

**Emīls Bolmanis**

**CEĻĀ UZ INDUSTRIJU 4.0: REĀLLAIKA MONITORINGS,  
HIBRĪDĀ MODELĒŠANA UN PROGNOZĒJOŠĀ VADĪBA  
*PICHIA PASTORIS* FERMENTĀCIJĀS**

Promocijas darba kopsavilkums



# RĪGAS TEHNISKĀ UNIVERSITĀTE

Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultāte  
Biomateriālu un bioinženierijas institūts

**Emīls Bolmanis**

Doktora studiju programmas “Ķīmija, materiālzinātne un tehnoloģijas” doktorants

## CEĻĀ UZ INDUSTRIJU 4.0: REĀLLAIKA MONITORINGS, HIBRĪDĀ MODELĒŠANA UN PROGNOZĒJOŠĀ VADĪBA *PICHA* *PASTORIS* FERMENTĀCIJĀS

Promocijas darba kopsavilkums

Zinātniskie vadītāji  
vadošais pētnieks *Dr. biol.*  
ANDRIS KAZĀKS

profesors *Dr. sc. ing.*  
JURIS VANAGS

Konsultants  
profesors *Dr. sc. ing.*  
VYTAUTAS GALVANAUSKAS

RTU Izdevniecība  
Rīga 2026

Bolmanis, E. Ceļā uz Industriju 4.0: reāllaika monitorings, hibrīdā modelēšana un prognozējošā vadība *Pichia Pastoris* fermentācijās. Promocijas darba kopsavilkums. Rīga: RTU Izdevniecība, 2026. 50 lpp.

Publicēts saskaņā ar promocijas padomes “RTU P-01” 2026. gada 9. decembra lēmumu, protokols Nr. 04030-9.1/77.

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā, Rīgas Tehniskajā universitātē un Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūtā.



Darbs izstrādāts ar Eiropas Sociālā fonda atbalstu darbības programmas “Izaugsme un nodarbinātība” 8.2.2. specifiskā atbalsta mērķa “Stiprināt augstākās izglītības institūciju akadēmisko personālu stratēģiskās specializācijas jomās” projektā Nr. 8.2.2.0/20/I/008 un ar Eiropas Savienības Atveseļošanas un noturības mehānisma atbalstu projektā Nr. 5.2.1.1.i.0/2/24/I/CFLA/003 “Konsolidācijas un pārvaldības izmaiņu ieviešana Rīgas Tehniskajā universitātē, Liepājas Universitātē, Rēzeknes Tehnoloģiju akadēmijā un Latvijas Jūras akadēmijā un Liepājas Jūrniecības koledžā virzībai uz izcilību augstākajā izglītībā, zinātnē un inovācijās” akadēmiskās karjeras doktorantūras grantu ietvaros. Autors izsaka pateicību RTU HPC centram par piekļuves nodrošināšanu augstas veiktspējas skaitļošanas infrastruktūrai.

NACIONĀLAIS  
ATTĪSTĪBAS  
PLĀNS 2020

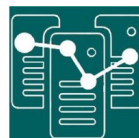


EIROPAS SAVIENĪBA  
Eiropas Sociālais  
fonds



Finansē  
Eiropas Savienība  
NextGenerationEU

2027  
Nacionālais  
attīstības plāns



I E G U L D Ī J U M S T A V Ā N Ā K O T N Ē

Vāka attēls no [www.shutterstock.com](http://www.shutterstock.com).

<https://doi.org/10.7250/9789934372827>

ISBN 978-9934-37-282-7 (pdf)

# PROMOCIJAS DARBS IZVIRZĪTS ZINĀTNES DOKTORA GRĀDA IEGŪŠANAI RĪGAS TEHNISKAJĀ UNIVERSITĀTĒ

Promocijas darbs zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai tiek publiski aizstāvēts 2026. gada 29. aprīlī plkst. 14 Rīgas Tehniskās universitātes Dabaszinātņu un tehnoloģiju fakultātē, Paula Valdena ielā 3, 272. auditorijā.

## OFICIĀLIE RECENZENTI

Asoc. prof. *Dr. sc. ing.* Linda Mežule,  
Rīgas Tehniskā universitāte

Profesors *Dr. biol.* Uldis Kalnenieks,  
Latvijas Universitāte, Latvija

Profesors, *Ph. D. Rui Manuel Freitas Oliveira*,  
Lisabonas NOVA Universitāte, Portugāle

## APSTIPRINĀJUMS

Apstiprinu, ka esmu izstrādājis šo promocijas darbu, kas iesniegts izskatīšanai Rīgas Tehniskajā universitātē zinātnes doktora (*Ph. D.*) grāda iegūšanai. Promocijas darbs zinātniskā grāda iegūšanai nav iesniegts nevienā citā universitātē.

Emīls Bolmanis ..... (paraksts)

Datums: .....

Promocijas darbs sagatavots kā tematiski vienotu zinātnisko publikāciju kopa ar kopsavilkumu latviešu un angļu valodā. Tajā ietverti pieci zinātniskie oriģinālraksti angļu valodā. Promocijas darba kopējais apjoms, ieskaitot pielikumus, ir 205 lpp.

## ANOTĀCIJA

Promocijas darbs sniedz ieguldījumu rekombinanto *Pichia pastoris* (pārklasificēts kā *Komagataella phaffii*) fermentāciju inženierijas attīstībā, izstrādājot un integrējot uzlabotas stratēģijas reāllaika procesu monitoringam, prognozējošai modelēšanai un procesa vadībai, uzsverot datus balstītu pieeju, kas atbilst ceturtās industriālās revolūcijas principiem. Kā pētāmos objektus izmantojot rekombinantās *P. pastoris* šūnu līnijas, kas producē cilvēka B hepatīta vīrusa kodola antigēnu (HBcAg), sojas leghemoglobīnu (LegH) un bakteriofāga Qβ apvalka proteīnu, tiek risināti būtiski tehnoloģiskie izaicinājumi fermentācijās ar substrāta piebarošanu (*fed-batch*).

Darba pirmajā daļā uzmanība pievērsta sensoru sistēmu validācijai un signālu kvalitātes uzlabojumiem šūnu biomasas, metanola koncentrācijas un bioreaktora izplūdes gāzu sastāva monitoringam reāllaikā. Tika izstrādāti sensoru signālu apstrādes algoritmi, lai uzlabotu iegūto datu kvalitāti un sensoru rādījumu ticamību fermentācijas laikā.

Otrajā daļā pētītas mehānistiskās, datus balstītās un hibrīdās modelēšanas pieejas, izvērtējot to prognozēšanas precizitāti un robustumu. Hibrīdo modeļu izstrādē tika izmantota zināšanu pārneses mācīšanās (*transfer learning*) pieeja, kas ļāva izmantot vēsturisko fermentāciju datus jauna produkta fermentācijas modeļa izveidei, samazinot eksperimentiem nepieciešamo laiku un resursus.

