

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2021 514**
(22) Paraiškos padavimo data: **2021-04-02**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2021-10-25**
(45) Patento paskelbimo data: **2021-11-10**

(73) Patento savininkas:
Kauno Technologijos Universitetas, K. Donelaičio g. 73, 44029 Kaunas, LT

(72) Išradėjas:
Vytautas GALVANAUSKAS, LT
Rimvydas SIMUTIS, LT
Donatas LEVIŠAUSKAS, LT
Renaldas URNIEŽIUS, LT
Vygandas VAITKUS, LT
Tomas TEKORIUS, LT
Mantas BUTKUS, LT
Arnas SURVYLA, LT

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Otilija KLIMAITIENĖ, 35, AAA Law, A. Goštauto g. 40B, Verslo centras „Dvyniai“, LT-03163 Vilnius, LT

LT 6861 B

(54) Pavadinimas:

Maitinimo profilių, skirtų valdyti pusiau-periodinius rekombinantinių *E. coli* kultivavimo procesus, formavimo ir adaptavimo būdas

(57) Referatas:

Išradimas atskleidžia maitinančio substrato tiekimo į bioreaktorių būdą. Konkrečiau, tai eksperimentinių duomenų analize pagrįstas trikdžiams atsparių (angl. *robust*) maitinimo profilių formavimo ir adaptavimo būdas, skirtas racionaliai valdyti pusiau-periodinių rekombinantinių *E. coli* kultivavimo procesus ir užtikrinti šių procesų stabilumą, atsikartojamumą ir aukštą našumą. Būdas paremtas gliukozės sunaudojimo kultivavimo terpėje reguliavimu, taikant tinkamai paruoštus atsparius trikdžiams maitinimo gliukoze algoritmus, kurie formuojami, remiantis pirminių kultivavimo eksperimentų ir specializuotų eksperimentų su rekombinantinių *E. coli* bakterijomis duomenimis. Tiekiamos gliukozės maitinimo profilių atsparumas trikdžiams užtikrinamas formuojant tinkamus gliukozės sunaudojimo greičio limitavimo lygius *E. coli* bakterijų kultivavimo metu. Profilių adaptavimas atliekamas realiu laiku, naudojant specializuotą, programinio jutiklio pagrindu sukurtą indikatorį, kuris signalizuoja apie bioreaktoriaus terpėje besikaupiančią perteklinę gliukozės koncentraciją. Indikatoriaus reikšmės įvertinamos pagal sunaudoto deguonies kiekio santykį su tiekiamos į bioreaktorių gliukozės kiekiu per pasirinktą kultivavimo laiko intervalą. Gautos indikatoriaus reikšmės lyginamos su indikatoriaus reikšmėmis, nustatytomis etaloniniam procesui, kurio metu užtikrinamas tinkamas proceso atsparumas trikdžiams ir aukštas sintezuojamo tikslinio rekombinantinio baltymo kiekis. Remiantis gautomis nuokrypomis, valdiklio pagalba realiu laiku adaptuojamas etaloninis gliukozės maitinimo profilis.

IŠRADIMO SRITIS

Išradimas susijęs su bioreaktorių automatinio valdymo technologijomis. Konkrečiau, jis atskleidžia būdą automatiškai valdyti mikroorganizmų kultūrų kultivavimo sąlygas, parenkant racionalius maitinančio substrato tiekimo į bioreaktorių režimus, kurie užtikrintų trikdžiams atsparius ir aukšto našumo atsikartojančius rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procesus.

TECHNIKOS LYGIS

Didelė dalis rekombinantinių baltymų, taikomų biomedicininiais tikslais, šiuo metu yra išgaunama vykdant pusiau-periodinius rekombinantinės *E.coli* bakterijos kultivavimo procesus specialiuose bioreaktoriuose. Dėl greito augimo ir aukšto tikslinio produkto sintezės greičio, *E.coli* bakterijos yra ypač naudingos didelio masto pramonei rekombinantinių baltymų gamybai.

Tradiciniuose periodiniuose kultivavimo procesuose (angl. *batch-cultivation processes*) visa maitinamoji terpė į bioreaktorių patiekama kultivavimo proceso pradžioje ir kultivavimo procesai yra nevaldomi.

Šiuolaikiniuose pažangiuose rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procesuose maitinamoji terpė mikroorganizmams tiekama palaipsniui viso kultivavimo proceso vykdymo metu (pusiau-periodiniai kultivavimo procesai, angl. *Fed-Batch Cultivation Processes*). Toks bakterijų kultivavimo būdas leidžia kontroliuoti substrato (daugiausia, gliukozės) koncentraciją kultivavimo terpėje taip, kad būtų išvengiama bakterijų augimo greičio slopinimo dėl aukštų substrato koncentracijų ir būtų ribojamas šalutinių produktų susidarymas, kurie mažina bakterijų augimo greitį ir tikslinio produkto sintezės greitį.

Maitinančio substrato (daugiausiai, gliukozės) tiekimo į bioreaktorių greitis yra pagrindinis faktorius, lemiantis rekombinantinių *E.coli* aerobinio augimo procesų valdomumą, atsparumą trikdžiams (angl. *robustness*), atsikartojamumą ir tikslinio rekombinantinio baltymo sintezės greitį. Todėl efektyvių ir atsparių trikdžiams substrato tiekimo į bioreaktorių profilių paruošimas ir realizavimas yra svarbiausias žingsnis, įgyvendinant efektyvius rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procesus pramoniniuose bioreaktoriuose. Kai substrato srauto dydis tiekiamas į bioreaktorių nepakankamas, atitinkamai, yra apribojamas rekombinantinių *E.coli* bakterijų augimo greitis, ir tuo pačiu sumažėja proceso produktyvumas. Kita vertus, kai tiekiamo

substrato srautas viršija` *E.coli* bakterijų maksimaliai galimą įsisavinti substrato srautą, kultivavimo terpėje pradeda kauptis perteklinė gliukozė ir šalutiniai metabolizmo produktai, daugiausia acetatas. Šie produktai mažina *E.coli* bakterijų augimo greitį ir tikslinio produkto sintezės greitį produkto formavimo fazėje.

Yra žinoma eilė sprendimų, kuriuose atskleisti įvairūs maitinančio substrato srauto tiekiamo į bioreaktorių formavimo ir realizavimo metodai.

JAV patente US5595905A (suteiktas 1997.01.21) yra aprašyta maitinančio substrato padavimo į bioreaktorių reguliavimo sistema, skirta pusiau-periodiniams bakterijų arba mielių kultivavimo procesams. Valdymo sistema remiasi laboratoriniais maitinančio substrato koncentracijos matavimų eksperimentais ir skaičiavimo procedūromis, kurios leidžia apskaičiuoti maitinančio substrato srautą sekančio kultivavimo eksperimento etapui. Šios valdymo sistemos taikymas kultivavimo procesams neužtikrina procesų atkartojamumo tais atvejais, kai kultivavimo proceso pradžioje mikroorganizmų koncentracija ir kultūros pradinis augimo greitis nors nežymiai skiriasi nuo standartinio kultivavimo proceso sąlygų. Tokia sistema taip pat yra neefektyvi, jei tikslinio produkto sintezės fazėje reikalinga užtikrinti substrato sunaudojimo greitį mažesnį už maksimalų. Taip pat, tokia sistema sunkiai realizuojama pramoniniuose kultivavimo procesuose, nes reikalauja daug sąnaudų atliekant dažnus eksperimentinius substrato koncentracijos bioreaktoriuje matavimus, o sistemos palaikymas reikalauja papildomų darbo sąnaudų kalibruojant substrato matavimo metodus.

Kitas žinomas maitinančio substrato tiekimo būdas aprašytas JAV patentuose US6955892B2 (suteiktas 2005) ir US7521203B2 (suteiktas 2009), kur substrato srautas reguliuojamas reguliatoriaus pagalba, pagal nuokrypą nuo užduotos ir esamos ištirpusio deguonies koncentracijos, pO_2 , bioreaktoriaus terpėje, tuo pačiu metu deguonies tiekimą į bioreaktorių reguliuojant taip, kad palaikyti pastovų kultūrinės terpės pH. Kai kultivavimo terpėje pradeda trūkti substrato, tada sumažėja mikroorganizmų augimo greitis ir pakyla terpėje ištirpusio deguonies koncentracija pO_2 . Tiekiamo substrato srauto reguliatorius įvertina nuokrypą tarp užduotos ir esamos pO_2 reikšmės ir atitinkamai koreguoja tiekiamą maitinančio substrato srautą. Šio būdo trūkumas tas, kad dėl stiprios dviejų reguliavimo sistemų (pH ir pO_2) tarpusavio sąveikos yra sunku užtikrinti sistemų atsparumą trikdžiams ir tinkamą tiekiamo substrato srauto reguliavimo kokybę bei stabilumą. Jeigu sistemoje

dėl įvairių trikdžių padidėja substrato koncentracija, terpėje pažeidžiamos *E.coli* kultivavimo proceso valdomumo savybės ir kultivavimo procesas tampa nestabiliu.

