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) PRODUCENTA FERMENTĀCIJAS PROCESAM AR PIEBAROŠANU

Promocijas darba kopsavilkums

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

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

RTU Izdevniecība
Rīga 2016

Grīgs O. Uz modeli bāzēta biomasas iznākuma optimizācija un kontrole *E. coli* BL21 (DE3) hepatīta B kor-antigēna (HBcAg) producenta fermentācijas procesam ar piebarošanu. Promocijas darba kopsavilkums. – Rīga: RTU Izdevniecība, 2016. – 29 lpp.

Iespiests saskaņā ar VĶT institūta 2016. gada 29. aprīļa lēmumu, protokols Nr. 13-15/16.

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.

ISBN 978-9934-10-840-2

PROMOCIJAS DARBS
IZVIRZĪTS INŽENIERZINĀTŅU DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI
RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2016. gada 28. septembrī plkst. 15 Rīgas Tehniskajā universitātē, Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

OFICIĀLIE RECENZENTI

Profesors *Dr. sc. ing.* Jurijs OZOLIŅŠ
Vispārīgās ķīmijas tehnoloģijas institūts, Materiālzinātnes un lietišķās ķīmijas fakultāte, Rīgas Tehniskās universitāte

Profesors *Dr. biol.* Uldis KALNENIEKS
Mikrobioloģijas un biotehnoloģijas katedra, Bioloģijas fakultāte, Latvijas Universitāte

Profesors *Dr. habil. Rimvydas SIMUTIS*
Automatizācijas katedra, Elektrības un Elektronikas fakultāte, Kauņas Tehnoloģiju universitāte

APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē inženierzinātņu doktora grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Oskars Grīgs .....

Datums: .....

Promocijas darbs ir uzrakstīts latviešu valodā, tajā ir ievads, literatūras apskats, eksperimentālā daļa, rezultāti un to izvērtējums, secinājumi, literatūras saraksts, 24 ilustrācijas un 16 tabulu, kopā 116 lpp. Literatūras sarakstā ir 148 avoti.

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 izstrātdē, 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.

SATURS

DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS 6
Tēmas aktualitāte 6
Darba mērķis un uzdevumi 6
Promocijas darba zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti 7
Promocijas darba praktiskā nozīme 7
Darba aprobācija 7
LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS 8
EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA 10
Iekārtas un aprīkojums 10
Analīzes un kontrole 10
Modelēšana 12
EKSPERIMENTĀLIE REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS 12
1. Biomasas optimizācijas pētījums *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kolbu mērogam 12
2. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru piemeklēšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 partijas tipa kultivēšanas procesam kolbās 14
3. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru piemeklēšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 bioreaktora partijas procesam ar piebarošanu 16
4. Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole pēc pO2 *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam 20
5. Izmeklēta uz modeli bāzēta piebarošanas ātruma kontrole *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 procesam ar prognozi pēc references profilu datiem 21
SECINĀJUMI 26
PUBLIKĀCIJU SARAKSTS 27
LITERATŪRA 28

DARBA VISPĀRĪGS RAKSTUROJUMS

Tēmas aktualitāte

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.

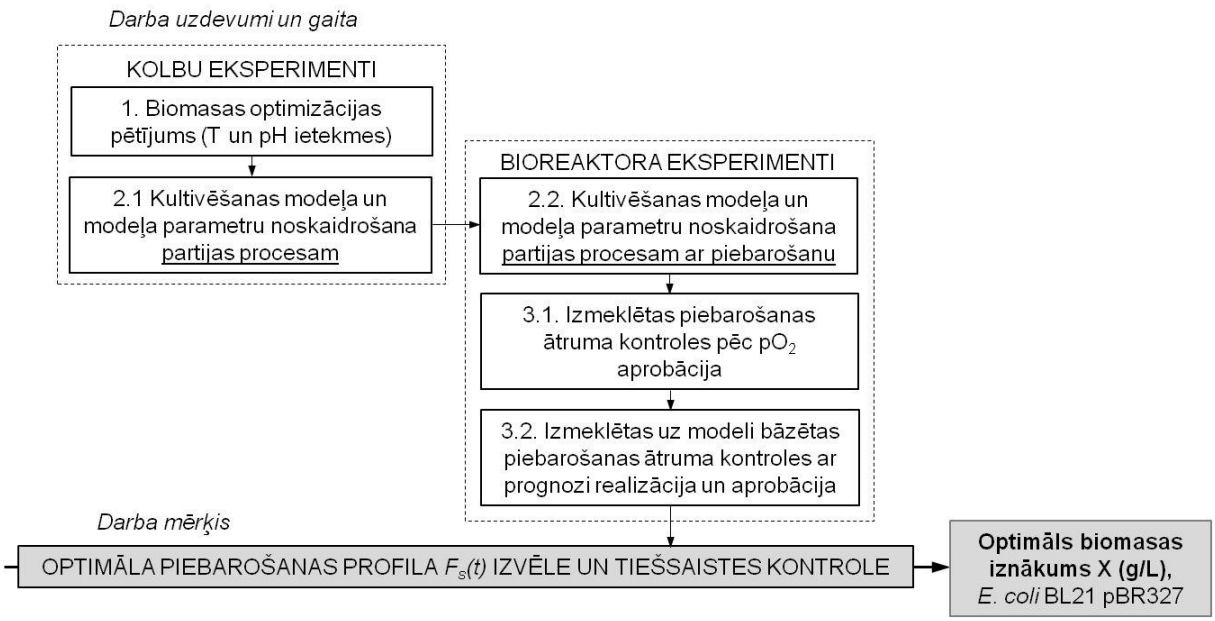
Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrs ir izstrādājis *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 hepatīta B kor-antigēna (HBcAg) producentu, kur HBcAg tiek intensīvi pētīts vakcīnas ieguvei pret hepatīta B vīrusu kā līdzeklis dažādu hepatīta B stadiju diagnostikā un kor-antigēna kapsīdu struktūras izmantošanā 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.

Darba mērķis un uzdevumi

Lietojot uz modeli bāzētu fermentācijas procesa ar piebarošanu aprēķinu un izmeklētu piebarošanas ātruma kontroli, iegūt piebarošanas profilu un to kontrolēt *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 fermentācijas procesā maksimāla un kontrolēta biomasas iznākuma ieguvei procesa beigās.



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

Promocijas darba zinātniskā novitāte un galvenie rezultāti

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 biomasas ieguves procesam vēlamie piebarošanas ātruma ($F_s(t)$) un biomasas ($x(t)$) profili, kā arī realizēta doto profilu izmeklēta kontrole tiešsaistes režīmā.

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.

Promocijas darba praktiskā nozīme

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 procesam.