Visbeidzot, promocijas darba trešajā daļā atspoguļota uzlabotu procesa vadības stratēģiju ieviešana. Klasisks proporcionāli integrālais (PI) kontrolieris tika izmantots metanola koncentrācijas regulēšanai reāllaikā, savukārt uz hibrīdā procesa modeļa balstītais prognozējošās vadības (*MPC*) ietvars kontrolēja piebarošanas ātrumu, nodrošinot šūnu biomasas pieaugumu, saskaņā ar izvēlētu trajektoriju. *MPC* sistēma demonstrēja labu noturību mainīgajos procesa apstākļos, apliecinot tās piemērotību procesa vadībai fermentācijās.

Darbs strukturēts kā tematiski vienota četru oriģinālu zinātnisko rakstu un viena apskatraksta kopa, kas sniedz ieguldījumu fermentāciju inženierijas prakses modernizācijā. Tajā iekļauti kopsavilkumi angļu un latviešu valodā, 14 attēli, viena shēma, trīs tabulas un pieci pielikumi, kopējais apjoms – 205 lappuses.

# SATURS

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| SAĪSINĀJUMI .....                                                     | 6  |
| PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS.....                          | 7  |
| Ievads .....                                                          | 7  |
| Pētījuma mērķis un uzdevumi .....                                     | 9  |
| Aizstājamās tēzes .....                                               | 10 |
| Zinātniskā novitāte.....                                              | 10 |
| Praktiskā nozīme.....                                                 | 11 |
| Promocijas darba struktūra un apjoms .....                            | 11 |
| Promocijas darba aprobācija un publikācijas .....                     | 12 |
| PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI .....                             | 15 |
| 1. Literatūras apskats.....                                           | 15 |
| 2. Fermentāciju reāllaika monitorings.....                            | 18 |
| 2.1. Šūnu biomasas mērījumi.....                                      | 18 |
| 2.2. Metanola koncentrācijas mērījumi .....                           | 20 |
| 2.3. Reaktora izejas gāzu sastāva analīze .....                       | 21 |
| 2.4. Biomasas sensoru signāla anomāliju noteikšana un korekcija ..... | 22 |
| 3. <i>P. pastoris</i> fermentāciju modelēšana .....                   | 26 |
| 3.1. Mehānistiskā modelēšana .....                                    | 26 |
| 3.2. Datos balstīta modelēšana.....                                   | 29 |
| 3.3. Hibrīdā modelēšana .....                                         | 30 |
| 3.4. Modeļu veidu salīdzinājums .....                                 | 32 |
| 3.5. Pārneses mācīšanās.....                                          | 36 |
| 4. Fermentācijas procesu vadība .....                                 | 39 |
| 4.1. Metanola koncentrācijas kontrole .....                           | 39 |
| 4.2. Uz modeli balstīta prognozējošā vadība .....                     | 41 |
| SECINĀJUMI .....                                                      | 45 |
| LITERATŪRAS SARAKSTS .....                                            | 46 |

## SAĪSINĀJUMI

|                  |                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <i>AICc</i>      | Akaike informācijas kritērijs                                            |
| <i>ADAM</i>      | adaptīvais momenta novērtēšanas algoritms                                |
| <i>AI</i>        | mākslīgais intelekts                                                     |
| <i>ANN</i>       | mākslīgais neironu tīkls                                                 |
| <i>AOXI</i>      | alkohola oksidāzes I promoters                                           |
| <i>CER</i>       | oglekļa dioksīda izdalīšanas ātrums                                      |
| <i>DCW</i>       | sausu šūnu masas svars                                                   |
| <i>DNN</i>       | dziļais neironu tīkls                                                    |
| <i>DO</i>        | izšķīdušā skābekļa koncentrācija                                         |
| <i>DRA</i>       | dubultā slidošā vidējais                                                 |
| <i>FC</i>        | pilnībā savienotais (slānis)                                             |
| <i>GRAS</i>      | atzīts par drošu lietošanai ( <i>Generally Recognized As Safe</i> )      |
| <i>HBcAg</i>     | B hepatīta vīrusa kodola antigēns                                        |
| Industrija 4.0   | ceturtnā industriālā revolūcija                                          |
| <i>IQR</i>       | interkvartīļu diapazons                                                  |
| <i>LegH</i>      | sojas leghemoglobīns                                                     |
| <i>LeakyReLU</i> | rektificētā lineārā vienības aktivācija ar negatīvo vērtību caurlaidību  |
| <i>LSTM</i>      | ilgttermiņa-īstermiņas atmiņas tīkls                                     |
| <i>MAD</i>       | mediānas absolūtā novirze                                                |
| <i>MeOH</i>      | metanols                                                                 |
| <i>MPC</i>       | uz modeli bāzēta prognozējošā vadība ( <i>Model Predictive Control</i> ) |
| <i>NC</i>        | vadības horizonts                                                        |
| <i>NP</i>        | prognozes horizonts                                                      |
| <i>NRMSE</i>     | normalizētā kvadrātsaknes vidējās kļūdas vērtība [%]                     |
| <i>ODE</i>       | parastais diferenciālvienādojums                                         |
| <i>OUR</i>       | skābekļa patēriņa ātrums                                                 |
| <i>P</i>         | produkta koncentrācija                                                   |
| Pareto fronte    | optimālās kompromisa līknes daudz-mērķu optimizācijā                     |
| <i>PID</i>       | proporcionāli–integrāli–diferenciālais (kontrolieris)                    |
| <i>PI</i>        | proporcionāli–integrālais (kontrolieris)                                 |
| <i>Qβ</i>        | bakteriofāga Q-beta apvalka proteīna vīrusveidīgā daļiņa                 |
| <i>ReLU</i>      | rektificētā lineārā vienība (aktivācijas funkcija)                       |
| <i>RNN</i>       | neironu tīkls ar atgriezenisko saiti                                     |
| <i>RQ</i>        | elpošanas koeficients                                                    |
| <i>S</i>         | substrāta koncentrācija                                                  |
| <i>SCADA</i>     | uzraudzības un datu ieguves sistēma                                      |
| <i>Tanh</i>      | hiperboliskā tangensa aktivācijas funkcija                               |
| <i>V</i>         | tilpums                                                                  |
| <i>VLP</i>       | vīrusveidīgā daļiņa                                                      |
| <i>X</i>         | šūnu biomasas koncentrācija                                              |

# PROMOCIJAS DARBA VISPĀRĒJS RAKSTUROJUMS

## Ievads

Rekombinantie proteīni ir pamats plašam biotehnoloģisko lietojumu klāstam, tostarp biofarmaceitisko preparātu, diagnostikas līdzekļu, industriālo enzīmu un sintētiskās bioloģijas attīstībai [1, 2]. Sabiedrības novecošanās un precīzijas medicīnas attīstības ietekmē pieprasījums pēc bioloģiskajiem preparātiem turpina pieaugt. Plānots, ka biofarmaceitiskās industrijas globālā tirgus vērtība līdz 2031. gadam sasniegs 740 miljardu ASV dolāru [3]. Šī pieprasījuma apmierināšanai nepieciešamas mērogojamas un izmaksu ziņā efektīvas biotehnoloģiskās ražošanas platformas ar piemērotiem saimniekorganismiem, optimizētām ekspresijas sistēmām un inovatīviem procesa vadības risinājumiem.

