

(19)



(10) **LT 6395 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patent numeris: **6395** (51) Int. Cl. (2017.01): **C12N 1/00**
- (21) Paraiškos numeris: **2015 062**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2015-07-24**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2017-02-27**
- (45) Patent paskelbimo data: **2017-06-12**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Rimvydas SIMUTIS, LT
Donatas LEVIŠAUSKAS, LT
Vytautas GALVANAUSKAS, LT
Jolanta REPŠYTĖ, LT
Vykantas GRINCAS, LT
Renaldas URNIEŽIUS, LT
- (73) Patent savininkas:
KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETAS, K. Donelaičio g. 73, 44249
Kaunas, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Otilija KLIMAITIENĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Mikroorganizmų augimo greičio automatinė valdymo sistema ir būdas
- (57) Referatas:

Išradimas yra susijęs su bioreaktorių automatinio valdymo sistema ir būdu, konkrečiai automatinė valdymo sistema, leidžiančia kontroliuoti mikroorganizmų kultūrų kultivavimo procesus. Pasiūlyta automatinė valdymo sistema kontroliuoja paduodamo į bioreaktorių maitinančio substrato srautą taip, kad būtų užtikrintas vartotojo užsiduotas specifinis mikroorganizmų augimo greitis. Mikroorganizmų augimo greitis nustatomas netiesioginiu būdu matuojant bioreaktoriuje kultivuojamos kultūros deguonies sunaudojimo greitį. Valdymo sistema realizuota kombinuoto reguliatoriaus pagalba, kuris bendrą maitinančio substrato srautą formuoja iš dviejų dalių: bazinis substrato srautas yra nustatomas iš koreliacijos tarp sunaudojamo substrato ir jam oksiduoti

reikalingo deguonies kiekio, o koreguojantis substrato srautas nustatomas priklausomai nuo paklaidos tarp užduoto ir bioreaktoriuje stebimo deguonies sunaudojimo greičio. Užduotas deguonies sunaudojimo greitis papildomai koreguojamas pagal užduoto ir bioreaktoriuje stebimo sunaudoto deguonies kiekio santykį. Automatino reguliatoriaus suderinimo parametrai keičiami adaptyviai, priklausomai nuo mikroorganizmo kultūros deguonies sunaudojimo greičio.

Išradimo sritis

Išradimas yra susijęs su bioreaktorių automatinio valdymo sistema ir būdu, konkrečiai automatine valdymo sistema, leidžiančia kontroliuoti mikroorganizmų kultūrų kultivavimo procesus.

Technikos lygio aprašymas

Pramoninių biotechnologinių procesų efektyvumą apsprendžia juose auginamos mikroorganizmų kultūros ir jų kultivavimo režimai. Mikroorganizmų kultivavimas atliekamas specialiuose bioreaktoriuose, kuriuose sukuriamos tinkamos sąlygos mikroorganizmų kultūrų augimui. Bioreaktoriuose specialių valdiklių pagalba palaikoma racionali kultivavimo terpės temperatūra, rūgštingumas ir tinkami kultivavimo terpės maišymo bei aeracijos režimai. Svarbiausią įtaką mikroorganizmų augimui turi kultūros augimui būtinos maitinamosios terpės į bioreaktorių padavimas. Tradiciniuose periodiniuose kultivavimo procesuose visa maitinamoji terpė į bioreaktorių patiekama kultivavimo proceso pradžioje ir kultivavimo procesai yra nevaldomi. Šiuo metu labiausiai paplitusiuose pažangiuose mikroorganizmų kultivavimo procesuose (kultivavimo procesai su pamaitinimu) maitinamoji terpė mikroorganizmams tiekama palaipsniui viso kultivavimo proceso vykdymo metu. Šiuo metu nėra žinoma būdų, kaip tiesiogiai su pakankamu tikslumu išmatuoti mikroorganizmų augimo greitį ir pagal tai valdyti maitinamosios terpės padavimą. Todėl maitinamosios terpės į bioreaktorių tiekimas dažniausiai atliekamas programiniu būdu pagal iš anksto numatytą maitinamosios terpės tiekimo į bioreaktorių grafiką. Toks maitinamosios terpės tiekimas ir mikroorganizmų augimo greičio valdymas yra netikslus, labai jautrus įvairiems trikdžiams ir sukelia didelius gaunamų bioproduktų koncentracijų svyravimus. Kad padidinti mikroorganizmų augimo greičio valdymo sistemų tikslumą ir užtikrinti stabilias sintezuojamų bioproduktų koncentracijas bandoma kurti netiesiogines mikroorganizmų augimo greičio reguliavimo ir valdymo sistemas. Šiose sistemos mikroorganizmų augimo greitis nustatomas netiesiogiai, panaudojant kitų procesų kintamųjų matavimo informaciją bei specialias skaičiavimo procedūras, o maitinamosios terpės į bioreaktorių padavimo valdymas ir reguliavimas atliekamas atsižvelgiant į netiesiogiai apskaičiuotą mikroorganizmų augimo greitį.