Dar vienas maitinančio substrato srauto tiekimo į bioreaktorių būdas aprašytas JAV patente US6284453B1 (suteiktas 2001), kur substrato srautas reguliuojamas siekiant palaikyti užduotą *E.coli* bakterijų augimo greitį, kuris nustatomas iš eilės tiesioginių ir netiesioginių matavimų. Šis metodas negali užtikrinti procesų pakankamo atsparumo trikdžiams ir atsikartojamumo, nes dėl tipinių trikdžių kultivavimo metu (substrato tiekimo grandinės trikdžiai, putų gesinimo tirpalo padavimo sukelti trikdžiai, pradinės mikroorganizmų koncentracijos ir aktyvumo svyravimai) tik augimo greitį reguliuojanti sistema negali garantuoti užsiduotų kultivavimo proceso kintamųjų integralinių verčių sekimo, tai yra, užsiduotų biomasės ir tikslinio produkto koncentracijų reikšmių sekimo kultivavimo proceso metu ir jo pabaigoje. Tuo pačiu, šis metodas negali užtikrinti tinkamo kultivavimo procesų atsikartojamumo. Taip pat, šiam metodui realizuoti reikalinga vykdyti matavimus, kuriuos atlikti pramoniniuose bioreaktoriuose gali būti sudėtinga.

Akesson, M. (1999) [1] disertacijoje aprašytas maitinančio substrato reguliavimo būdas, besiremiantis testiniais maitinančio substrato srauto padavimo į bioreaktorių signalais ir atitinkama ištirpusio deguonies jutiklio signalo analize. Tiekiamo į bioreaktorių substrato srautas parenkamas taip, kad jo padidėjimas dar galėtų iššaukti bakterijų augimo padidėjimą, bei atitinkamai ištirpusio deguonies koncentracijos terpėje mažėjimą. Tokių testavimo poveikių pagalba parenkant maitinančio substrato srauto dydį, išvengiama perteklinio substrato kaupimosi bioreaktoriuje. Tačiau šio būdo realizavimui kultivavimo proceso metu reikalinga atlikti trumpo laikotarpio, aktyvius testinius substrato srauto paduodamo į bioreaktorių keitimo eksperimentus ir tai apriboja šio būdo taikymą realiuose pramoniniuose procesuose.

Netiesioginis maitinančio substrato reguliavimo būdas aprašytas Kuprijanov A. et al. (2012) straipsnyje [2]. Šiuo būdu, maitinančio substrato srautas keičiamas taip, kad palaikyti užsiduotą išsiskiriančio anglies dvideginio kiekio profilį kultivavimo metu. Tačiau minėto būdo praktinis realizavimas yra gana sudėtingas, kadangi reguliavimui realizuoti reikia iš anksto žinoti išsiskiriančio anglies dvideginio kiekio ir greičio profilius. Be to, šio būdo tikslumą riboja tai, kad regulatorių parametrai nėra adaptuojami mikroorganizmų kultivavimo metu ir tai sukelia dideles reguliavimo

paklaidas, keičiantis biotechnologinio proceso dinamikai.

Dar vienas netiesioginis maitinančio substrato reguliavimo būdas aprašytas LT patente LT6395B (prioriteto data: 2015.07.24), kuriame substrato srautas keičiamas taip, kad būtų užtikrintas gamybos operatoriaus užduotas specifinis mikroorganizmų augimo greitis, kuris nustatomas netiesioginiu būdu matuojant bioreaktoriuje auginamos kultūros deguonies sunaudojimo greitį ir kiekį. Šio metodo pagrindinis trūkumas yra tas, kad dėl įvairių trikdžių padidėjus substrato koncentracijai bioreaktoriaus terpėje virš tam tikros ribos, kultivavimo procesas praranda valdomumo savybes, todėl didinant substrato srautą nebegalima pasiekti užsiduotų deguonies sunaudojimo greičio bei kiekio reikšmių, dėl šios priežasties substratas toliau kaupiasi bioreaktoriuje, kultivavimo procesas tampa nestabilus ir jo produktyvumas stipriai krenta.

Esamam išradimui artimiausias analogas yra maitinančio substrato srauto reguliavimo metodas pusiau-periodiniams rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procesams, aprašytas straipsnyje [3] V. Galvanauskas et al. (2018). Šiame metode, trikdžiams atsparūs maitinančio substrato profiliai yra apskaičiuojami, remiantis kultivavimo proceso matematiniais modeliais. Pagrindinis šio metodo trūkumas yra tas, kad maitinimo profilių formavimui reikalinga sukurti adekvačius rekombinantinės *E.coli* kultivavimo proceso matematinius modelius vystomiems procesams. Tai reikalauja didelių darbo ir laiko sąnaudų, todėl šio metodo taikymas pramoniniuose kultivavimo procesuose yra ribotas.

Šis išradimas sukurtas siekiant išvengti aukščiau apžvelgtuose sprendimuose pastebėtų trūkumų ar ribotumų. Jame siekiama paprasčiau ir stabiliau reguliuoti į bioreaktorių tiekiamo maitinančio substrato srautą, užtikrinant geresnį kultivavimo proceso atkartojamumą ir sintezuojamų tikslinių produktų aukštesnius koncentraciją bei kiekį.

IŠRADIMO ESMĖ

Šis išradimas atskleidžia eksperimentinių duomenų analize pagrįstą trikdžiams atsparių (angl. *robust*) substrato maitinimo profilių kūrimo ir adaptavimo būdą, kuris užtikrina geresnį rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procesų stabilumą, atkartojamumą, ir aukštą tikslinio baltymo sintezės produktyvumą. Būdas apima keturis pagrindinius žingsnius.

Pirmame žingsnyje: atliekamas eksperimentinis rekombinantinių *E.coli* kultivavimas, kurio metu bakterijų auginimas nėra limituojamas ir bioreaktoriaus terpėje palaikoma aukšta gliukozės koncentracija (1-2 g/L).

Antrame žingsnyje: gauti eksperimentiniai bakterijų sunaudojamos gliukozės kiekio duomenys apdorojami, taikant žinomą lyginančių spleinų techniką ir nustatomas nelimituoto augimo kultivavimo proceso gliukozės sunaudojimo greičio profilis, atitinkamai, *E.coli* augimo ir tikslinio produkto sintezės fazėms. Remiantis šiais rezultatais, suplanuojami atsparūs trikdžiams augimo limitavimo ir maitinančio substrato srauto padavimo į bioreaktorių profiliai abejoms rekombinantinės *E.coli* kultivavimo proceso fazėms. Augimą limituojantys substrato maitinimo profiliai leidžia vykdyti stabilius ir atsikartojančius *E.coli* kultivavimo procesus, kurie yra atsparūs įvairiems proceso trikdžiams ir galimiems pradinės biomasės koncentracijos ir aktyvumo svyravimams.

Trečiame žingsnyje: atliekami *E.coli* limituoto augimo kultivavimo eksperimentai su suformuotais limituoto *E.coli* augimo substrato maitinimo profiliais ir atrenkamas substrato maitinimo profilis, kurio realizavimas leidžia vykdyti atsparų trikdžiams, aukšto produktyvumo rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procesą. Toks kultivavimo procesas apibrėžiamas kaip etaloninis kultivavimo procesas. Šiam etaloniniam kultivavimo procesui papildomai nustatomas proceso stabilumo indikatorius profilis, kuris randamas paskaičiuojant sunaudoto deguonies kiekio santykį su tiekiamos į bioreaktorių gliukozės kiekiu per pasirinktą kultivavimo laiko intervalą.

Ketvirtame žingsnyje: pagal nustatytą etaloninį kultivavimo procesą ir suformuotą etaloninį substrato maitinimo profilį atliekami pramoniniai *E.coli* kultivavimo eksperimentai. Jų metu realiuoju laiku nustatomos aukščiau minėto kultivavimo proceso stabilumo indikatorius reikšmės, jos lyginamos su etaloninio proceso indikatorius reikšmėmis ir apskaičiuojamos atitinkamos nuokrypos. Nuokrypų augimas signalizuoja apie galimą nepageidautiną gliukozės koncentracijos kaupimą bioreaktoriaus terpėje. Remiantis gautomis nuokrypų reikšmėmis proceso valdiklis realiuoju laiku adaptuoja etaloninį gliukozės maitinimo profilį.

Šis *E.coli* kultivavimo proceso valdymo būdas efektyvus ir taikytinas pramoniniuose *E.coli* kultivavimo procesuose / bioreaktoriuose, nes:

- nereikalauja iš gamybos operatoriaus specializuotų modeliavimo ir valdymo teorijos žinių, kadangi yra paremtas eksperimentiniais duomenimis bei kultivavimo proceso metu atliekamais nesudėtingais matavimais;

- kultivavimo proceso metu yra taikomi maitinančio substrato srauto profiliai, pasižymintys aukštu atsparumu trikdžiams, leidžiantys pramoniniame bioreaktoriuje automatiškai ir realiu laiku juos, šiuos profilius, adaptuoti, jei dėl didelių trikdžių kultivavimo proceso savireguliuojančios savybės nebegali kompensuoti bioreaktoriuje atsiradusių *E.coli* bakterijų augimo nuokrypių bei kultivavimo procesas pereina į nestabilią (nebevaldomą) būseną;

- leidžia paprasčiau ir stabiliau reguliuoti į bioreaktorių tiekiamo substrato srautą, tuo pačiu - užtikrinti geresnį kultivavimo procesų atsikartojamumą, aukštesnę sintezuojamų tikslinių produktų koncentraciją bei kiekį.

BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

Išradimo požymiai ir privalumai yra aprašomi detaliame išradimo aprašyme su nuorodomis į žemiau pateiktus brėžinius:

1 pav. pavaizduoti valdymo būdas ir jo žingsniai: formuoti bei adaptuoti atsparius trikdžiams maitinimo profilius pusiau-periodinių rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procese.

2 pav. kultivavimo proceso esminių parametrų kitimo grafikai, nelimituoto maitinimo gliukoze pusiau-periodinio *E.coli* auginimo proceso metu (P_x - tikslinio baltymo santykinė dalis ląstelėje, %, $0,01 \cdot P_x \cdot X$ - tikslinio baltymo koncentracija kultivavimo terpėje, g/kg, $cumF_{gl}$ – gliukozės kiekis patiektas į bioreaktorių, kg, X – biomasės koncentracija terpėje, g/kg, W – kultivavimo terpės svoris, kg, OUR – deguonies sunaudojimo greitis, g/kg/val.

3 pav. gliukozės maitinimo profiliai ir esminių proceso kintamųjų skirtingi grafikai, atitinkantys skirtingus gliukozės vartojimo greičio limitavimo lygius (85%, 90%, 95% ir neribotas).

4 pav. esminių proceso parametrų grafikai, naudojant trikdžiams atsparų maitinimo profilį tipiniame *E.coli* kultivavimo procese, su trikdžiais ($X_d(0)=0,95 \cdot X(0)$, $\sigma_{max_d} = 0,985\sigma_{max}$, $\sigma_d = 0,5\sigma$ trumpuoju laikotarpiu), ir be trikdžių.

5 pav. kultivavimo proceso kokybės pablogėjimas, kai maksimalus specifinis

gliukozės vartojimo greitis sumažėja 4%.

6 pav. etaloninio maitinimo profilio adaptavimas realiu laiku a) bioreaktoriaus ir PI valdiklio su maitinimo profiliu schema b) deguonies pasisavinimo iš gliukozės įvertis Y_{OUR}/F_{gl} - grafikas gautas 30 sekundžių slenkančio lango metodu.

7 pav. maitinimo profilio adaptavimo realiuoju laiku pavyzdys ir rezultatai rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procese.

DETALUS IŠRADIMO APRAŠYMAS

Maitinimo profilių formavimo ir adaptavimo būdo detalės atskleidžiamos, siekiant pateikti pilną ir suprantamą išradimo pavyzdinio įgyvendinimo aprašymą. Išradimo įgyvendinimo konkrečių pavyzdžių detalumas neapriboja išradimą įgyvendinti kitais variantais, kurie galėtų būti įgyvendinti ir be tokių konkrečių nurodymų. Gerai žinomos procedūros ir sudedamosios dalys nebuvo detaliai aprašytos, kad išradimo pavyzdžiai nebūtų klaidinantys. Metodo įgyvendinimo konkretus pavyzdys ir konkrečios sąlygos neapriboja metodą taikyti kitiems panašiams *E.coli* kultivavimo procesams.

Metodinė žingsnių seka. Būdo formuoti ir adaptuoti atsparius trikdžiams maitinimo profilius pusiau periodinių (angl. *fed-batch*) rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procesuose, 4 esminiai žingsniai pavaizduoti 1 paveiksle.

Pirmame žingsnyje atliekamas eksperimentinis rekombinantinės *E.coli* pusiau-periodinis kultivavimo procesas. Jo metu, rankiniu ar pusiau-automatiniu būdu, kultivavimo terpėje palaikoma 1-2 g/L gliukozės koncentracija, užtikrinanti gliukozės sunaudojimo greitį artimą maksimaliam, bet neleidžianti intensyviai skirtis antriniams metabolizmo produktams, kurie stabdytų *E.coli* bakterijų augimą. Šiame eksperimentiniame procese, biomasės pradinė koncentracija ir tikslinio produkto indukcijos grafikas turi būti parenkami pagal laboratorijoje ar įmonėje įprastai taikomą *E.coli* kultivavimo protokolą. Kultivavimo laikotarpyje, 15-30 minučių diskretiškumu, fiksuojamas *E.coli* bakterijų sunaudotos gliukozės kiekis. Šis kintamasis atspindi *E.coli* bakterijų didžiausią galimą gliukozės įsisavinimo kiekį visame kultivavimo laikotarpyje, ir yra bazinis kintamasis, reikalingas toliau formuoti efektyvius ir atsparius trikdžiams *E.coli* maitinimo gliukoze profilius.

Antrame žingsnyje, pagal *E.coli* bakterijų nelimituoto augimo sąlygomis sunaudotos gliukozės kiekio duomenis, ir pritaikius žinomą lyginančių kubinių splainų

techniką, yra įvertinamas maksimalus gliukozės naudojimo greitis *E.coli* kultivavimo proceso (i) augimo fazėje ir (ii) tikslinio produkto skyrimo fazėje. Remiantis šiais greičio įverčiais, paruošiami gliukozės srauto tiekimo į bioreaktorių profiliai $F_{GI}(t)$, juose pasirinktinai pritaikius įvairius galimus gliukozės tiekimo (tuo pačiu, ir *E.coli* bakterijų augimo greičio) limitavimo lygius (pavyzdžiui, 85%, 90% ar 95%). Limituoto tiekimo maitinimo profiliai suformuojami, ištesus kultivavimo proceso trukmę atvirkščiai-proporcingai pasirinktam limitavimo lygiui (pavyzdžiui, proporciija 1/0.85) - taip, kad bendras gliukozės sunaudojimo numatytas kiekis būtų toks, kaip (a) žingsnio nelimituotame kultivavimo procese sunaudotas gliukozės kiekis. Rekombinantinės *E.coli* kultivavimo procesai susideda iš biomasės augimo fazės (i) ir tikslinio produkto formavimo fazės (ii). Taikant atsparų trikdžiams maitinimo profilį, suplanuojamas į bioreaktorių tiekiamas gliukozės srautas, sudarantis 85-95% maksimalaus gliukozės naudojimo greičio, kuris buvo registruotas pirmame (a) žingsnyje (kultivavimo procese nelimituoto augimo sąlygomis). Šis limituotas gliukozės srautas palaiko aukštą biomasės augimo greitį, bet tuo pat išlaiko ir palyginti žemą gliukozės koncentraciją bioreaktoriuje. Toks subalansuotas maitinimas pagerina kultivavimo proceso valdomumą ir atkartojimą, bei sumažina šalutinių metabolizmo produktų susidarymą. Formuojant maitinimo profilius, galima dar papildomai atsižvelgti ir į ribotas deguonies perdavimo į kultūrinę terpę galimybes ir, priklausomai nuo to, dar atitinkamai mažinti maitinančios gliukozės srautą. Tikslinio produkto sintezės fazei (ii) valdyti, maitinimo profiliuose yra pasirenkami *E.coli* augimo limitavimo lygiai ir, atitinkamai, maitinimo gliukoze srautų lygiai, sudarantys 60-95% maksimalaus gliukozės naudojimo greičio (užfiksuoto nelimituojamo augimo sąlygomis).

Trečiame žingsnyje vykdomi rekombinantinės *E.coli* pusiau-periodiniai kultivavimo eksperimentai, juose naudojant ankstesniu (b) žingsniu suformuotus atsparius trikdžiams maitinimo gliukoze profilius $F_{GI}(t)$. Pagal šių eksperimentų rezultatus, atrenkamas etaloninis kultivavimo profilis, užtikrinantis tinkamiausią proceso atsparumą trikdžiams ir aukštą sintezuojamo tikslinio produkto kiekį. Pagal eksperimentų duomenis, šiam etaloniniam profilui/kultivavimo procesui - taip pat apskaičiuojamas stabilumo indikatorius $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$, kuris yra santykis sunaudoto deguonies kiekio su tiekiamos gliukozės kiekiu, pasirinktame kultivavimo laikotarpyje.