Lai ilustrētu rekombinanto proteīnu daudzveidību un to lietojuma potenciālu, kā piemērus ar ievērojamu medicīnisko un industriālo nozīmi var minēt rekombinanta cilvēka B hepatīta vīrusa kodola antigēna (HBcAg) un bakteriofāga Qβ kapsīdas proteīna (Qβ) veidotās vīrusveidīgās daļiņas (*VLP*), kā arī sojas leghemoglobīnu (LegH). HBcAg ir vīrusa kapsīdas proteīns, kas plaši pētīts tieši kā *VLP* platforma. Pateicoties to augstajai imunogenitātei un drošībai, šīs platformas ir daudzsoļošanas vakcīnu izstrādē, zāļu piegādē un imūnterapijā [4, 5]. Līdzīgi arī Qβ kapsīdas proteīns, vēl viens *VLP* veidojošs proteīns, kas iegūts no bakteriofāgiem, kalpo kā daudzpusīgs karkass nanotehnoloģijā, vakcīnās un diagnostikā, pateicoties tā strukturālajai viendabībai un modificējamai virsmai [6–8]. Savukārt LegH, augu izcelsmes hēma proteīns, kas piešķir gaļai tai raksturīgo garšu un aromātu, ir kļuvis par galveno komponentu strauji augošajā augu izcelsmes gaļas alternatīvu tirgū, īpaši tādos produktos kā *Impossible™ Burger* [9, 10]. Šo proteīnu mikrobiālā ekspresija gan laboratorijas, gan rūpnieciskā mērogā, piedāvā mērogojamu un izmaksu ziņā efektīvu platformu ilgtspējīgai ražošanai, kas atbilst pieaugošajām veselības aprūpes vajadzībām un vides ilgtspējas prasībām.

Galvenais elements šīs mērogojamās ražošanas nodrošināšanā ir mikroorganisms (saimniekorganisms), un no pieejamām ekspresijas sistēmām *Pichia pastoris* ir stabila, pārbaudīta un daudzpusīga izvēle. Lai gan taksonomiski pārklasificēts kā *Komagataella phaffii*, ņemot vērā to, ka eksperimentālais darbs, celmu apzīmējumi un lielākā daļa citētās literatūras atsaucas uz šo organismu kā *Pichia pastoris*, šajā promocijas darbā konsekvences nolūkos viscaur tiek lietots apzīmējums *P. pastoris*.

Plaši atzīts par vienu no galvenajiem “darba zirgiem” industriālajā biotehnoloģijā, šis metilotrofais raugs apvieno spēju strauji augt un sasniegt augstu šūnu koncentrāciju arī definēta sastāva barotnēs ar stingri regulētām, metanola inducējamām promoteru sistēmām, sevišķi AOX1, kas nodrošina spēcīgu un kontrolējamu gēnu ekspresiju [11–13]. Turklāt šim organismam ir arī efektīva sekrēcijas sistēma, un tas spēj nodrošināt būtiskas eikariotu pēctranslācijas modifikācijas, piemēram, disulfīdu saišu veidošanu un glikozilāciju, kas ir kritiska daudzu terapeitisko proteīnu pareizai funkcionalitātei [14, 15]. Tā statuss “atzīts par drošu lietošanai” (*GRAS*) vēl vairāk izceļ šī organisma piemērotību farmaceitiskajām un industriālajām lietojuma jomām [16, 17].

Lai pilnībā utilizētu šādu mikrobiālo ekspresijas platformu potenciālu, īpaši lielā mērogā, ir nepieciešamas robustas un efektīvas kultivācijas stratēģijas. Kultivācija ar substrāta piebarošanu (*fed-batch*) kļuvusi par nozares standartu mikroorganismu fermentācijās. Šī pieeja spēj nodrošināt augstu produkta iznākumu, pateicoties kontrolētai substrāta padevei, un tiek plaši izmantota aminoskābju, antibiotiku, enzīmu un citu bioķīmisko savienojumu ražošanai [18–20]. Regulējot substrāta piebarošanas ātrumu, iespējams efektīvi pārvarēt liela mēroga ražošanas radītos izaicinājumus, piemēram, nodrošināt efektīvu masas apmaiņu un siltuma pārnesi, veicinot optimālu maisīšanu, skābekļa pieejamību un stabilu temperatūras kontroli [21]. Tomēr *fed-batch* fermentāciju panākumi lielā mērā ir atkarīgi no precīzas piebarošanas ātruma kontroles, jo pārmērīga vai nepietiekama substrāta pievade var izraisīt tā trūkumu vai uzkrāšanos augšanu inhibējošā līmenī, skābekļa deficītu vai pārmērīgu metabolītu akumulāciju, kas negatīvi ietekmē kultūru [18, 22]. Šo problēmu risināšanai arvien plašāk tiek ieviestas uzlabotas procesu modelēšanas un vadības stratēģijas, lai paaugstinātu procesu efektivitāti un mērogojamību.

Šo uzlaboto stratēģiju pamatā ir trīs galvenie fermentācijas inženierijas balsti: procesa monitorings; modelēšana; vadība [23, 24]. Nepārtraukts procesa monitorings, izmantojot fiziskos sensorus un/vai paraugu ņemšanu, nodrošina datus par šūnu biomasas, substrāta un produkta līmeni, ko modelēšana pārvērš prognozējošās atziņās, izmantojot mehānistiskās, datus balstītas vai hibrīdās pieejas. Šie modeļi balsta dinamiskās vadības stratēģijas, kas pielāgo galvenos procesa mainīgos parametrus, lai uzturētu optimālus apstākļus un nodrošinātu pastāvīgu produkta kvalitāti. Integrējot šos trīs balstus, fermentācijas procesus iespējams precīzi pārvaldīt, tādējādi uzlabojot mērogojamību, robustumu un efektivitāti rekombinanto proteīnu ražošanā.

Vēsturiski *P. pastoris* fermentāciju vadības stratēģijas galvenokārt balstījušās empīriskās sakarībās vai vienkāršotos mehānistiskos modeļos, kas ierobežoja to pielāgojamību un prognozēšanas spēju [25, 26]. Savukārt tiekšanās uz ceturto industriālo revolūciju (Industrija 4.0) ir pārvērtusi fermentācijas procesus par datiem bagātu disciplīnu, kur vēsturisko datu kopas un reāllaika datu plūsmas iespējams sistemātiski izmantot, lai padziļinātu izpratni, uzlabotu prognozēšanas spēju un atbalstītu lēmumu pieņemšanu [27]. Šajā kontekstā inteliģenta hibrīdā modelēšana piedāvā robustu risinājumu mikroorganismu kultivāciju nelineārajai un dinamiskajai dabai, ļaujot ieviest adaptīvas, mērogojamas un efektīvas vadības stratēģijas mūsdienu biotehnoloģiskajā ražošanā.

Starp jaunajām pieejām arvien lielāku nozīmi iegūst hibrīdā modelēšana – īpaši tās pieejas, kas apvieno biotehnoloģisko procesu pamatprincipus ar mašīnmācīšanās komponentēm, jo tās spēj saglabāt procesa interpretējamību, vienlaikus uzlabojot prognozēšanas precizitāti [27–29]. Starp datus balstītajām metodēm dziļie neironu tīkli (*DNN*), tostarp ar atgriezenisko saiti (*RNN*) un ilgtermiņa-īstermiņa atmiņas arhitektūras (*LSTM*), ir īpaši piemēroti biotehnoloģisko procesu lietojumiem, pateicoties spējai apgūt laika gaitā mainīgās sakarības un uztvert aizkavētās sistēmas reakcijas. Šie modeļi veiksmīgi izmantoti sistēmas stāvokļa noteikšanai, kļūdainu vērtību detektēšanai, procesu optimizācijai un kā matemātiskie (*software*) sensori dažādos biotehnoloģiskās ražošanas kontekstos [30–32]. Tomēr to “melnās kastes” daba var ierobežot interpretējamību un lietojumu, īpaši, ja tie tiek lietoti izolēti.