Aprakstītā modeļa un modeļa parametru noteikšanas metodoloģija var tikt lietota līdzīgu fermentācijas procesu modeļu un modeļa parametru noteikšanai.

Izmeklētās piebarošanas ātruma kontroles metodes realizētas un aprobētas A/S «Biotehniskais centrs» komerciālās bioreaktoru kontroles sistēmās.

Darba aprobācija

Par promocijas darba zinātniskajiem 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.

LITERATŪRAS APSKATA KOPSAVILKUMS

Veicot mikroorganismu fermentācijas procesus bioreaktoros, biotehnoloģiski iegūst sabiedrībā plaši patērētus produktus, lietotus medicīnā, pārtikas rūpniecībā, sadzīves pateriņam un citos rūpnieciskajos procesos [1, 2]. Lielā vairumā rūpnieciskajos fermentācijas procesos, īpaši rekombinanto olbaltumvielu un citu medicīnā lietojamo preparātu ieguvē, lieto procesa laikā nepārtrauktu, substrāta limitētu mikroorganismu piebarošanu ar substrātu [3, 4]. Tā rezultātā iespējams iegūt augstāku procesa produktivitāti augstākas šūnu biomasas un uzlabota produktu iznākuma dēļ. Fermentācijas procesa modelēšanu lieto substrāta piebarošanas profila *Fs(t)* aprēķiniem pirms procesa, kā arī tā kontrolei procesa laikā [5, 6]. 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 [7].

Latvijā un pasaulē ievērojami pētījumi norit vīrusiem līdzīgo daļiņu (VLP), tajā skaitā rekombinantā hepatīta B kor-antigēna (HBcAg), ieguves jomā [8–10]. 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 imūnsistēmu 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 [3]. 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 – acetāta – uzkrāšanos. Acetātu uzkrāšanās vidē virs 1,5–2 g/l sāk negatīvi ietekmēt biomasas augšanu un produkta veidošanos [11]. Zināms, ka acetātu veidošanās notiek nesabalansēta substrāta metabolisma dēļ, 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 [5, 12].

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 [13]. Biotehnoloģisko procesu dažādības dēļ procesa modelis un modeļa parametri jāidentificē katram konkrētam mikroorganismu kultivēšanas procesam. Rūpniecisko procesu kontrolē lietotajiem modeļiem un algoritmiem jābūt arī validētiem [14].

Izmeklēta piebarošanas ātruma kontrole paredz lietot analītiskos un instrumentālos rīkus procesos ar limitētu substrāta padevi kultūras vidē [15]. Atgriezeniskā 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 sensoru/tehnoloģiju trūkuma dēļ. Pastarpinātu 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) [6]. To priekšrocība ir relatīvi vienkāršu matemātisko modeļu lietošana biomasas pieauguma prognozēšanai un atbilstoša piebarošanas profila aprēķinam, ņemot vērā laikā mainīgās procesa izmaiņas.

EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

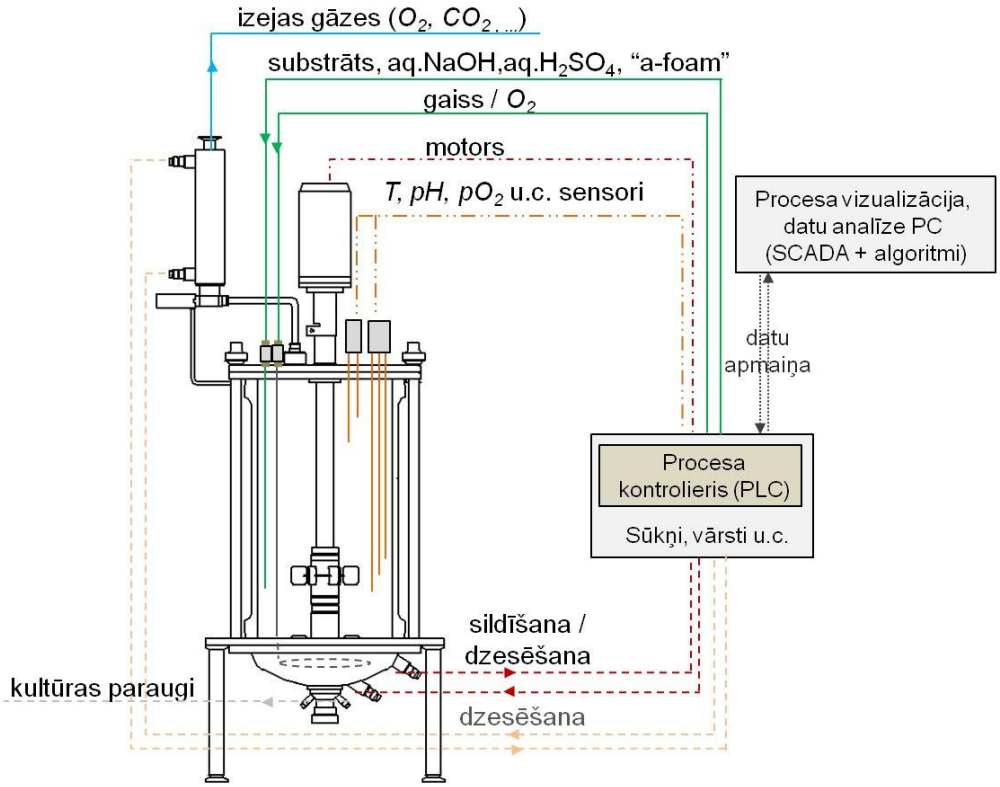
Promocijas darbā izvirzītās pamatproblēmas, t. i., optimāla *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 biomasas iznākuma ieguvei ar optimāla piebarošanas profila lietošanu, risināto uzdevumu blokshēma norādīta 1. attēlā.

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). Kolbu un bioreaktora eksperimentos izmantoja barotni un piebarošanas šķīdumu, kādi aprakstīti R. Baipaja pētījumā [16].

Iekārtas un aprīkojums

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

Bioreaktora eksperimenti. Fermentācijas procesus veica 5,4 l laboratorijas bioreaktorā EDF-5.4/BIO-4 (Rīga, Latvija) (skat. 2. att.). Viens demonstrējuma eksperiments veikts ar 5,7 l vienreizlietojamo bioreaktoru CerCell 5.7 (Holte, Dānija).



2. attēls. EDF-5.4 bioreaktora principiāla uzbūve

Analīzes un kontrole

E. coli BL21 (DE3) pBR327 biomasas augšanai procesa laikā tika sekots līdzi manuāli mērot optisko blīvumu (*OD*) pie viļņa garuma 560 nm (*Jenway*, 6300, *Essex*,

Anglija). Biomasas koncentrācija aprēķināta, reizinot *OD* ar iepriekš noteiktu korelācijas koeficientu 0,45. Glikozes koncentrāciju noteica 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*).