Yra žinomas netiesioginis mikroorganizmų augimo greičio reguliavimo būdas

(Akesson, M. (1999). *Probing control of glucose feeding in Escherichia coli cultivations*. ISRN LUTFD2/TFRT-1057-SE. PhD thesis. Department of automatic control, Lund Institute of Technology, Sweden) besiremiantis testiniais pamaitinančio substrato padavimo signalais ir atitinkama ištirpusio deguonies jutiklio signalo analize. Šio būdo realizavimui proceso metu reikalinga atlikti trumpo laikotarpio aktyvius testinius eksperimentus ir tai apriboja šio būdo taikymą realiuose pramoniniuose procesuose. Be to taikant šį metodą remiamasi lokaliniais ištirpusio deguonies matavimo jutikliais, kurie nepilnai charakterizuoja bendrą bioreaktoriaus kultivavimo terpės būseną.

JAV patentinėje paraiškoje Nr. US 08/289,610 yra aprašoma mikroorganizmų augimo greičio reguliavimo sistema, keičianti maitinančio substrato padavimą mikroorganizmų kultivavimo metu. Valdymo sistema remiasi laboratoriniais maitinančio substrato koncentracijos matavimų eksperimentais ir skaičiavimo procedūromis, kurios leidžia apskaičiuoti maitinančio substrato srautą sekančio kultivavimo eksperimento etapui. Tačiau ši sistema praktiškai sunkiai realizuojama pramoniniuose procesuose, reikalauja daug sąnaudų atliekant eksperimentinius substrato koncentracijos bioreaktoriuje matavimus, be to sistemos palaikymas reikalauja daug darbo sąnaudų kalibruojant substrato matavimo metodus.

JAV patente Nr. US 7,521,203 (B2) yra aprašomas mikroorganizmų augimo greičio reguliavimo būdas, besiremiantis buferinio tirpalo tiekimo į bioreaktorių srautu, kuris prie tam tikrų sąlygų yra proporcingas mikroorganizmų augimo greičiui. Šis buferinis tirpalas yra naudojamas bioreaktoriaus terpės rūgštingumui palaikyti. Tačiau paminėtas būdas gali iššaukti didelius reguliuojamo augimo greičio svyravimus, nežymiai pasikeitus kultivavimo terpės cheminei sudėčiai ir jos rūgštingumui. Tai stabdo šio būdo taikymą pramoniniuose biotechnologiniuose procesuose.

Artimiausias analogas yra netiesioginis mikroorganizmų augimo greičio reguliavimo būdas (Kuprijanov, Artur, Schaepe, Sebastian, Aehle, Mathias, Simutis, Rimvydas, Lübbert, Andreas, *Improving cultivation processes for recombinant protein production*. // *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Berlin : Springer. ISSN 1615-7591. 2012, Vol. 35, iss. 3, p. 333-340), besiremiantis proceso metu nustatomu anglies dvideginio išsiskyrimo greičiu ir išsiskiriančio anglies dvideginio kiekiu. Tačiau minėto būdo praktinis realizavimas yra gana sudėtingas, kadangi reguliavimui realizuoti reikia iš anksto žinoti apytikrį maitinančio substrato laikinį

profilį. Be to šio būdo tikslumą riboja tai, kad reguliatorių parametrai nėra adaptuojami mikroorganizmų kultivavimo metu ir tai sukelia dideles reguliavimo paklaidas keičiantis biotechnologinio proceso dinamikai.

Išradimu yra išvengiama minėtų analogų trūkumų ir yra įgyvendinamas pamaitinančio substrato padavimas į bioreaktorių automatinę valdymo sistemą netiesioginių matavimo metodų pagalba, tinkamai reguliuojant vartotojo užsiduotą mikroorganizmų kultūros santykinį augimo greitį ir tuo pačiu užtikrinant gerą procesų atsikartojamumą, aukštą sintezuojamų produktų koncentraciją bei kokybę. Pasiūlyta automatinė valdymo sistema leidžia paprasčiau ir stabiliau reguliuoti vartotojo užsiduotą mikroorganizmų kultūros santykinį augimo greitį ir tuo pačiu įgalinti geresnį procesų atsikartojamumą, aukštesnę sintezuojamų produktų koncentraciją bei geresnę produktų kokybę.