Lai šīs uzlabotās modelēšanas iespējas pārvērstu risinājumos, kas īstenojami procesu vadībā, īpaši efektīva stratēģija ir uz modeli bāzēta prognozējošā vadība (*MPC*). *MPC* piedāvā strukturētu ietvaru vairāku mainīgo, ierobežotu un laikā mainīgu sistēmu vadībai [33–35]. Izmantojot mehānistiskos, datus balstītos vai hibrīdos prognozējošos modeļus, *MPC* spēj paredzēt procesa turpmāko attīstību un aprēķināt optimālas vadības darbības, izmantojot attālinošā horizonta pieeju. Tās spēja ņemt vērā noteiktos parametru ierobežojumus un paredzēt procesa traucējumus, padara *MPC* īpaši piemērotu *fed-batch* fermentācijām, kur kritiski ir uzturēt optimālu substrāta koncentrāciju vai mikrobu augšanas ātrumu, minimizēt parametru svārstības un maksimizēt produktivitāti [36–38]. *P. pastoris* fermentāciju kontekstā *MPC* integrācija ar hibrīdajiem procesa modeļiem sniedz augstu potenciālu substrāta piebarošanas un vides apstākļu reāllaika optimizācijai, uzlabojot procesa robustumu, mērogojamību un efektivitāti. Tomēr šādas lietojuma jomas pašreizējā zinātniskajā literatūrā nav pietiekami dziļi pētītas.

Lai pārvarētu minētās nepilnības, promocijas darbā risināti galvenie izaicinājumi rekombinanto *P. pastoris* fermentāciju inženierijā, kas saistīti ar procesa monitoringu, modelēšanu un vadību, izmantojot HBcAg, LegH un Q $\beta$  producējošos celmus kā pētāmos objektus. Reāllaika procesa monitoringa ietvaros tiek izmantoti biomasas, metanola un izplūdes gāzu sensori, lai ģenerētu plašas datu kopas. Savukārt sensoru signālu kvalitāte tiek uzlabota, lietojot datu apstrādes tehnikas, lai mazinātu signāla troksni un algoritmu, kas atklāj un noņem anomālijas biomasas zondes signālos. Fermentācijas procesa modelēšanai tika izstrādāti mehānistiskie, datus balstītie un hibrīdie modeļi, un to prognozēšanas spēja tika savstarpēji salīdzināta. Lai izveidoto hibrīdo procesa modeļi sekmīgi adaptētu jaunam producentam, tika lietota pārnese mācīšanās (*transfer learning*) metode, izmantojot vēsturisko procesu datu kopu. Visbeidzot, procesa vadības kontekstā, tika ieviests gan vienkāršs PI kontrolieris metanola koncentrācijas regulēšanai, gan demonstrēts uz hibrīdu procesa modeļi balstīts *MPC* risinājums, lai efektīvi nodrošinātu šūnu biomasas koncentrācijas pieaugumu, sekojot iepriekš definētai šūnu augšanas trajektorijai.

## **Pētījuma mērķis un uzdevumi**

Promocijas darba mērķis ir sniegt ieguldījumu rekombinantu *P. pastoris* fermentāciju jomas attīstībā, izstrādājot un integrējot uzlabotas procesa monitoringa, modelēšanas un vadības stratēģijas. Darbs saskaņā ar Industrijas 4.0 principiem veicina pāreju uz inteliģentu, datus balstītu biotehnoloģisko ražošanu. Kā izpētes objekti izmantoti HBcAg, LegH un Q $\beta$  producējošie celmi.

Promocijas darba mērķi

1. Validēt biomasas, metanola un reaktora izejas gāzu sensorus *P. pastoris* fermentācijās, lai nodrošinātu augstas kvalitātes tiešsaistes datu ieguvu. Izstrādāt reāllaika signāla apstrādes algoritmus sensoru signālu kvalitātes un uzticamības uzlabošanai.

2. Izstrādāt, novērtēt un salīdzināt mehānistiskas, datus balstītas un hibrīdas modelēšanas pieejas. Izpētīt pārneses mācīšanās izmantošanu, lai paātrinātu hibrīdo procesa modeļu izstrādi, balstoties vēsturisko procesu datus.
3. Ieviest un eksperimentāli validēt substrāta piebarošanas vadības stratēģijas, tostarp tradicionālu PI kontrolieri metanola koncentrācijas regulācijai, izmantojot tiešsaistes sensoru atgriezenisko saiti, kā arī uz hibrīda procesa modeļa balstītu *MPC* ietvaru izvēlētas šūnu biomasas pieauguma dinamikas trajektorijas nodrošināšanai.

### **Aizstāvamās tēzes**

1. Sensoru signālu kvalitātei fermentācijās ir būtiska nozīme, un efektīva reāllaika priekšapstrāde ir nepieciešama, lai nodrošinātu precīzu procesa monitoringu un vadību.
2. Hibrīdas modelēšanas pieejas pārspēj mehānistiskos un datus balstītos modeļus gan prognozēšanas precizitātes, gan robustuma ziņā.
3. Pārneses mācīšanās ir efektīva stratēģija bioprocesu inženierijā, samazinot modeļa apmācības laiku un eksperimentālos resursus, balstoties līdzīgu procesu vēsturiskajos datus.
4. Uz hibrīda procesa modeļa bāzēts *MPC* ietvars ļauj precīzi regulēt substrāta padevi, nodrošinot iepriekš definētu šūnu augšanas trajektoriju izsekošanu *P. pastoris* fermentācijās.

### **Zinātniskā novitāte**

Zinātniskā novitāte šajā promocijas darbā atspoguļota trīs galvenajās jomās – procesa monitoringā, modelēšanā un vadībā, katrai no tām sniedzot ieguldījumu inteliģentu *P. pastoris* fermentāciju inženierijas attīstībā.

1. Izstrādāti un demonstrēti reāllaika signālu apstrādes risinājumi biomasas, metanola un reaktora izejas gāzu sensoriem, uzlabojot signālu kvalitāti un nodrošinot uzticamāku tiešsaistes monitoringu *P. pastoris* fermentācijās.
2. Mehānistiskie, datus balstītie un hibrīdie procesa modeļi tika sistemātiski salīdzināti, parādot to, ka hibrīdie modeļi, kas apvieno neironu tīklus ar fizikāliem pamatprincipiem, sniedz visaugstāko prognozēšanas precizitāti HBcAg, LegH un Qβ celmu fermentācijās. Demonstrēts pārneses mācīšanās lietojums, izmantojot vēsturisko procesu datu kopu, samazinot jaunā modeļa apmācības laiku un eksperimentālo resursu patēriņu.
3. Ieviests uz hibrīda procesa modeļa bāzēts *MPC* ietvars, lai reāllaikā kontrolētu īpatnējo augšanas ātrumu, demonstrējot augšanas trajektorijas izsekošanu ar 10,6 % kļūdu (*NRMSE*). Sistēma demonstrēja noturību procesa mainīguma apstākļos, apliecinot hibrīdā *MPC* piemērotību inteliģentai vadībai biotehnoloģiskajā ražošanā.