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). Bioreaktoru kontrolē izmantoja šādus 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).

EDF-5.4/BIO-4 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.

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. Atsevišķos eksperimentos pO_2 kontroli veica ar trešo kaskādes elemetu – piebarošanas sūkni. 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. Mitruma kondensēšanai no izejas gāzēm tika izmantots kondensators. Putu līmenis tika kontrolēts, pievienojot pretputu līdzekli A (*Sigma Aldrich*).

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

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

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 bija atšķirīga.

Modelēšana

Darbā aprakstīto fermentācijas procesu modelēšanu veica ar mehānistiskiem matemātiskiem modeļiem, kas sastopami literatūrā [12, 17, 18]. Vidējās parametru vērtības, kas noteiktas no literatūras datiem [3, 5, 12, 16, 19–21, 23–25], 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.

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:

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

$$\bar{x}_{exp} = \frac{\sum x_{i,exp}}{n} \qquad (3.)$$

$$r_x = \frac{x_s}{\bar{x}_{exp}} \cdot 100\% \qquad (4.)$$

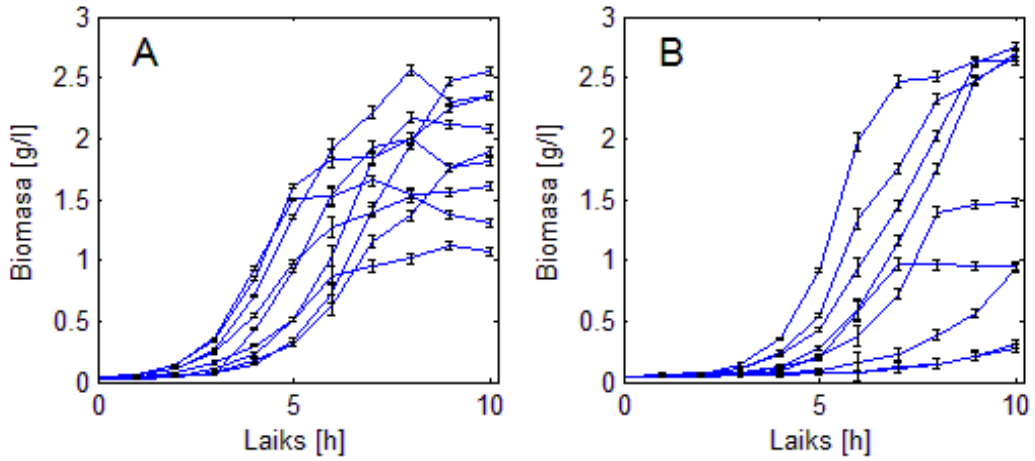
kur x_s – modelētā x komponenta standartnovirze no eksperimentāli noteiktā x; $x_{i,exp}$ – eksperimentāli noteiktais x punktā i; $x_{i,mod}$ – modelētais x punktā i; n – eksperimentālo mērījumu skaits; $\bar{x}_{exp}$ – eksperimentālo mērījumu vidējā vērtība; r_x – modelētā x modeļa relatīvā novirze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

Vienādojumu 4. lietoja biomasas (r_x), substrāta (r_s) un acetātu (r_a) modelēšanas precizitātes aprēķinos.

EKSPERIMENTĀLIE REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

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 (skat. 3. att.).



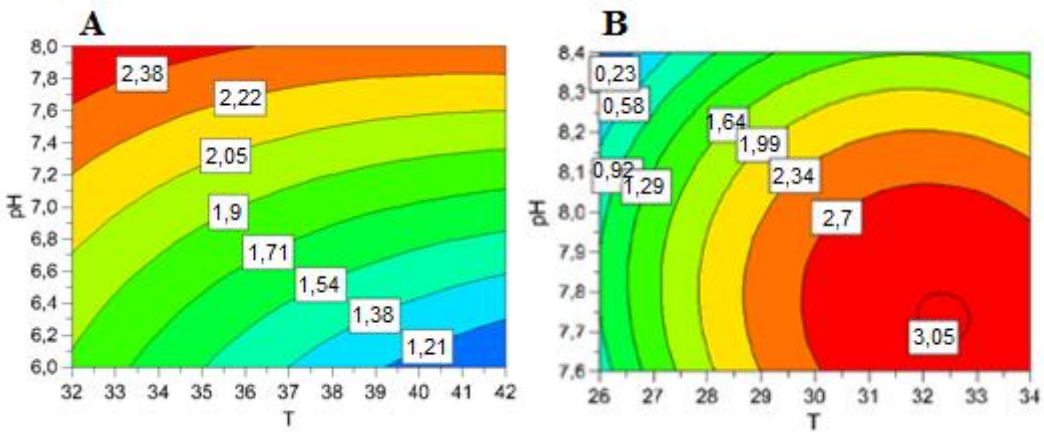
3. attēls. Biomasas rezultātu izkliede optimizācijas procedūras gaitā. (A) Eksperimentālie rezultāti pie pirmās optimizācijas, (B) eksperimentālie rezultāti pie otrās optimizācijas

Pēc temperatūras un pH 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 (skat. 4. att.). Pēc eksperimentu sērijas veikšanas tika iegūts modelis un konstatēti faktori, kas visvairāk ietekmē modeli.

Veicot visus otrās optimizācijas plāna eksperimentus, tika iegūts modelis/vienādojums nr. 5 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, modelis/vienādojums nr. 6, samazinājās modeļa korelācija R^2=0,86, bet paaugstinājās prognoze Q^2=0,67.

$$x = -275{,}3 - 0{,}0522T^2 - 3{,}328pH^2 + 4{,}1384T + \ldots$$
$$\ldots + 54{,}616pH - 0{,}0968pH \cdot T \qquad (5.)$$

$$x = -49{,}215 + 4{,}0224T - 1{,}511pH - 0{,}06328T^2 \qquad (6.)$$



4. attēls. Biomasas optimizācijas rezultāti izteikti ar 2D atsauces virsmas grafikiem. (A) Eksperimentālie rezultāti pie pirmās optimizācijas, (B) eksperimentālie rezultāti pie otrās optimizācijas, ņemot vērā visas regresijas vienādojuma koeficientus

Gadījumā, kad pie regresijas vienādojuma iegūšanas tika ņemti vēra visi regresijas koeficienti (modelis/vienādijums nr. 5), 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 (modelis/vienādojums nr. 6), izslēdzot mazāk būtiskos faktorus, ieguva maksimālu 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 prognozējamības koeficienta vērtības Q^2 palielināšana modeļa nr. 6 gadījumā neveicināja labāku korelāciju starp eksperimentāli iegūto un paredzēto biomasas vērtību.

