// Applied Spectroscopy - 1996. - Vol. 50. – p. 270-276.

111. Qiu J., Arnold M.A., Murhammer D.W. On-line near infrared bioreactor monitoring of cell density and concentrations of glucose and lactate during insect cell cultivation// Journal of Biotechnology - 2014. - Vol. 173. - p. 106–111.

112. Tartakovsky B., Sheintuch M. Application of Scanning Fluorometry for Monitoring of a Fermentation Process// Biotechnol. Prog. - 1996. - Vol. 12. - p. 126-131.

113. Marose S., Lindemann C., Ulber R., Scheper T. Two-Dimensional Fluorescence Spectroscopy: A New Tool for On-Line Bioprocess Monitoring// Biotechnol. Prog. - 1998. - Vol. 14. - p. 63-74.

114. Ellington A.D., Szostak J.W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands// Nature - 1990. - Vol. 364. - p. 818-822.

115. Song K.M., Lee S., Ban C. Aptamers and Their Biological Applications// Sensors - 2012. - Vol. 12. - p. 612-631.

116. Namekar M., et.al. Evaluation of a New Commercially Available Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Dengue Virus Infection// Journal of Clinical Microbiology - 2013. - Vol. 51. - p. 3102-3106.

117. Haenisch F., et.all. Multiplex immunoassay analysis of plasma shows differences. Journal of Affective Disorders – 2015. - Vol. 185. - p. 12-16.

118. Davis K.A., Lin Y., Abrams B., Jayasena S.D. Staining of cell surface human CD4 with 2′-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry// Nucleic Acids Res - 1998. - Vol. 26. - p. 3915-3924.

119. Bailu X., Zhao C., Weili W., Ren J., Miyoshi D., Sugimoto N., Qu X. Aptamer carbon nanodot sandwich used for fluorescent detection of protein// Analyst. - 2012. - Vol. 137. - p. 5483-5486.

120. Lee M., Walt D.R.. A Fiber-Optic Microarray Biosensor Using Aptamersas Receptors// Analytical Biochemistry - 2000. - Vol. 282. - p. 142-146.

121. Shigehiro T., Sato K., Anzai J. Layer by layer construction of protein architectures// Anal. Bioanal. Chem. - 2012. - Vol. 402. - p. 1749-1758.

122. Kechadi M., et.all. A real time affinity biosensor on an insulated// Analyst - 2014. - Vol. 139. - p. 3115-3121.

123. Michael L., Petersen B., Wolf H., Prohaska E. An Aptamer-Based Quartz Crystal Protein Biosensor// Anal. Chem. - 2002. - Vol. 74. - p. 4488-4495.

124. Suzuki T., Yamane T., Shimizu S. P. Henomenological Background and Some Preliminary Trials of Automated Substrate Supply in pH-Stat Modal Fed-Batch Culture Using a Setpoint of High Limit// Journal of Fermentation and Bioengineering - 1990. - Vol. 69(5). - p. 292-297.

125. Kim B.S., Lee S.C., Lee S.Y., Chang Y.K., Chang H.N. High cell density fed-batch cultivation of Escherichia coli using exponential feeding combined with pH-stat// Bioprocess Biosyst. Eng. - 2004. - Vol. 26. - p. 147-150.

126. Choi H., Keum K.C., Lee S.Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli// Chemical Engineering Science - 2006. - Vol. 61. - p. 876-885.

127. Sonnleitner B., Hahnemann U. Dynamics of the respiratory bottleneck of Saccharomyces cerevisiae// J Biotechnol - 1994. - Vol. 38. - p. 63-79.

128. Lin H.Y, Neubauer P. Influence of controlled glucose oscillations on a fed-batch process of recombinant Escherichia coli// Journal of Biotechnology - 2000. - Vol. 79. - p. 27-37.

129. Lin H.Y., Mathiszik B., Xu B., Enfors S.O., Neubauer P. Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch cultivations of Escherichia coli// Biotechnol and Bioeng - 2001. - Vol. 73. - p. 347–357.

130. Korz D.J., Rinas U., Hellmuth K., Sanders E.A., Deckwer W.D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of Escherichia coli// Journal of Biotechnology - 1995. - Vol. 39. - p. 59-65.

131. Galvanauskas V., Grigs O., Vanags J., Dubencovs K., Stepanova V.. Model-based optimization and pO2 control of fed-batch Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae cultivation processes// Eng. Life. Sci. - 2013. - Vol. 13. p. 172-184.

132. Aiba S., Nagai S., Nishizawa Y. Fed Batch Culture of Saccharomyces cerevisiae// Biotechn. Bioeng. - 1976. - Vol. 18. - p. 1001-1016.