Ketvirtame žingsnyje, atrinktasis etaloninis atsparus trikdžiams maitinimo

profilis realizuojamas rekombinantinės *E.coli* kultivavimo pramoniniame procese. Atrinktas profilis leidžia palaikyti našų, atkartojamą kultivavimo procesą net tada, kai procesą neprognozuojamai veikia tipiniai trikdžiai (trumpalaikiai gliukozės tiekimo sutrikimai, putų slopinimo skysčio impulsai, *E.coli* bakterijų pradinės koncentracijos ir aktyvumo 5-10% nevienodumai). Tačiau, jei šių trikdžių amplitudė yra pakankamai didelė, jie gali ženkliai sumažinti maksimalų specifinį *E.coli* kultūros gliukozės naudojimo greitį, ir kultivavimo procesas taps nestabilus. Tokie didesni trikdžiai vis tik gali sąlygoti nebevaldomą gliukozės kaupimąsi bioreaktoriaus terpėje, metabolizmo antrinių produktų susidarymą ir slopinti tikslinio produkto sintezę. Todėl šiame metode yra numatytas etaloninio maitinimo profilio adaptavimo valdiklis, kuris aktyvuojamas didesnių trikdžių atvejais. Valdiklyje realiu laiku tikrinamos kultivavimo proceso stabilumo indikatorius $Y_{OUR/FGL}(t)$ reikšmės, kurios lyginamos su etaloninio indikatorius $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$ reikšmėmis. Ženklesnis $Y_{OUR/FGL}(t)$ nuokrypis nuo etalono $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$ - signalizuoja apie nepageidaujamą gliukozės kaupimąsi bioreaktoriuje. Adaptavimo valdiklis - tai tipinis proporcinis-integruojantis *PI* valdiklis, reaguojantis į indikatorius $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$ nuokrypius ir formuojantis koreguojantį maitinimo srautą $dF_{GI}(t)$, o *PI* valdiklio korekcijų rezultate į bioreaktorių tiekiamas jau adaptuotas maitinimo srautas $F_{GI_a}(t)$. Profilio adaptavimo funkcija išplečia kultivavimo proceso valdymo metodo galimybes ir leidžia atrinktąjį etaloninį maitinimo profilį taikyti ir tada, kai dėl stiprių trikdžių etaloninis maitinimo profilis pats savaime nebegali palaikyti stabilaus kultivavimo proceso, jo aukšto našumo ir atkartojimo.

Temperatūros ir kitų parametru, sąlygojančių *E.coli* kultivavimo ir bioreaktoriaus procesus, įtaka šiame išradime laikoma neesmine ir išspręsta. Šiuolaikiniai bioreaktoriai turi patikimas T, pH, pO₂ reguliavimo sistemas, kurios aprašyme nedetalizuojamos, ir laikoma, kad jos veikia pakankamai ir tinkamai.

Metodo ir profilių testavimo aplinka. Sukurtas metodas, maitinimo profiliai ir jų efektyvumas patikrinti „virtualiame bioreaktoriuje“ (VBR). Šio VBR funkcija: imituoti realų *E.coli* kultivavimo procesą, kurio metu rekombinantinės *E.coli* bakterijose sintezuojamas Interferono-alfa-5 (IFNa5) baltymas [15, 16]. VBR pagrindas yra rekombinantinės *E.coli* augimo proceso matematinis modelis. Jį sudaro pagrindinių modeliujamų komponentų masės balanso lygtys ir specifinės reakcijos greičio išraiškos, apibūdinančios biocheminės konversijos rodiklius. Pagrindiniai VBR būsenos parametrai yra biomasės koncentracija *X*, gliukozės koncentracija *S*,

tikslinio baltymo IFNa5 koncentracija (procentinė dalis ląstelėje, netirpiuose kūneliuose (angl. *inclusion bodies*)) P_x , kultūrinės terpės svoris W :

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F}{W} \cdot X \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\sigma \cdot X - \frac{F}{W} \cdot S + \frac{F_S}{W} \cdot S_F \quad (2)$$

$$\frac{dP_x}{dt} = Ind \cdot K_p \cdot \mu \quad (3)$$

$$\frac{dW}{dt} = F - F_{smp} \quad (4)$$

Bendras masės srautas į bioreaktorių apskaičiuojamas, įvertinant mėginių ėmimą F_{smp} , substrato tiekimą F_S , rūgštingumo pH valdymo šarminį buferį F_b , terpės svorio nuostolius šalinant CO_2 išleidžiamose dujose F_{CO_2} , ir vandens per ventiliacinį kanalą išgaravimą F_e . VBR uždaviniuose šie srautai modeliuojami pagal empirines priklausomybes, atsižvelgiant į biomasės augimo dinamiką ir kitus svarbius biotechnologinio proceso kintamuosius:

$$F_b = Y_{XB} \cdot \mu \cdot X \cdot W \quad (5)$$

$$F_{CO_2} = -R \cdot OUR_W \quad (6)$$

$$F_e = -k_e \cdot W \quad (7)$$

$$F = F_S + F_b + F_{CO_2} + F_e \quad (8)$$

Be to, yra apskaičiuojamas deguonies pasisavinimo greitis OUR (svorio vienetai, ir visai augimo terpės masei), susiejant du komponentus, kuriuose deguonis suvartojamas (i) biomasei auginti ir (ii) biomasei palaikyti:

$$OUR = Y_{OX} \cdot \mu \cdot X + m_{OX} \cdot X \quad (9)$$

$$OUR_W = OUR \cdot W. \quad (10)$$

Specifiniai pagrindinių komponentų - gliukozės S ir biomasės X - reakcijų greičiai modeliuojami naudojant kinetinius ryšius, atspindinčius reakcijų greičio ribojimą ir slopinimą. Specifinis gliukozės suvartojimo greitis σ yra sąlygotas substrato ribojimo, bei slopinimų dėl didelės biomasės koncentracijos ir ląstelių viduje netirpiuose kūneliuose (*inclusion bodies*) sintetiamo tikslnio baltymo koncentracijos:

$$\sigma = \sigma_{max} \frac{S}{K_S + S} \cdot \frac{K_X}{K_X + X} \cdot \frac{K_{P_x}}{K_{P_x} + P_x} \quad (11)$$

Specifinis biomasės augimo greitis μ modeliuojamas atsižvelgiant į substrato sunaudojimą augimui ir gyvybingumo palaikimui, m . Esant didelei gliukozės koncentracijai, rekombinantinė *E.coli* išskiria acetatus ir kitus šalutinius perteklinio metabolizmo produktus. Dėl to sumažėja biomasės išeiga, o susidarantys šalutiniai produktai gali slopinti gliukozės vartojimo greitį. Tiriamame kultivavimo procese, šių šalutinių produktų sąlygojamas slopinimas buvo nereikšmingas, todėl specifinis biomasės augimo greitis modeliuojamas naudojant šią supaprastintą lygtį:

$$\mu = (\sigma - m) \cdot Y_{XS} \cdot \frac{K_{YS}}{K_{YS} + S} \quad (12)$$

Tiriamame procese, inicijuotas tikslinio baltymo IFNa5 formavimas pridant racionalių induktoriaus (IPTG) kiekį, kai biomasės koncentracija X kultivavimo metu viršijo 40 g/kg ($Ind=0$, iki kol $X < 40 \text{ g/kg}$, ir $Ind=1$ po $X \geq 40 \text{ g/kg}$). Tikslinis baltymas formuojamas *E.coli* ląstelėse susidarančiuose netirpiuose kūneliuose (*inclusion bodies*), o formavimosi greitis šiuo atveju buvo proporcingas specifiniam augimo greičiui. Modelio lygčių (1-12) parametrai buvo nustatyti pagal eksperimentinius duomenis iš 15 pusiau-periodinių rekombinantinės *E.coli* kultivavimo procesų, atliktų 7 L bioreaktoriuje (darbinis tūris 3 L) [16]. Parengtas modelis tinkamai apibūdina rekombinantinės *E.coli* kultivavimo procesą, o modelio kokybė pakankama, kad ištestuoti šiuo išradimu sukurtą maitinimo profilių formavimo ir adaptavimo metodiką. Parengtas modelis realizuotas su VBR naudotojo patogia sąsaja, leidžiančia imituoti įvairius maitinimo scenarijus bei tipinius kultivavimo proceso trikdžius, o taip pat matavimų triukšmus. Toliau, VBR modelis buvo panaudotas ištestuoti maitinimo profilių formavimo ir adaptavimo procedūros efektyvumą.

Duomenų analizė ir maitinimo profilių sudarymas. Pagal metodo seką, pirmame žingsnyje, neriboto augimo sąlygomis, vykdomas kultivavimo eksperimentas su tipinėmis pradinėmis sąlygomis, kad nustatyti maksimalų ląstelių gliukozės suvartojimo pajėgumą. Pradinė biomasės koncentracijos ir kultūros indukcijos grafikas atitiko tipinį *E.coli* augimo ciklą. Eksperimentui naudotas minėtas VBR modelis, kuriame gliukozės koncentracija S buvo rankiniu būdu kontroliuojama 1–1,5 g/kg ribose, pradinė biomasės koncentracija $X(0)=0,15 \text{ g/kg}$, o indukcija pradėta, kai biomasės koncentracija X viršijo 40 g/kg. Kultivavimo metu, kas pusvalandį fiksuojamas į bioreaktorių tiekiamos grynos gliukozės kiekis *cumFgl*, ir matuojama biomasės koncentracija, bei tikslinio produkto koncentracija. Be to,

auginimo metu realiu-laiku fiksuojamas dar vienas svarbus parametras - deguonies pasisavinimo greitis *OUR*. Šių esminių kintamųjų kitimas kultivavimo laikotarpyje (neribotos gliukozės sąlygomis) parodytas 2 paveiksle. Gauti gliukozės vartojimo duomenys *cumFgl* naudojami gliukozės suvartojimo greičiui įvertinti taikant išlyginamųjų kubinių splainų metodą. Remiantis didžiausiu gliukozės suvartojimo greičiu, sukurti įvairūs maitinimo greičio scenarijai (profiliai), su skirtingais gliukozės vartojimo greičio / tiekimo ribojimo lygiais - (i) biomasės augimo fazėje ir (ii) tikslinių baltymų sintezės fazėje. Maitinimas gliukoze pradedamas, kai bioreaktoriuje pradinė gliukozė jau sunaudota. Visuose maitinimo scenarijuose, į bioreaktorių patiekiamas bendras gliukozės kiekis yra vienodas. Todėl kultivavimo procesai/ eksperimentai su ribotu gliukozės vartojimo greičiu išsitęsia laike, ir yra atitinkamai ilgesni.