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. Modeļa struktūras un tā parametru noskaidrošana tika veikta, pamatojoties uz literatūrā pieejamo informāciju par līdzīgu procesu modelēšanu [5]. Izdalīti četri dažādi modeļa sarežģītības gadījumi: pirmajā gadījumā (a) substrāta uzņemšanas ātruma izteiksmē ņemta vērā tikai substrāta koncentrācijas ietekme (Mono kinētika) [22]; otrajā gadījumā (b) substrāta uzņemšanas ātruma izteiksmē papildu ņemta vērā procesa laikā radušos acetātu ietekme uz glikozes un acetātu uzņemšanas ātrumu un biomasas veidošanos [12];

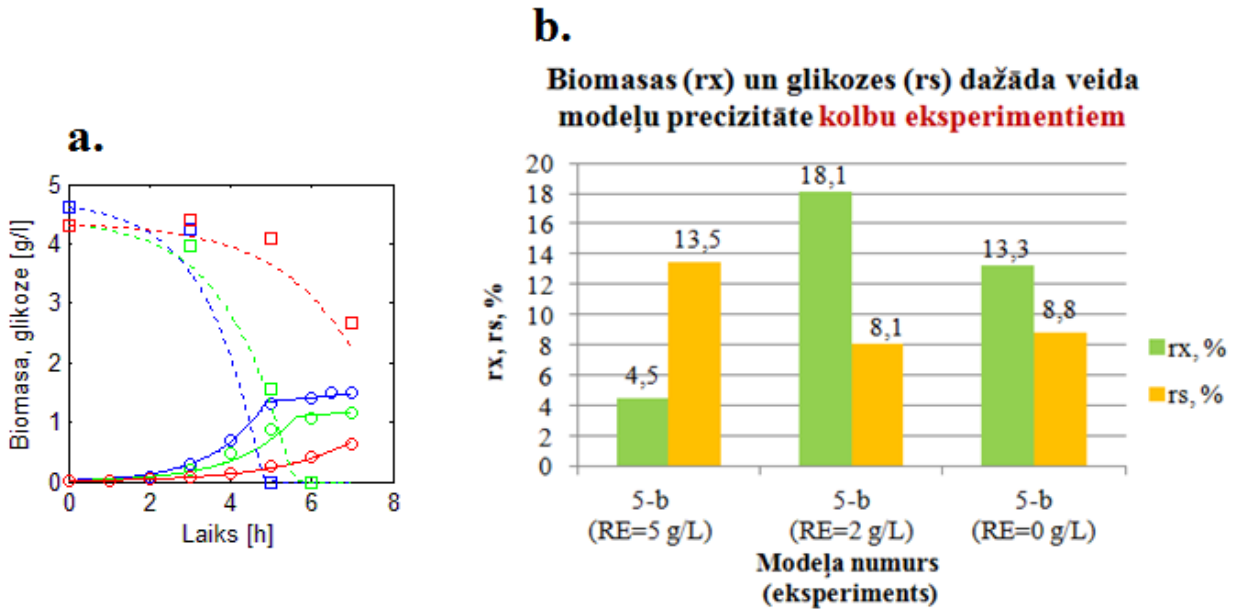
trešajā gadījumā (c) b gadījums papildināts ar skābekļa limita, kā konkurējošā substrāta ietekmi uz glikozes uzņemšanas ātrumu [13]; ceturtajā gadījumā (d) a gadījums papildināts ar skābekļa limita, kā konkurējošā substrāta ietekmi uz glikozes uzņemšanas ātrumu.

1. tabula

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

Modeļa apzīmējums	Substrāta uzņemšanas modeļi		
	q_s, K_s	q_{ar}, q_{au}, $K_{i,a}$	q_{O2}, K_{O2}
a	*S* uzņemšana	—	—
b	*S* uzņemšana; *A* rašanās, inhibīcija un uzņemšana		—
c	*S* uzņemšana; *A* rašanās, uzņemšana un inhibīcija; O_2 limita ietekme uz *S* uzņemšanu		
d	*S* uzņemšana	—	O_2 limita ietekme *S*

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. 5. attēlā apkopoti šo eksperimentu modelēšanas rezultāti. Modelēšana veikta ar koriģētiem izejas Y_{xs}, Y_{xa} un q_{sMax} parametriem.



5. attēls. **a. grafiks**: *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 biomasas augšanas raksturs pie dažādām rauga ekstrakta sākuma vērtībām; sarkanā krāsa atbilst eksperimentam ar rauga ekstrakta sākuma vērību 0 g/l, zaļā – 2 g/l, zilā – 5 g/l. Eksperimentāli mērītie lielumi: biomasas (apļi) un glikozes (kvadrāti) koncentrācijas. Līnijas atbilst modelētajām trajektorijām. **b. grafiks**: *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas modeļa 5-b precizitāte kolbu eksperimentiem ar rauga ekstrakta koncentrāciju (RE) procesa sākumā 5, 2 un 0 g/l.

2. tabula

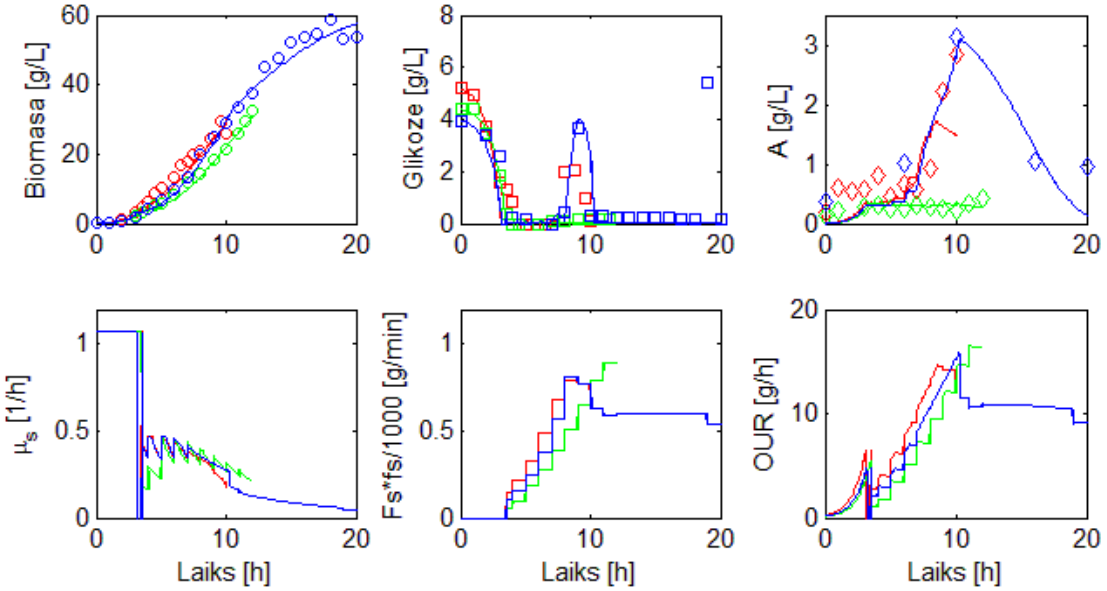
Identificētās parametru vērtības *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kolbu eksperimentiem ar dažādu rauga ekstrakta koncentrāciju procesa sākumā; salīdzinājums ar pieejamajiem parametriem no literatūras (ar *bold* iekrāsotas pielāgotās parametru vērtības)

Param.	Vien.	References [3, 5, 12, 16, 19–21, 23–25]	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 parādīja, ka rauga ekstraktam ir būtiska ietekme uz Y_{xs} un q_{sMax}, kas jāņem vērā precīzai procesa modelēšanai. Parametru piemeklēšanas gaitā tika paaugstināta arī parametra Y_{xa} vērtība. 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. Identificētās modeļa parametru vērtības apkopotas 2. tabulā.