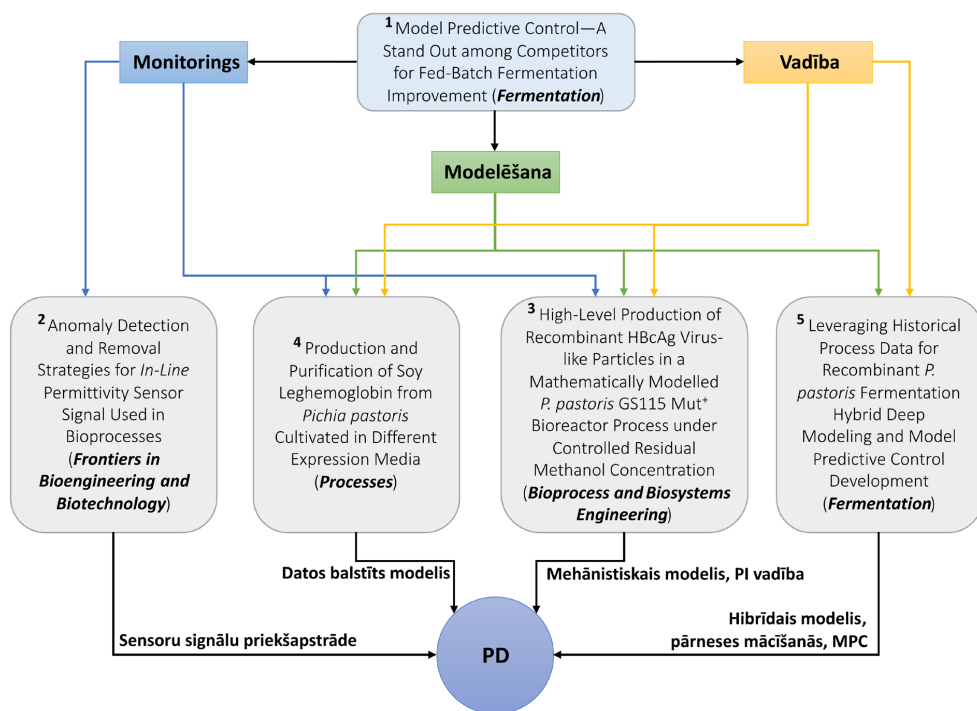
## **Praktiskā nozīme**

Promocijas darba praktiskā nozīme ir tās ieguldījumā reāllaika bioprocesu monitoringa, prognozējošās modelēšanas un procesa vadības uzlabošanā rekombinantās *P. pastoris* fermentācijās. Pieskaņojoties Industrijas 4.0 principiem, darbs veicina pāreju uz inteligentu un datus balstītu bioprocesu inženieriju.

1. Reāllaika signālu apstrādes metodes uzlaboja biomasas, metanola un izejas gāzu sensoru datu uzticamību, ļaujot precīzāk veikt procesu tiešsaistes monitoringu un lēmumu pieņemšanu fermentācijās.
2. Hibrīdā modelēšanas pieeja uzlaboja procesa izpratni un prognozēšanu, savukārt pārneses mācīšanās samazināja eksperimentālo slodzi, piedāvājot praktiskus rīkus ātrai modeļa adaptācijai industriālā vidē.
3. Hibrīdā *MPC* sistēma ļāva automatizēti kontrolēt šūnu īpatnējo augšanas ātrumu, sekmējot konsekventu procesa darbību un mērogojamību industriālai proteīnu ražošanai.

## **Promocijas darba struktūra un apjoms**

Promocijas darbs veidots kā tematiski vienotu publikāciju kopa, kas sniedz ieguldījumu procesa monitoringa, modelēšanas un vadības stratēģijas rekombinantās *P. pastoris* fermentācijās ar piebarošanu. Darbs ietver četras zinātniskās oriģinālpublikācijas un vienu apskatrakstu, uzsverot uzlabotu tiešsaistes sensoru signālu kvalitāti, hibrīdo modelēšanu ar pārneses mācīšanos un inteligentu hibrīdā *MPC* bāzētu procesa vadību, sniedzot ieguldījumu nozares attīstībā, saskaņā ar Industrijas 4.0 principiem datus balstītā biotehnoloģiskajā ražošanā (1. shēma).



1. shēma. Promocijas darba (PD) struktūras shematisks attēlojums.

## Promocijas darba aprobācija un publikācijas

Promocijas darba rezultāti ir publicēti četros oriģinālos zinātniskajos rakstos un vienā apskatrakstā. Galvenie rezultāti tika prezentēti trīs konferencēs.

### Zinātniskās publikācijas

1. **E. Bolmanis**, K. Dubencovs, A. Suleiko, and J. Vanags, “Model Predictive Control – A Stand Out among Competitors for Fed-Batch Fermentation Improvement”, *Fermentation*, vol. 9, 206, 2023, doi: 10.3390/fermentation9030206 [Scopus, WoS, Open Access, IF 5,123, Q1, CiteScore 5,3].
2. **E. Bolmanis**, S. Uhlendorff, M. Pein-Hackelbusch, V. Galvanauskas, and O. Grigs, “Anomaly Detection and Removal Strategies for In-Line Permittivity Sensor Signal Used in Bioprocesses”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 13, 2025, doi: 10.3389/fbioe.2025.1609369 [Scopus, WoS, Open Access, IF 4,8, Q1, CiteScore 8,8].
3. **E. Bolmanis**, O. Grigs, A. Kazaks, V. Galvanauskas, “High-Level Production of Recombinant HBcAg Virus-like Particles in a Mathematically Modelled *P. pastoris* GS115 Mut+ Bioreactor Process under Controlled Residual Methanol Concentration”,

*Bioprocess Biosyst. Eng.*, vol. 45, pp. 1447–1463, 2022, doi: 10.1007/s00449-022-02754-4 [Scopus, WoS, IF 3,6, Q2, CiteScore 6,7].

4. **E. Bolmanis**, J. Bogans, I. Akopjana, A. Suleiko, T. Kazaka, and A. Kazaks, “Production and Purification of Soy Leghemoglobin from *Pichia pastoris* Cultivated in Different Expression Media”, *Processes*, vol. 11, 3215, 2023, doi: 10.3390/pr11113215 [Scopus, WoS, Open Access, IF 3,5, Q2, CiteScore 4,7].
5. **E. Bolmanis**, V. Galvanauskas, O. Grigs, J. Vanags, and A. Kazaks, “Leveraging Historical Process Data for Recombinant *P. pastoris* Fermentation Hybrid Deep Modeling and Model Predictive Control Development”, *Fermentation*, vol. 11, 411, 2025, doi: 10.3390/fermentation11070411 [Scopus, WoS, Open Access, IF 3,3, Q2, CiteScore 5,7].