Suplanuoti kultivavimo eksperimentai atlikti „virtualiame bioreaktoriuje“. Jų rezultatai, su skirtingais maitinimo profiliais bei ribojimo lygiais, parodyti 3 paveiksle. Pagal šiuos rezultatus, galima pasirinkti efektyvų maitinimo profilį.

Efektyvių profilių parinkimas. Kultivavimo eksperimentų VBRe analizės duomenys teikia galimybę įvertinti proceso kokybę įvairių maitinimo gliukoze profilių atvejais. Svarbu pažymėti, kad tiriamais atvejais tikslinis baltymas susidaro *E.coli* ląstelėse netirpių kūnelių (*inclusion bodies*) pavidalu, o baltymų sintezės greitis yra proporcingas specifiniam augimo greičiui. Todėl siekiant efektyvios baltymų gamybos, pirmenybė teikiama dideliame gliukozės vartojimo greičiui. Kita vertus, per didelis vartojimo greitis didina šalutinių metabolinių produktų susidarymą ir augimo greitis mažėja. Kaip matyti rezultatuose 3 paveiksle, kultivavimo eksperimentas su nedideliu gliukozės ribojimu (maitinimo greitis yra 0,95 neriboto maitinimo) leidžia pasiekti efektyviausią procesą ir didžiausią pagaminamą tikslinio baltymo kiekį. Tačiau, siekiant užtikrinti ir didesnę proceso pakartojamumą bei stabilumą - naudinga parinkti maitinimo profilį, kuris apimtų tik 90% neriboto maitinimo. Šiuo atveju, kultivavimo pabaigoje gautas tikslinio baltymo kiekis 6,3 g ir yra apie 3% mažesnis, nei būtų gautas neriboto maitinimo atveju, tačiau - kultivavimo procesas tampa atsparesnis įvairiems trikdžiams. Todėl šis maitinimo profilis parinktas, kaip etaloninis tolesniems tyrimams.

Maitinimo profilio atsparumo trikdžiams testavimas. Pasirinkto etaloninio profilio atsparumas trikdžiams išbandytas, sukūrus tipinius trikdžius kultivavimo procese. Modeliavimo eksperimentai rodo, kad etaloninis maitinimo gliukoze profilis

užtikrina efektyvų ir stabilų *E.coli* kultivavimo procesą, kai pradinė biomasės koncentracija skiriasi $\pm 15\%$ ribose nuo tipinės vertės. Taip pat, kultivavimo procesas išlieka efektyvus ir stabilus, imitavus trumpalaikį (5 min.) specifinio gliukozės pasisavinimo greičio sumažėjimą (iki 50%). Tokie trikdžiai yra būdingi realiuose kultivavimo procesuose, ypač kai į bioreaktorių įpurškiamas putojimo slopinimo skystis. Šis veiksmas gali ženkliai sumažinti gliukozės suvartojimą ir biomasės augimo greitį trumpuoju laikotarpiu, tačiau maitinimo profilio atsparumo dėka, jis neturi reikšmingos įtakos kultivavimo procesui. Naudojant etaloninį profilį, kultivavimo procesas išlieka stabilus, kol maksimalus specifinis gliukozės suvartojimas σ_{max} nemažėja daugiau kaip 3%. Esminių kintamųjų kitimas tipiškame rekombinantinės *E.coli* kultivavimo procese, su tipiniais trikdžiais ir be jų, parodytas 4 paveiksle. Kaip matyti, įvykus palyginti reikšmingiems trikdžiams, tikslinio baltymo kiekis gaunamas vos 2,9% mažesnis, nei būtų gautas procese be trikdžių.

Modeliavimo rezultatai rodo, kad maitinimo profiliai, suformuoti šio išradimo metodu (indukcija pradedama, kai gliukozės suvartojimas *cumFgl* viršija 0,425 kg), užtikrina stabilų *E.coli* kultivavimo procesą su savireguliacija. Todėl maži sutrikimai, būdingi realiuose kultivavimo procesuose, ypač pradinės biomasės koncentracijos nuokrypiai ar trumpalaikiai specifinio gliukozės vartojimo normos sutrikimai, taip pat, nedideli specifinio maksimalaus substrato vartojimo greičio pokyčiai - reikšmingai nekeičia kultivavimo proceso kokybės: pagaminta biomasė ir tikslinio baltymo kiekiai išlieka tame pačiame reikšmių intervale, kaip ir netrikdomo proceso atveju. Daroma išvada, kad kultivavimo procesą veikiant nedideliems trikdžiams, maitinimo profilį adaptuoti nėra būtina. O tai itin svarbu pramoninio kultivavimo procesuose, kuriuose įgyvendinti bet kokius papildomus procesų korekcijos ar stabilizavimo veiksmus, yra reikalingi sudėtingi proceso taisyklių ir receptų pakeitimai.

Maitinimo profilio adaptavimas kultivavimo procese. Tačiau, pramoniniuose kultivavimo procesuose gali pasitaikyti ir didesnių trikdžių, kurių atveju etaloninis maitinimo profilis nebepajėgia palaikyti proceso stabilumo, todėl kultivavimo procesas gali destabilizuotis ir tapti neefektyvus dėl bioreaktoriuje susikaupusio didelio gliukozės kiekio. Tipiškas eksperimentinis pavyzdys pavaizduotas 5 paveiksle. Jame imituota, kad dėl *E.coli* bakterijos tam tikrų pokyčių, kultivavimo metu maksimalus specifinis gliukozės vartojimo greitis sumažėjo 4%. Tai nulėmė gliukozės kaupimąsi, pablogėjo proceso kokybė, o pagamintas tikslinio baltymo kiekis sumažėjo 35%.

Tokiems atvejams, yra numatytas kultivavimo proceso valdymo žingsnis netiesiogiai stebėti gliukozės kaupimąsi kultivavimo terpėje ir realiu laiku adaptuoti etaloninį gliukozės maitinimo profilį. Šiuo tikslu, realiuoju laike atliekamas realaus deguonies sunaudojimo tiekiamai gliukozei santykio vertinimas, naudojant slenkančio lango metodą (30 sek. langas) ir palyginamas su etaloniniu indikatoriumi Y_{OUR/Fgl_set} , kurio laikinis profilis pateiktas paveiksle 6 (b). Adaptuoti etaloninio maitinimo profilį naudojamas pokyčių formos (angl. *velocity form*) proporcinis-integruojantis PI valdiklis. Etaloninio maitinimo profilio adaptavimo realiu laiku schema parodyta 6 (a) paveiksle. Šis etaloninio profilio adaptavimo žingsnis leido pašalinti perteklinį gliukozės kaupimąsi bioreaktoriaus terpėje ir pagerino tikslinio baltymo gamybos efektyvumą.

Profilio adaptavimo rezultatai parodyti 7 paveiksle. Kaip matyti iš grafiko, profilio adaptavimo žingsnis padėjo išvengti per didelio gliukozės kaupimosi kultivavimo terpėje ir pagerino proceso kokybę. Pagaminto tikslinio baltymo gautas kiekis 5,9 g yra artimas baltymo kiekiui 6,3 g, kuris gautas pirminiame etaloniniame kultivavimo procese. Tuo tarpu, kultivavimo procese, kuriame nebuvo suvaldytas gliukozės kaupimasis, pagaminto tikslinio baltymo kiekis gautas tik 4,3 g.

Taikymai. Šiuo išradimu atskleistas atsparių trikdžiams (angl. *robust*) maitinimo gliukoze profilių kūrimo ir adaptavimo būdas įgalina realizuoti stabilius, atsikartojančius ir našius pusiau periodinių rekombinantinių *E.coli* kultivavimo procesus, kurių metu gali būti sintezuojami įvairios paskirties biofarmaciniai tiksliniai produktai.

Išradimo aprašyme buvo išvardinta eilė metodo charakteristikų ir privalumų, kurių detalės gali būti keičiamos nenutolstant nuo išradimo principų, vadovaujantis plačiausiai suprantamomis apibrėžties punktuose naudojamų sąvokų reikšmėmis.

NEPATENTINĖS LITERATŪROS SĄRAŠAS

[1] 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).

[2] Kuprijanov A., Schaepe S., Aehle M., Simutis R., Lübbert A., "*Improving cultivation processes for recombinant protein production*" // Bioprocess and Biosystems Engineering. Berlin: Springer. ISSN 1615-7591. 2012, Vol. 35, iss. 3, p.

333-340).