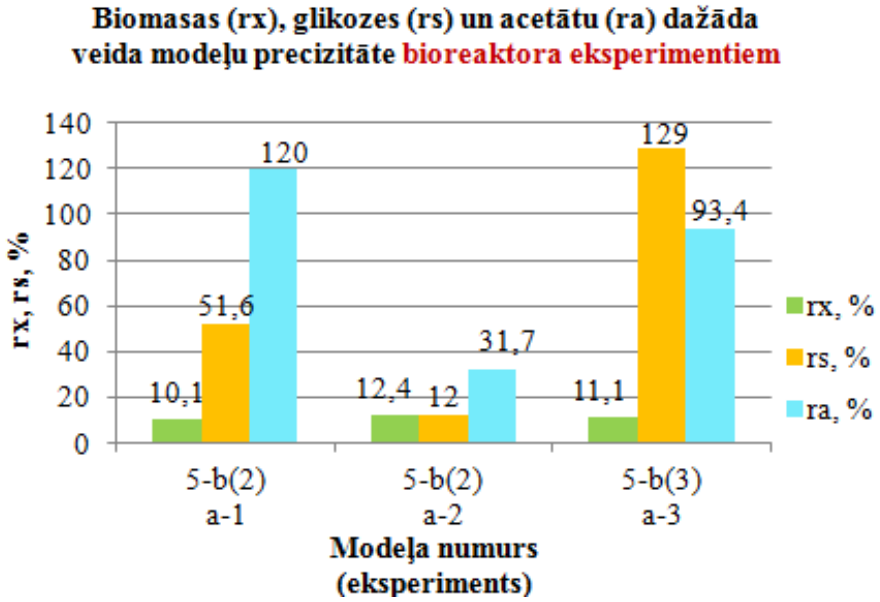
3. Kultivēšanas modeļa un modeļa parametru piemeklēšana *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 bioreaktora partijas procesam ar piebarošanu

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. Tālāk modeli un modeļa parametrus papildināja un koriģēja atbilstoši, lai uzlabotu modeļa sakritību ar eksperimentāli iegūtajiem datiem, kur modelis paredz ņemt vērā acetātu ietekmes 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).



6. attēls. *E. coli* piebarošanas process un modelēšanas rezultāti ņemot vērā acetātu rašanos/uzņemšanu. Eksp. a-1 (sarkans), eksp. a-2 (zaļš), eksp. a-3 (zils). Eksperimentālie mērījumi (apļi, kvadrāti, rombi), modelētie lielumi (līnijas)

Piebarošanas ātruma aprēķināšanai nepieciešamie Y_{xs} un m_s parametri pirmajam no trim a sērijas bioreaktora eksperimentiem noteikti iepriekš veiktajos kolbu eksperimentos; pārējās modelēšanā izmantotās parametru vērtības norādītas 3. tabulā. Kultūras augšanas modelēšanu ar aprēķināto piebarošanas profilu sākotnēji veica ar kolbu eksperimentu modelēšanas gaitā iegūto a modeli (skat. 1. tabulu), tā dēļ uzrādītās visaugstākās precizitātes. Šo modeli papildināja ar rauga ekstrakta ietekmi uz Y_{xs}, kā arī glikozes inhibējošo ietekmi uz q_s. Procesa laikā pO_2 kontrolēja ap 40 % maksimālā kalibrētā skābekļa piesātinājuma, tādēļ pO_2 ietekme uz glikozes un acetātu oksiditatīvu uzņemšanu tika ierobežota līdz minimumam.



7. attēls. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas modeļa, ņemot vērā acetātu ietekmi, pilnveidošanas gaita bioreaktora kultivēšanas a sērijas procesiem ar piebarošanu

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.

Iegūtie līdzīgie eksperimentālie rezultāti, veicot līdzīgu procesu a-1 un a-3 kontroli, liecina par labu procesa un analītisko mērījumu atkārtojamību (skat. 6. att.). 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 3. tabulā. Tika iegūts modelis, kas deva a-3 eksperimenta modelēšanas precizitāti biomasai 11,1 %, substrātam 129 % un acetātiem 93,4 % (skat. 7. att.).

3. tabula

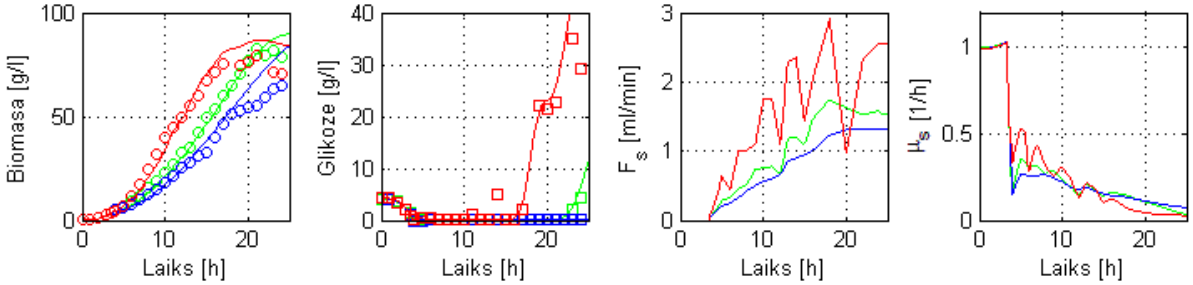
No bioreaktora eksperimentiem identificēto parametru, kas paredz acetātu ietekmes ņemšanu vērā, salīdzinājums ar pieejamajiem parametriem no literatūras (ar *bold* iekrāsotas pielāgotās parametru vērtības)

Param.	Vien.	Lit. dati (atsauces skat. 1. tabulā)	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**