### Citas zinātniskās publikācijas

1. O. Grigs, **E. Bolmanis**, and V. Galvanauskas, “Application of *In-Situ* and Soft-Sensors for Estimation of Recombinant *P. pastoris* GS115 Biomass Concentration: A Case Analysis of HBcAg (Mut<sup>+</sup>) and HBsAg (Mut<sup>S</sup>) Production Processes under Varying Conditions”, *Sensors*, vol. 21, 1268, 2021, doi: 10.3390/s21041268.
2. O. Grigs, E. Didrihsone, and **E. Bolmanis**, “Investigation of a Broad-Bean Based Low-Cost Medium Formulation for *Bacillus subtilis* MSCL 897 Spore Production”, *Fermentation*, vol. 9, 4, 2023, doi: 10.3390/fermentation9040390.
3. A. Pentjuss, **E. Bolmanis**, A. Suleiko, E. Didrihsone, A. Suleiko, K. Dubencovs, J. Liepins, A. Kazaks, and J. Vanags, “*Pichia pastoris* Growth—Coupled Heme Biosynthesis Analysis Using Metabolic Modelling”, *Sci. Rep.*, vol. 13, 15816, 2023, doi: 10.1038/s41598-023-42865-w.
4. A. Suleiko, K. Dubencovs, A. Kazaks, A. Suleiko, J.E. Daugavietis, E. Didrihsone, J. Liepins, **E. Bolmanis**, O. Grigs, and J. Vanags, “Performance of Recombinant *Komagataella phaffii* in Plant-Based Meat Flavor Compound (Leghemoglobin) Production through Fed-Batch Fermentations”, *Fermentation*, vol. 10, 1, 2024, doi: 10.3390/fermentation10010055.
5. **E. Bolmanis**, O. Grigs, E. Didrihsone, M. Senkovs, and V. Nikolajeva, “Pilot-scale production of *Bacillus subtilis* MSCL 897 spore biomass and antifungal secondary metabolites in a low-cost medium”, *Biotechnol. Lett.*, vol. 46, 3, 2024, doi: 10.1007/s10529-024-03481-4.

### Dalība zinātniskajās konferencēs

1. **E. Bolmanis**, S. Ramm, M. Pein-Hackelbusch, V. Galvanauskas, and O. Grigs, “Dielectric permittivity sensor signal anomaly detection and compensation strategies in yeast *P. pastoris* fermentations”, *Latvijas Universitātes 83. starptautiskā zinātniskā konference*. 14. Februāris, 2025, Rīga, Latvija (*Mutiskā prezentācija*).

2. S. Uhlendorff, **E. Bolmanis**, M. Pein-Hackelbusch, V. Galvanauskas, and O. Grigs, "Analysis of Anomaly Detection Techniques for *In-line* Permittivity Sensors in Bioprocesses", *8th European Congress of Applied Biotechnology (ECAB)*. 8.-10. Septembris, 2025, Lisabona, Portugāle (*Stenda referāta prezentācija*).
3. **E. Bolmanis**, V. Galvanauskas, and A. Kazaks, "Leveraging Historical Process Data for Recombinant *P. pastoris* Fermentation Hybrid Deep Modeling", *6. Baltijas mikrobiologu kongress*. 1.–3. oktobris, 2025, Rīga, Latvija (*Mutiskā prezentācija*).

#### **Dalība citos zinātniskos pasākumos**

1. **E. Bolmanis** un A. Kazaks, "Soy leghemoglobin (LegH) production in yeast *P. pastoris* in different cultivation media", *Informatīvs seminārs par projekta "The development of an efficient pilot-scale leghemoglobin production technology, based on recombinant Pichia pastoris and Kluyveromyces lactis fed-batch fermentations (BioHeme)" rezultātiem*. 15. novembris, 2023, Rīga, Latvija (*Mutiskā prezentācija*).
2. **E. Bolmanis** un A. Kazaks, "Soy leghemoglobin (LegH) production in yeast *P. pastoris* in different cultivation media", *Informatīvs seminārs par projekta "The development of an efficient pilot-scale leghemoglobin production technology, based on recombinant Pichia pastoris and Kluyveromyces lactis fed-batch fermentations (BioHeme)" rezultātiem*. 23. novembris, 2023, Rīga, Latvija (*Mutiskā prezentācija*).

# PROMOCIJAS DARBA GALVENIE REZULTĀTI

## 1. Literatūras apskats

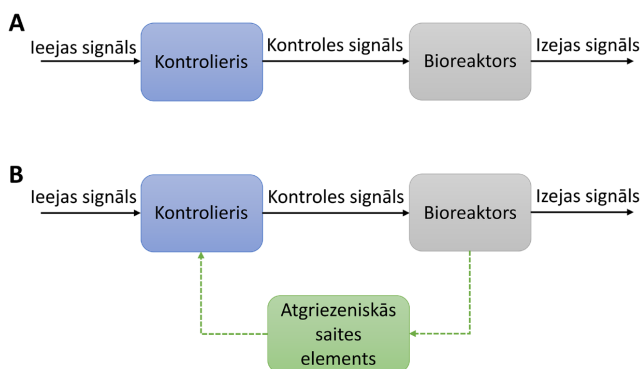
Publikācija

- **Bolmanis, E.;** Dubencovs, K.; Suleiko, A.; Vanags, J. Model Predictive Control – A Stand Out among Competitors for Fed-Batch Fermentation Improvement. *Fermentation* **2023**, 9, 206 kā [33].

Fermentācija ar substrāta piebarošanu (*fed-batch*) jau ilgu laiku ir bijusi rūpniecisko fermentācijas procesu stūrakmens un tikusi plaši lietota augstas pievienotās vērtības biotehnoloģisko produktu ražošanā. Tā joprojām ir dominējošā pieeja biofarmaceutiskajā ražošanā, aptverot gan tirgū esošos terapeitiskos līdzekļus, gan klīnisko pētījumu stadijā esošos produktus [19, 20].

Viens no galvenajiem izaicinājumiem kultivācijas procesos ar piebarošanu ir substrāta piebarošanas ātruma kontrole – būtisks procesa parametrs, kas tieši ietekmē īpatnējo augšanas ātrumu, šūnu metabolismu, produkta titru un procesa atkārtojamību [13, 33]. Mikroorganismu augšanas nelineārais un laikā mainīgais raksturs apvienojumā ar dinamiskajiem vides apstākļiem bioreaktorā piebarošanas stratēģiju optimizēšanu padara īpaši sarežģītu.

Substrāta piebarošanas ātruma kontroles stratēģijas fermentācijās var iedalīt divās kategorijās – atvērtās un slēgtās cilpas (atgriezeniskās saites) vadībā (1.1. att.). Katrai no tām ir savas priekšrocības un ierobežojumi. Atvērtās cilpas stratēģijas ir vienkārši realizējamas, taču tām trūkst elastības, jo piebarošanas profils tiek noteikts iepriekš un procesa gaitā netiek mainīts. Savukārt slēgtās cilpas stratēģijas ietver atgriezeniskās saites elementu, piemēram, reāllaika sensoru datus vai modeļos balstītas prognozes, kas ļauj nepārtraukti pielāgot piebarošanas ātrumu kultivēšanas laikā. Šāda dinamiska pielāgošanās nodrošina lielāku noturību pret traucējumiem un bioloģisko mainīgumu, uzlabojot procesa stabilitāti un atkārtojamību. *P. pastoris* fermentācijās atvērtās cilpas pieeja nozīmētu substrāta piebarošanas profila aprēķināšanu iepriekš, savukārt atgriezeniskajā saitē balstīta stratēģija ļautu profilam attīstīties, reaģējot uz reāllaika signāliem no atgriezeniskās saites elementa.