133. Whaite P., Aborhev S., Hong E., Rogers P. L**.** Microprocessor Control of Respiratory Quotient// Biotechnology and Bioengineering -1978. - Vol. 20. - p. 1459-1463.

134. Sakato K., Tanaka H. Advanced Control of Glutathione Fermentation Process// Biotechnology and Bioengineering - 1992. - Vol. 40. - p. 904-912.

135. Jenzsch M., Gnoth S., Kleinschmidt M. Improving the batch-to-batch reproducibility of microbial cultures during recombinant protein production by regulation of the total carbon dioxide production// Journal of Biotechnology - 2007. - 128. Vol. - p. 858-867.

136. Kuprijanov A. Design and application of advanced control systems for pilot-scale bioreactors// Doktoral dissertation. - Kaunas: Kaunas University of Technology, 2013. - p. 155.

137. Chen L.Z., Nguang S.K., Chen X.D., Li X.M. Modelling and optimization of fed-batch fermentation processes using dynamic neural networks and genetic algorithms// Biochemical Engineering Journal - 2004 - Vol. 22. - p. 51-61.

138. Levisauskas D., Galvanauskas V., Henrich S., Wilhelm K., Volk N., Lubbert A. Model-based optimization of viral capsid protein production in fed-batch culture of recombinant Escherichia// Bioprocess Biosyst Eng - 2003. - Vol. 25. - p. 255-262.

139. Jenzsch M., Simutis R., Luebbert A. Generic model control of the specific growth rate in recombinant Escherichia coli cultivations// Journal of Biotechnology - 2006. - Vol. 122. - p. 483-493.

140. Olympia R., et al. Multiple model approach to modelling of Escherichia coli fed-batch cultivation extracellular production of bacterial phytase// Electronic Journal of Biotechnology - 2007. - Vol. 10. - p. 592-603.

141. Paalme T., Elken R., Kahru A., Vanatalu K., Vilu R. The growth rate control in Escherichia coli at near to maximum growth rates: the A-stat approach// Antonie van Leeuwenhoek - 1997. - Vol. 71. - p. 217-230.

142. Stolper D.A, Revsbechb N.P., Canfielda D.E. Aerobic growth at nanomolar oxygen concentrations// PNAS - 2010. - Vol. 44. - p. 18755-18760.

143. Walsh K., Koshland D. Branch Point Control by the Phosphorylation State of Isocitrate Dehydrogenase// The J Biological Chem - 1985. - Vol. 260. - p. 8430-8437.

144. Bae C.S., Hong M.S., Chang S.G., Kim D.Y., Shin H.C..Optimization of fusion proinsulin production by high cell-density fermentation of recombinant E. coli// Biotechnol. Bioprocess Eng - 1997. - Vol. 2. - p. 27-32.

145. Suijdam J. C. Van, Kossen N.W.F., Joha A.C. Model for Oxygen Transfer in a Shake Flask// Biotechnology and Bioengineering - 1978. - Vol. 20. - p. 1695-1709.

146. Nielsen J. Microbial process kinetics// Kristiansen B., Ratledge C. (Eds.). Basic biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press. - 2006. - p. 155-180.

147. Gnoth S.., Jenzsch M., Simutis R., Lubbert A. Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review// Bioprocess Biosyst Eng - 2008. – Vol. 31. - p. 21-39.

148. Grigs O., Galvanauskas V., Dubencovs K., Vanags J., Suleiko A., Berzins T., Kunga L. Model Predictive Feeding Rate Control in Conventionaland Single-use Lab-scale Bioreactors: A Study on Practical Application// Chem. Biochem. Eng. Q. - 2016. - Vol. 30. - p. 47-60.

DARBA APROBĀCIJA

Pilnteksta publikāciju sarakts

1. Grigs O., Galvanauskas V., Dubencovs K., Vanags J., Suleiko A., Berzins T., Kunga L. Model predictive feeding rate control in conventional and single-use lab-scale bioreactors: a study on practical application// Chem. Biochem. Eng. Q. - 2016. - Vol. 31(1) - p. 75.-88. (SCOPUS.)
2. Vanags J., Kunga L., Dubencovs K., Galvanauskas V., Grigs O. Influence of light intesity and temperature on cultivation of micoalgae Desmodesmus communis in flasks and laboratory-scale stirred tank photobioreactor// Latvian Journal of Physics and Technical Science. - 2015. - Vol. 52(2) – p. 59.-70. (Pilnteksts, SCOPUS.)
3. Vanags J., Kunga L., Dubencovs K., Galvanauskas V., Balode M., Grigs O. The effect of shaking, CO2 concentration and light intensity on biomass growth of green microalgae Desmodesmus communis// Environmental Research, Engineering and Management. - 2015. - Vol. 4(70) - p. 73.-79. (Pilnteksts)
4. Galvanauskas V., Grigs O., Vanags J., Dubencovs K., Stepanova V. Model-Based Optimization and pO2 Control of Fed-Batch Escherichia Coli and Saccharomyces Cerevisiae Cultivation Processes// Engineering in Life Sciences. - 2013. - Vol. 13(2) - p. 172.-184. (Pilnteksts, SCOPUS.)
5. Vilums S., Grigs O. Application of functional state modelling approach for yeast Saccharomyces cerevisiae batch fermentation state estimation// 5th International Scientific Conference on Applied Information and Communication Technologies. Proceedings. - Jelgava: Latvia University of Agriculture, 2012. - p. 300.-305.