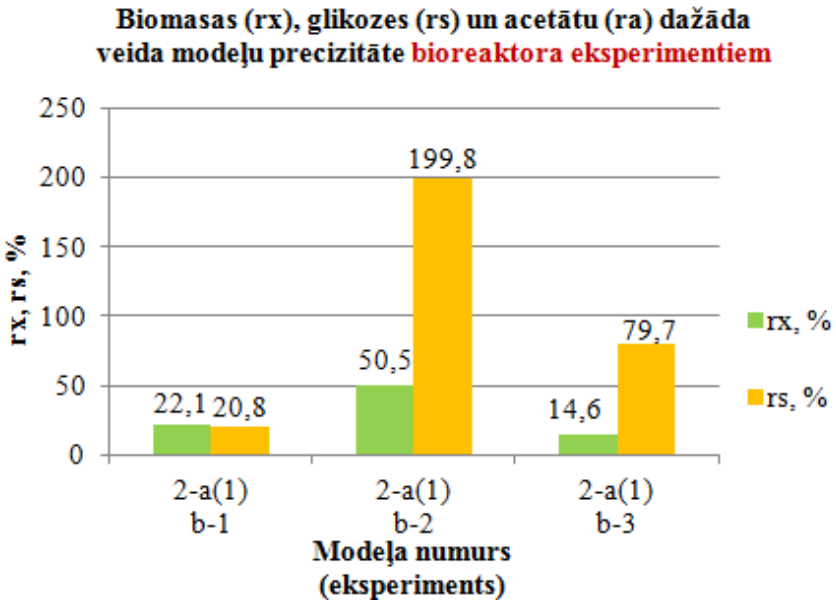
Vienkāršāks un universālāks procesa modelis uz modeli bāzētai piebarošanas ātruma kontroles (MPC) izstrādei var tikt lietots [6], ja, ņemot vērā procesa aktuālo

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, kurā netika ņemta vērā acetātu rašanās un ietekme uz biomasas augšanu; pieņēma, ka substrāta uzņemšanu ietekmēja tikai glikozes koncentrācija (Mono kinētika) un glikozes inhibējošais efekts. Iegūtie eksperimentālie un modelēšanas rezultāti parādīti 8. un 9. attēlos. 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 serijas 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. tabulā.



8. attēls. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 b sērijas piebarošanas procesu un modelēšanas rezultāti, lietojot vienkāršotu modeli. Eksp. b-1 (zils), eksp. b-2 (zaļš), eksp. b-3 (sarkans). Eksperimentālie mērījumi (apļi, kvadrāti), modelētie lielumi (līnijas)



9. attēls. Vienkāršota *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 kultivēšanas modeļa pilnveidošanas gaita bioreaktora b sērijas kultivēšanas procesiem ar piebarošanu

4. tabula

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

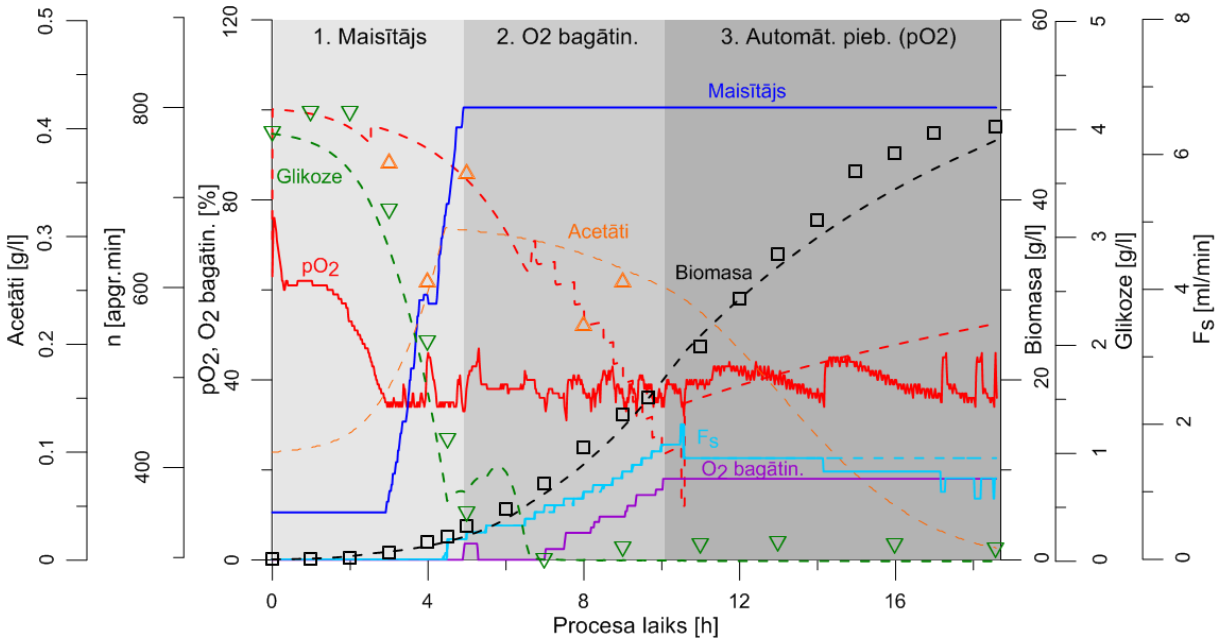
Param.	Vien.	Lit. dati (atsauces skat. 1. tabulā)	Identificētie param. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 bioreakt. proc.
Y_{xs}	g/g	0,50	**0,55**
q_{sMax}	g/g/h	1,69	**1,15**
K_s	g/kg	0,081	**0,005**
Papildparametri bioreaktora modelēšanai			
Y_{xYE}	g/g	–	**0,45**
Y_{bx}	g/g	–	**0,001**
t_{YE}	h	–	**3,5**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

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, kā arī pēc procesa piebarošanas profila aprēķina, procesā vēlamo biomasas augšanas (X), substrāta (S) un acetātu (A) trajektoriju nodrošināšanai tika veikts testa eksperiments (skat. 10. att.). Tā mērķis bija vadīt procesa otro stadiju pēc iespējas tuvāk pirms procesa definētajiem X, S, A un pO_2 nosacījumiem, 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, jo procesa otrajā stadijā ir izteikti komplekss kultūras stāvoklis. Jāatzīmē, ka lietojot šo principu, mikroorganismu īpatnējais augšanas ātrums tiek limitēts, jo tiek samazināts substrāta piebarošanas ātrums atkarībā no vidē pieejamā O_2.