1.1. att. Shematisks atvērtās (A) un aizvērtās (B) cilpas kontroles arhitektūras attēlojums.

Atbilstošas vadības stratēģijas izvēlei jānodrošina līdzsvars starp realizācijas sarežģītību un sagaidāmo veiktspēju, jo šis kompromiss tiešā veidā ietekmē izmaksu efektivitāti un atkārtojamību [33]. Ņemot vērā mikroorganismu sistēmu raksturīgo mainīgumu pat pie nomināli nemainīgiem darbības apstākļiem, atgriezeniskās saites vadība ir īpaši nozīmīga. Nepārtraukti pielāgojot substrāta padevi, balstoties reāllaika mērījumos, atgriezeniskajā saitē balstītas stratēģijas palīdz uzturēt metabolisko līdzsvaru, uzlabot procesa atkārtojamību un nodrošināt to, ka barības vielu pieejamība visā kultivēšanas procesā atbilst šūnu vajadzībām [18].

Efektīva atgriezeniskās saites vadības ieviešana ir atkarīga no uzticama atgriezeniskās saites mehānisma pieejamības. Parasti šādi mehānismi apvieno reāllaika fiziskos sensorus (piemēram, izšķīdušā skābekļa (*DO*), substrāta vai biomasas noteikšanai), *at-line* vai *off-line* analītiskos mērījumus (piemēram, kultūras optisko blīvumu vai substrāta koncentrāciju) un prognozējošos procesa modeļus. Šie komponenti darbojas sinerģijā, lai novērtētu iekšējos stāvokļus un reāllaikā vadītu regulācijas mehānismus [39].

Atgriezeniskās saites cilpas precizitāte, reaģētspēja un robustums ir kritiski faktori, kas nosaka kontroliera veiktspēju. Nepietiekams vai ar troksni piesārņots atgriezeniskās saites signāls var izraisīt kļūdainas vadības darbības, kas savukārt var radīt pārmērīgu substrāta padevi, samazinātus produkcijas ražīguma rādītājus vai pat rezultēties procesa utilizācijā [40]. Tāpēc augstas kvalitātes monitoringa tehnoloģiju un robustu procesa modeļu integrācija ir būtiska, lai pilnībā izmantotu atgriezeniskās saites vadības priekšrocības fermentācijās ar substrāta piebarošanu.

Atgriezeniskās saites infrastruktūras centrā atrodas sensori un procesa modeļi, kas pilda savstarpēji papildinošas funkcijas biotehnoloģisko procesu monitoringā un vadībā. Fiziskie sensori nodrošina galveno procesa parametru, piemēram, pH, temperatūras, *DO*, biomasas (mērot kultūras dielektrisko spektroskopiju vai duļķainību), un oglekļa avotu, piemēram, glikozes vai metanola, tiešus reāllaika mērījumus [41, 42]. Lai gan šie sensori parasti ir stabili un viegli kalibrējami, to lietojuma diapazons mēdz būt ierobežots, tie var būt dārgi, kā arī pakļauti aizsērēšanai vai signāla nobīdei – īpaši liela mēroga ražošanā [43, 44].

Lai pārvarētu šos ierobežojumus, arvien lielāku nozīmi iegūst procesa modeļi. Šie modeļi – mehānistiskie, datos balstītie vai hibrīdie – spēj novērtēt nemērītos lielumus (piemēram, šūnu īpatnējo augšanas vai produkcijas ātrumu), sekmīgi integrējot pieejamos mērījumus [45, 46]. To galvenās priekšrocības ir elastīgums, izmaksu efektivitāte un spēja prognozēt citādi nemērāmus procesa stāvokļus. Tomēr to uzticamība lielā mērā ir atkarīga no modeļa struktūras un ievades datu kvalitātes, tāpēc ilgtermiņa precizitātes uzturēšanai nepieciešama regulāra rekālībrācija [47].

Bioprocetu modeļi variē no mehānistiskām pieejām, balstītām biokīmijas un fizioloģijas principos, līdz datos balstītiem modeļiem, piemēram, statistiskajām regresijām vai mašīnmācīšanās algoritmiem, kas spēj uztvert datu kopā esošās empīriskas sakarības. Mehānistiskie modeļi nodrošina augstāku interpretācijas pakāpi un dziļāku izpratni, taču bieži prasa ievērojamas nozares zināšanas un intensīvu darbu modeļa parametru noteikšanai [23]. Datos balstītie modeļi izceļas ar spēju modelēt sarežģītas un nelineāras dabas sakarības bez

detalizētām iepriekšējām zināšanām, taču tiem trūkst caurspīdīguma, un to precizitāte lielā mērā ir atkarīga no datu kvalitātes [48].

Efektīvi izmantojot abu iepriekšminēto modeļu veidu stiprās puses, hibrīdie modeļi kļūst arvien populārāki bioprocesu inženierijā [29, 49, 50]. Hibrīdā modelēšana apvieno mehānistisko modeļu struktūru ar datos balstīto modeļu elastīgumu, nodrošinot precīzākas un vispārīgākas bioprocesu dinamikas reprezentācijas, īpaši tad, kad trūkst pilnīgas mehānistiskās izpratnes.

Slēgtās cilpas vadības stratēģiju vidū proporcionāli-integrālā-atvasinātā (PID) kontroliera metode joprojām ir visplašāk lietotā rūpnieciskajās fermentācijās ar piebarošanu. Šis klasiskais kontrolieris aprēķina kļūdu starp izmērīto lielumu un uzdotās vērtības līmeni, pēc tam pielāgo ievadi (substrāta piebarošanas ātrumu), ņemot vērā proporcionālo ( $K_P$ ), integrālo ( $K_I$ ) un atvasināto ( $K_D$ ) komponenti [51]. PID kontrolieri parasti tiek izmantoti netiešās atgriezeniskās saites konfigurācijās, pielāgojot substrāta piebarošanas ātrumu, balstoties sekundāros signālos, piemēram, pH (*pH-stat*), DO (*DO-stat*), īpatnējā augšanas ātrumā ( $\mu$ -*stat*) vai substrāta koncentrācijā. Lai gan tie ir salīdzinoši vienkārši un robusti, PID kontrolieru veikspēju bieži ierobežo pieejamo uzticamo reāllaika bioloģisko lielumu mērījumu trūkums un mikroorganismu sistēmu nelineārā un laikā mainīgā daba [33, 52].