[3] V. Galvanauskas, R. Simutis, D. Levišauskas, M. Butkus and R. Urniežius, "*Development and Investigation of Efficient Substrate Feeding and Dissolved Oxygen Control Algorithms for Design of Recombinant E. coli Cultivation Process*", 2018 IEEE 14th International Conference on Automation Science and Engineering (CASE), Munich, 2018, pp. 657-660, doi: 10.1109/COASE.2018.8560495).

[4] V.A. Bumelis, "Method for producing interferon alpha 5," European Patent No. EP2532734A1, Jan 31, 2011.

[5] R. Urniežius, A. Survyla, D. Paulauskas, V.A. Bumelis, and V. Galvanauskas, "Generic Estimator of Biomass Concentration for Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae Fed-Batch Cultures Based on Cumulative Oxygen Consumption Rate," *Microbial Cell Factories*, vol. 18, 190, Nov. 2019.

APIBRĖŽTIS

1. Būdas valdyti bioreaktoriuje rekombinantinių *E.coli* pusiau-periodinį kultivavimo procesą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad paremtas eksperimentinių *E.coli* maitinimo profilių formavimu ir adaptavimu, apimantis mažiausiai šiuos žingsnius:

a) eksperimentiškai įvertinamas *E.coli* bakterijų didžiausias galimas gliukozės įsisavinimo kiekis, neriboto augimo sąlygomis;

b) iš gliukozės įsisavinto kiekio duomenų, įvertinamas gliukozės sunaudojimo maksimalus greitis *E.coli* kultivavimo procese, ir paruošiami atsparūs proceso trikdžiams gliukozės tiekimo į bioreaktorių profiliai $F_{GI}(t)$;

c) profiliai $F_{GI}(t)$ eksperimentiškai testuojami bei iš jų, pagal kultivavimo proceso atsparumą trikdžiams ir tikslinio produkto kiekį, atrenkamas etaloninis profilis ir paskaičiuojamas kultivavimo proceso stabilumo indikatorius $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$, kuris yra santykis sunaudoto deguonies kiekio su tiekiamos gliukozės kiekiu pasirinktam laiko intervalui;

d) etaloninis maitinimo profilis įdiegiamas *E.coli* kultivavimo procese, naudojant profilio adaptavimo valdiklį PI koreguoti gliukozės srautą $F_{GL_a}(t)$, pagal skirtumą tarp realaus kultivavimo proceso stabilumo indikatoriaus $Y_{OUR/FGL}(t)$ ir etaloninio proceso indikatoriaus profilio $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$.

2. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad pirmajame (a) žingsnyje atliekamas rekombinantinės *E.coli* pusiau-periodinis kultivavimo eksperimentas, kontroliuojant terpėje gliukozės koncentraciją, užtikrinančią artimą maksimaliam gliukozės sunaudojimo greitį, bet neleidžiančią intensyviai skirtis antriniam metabolizmo produktams, stabdantiems bakterijų augimą ir tikslinio produkto sintezę, o kultivavimo metu fiksuojamas sunaudotos gliukozės kiekis, kuris laikomas *E.coli* bakterijų didžiausiu galimu gliukozės įsisavinimo kiekiu kultivavimo proceso metu.

3. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad antrajame (b) žingsnyje, pagal kultivavimo metu sunaudotos gliukozės kiekio surinktus eksperimentinius duomenis bei naudojant lyginančių kubinių splineų techniką, įvertinamas maksimalus gliukozės sunaudojimo greitis (i) *E.coli* bakterijų augimo fazėje ir (ii) tikslinio produkto skyrimo fazėje, bei, remiantis šiais gliukozės naudojimo

greičio įverčiais, paruošiami gliukozės srauto tiekimo į bioreaktorių profiliai, suformuoti su gliukozės sunaudojimo greičio *E.coli* kultivavimo procese limitavimo lygiais.

4. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad trečiajame (c) žingsnyje atliekami rekombinantinės *E.coli* pusiau-periodiniai kultivavimo eksperimentai realizuojant suplanuotus atsparius trikdžiams gliukozės tiekimo į bioreaktorių profilius $F_{GI}(t)$ ir pagal jų rezultatus atrenkamas etaloninis kultivavimo procesas, kuris užtikrina tinkamą proceso atsparumą trikdžiams ir aukštą tikslinio produkto kiekį, taip pat, remiantis eksperimentiniais duomenimis etaloniniam procesui paskaičiuojamas kultivavimo proceso stabilumo indikatorius profilis $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$, kuris randamas paskaičiuojant kultivavimo metu sunaudoto deguonies kiekio santykį su tiekiamos į bioreaktorių gliukozės kiekiu per pasirinktą laiko intervalą;

5. Būdas pagal 1 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad ketvirtajame (d) žingsnyje etaloninis profilis įdiegiamas pramoniniame rekombinantinės *E.coli* kultivavimo procese, o proceso metu atsiradus ženkliais neprognozuojamiems trikdžiams, galintiems sukelti proceso nestabilumą, aktyvuojamas etaloninio gliukozės maitinimo profilio adaptavimo valdiklis PI , kuris:

- realiu laiku registruoja kultivavimo proceso stabilumo indikatorius reikšmę $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$, kuris yra santykis sunaudoto deguonies kiekio su tiekiamos gliukozės kiekiu,
- lygina $Y_{OUR/FGL}(t)$ su etaloninio proceso indikatorius $Y_{OUR/FGL_etal}(t)$ reikšmėmis,
- pagal gautą skirtuminį nuokrypį adaptuoja etaloninį gliukozės maitinimo srautą $F_{GL_a}(t)$, tiekiamą į bioreaktorių.

6. Būdas pagal 1 ir 3 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (i) *E.coli* bakterijų augimo fazėje, *E.coli* bakterijų gliukozės naudojimo greičio limitavimo lygiai yra 85-95% maksimalaus gliukozės sunaudojimo greičio.

7. Būdas pagal 1 ir 3 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad (ii) tikslinio produkto sintezės fazėje, *E.coli* bakterijų gliukozės naudojimo greičio limitavimo lygiai yra 60-95% maksimalaus gliukozės sunaudojimo greičio.

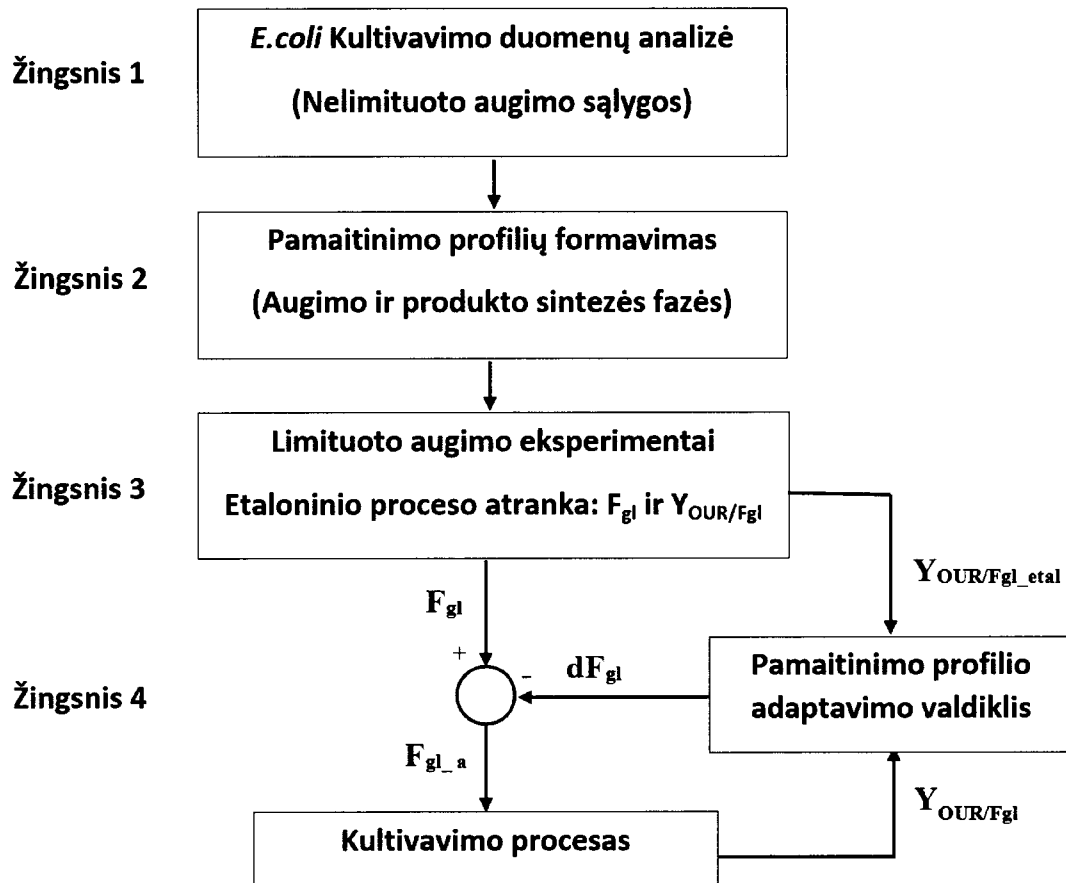
8. Būdas pagal 1, 3, 6-7 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tiriamam procesui (i) *E.coli* bakterijų augimo fazėje ir (ii) tikslinio produkto - baltymo IFNa5 -

sintezės fazėje, efektyviausiai gamybai pasiekti, gliukozės naudojimo greičio limitavimo lygis yra 95% maksimalaus gliukozės naudojimo greičio.