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



10. attēls. *E. coli* BL21 (DE3) pBR327 testa eksperiments ar piebarošanu pO_2 kaskādes kontroles pārbaudei. Analītiskie mērījumi biomasai, glikozei un acetātiem attēloti kā simboli (attiecīgi □, ▽, un △); modelēšanas rezultāti attēloti ar raustītām līnijām. Procesa tiešsaistes mērījumi attēloti kā līnijas

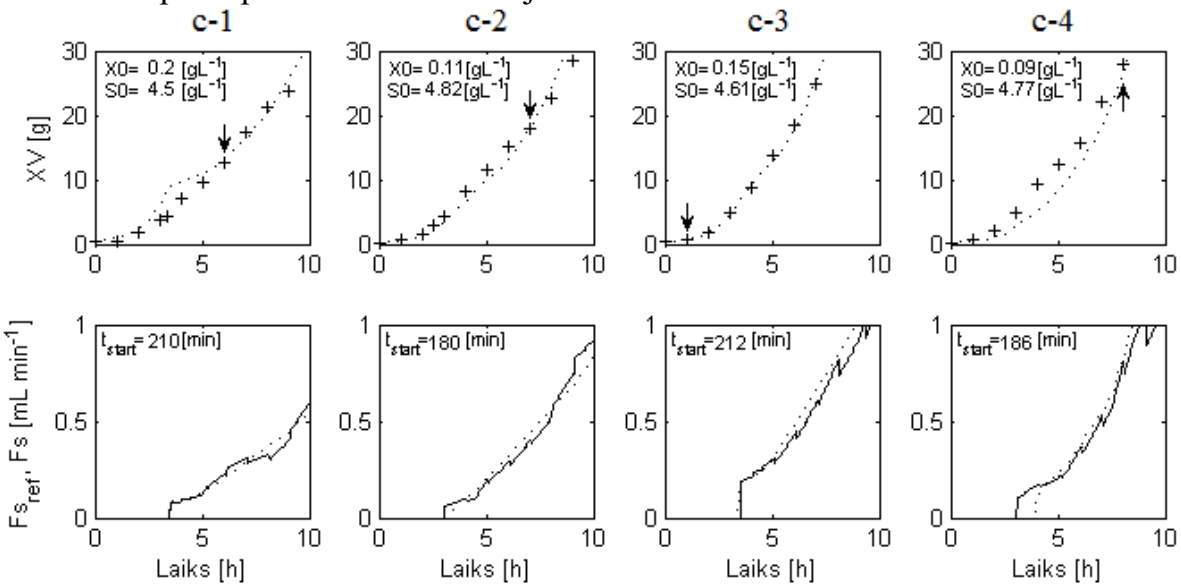
Optimizētā kontroles stratēģija deva stabilu biomasas augšanu bez ievērojamas acetātu uzkrāšanās piebarošanas fāzē. Procesa beigās tika sasniegta biomasas koncentrācija 48,15 g/l, bet acetātu koncentrācija visā procesa garumā nepārsniedza 0,37 g/l. Izšķīdušā skābekļa parciālā spiediena (pO_2) kaskādes 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.

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

3. nodaļā identificēto matemātisko modeli tālāk lietoja uz modeli bāzētai piebarošanas ātruma kontroles (MPC) realizācijai. Šim nolūkam veica c eksperimentu sēriju. Pētījumā metodoloģiski parādīts, kā doto principu var lietot vēlamā references piebarošanas/biomasas augšanas profilu atrašanai. Līdz ar uzkrātās eksperimentālās datubāzes paplašināšanos iespējams veikt precīzāku modeļa parametru identifikāciju. 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.

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 procesam (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.

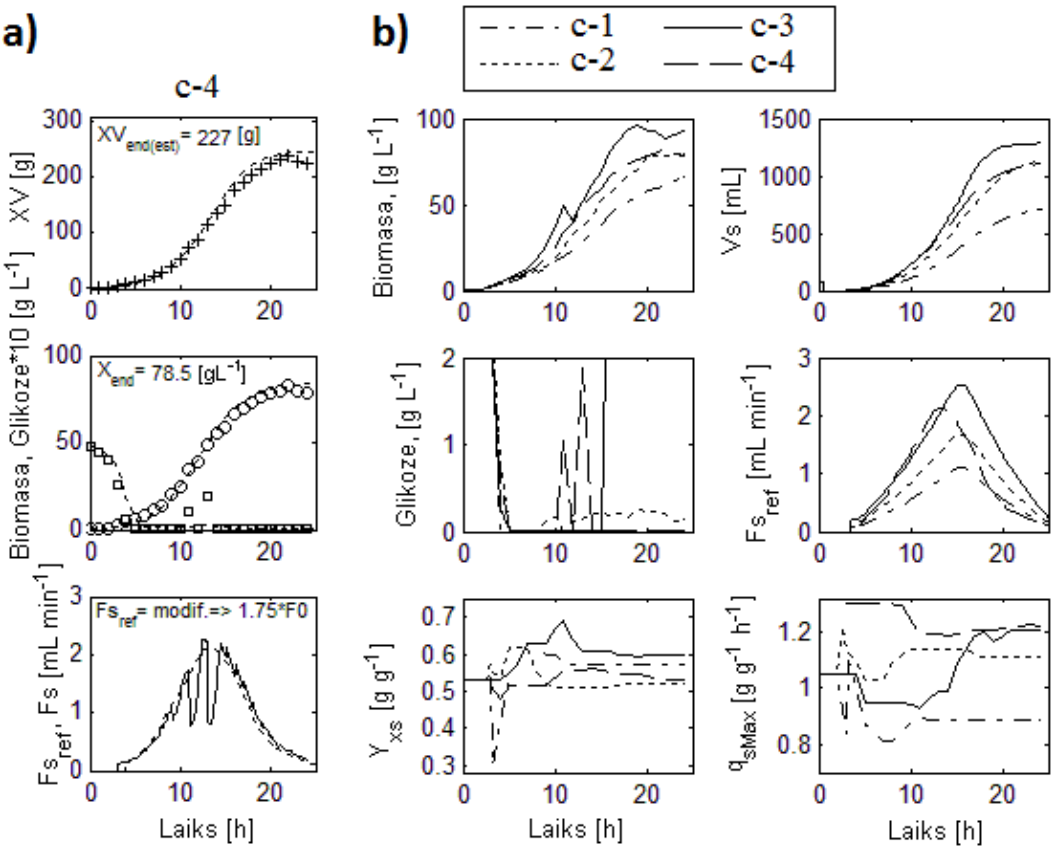


11. attēls. Procesa sākuma nosacījumi (X_0, S_0) un piebarošanas sākšanas laiks (t_{start}) procesiem c-1–c-4. (··) Uzstādītie (modelētie) references profili, (+) aprēķināts tiešsaistē, (▫) «rokas» glikozes analīzes, (○) «rokas» biomasas analīzes, (–) realizētais piebarošanas ātrums

Eksperimentālie rezultāti rādīja, ka līdzīgie X_0 un S_0 parametri c-1 un c-3 eksperimentos (skat. 11. 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. 11. att.), kad biomasa sasniegusi uzstādīto references vērtību, ir norādīti ar bultiņām.