Dalība zinātniskajās konferencēs ar recenzētām konferenču tēzēm

1. Vanags J., Galvanauskas V., Grigs O., Dubencovs K., Stepanova V. On-line model-based optimization and control of fed-batch processes using Matlab code, OPC server, SCADA, and PLC// New Biotechnology: Abstracts of the 15th European Congress on Biotechnology. Istambul, Turkey, Vol. 2, Supplement, 23 – 26 September 2012, S163 p. (Stenda referāts, tēzes Sciencedirect)

2. Vilums S., Grigs O. Application of functional state modelling approach for yeast Saccharomyces cerevisiae batch fermentations state estimation // Proceedings of the 5th International Scientific Conference, Latvia, Jelgava, April 26 – 27, 2012. - p. 1744.-1744. (Mutisks referāts, pilnteksta publikācija)
3. Grigs O., Vanags J., Galvanauskas V. Model based Escherichia coli bacteria fermentation // 52nd International Scientific Conference of Riga Technical University: Abstracts of the 52nd International Scientific Conference of Riga Technical University, Section: Material Science and Applied Chemistry, Latvia, Riga, October 13 - 15, 2011. - p. 1744.-1744. (Mutisks referāts, tēzes)
4. Vanags J., Grigs O., Viesturs U., Priede A. Flexible Approach by Development of Fed-Batch Algorithms for Fermentations under pO2 Cascade Control // CHISA: Summaries 5: Systems and Technology, Czech Republik, Prague, August 28 – September 1, 2010. - p. 1744.-1744. (Mutisks referāts, tēzes)