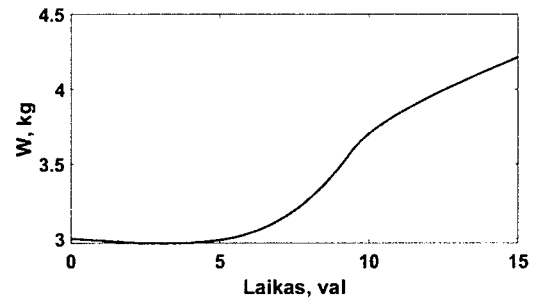
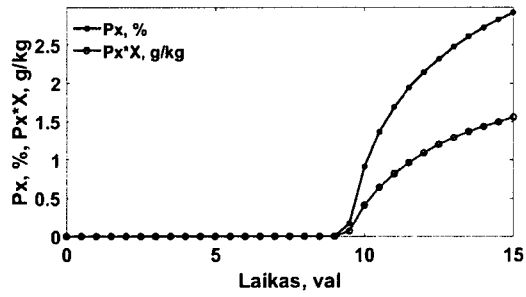
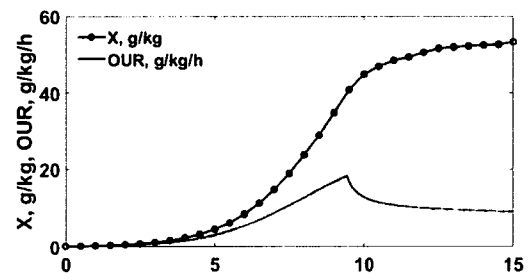
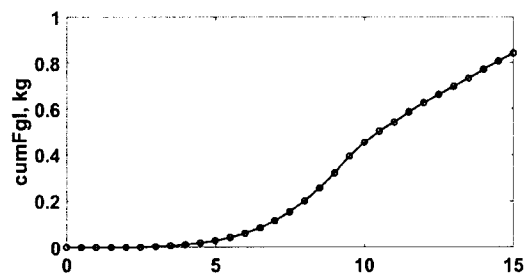
9. Būdas pagal 1, 3, 6-8 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad tiriamam procesui (i) *E.coli* bakterijų augimo fazėje ir (ii) tikslinio produkto - baltymo IFNa5 - sintezės fazėje, efektyviausiai gamybai ir stabiliam kultivavimo procesui kartu pasiekti, tinkamiausias gliukozės naudojimo greičio limitavimo lygis yra 90% maksimalaus gliukozės naudojimo greičio.

10. Būdas pagal 1 ir 5 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad etaloninio gliukozės maitinimo profilio adaptavimo valdiklis *PI* yra pokyčių formos proporcinis-integralinis valdiklis.

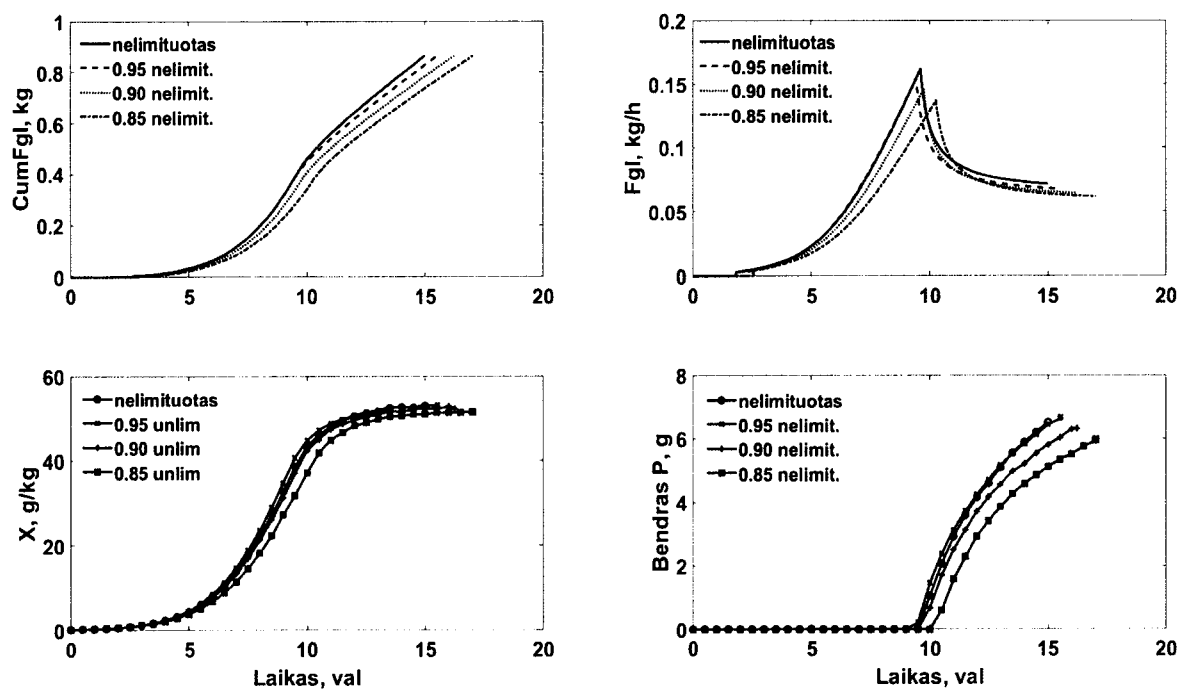
BRĖŽINIAI



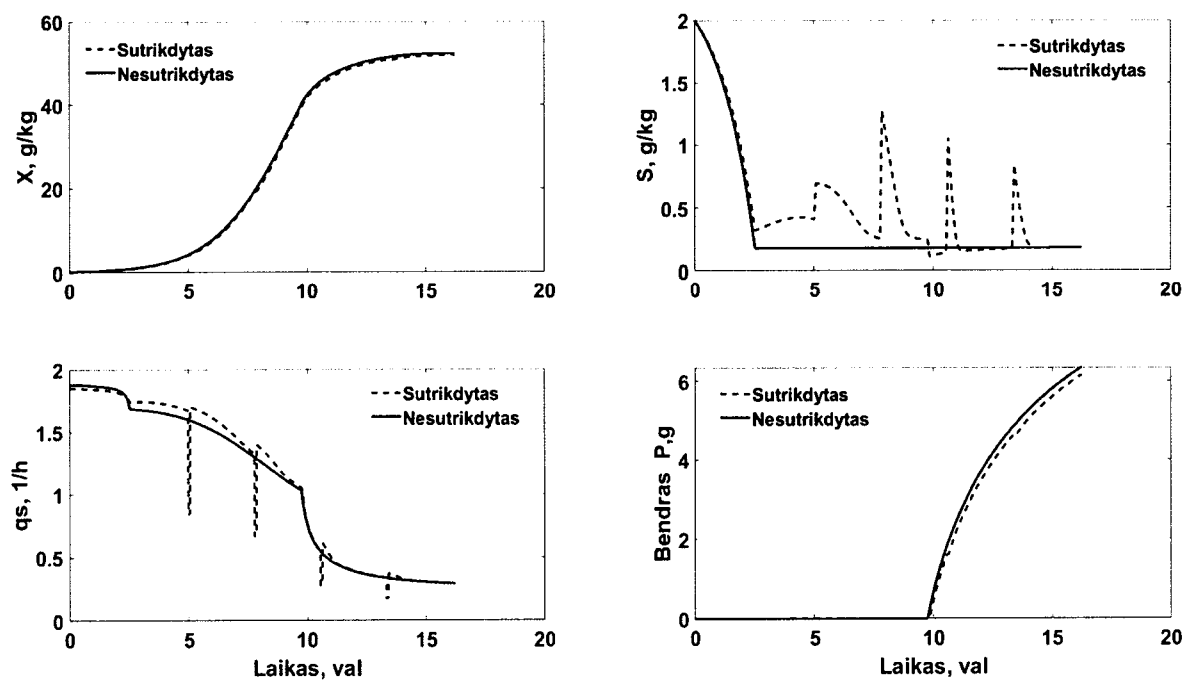
1 pav.