Trumpas išradimo aprašymas

Pasiūlyta automatinė valdymo sistema kontroliuoja paduodamo į bioreaktorių maitinančio substrato srautą taip, kad būtų užtikrintas vartotojo užsiduotas specifinis mikroorganizmų augimo greitis. Mikroorganizmų augimo greitis nustatomas netiesioginiu būdu matuojant bioreaktoriuje kultivuojamos kultūros deguonies sunaudojimo greitį. Valdymo sistema realizuota kombinuoto reguliatoriaus pagalba, kuris bendrą maitinančio substrato srautą formuoja iš dviejų dalių: bazinis substrato srautas yra nustatomas iš koreliacijos tarp sunaudojamo substrato ir jam oksiduoti reikalingo deguonies kiekio, o koreguojantis substrato srautas nustatomas priklausomai nuo paklaidos tarp užduoto ir bioreaktoriuje stebimo deguonies sunaudojimo greičio. Norint išvengti atsitiktinių proceso trikdžių įtakos produkto kokybei užduotas deguonies sunaudojimo greitis papildomai koreguojamas pagal užduoto ir bioreaktoriuje stebimo sunaudoto deguonies kiekio santykį. Kad užtikrinti aukštą reguliavimo kokybę keičiantis kultivuojamo proceso dinamikai, automatinio reguliatoriaus suderinimo parametrai keičiami adaptyviai, priklausomai nuo mikroorganizmo kultūros deguonies sunaudojimo greičio.

Trumpas brėžinių aprašymas

Kiti išradimo požymiai ir privalumai yra aprašomi detaliame išradimo aprašyme su nuoroda į žemiau pateiktus brėžinius:

Pav. 1 yra pavaizduota substrato padavimo į bioreaktorių automatinės

valdymo sistemos schema

Detalus išradimo aprašymas

Turėtų būti suprantama, kad daugybė konkrečių detalių yra išdėstytos, siekiant pateikti pilną ir suprantamą išradimo pavyzdinio įgyvendinimo aprašymą. Tačiau srities specialistui bus aišku, kad išradimo įgyvendinimo pavyzdžių detalumas neapriboja išradimo įgyvendinimo, kuris gali būti įgyvendintas ir be tokių konkrečių nurodymų. Gerai žinomi būdai, procedūros ir sudedamosios dalys nebuvo detaliai aprašyti, kad išradimo įgyvendinimo pavyzdžiai nebūtų klaidinantys. Be to, šis aprašymas neturi būti laikomas apribojančiu pateiktus įgyvendinimo pavyzdžius, o tik kaip jų įgyvendinimas.

Atlikus biotechnologinio proceso eksperimentinių duomenų analizę ir išnagrinėjus panašių mikroorganizmų kultūrų kultivavimo duomenis, yra parenkamas racionalus mikroorganizmų specifinio augimo greičio laikinis profilis $\mu(t)$. Pavyzdžiui pirmoje proceso kultivavimo fazėje yra parenkamas specifinis mikroorganizmų augimo greitis $\mu(t)$, kuris sudaro apie 90% maksimalaus augimo greičio, t.y. $\mu(t) \sim 0.9 \mu_{\max}$. Antroje kultivavimo fazėje yra parenkamas toks specifinis augimo greitis, kuris sudaro optimalias sąlygas sintezuojamo produkto skyrimuisi. Pagal pasirinktą augimo greičio profilį $\mu(t)$ ir pradinį mikroorganizmų biomasės kiekį $X(0)$ yra skaičiuojamas mikroorganizmų biomasės $X(t)$ ir augimo greičio $\mu(t)X(t)$ kitimas nuo proceso pradžios $t=0$, iki proceso pabaigos $t=t_f$. Tam skaitiniais metodais integruojama diferencialinė lygtis [1]:

$$\frac{dX}{dt} = \mu(t)X(t) \quad [1]$$

ir taikant integravimo metu gautas reikšmes $X(t)$ ir $\mu(t)X(t)$, pagal išraišką [2] yra paskaičiuojama, kaip proceso metu bioreaktoriuje (3) turėtų keistis deguonies sunaudojimo greitis, $DSG(t)$, kai proceso metu realizuojamas pasirinktas $\mu(t)$ profilis:

$$DSG(t) = K_1\mu(t)X(t) + K_2X(t) \quad , \quad [2]$$

čia K_1 ir K_2 yra konstantos, nustatomos konkrečiam procesui iš turimų eksperimentinių duomenų.