Dalība citās zinātniskajās konferencēs

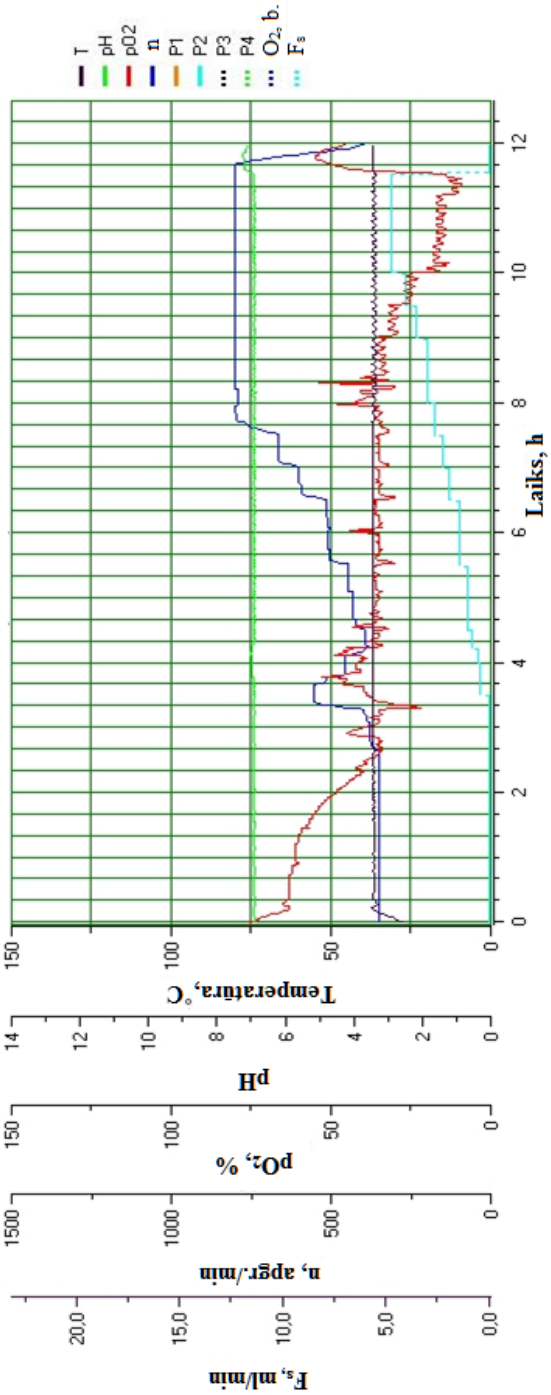
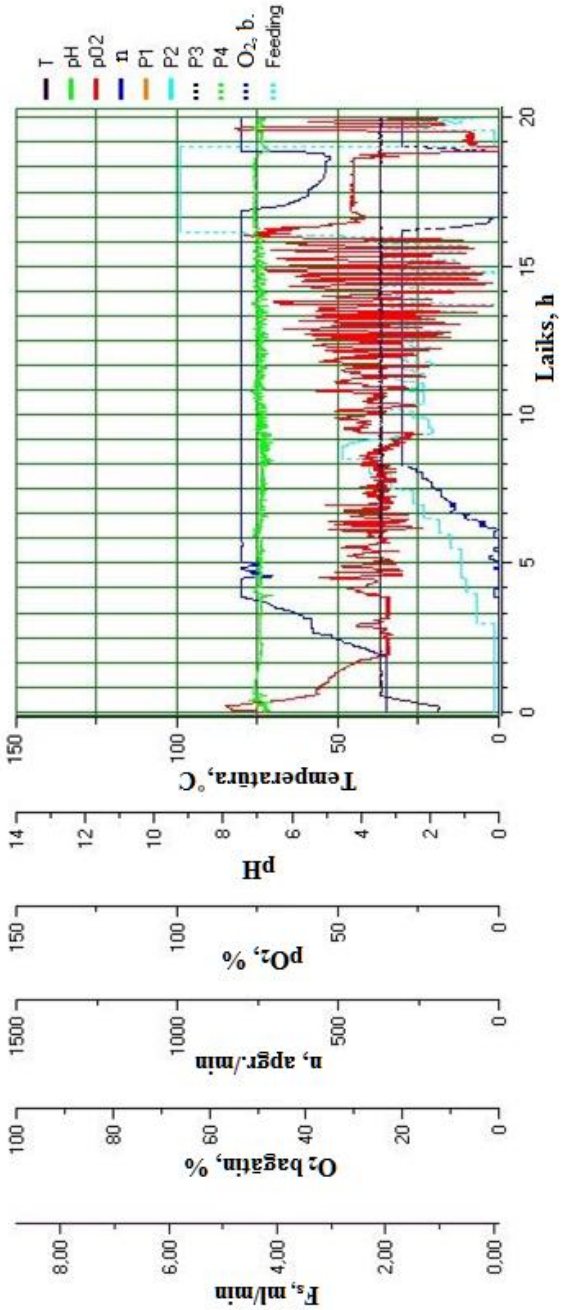
- 3rd Congress of Applied Biotechnology, Sept 27 - Okt 1st, 2015, Nica, France. (Stenda referāts, O. Grigs, Model predictive control tool for desirable feeding profile evaluation and control in to microbial fed-batch processes)
- 10th European Symposium on Biochemical Engineering Sciences and 6th International Forum on Industrial Bioprocesses, September 07-10, 2014, Lille, France. (Stenda referāts, O. Grigs, Application of Model Predictive Control for fed-batch cultivations using Matlab)
- 2nd Congress of Applied Biotechnology, April 22-25, 2013, The Hague, Netherlands. (Mutisks referāts, V. Galvanauskas, Robust on-line model based control of fed-batch processes using Matlab code, SCADA and PLC)
- 53rd International Scientific Conference of Riga Technical University October 11-12, 2012, Riga, Latvia. (Mutisks referāts, O. Grigs, Principles and application of pO_2 cascade control in fermentation processes)
- 2nd BioProScale Symposium “Inhomogeneities in large-scale bioprocesses: System biology and process dynamics”, March 14-16, 2012, Berlin, Germany. (Stenda referāts, O. Grigs, Model-based cultivation of Escherichia coli RB791 and BL21 (DE3) strains:

process parameter comparison from laboratory bioreactor and shake flask scale fermentations)

- 1st European Congress of Applied Biotechnology, ECAB, September 25-29, 2011, ICC Berlin, Germany. (Stenda referāts, O. Grigs, Automatic fed-batch process application to yeast and bacterial fermentations using pO_2 cascade control)
- 7th International Students' Conference of Nature Sciences, COINS 2010, September 21-25, 2010, Vilnius, Lithuania. (Mutisks referāts, O. Grigs, Cultivation of inducible Escherichia coli RB791 Hepatitis B core antigen producer: screening and modelling of fermentation process)

PIELIKUMS 1

Process a-2



Process a-3