C eksperimentu sērijas procesiem izraudzījās piebarošanas ātrumus, kas deva biomasas eksponenciālu augšanau 0,15–0,50 1/h robežās. Šīs eksperimentu sērijas rezultāti parādīti 12. un 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 [17, 26] un biomasas fizioloģisko stāvokli (šūnu novecošanu, dzīvotspējīgo šūnu attiecību u. c.) [27]. 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

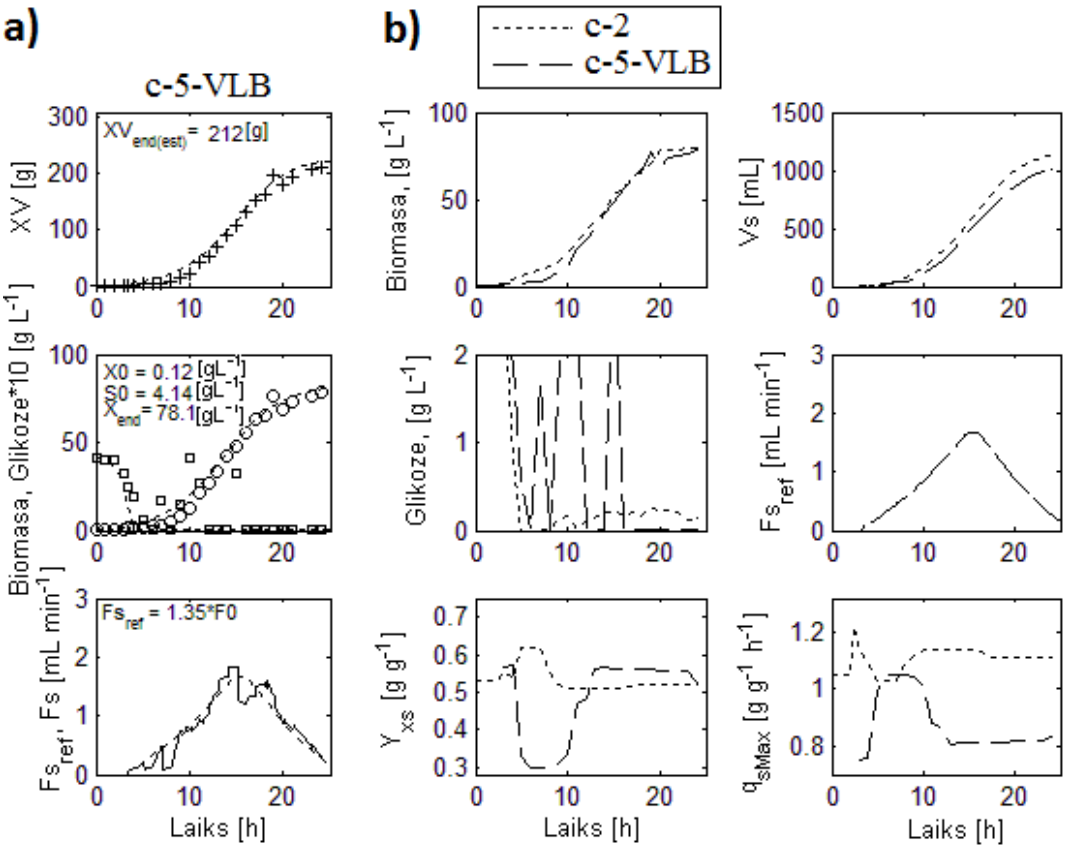
varētu uzlabot, veicot precīzāku tilpuma aprēķināšanu tiešsaistē. Turklāt c-4 rezultāti parāda to, ka modeļa paramteri, kas izmantoti references profila izvēlē, konkrētajā gadījumā nebija optimālie, kad eksponenciālajai augšanas fāzei tika izvēlēts pārlieku paaugstināts piebarošanas profils. Ņemot vērā c-4 sākuma apstākļus (X_0 and S_0), modelis neuzrādīja būtisku glikozes uzkrāšanos procesa 11. stundā.



12. 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

No Y_{xs} un q_{sMax} adaptācijas rezultātiem var iegūt vēl papildu informāciju. Biomasas iznākums no substrāta irparametrs, 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 astotās–devītās stundas, novērota korelācija starp aprēķinātajām Y_{xs} trajektorijām eksperimentiem c-1–c-4 (skat. 12. 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 parāda, ka šī parametera identificētā vērtība veiktajos eksperimentos bija atšķrīga un mainījusies 1,05±0,2 g/g/h

robežās. Iepriekš minētais varētu būt saistītas ar doto eksperimentu atšķirīgiem substrāta limitējošiem apstākļiem.



13. attēls. Biomasas daudzuma kontroles rezultāti (c-5-VLB) vienreizlietojamajā reaktorā un to salīdzinājums ar c-2. a) (– –) uzstādītais (modelētais) references profils, (+) aprēķināts tiešsaistē, (▫) «rokas» 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 «rokas» analītiskajiem mērījumiem, kas veikti ik pēc 1–2 h

Lai salīdzinātu šīs MPC kontroles metodes lietojumu citas konfigurācijas reaktorā, tika veikts testa eksperiments vienreizlietojamā laboratorijas bioreaktorā (13. 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. 13. 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.

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 0,45 ±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.

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 korantigēna (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»).

PUBLIKĀCIJU SARAKSTS

Publikācijas zinātniskajos žurnālos

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), 75–88.
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) – 59.–70. p.
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) – 73.–79. p.
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) – 172.–184. p.

Raksti pilna teksta konferenču rakstu krājumos

1. 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. – 300.–305. lpp.

Recenzētas zinātniskās konferenču tēzes

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.
2. 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. – 1744.–1744. p.
3. 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. – 1744.–1744. p.

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. Lee, S. Y. High cell density cultivation of Escherichia coli// Trends in Biotechnology – 1996. – Vol. 14. – p. 98–105.
4. 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.
5. Galvanauskas V., Simutis R., Volk N., Lübbert A. Model based design of a biochemical cultivation process// Bioprocess Engineering – 1998. – Vol. 18. – p. 227–234.
6. 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.
7. Shukla A. A., Gottschalk U. Single-use disposable technologies for biopHarmaceutical manufacturing// Trends in Biotechnology – 2013. – Vol. 31 (3). – p. 147–154.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Nielsen J. Microbial process kinetics// Kristiansen B., Ratledge C. (Eds.). Basic biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press. – 2006. – p. 155–180.
14. Siemens AG. Validation support manual// Kemper-Masterson Inc. – 1997. – document ID: C79000-G7076-C736-01.

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

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

17. 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.

18. 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.

19. 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.

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

21. 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.

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

23. 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.

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

25. 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.

26. 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.

27. 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.