Toliau integruojant laike deguonies sunaudojimo $DSG(t)$ išraišką [2] gaunamas deguonies sunaudojimo kultivavimo metu kiekis $DSK(t)$. Toks $DSK(t)$ yra stebimas kultivavimo proceso metu, jeigu proceso metu yra palaikomas vartotojo pasirinktas specifinis mikroorganizmų augimo greitis $\mu(t)$. Jei mikroorganizmų kultivavimo metu yra palaikomi aukščiau paskaičiuoto deguonies sunaudojimo greičio $DSG(t)$ ir deguonies sunaudojimo kiekio $DSK(t)$ laikiniai profiliai, tuo pačiu kultivavimo proceso metu yra išlaikomas vartotojo pasirinktas mikroorganizmų specifinio augimo greičio profilis $\mu(t)$. Taigi šioje automatinio valdymo sistemoje specifinio augimo greičio valdymo uždavinys transformuojamas į $DSG(t)$ ir $DSK(t)$ valdymo uždavinį.

Pav. 1 pavaizduota mikroorganizmų augimo greičio automatinė valdymo sistema, susideda iš adaptyvaus reguliatoriaus 1, bazinio pamaitinimo srauto skaičiuoklio 2, bioreaktoriaus 3, deguonies sunaudojimo greičio ir deguonies sunaudojimo kiekio skaičiuoklio 4, sumatorių 5 ir 6 bei aritmetinių įtaisų 7 ir 8.

Automatinės valdymo sistemos kombinuotas reguliatorius (1) į reaktorių (3) paduodamo maitinančio substrato bendrą srautą formuoja iš dviejų dalių, pagal kultivuojamos kultūros deguonies sunaudojimo greitį: bazinio substrato srauto, kuris yra nustatomas iš koreliacijos tarp sunaudojamo substrato ir jam oksiduoti reikalingo deguonies kiekio, ir koreguojančio substrato srauto, kuris nustatomas priklausomai nuo paklaidos tarp užduoto ir bioreaktoriuje stebimo deguonies sunaudojimo greičio. Tam, kad būtų išvengta atsitiktinių proceso trikdžių įtakos produkto kokybei, užduotas deguonies sunaudojimo greitis yra papildomai koreguojamas pagal užduoto ir bioreaktoriuje (3) stebimo sunaudoto deguonies kiekio santykį.

Mikroorganizmų kultivavimo metu bazinio pamaitinimo srauto skaičiuokliu (2) bioreaktoriuje (3) yra nustatomas deguonies sunaudojimo greitis $DSG_b(t)$ ir deguonies sunaudojimo kiekis $DSK_b(t)$. Šis dydis yra palyginamas su vartotojo pasirinktam specifinio augimo greičio profiliui $\mu(t)$ paskaičiuotu $DSG(t)$ dydžiu. Pagal šių dydžių skirtumą reguliatorius (1) suformuoja pamaitinančio substrato srauto korekciją ΔF . Bazinis pamaitinančio substrato srautas (F) yra paskaičiuojamas aritmetiniame įtaise (7), atsižvelgiant į pagal vartotojo reikalavimus suformuotą

deguonies sunaudojimo greitį $DSG(t)$ ir koreliacinę išraišką tarp sunaudojamo substrato kiekio ir jam oksiduoti reikalingo deguonies kiekio. Ši koreliacija nustatoma kiekvienai mikroorganizmų kultūrai eksperimentiškai. Bazinis pamaitinančio substrato srautas (F) ir srauto korekcija (ΔF) yra apjungiami sumatoriuje (6) ir suminis srautas yra paduodamas į bioreaktorių (3). Kultivavimo metu aritmetiniame įtaise (7) taip pat yra skaičiuojamas deguonies sunaudojimo kiekio bioreaktoriuje $DSK_b(t)$ ir pagal vartotojo poreikius planuoto deguonies sunaudojimo kiekio $DSK(t)$ santykis. Jei dėl įvairių mikroorganizmų kultivavimo proceso trikdžių šis santykis pradeda skirtis nuo vieneto, aritmetiniame įtaise (8) atitinkamai yra pakoreguojamas (padidinamas arba sumažinamas) vartotojo suformuotas deguonies sunaudojimo greičio $DSG(t)$ nuostatas.