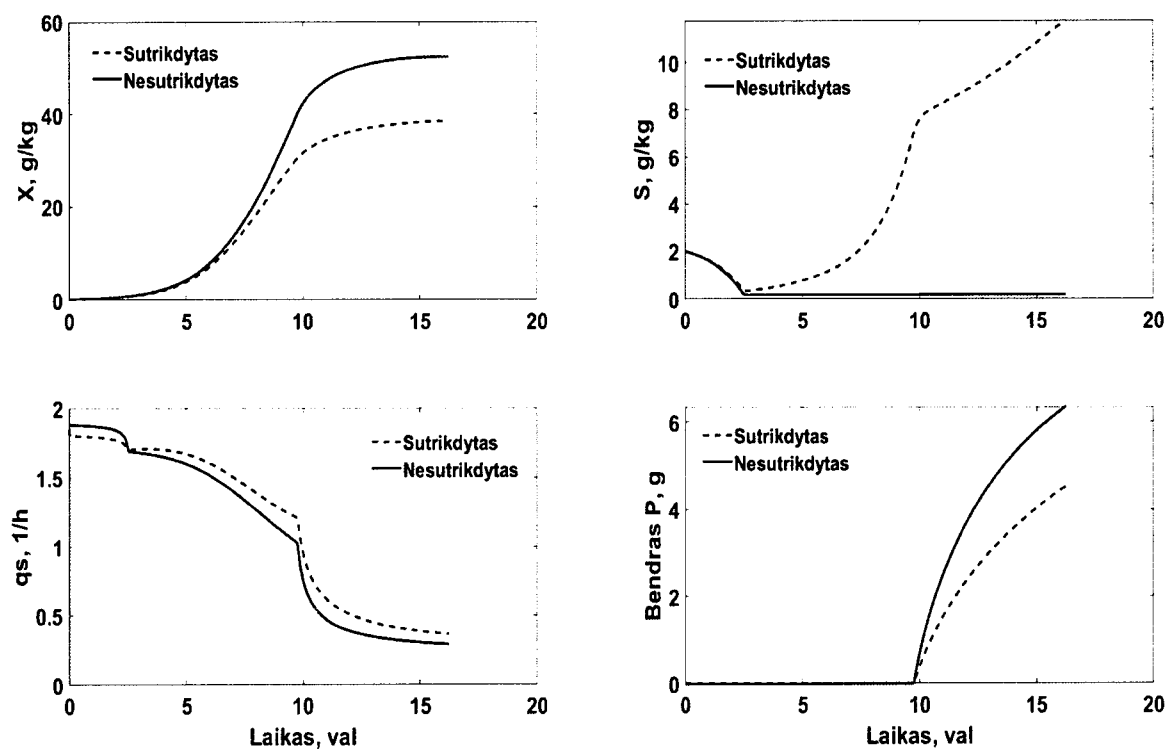
2 pav.



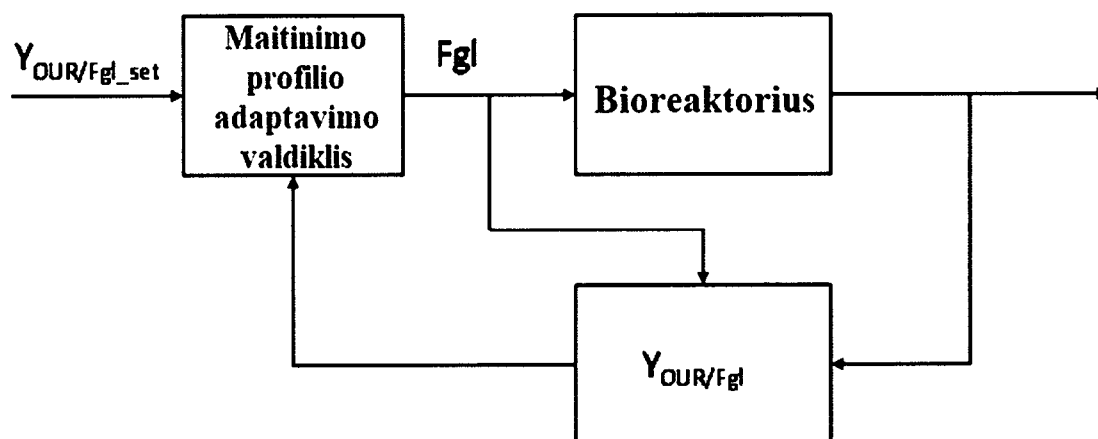
3 pav.



4 pav.

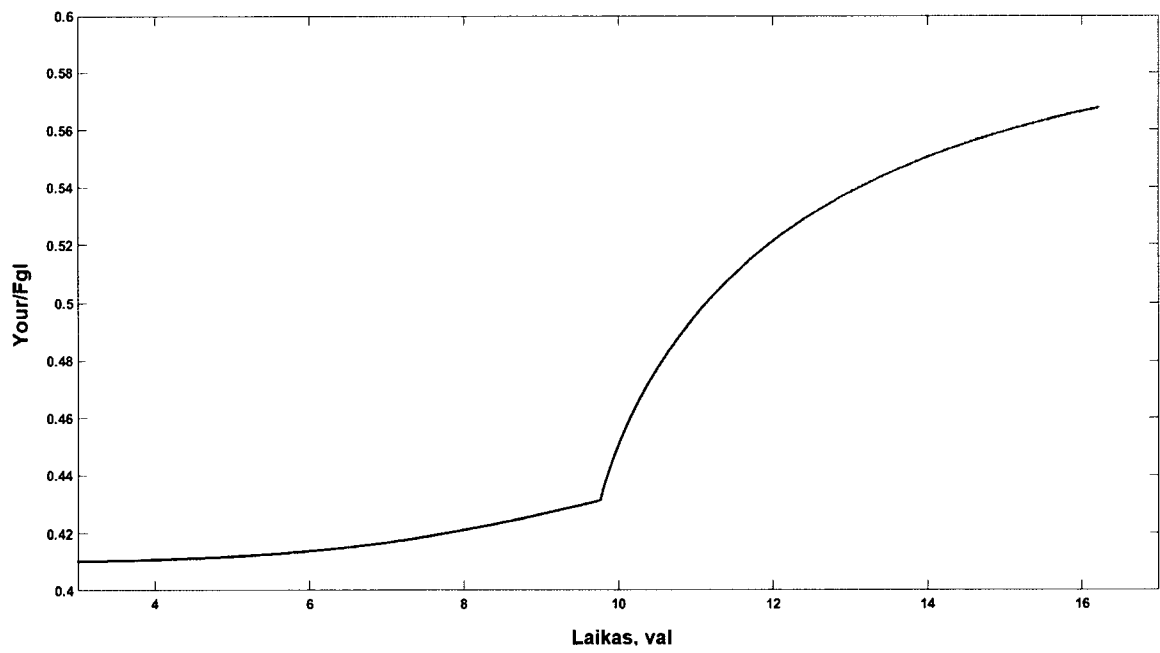


5 pav.



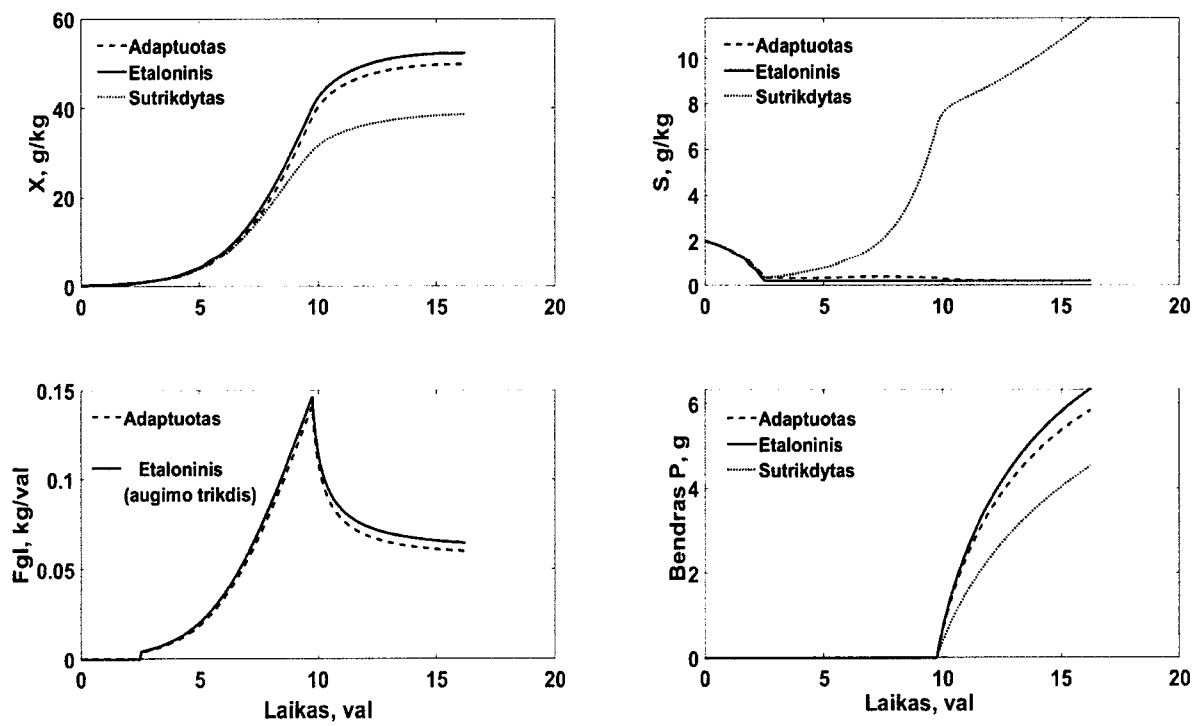
a)

6 pav.



b)

6 pav.



7 pav.