Išradimas yra skirtas kontroliuoti mikroorganizmų kultūrų kultivavimo procesus, pritaikant racionalius pamaitinančio substrato tiekimo į bioreaktorių režimus, kurie parenkami taip, kad užtikrinti vartotojo nustatytą mikroorganizmų kultūros specifinį augimo greitį. Tinkamas pamaitinimo režimų realizavimas įgalina gauti stabilius, atsikartojančius biotechnologinius procesus, padidina tikslinių sintezuojamų produktų koncentraciją ir kokybę.

Nors išradimo aprašyme buvo išvardinta daugybė charakteristikų ir privalumų, kartu su išradimo struktūrinėmis detalėmis ir požymiais, aprašymas yra pateikiamas kaip pavyzdinis išradimo išpildymas. Gali būti atlikti pakeitimai detalėse, ypatingai medžiagų formoje, dydyje ir išdėstyme nenutolstant nuo išradimo principų, vadovaujantis plačiausiai suprantamomis apibrėžties punktuose naudojamų sąvokų reikšmėmis.

Išradimo apibrėžtis

1. Mikroorganizmų augimo greičio valdymo sistema apimanti biorektorių (3), b e s i s k i r i a n t i tuo, kad apima adaptyvų kombinuotą reguliatorių (1), bazinio pamaitinimo srauto skaičiuoklį (2), deguonies sunaudojimo greičio ir deguonies sunaudojimo kiekio skaičiuoklį (4), sumatorius (5, 6) ir aritmetinius įtaisus (7, 8).

2. Mikroorganizmų augimo greičio valdymo būdas naudojant sistemą pagal 1 punktą, apimantis netiesioginį kultivuojamos kultūros deguonies sunaudojimo greičio nustatymą ir substrato tiekimą į biorektorių pagal nustatytą mikroorganizmų deguonies sunaudojimo greitį, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad apima žingsnius:

a) yra parenkamas racionalus mikroorganizmų specifinio augimo greičio laikinis profilis;

b) pagal pasirinktą augimo greičio profilį ir pradinį mikroorganizmų biomasės kiekį yra skaičiuojamas mikroorganizmų biomasės ir augimo greičio kitimas nuo proceso pradžios, iki proceso pabaigos;

c) integruojama deguonies sunaudojimo greičio išraiška tam, kad būtų gautas deguonies sunaudojimo kiekis, kultivavimo metu;

d) yra formuojamas maitinančio substrato srautas iš dviejų dalių,

e) pirmos dalies srautas ir antros dalies srautas yra apjungiami sumatoriuje (6) ir suminis srautas yra paduodamas į biorektorių (3);

f) deguonies sunaudojimo greitis papildomai koreguojamas pagal užduoto ir bioreaktoriuje stebimo sunaudoto deguonies kiekio santykį;

g) automatino reguliatoriaus suderinimo parametrai keičiami adaptyviai, priklausomai nuo mikroorganizmo kultūros deguonies sunaudojimo greičio.

3. Būdas pagal 2 punktą, kuriame mikroorganizmų biomasės ir augimo greičio kitimo nuo proceso pradžios iki proceso pabaigos skaičiavimas yra atliekamas integruojant diferencialinę lygtį, o naudojant integravimo metu gautas reikšmes yra paskaičiuojamas deguonies sunaudojimo greičio pokytis bioreaktoriuje (3), kai proceso metu yra realizuojamas pasirinktas profilis.

4. Būdas pagal 2 punktą, kuriame kaip minėta pirma srauto dalis yra nustatomas bazinis substrato srautas iš koreliacijos tarp sunaudojamo substrato ir

jam oksiduoti reikalingo deguonies kiekio, o kaip minėta antra srauto dalis yra nustatomas koreguojantis substrato srautas, priklausomai nuo paklaidos tarp užduoto ir bioreaktoriuje stebimo deguonies sunaudojimo greičio.

5. Būdas pagal 4 punktą, kur substrato bazinio srauto nustatymas apima žingsnius:

i) deguonies sunaudojimo greičio ir deguonies sunaudojimo kiekio nustatymą bioreaktoriuje (3), bazinio pamaitinimo srauto skaičiuokliu (2);

ii) žingsnyje i) gauto dydžio palyginimą su deguonies sunaudojimo greičiu, paskaičiuotu iš anksto parinktam specifinio augimo greičio profiliui;

iii) pamaitinančio substrato srauto korekcijos formavimą reguliatoriuje (1) pagal žingsnyje ii) gautą dydžių skirtumą;

iv) bazinio pamaitinančio substrato srauto skaičiavimą aritmetiniame įtaise (7), atsižvelgiant į deguonies sunaudojimo greitį ir koreliacinę išraišką tarp sunaudojamo substrato kiekio ir jam oksiduoti reikalingo deguonies kiekio.