Lai pārvarētu šos ierobežojumus, kā labāka alternatīva ir izvirzījusies uz modeli bāzēta prognozējošā vadība (*MPC*). *MPC* izmanto dinamisku procesa modeli, lai prognozētu sistēmas uzvedību nākotnē un attiecīgi optimizētu vadības darbības [34, 53]. Atšķirībā no PID, kas reaģē uz pašreizējām novirzēm vienā mainīgajā lielumā, *MPC* spēj vienlaikus pārvaldīt vairākus mainīgos, ievērot noteiktos darbības ierobežojumus un efektīvāk tikt galā ar mikroorganismiem raksturīgo nelinearitāti un procesa novirzēm [33, 54]. Turklāt PID kontrolierim nepieciešama regulāra parametru pielāgošana, kas bieži vien ir laikietilpīgs un pret neparedzamām novirzēm jutīgs process, savukārt *MPC* izmanto modeļos balstītus parametrus, piemēram, funkciju koeficientus un prognozes horizontus, kas nodrošina lielāku pielāgojamību un samazina nepieciešamību pēc biežām regulēšanas korekcijām. Turklāt jaunākajos pētījumos tiek uzsvērts, ka *MPC* var efektīvi darbināt uz standarta rūpnieciskās aparatūras, apliecinot tā praktisko piemērotību reāllaika bioprocesu vadībā [33].

## 2. Fermentāciju reāllaika monitorings

### Publikācijas

- **Bolmanis, E.**; Grigs, O.; Kazaks, A.; Galvanauskas, V. High-Level Production of Recombinant HBcAg Virus-like Particles in a Mathematically Modelled *P. pastoris* GS115 Mut+ Bioreactor Process under Controlled Residual Methanol Concentration. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2022**, *45*, 1447–1463 kā [4].
- **Bolmanis, E.**; Bogans, J.; Akopjana, I.; Suleiko, A.; Kazaka, T.; Kazaks, A. Production and Purification of Soy Leghemoglobin from *Pichia pastoris* Cultivated in Different Expression Media. *Processes* **2023**, *11*, 3215 kā [56].
- **Bolmanis, E.**; Uhlendorff, S.; Pein-Hackelbusch, M.; Galvanauskas, V.; Grigs, O. Anomaly Detection and Removal Strategies for In-Line Permittivity Sensor Signal Used in Bioprocesses. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2025**, *13* kā [60].

Efektīvs fermentācijas procesa monitorings ir būtisks, lai optimizētu ražošanas iznākumu un nodrošinātu nemainīgu produkta kvalitāti, ļaujot savlaicīgi atklāt un kontrolēt bioloģiskās un procesa apstākļu svārstības. Kultivējot *P. pastoris*, precīza galveno mainīgo lielumu, piemēram, biomasas koncentrācijas, substrāta pieejamības, metabolisma aktivitātes un produktu veidošanās uzraudzība, ne tikai uzlabo procesa izpratni, bet arī veicina agrīnu kļūmju identificēšanu un atbalsta paaugstinātu produktivitāti. Turklāt augstas izšķirtspējas monitoringa dati ir būtiski datos balstītu modelēšanas pieeju izstrādē un lietošanā, kam ir potenciāls vēl vairāk uzlabot procesa vadību un optimizāciju.

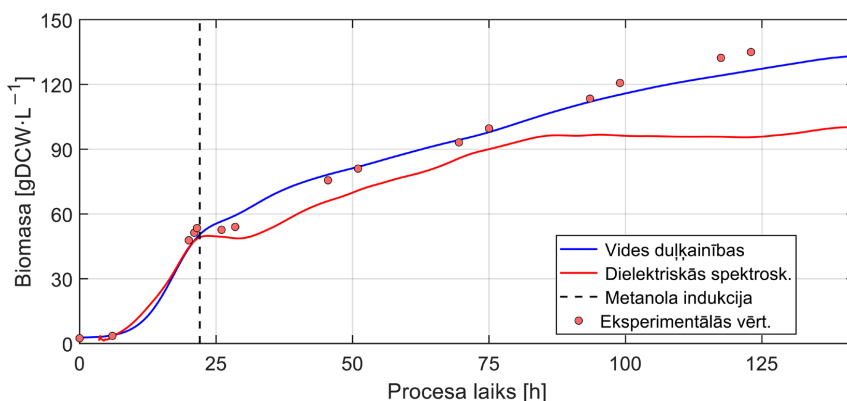
Šajā nodaļā aplūkota tādu fizisko sensoru kā biomasas un metanola sensoru un izplūdes gāzu analizatora integrācija bioreaktora sistēmā, lai nodrošinātu nepārtrauktu, neinvazīvu reāllaika uzraudzību visā fermentācijas procesā. Šie sensori tika izmantoti atsevišķos fermentācijas eksperimentos, lai papildinātu standarta bioreaktora mērījumus, tostarp *DO*, *pH*, temperatūru un maisītāja ātrumu. Iegūtās datu kopas nodrošināja visaptverošu ainu par procesu dinamiku un šūnu uzvedību fermentācijās, kas kalpoja par stabilu pamatu ne tikai procesu analīzei, bet arī reāllaika vadības stratēģiju ieviešanai, kā arī hibrīdo un mašīnmācīšanās modeļu izstrādei.

Fermentāciju laikā ievāktie monitoringa dati kalpoja par kritisku pamatu fermentācijas dinamikas izprašanai, optimizēšanai un modelēšanai. Reāllaika mērījumi sniedza vērtīgu ieskatu kultūras fizioloģiskajā stāvoklī fermentācijas laikā un nodrošināja pamatu datos balstītai modelēšanai (3. nodaļa) un vadības stratēģijām (4. nodaļa), kas izstrādātas un izvērtētas šajā promocijas darbā.

### 2.1. Šūnu biomasas mērījumi

*In situ* biomasas zondes sniedz reāllaika neinvazīvu šūnu koncentrācijas mērījumu fermentācijās, ļaujot nepārtraukti uzraudzīt mikroorganismu augšanu bez manuālas paraugu ņemšanas. Šī promocijas darba izstrādes gaitā izvēlētos fermentācijas procesos tika izmantotas divu veidu *in situ* biomasas sensoru zondes – optiskā zonde (*ASD19-EB-01*, *Optek-Danulat*), kas mēra kultūras duļķainību, un dielektriskās spektroskopijas zonde (*Incyte*, *Hamilton*).

Šis savstarpēji papildinošās tehnoloģijas sniedza būtiskas priekšrocības biomasas dinamikas uzraudzībai. Optiskā vides duļķainības zonde nodrošināja ātru un stabilu signālu, kas korelēja ar kopējo biomasu, lai gan tā ietvēra gan dzīvotspējīgo, gan mirušo šūnu frakcijas. Turpretī dielektriskā spektroskopijas zonde selektīvi novērtēja dzīvotspējīgo biomasu, mērot tikai neskartu šūnu membrānu elektriskās īpašības. Ņemot vērā to, ka galvenos fermentācijas parametrus, piemēram, augšanu un ražošanas ātrumu, galvenokārt ietekmē dzīvotspējīgās šūnas, šis mērījums ir informatīvāks. Tomēr precīzai kalibrēšanai ir nepieciešami uzlaboti references mērījumi, piemēram, dzīvotspējīgu šūnu skaits, kas nebija pieejams šo eksperimentu laikā. Abu biomasas sensoru signāli kopā ar references sausās biomasas mērījumiem redzami 2.1. attēlā.



2.1. att. Optiskā (vides duļķainības) un dielektriskās spektroskopijas sensoru šūnu biomasas koncentrācijas mērījumu salīdzinājums *P. pastoris* fermentācijā.

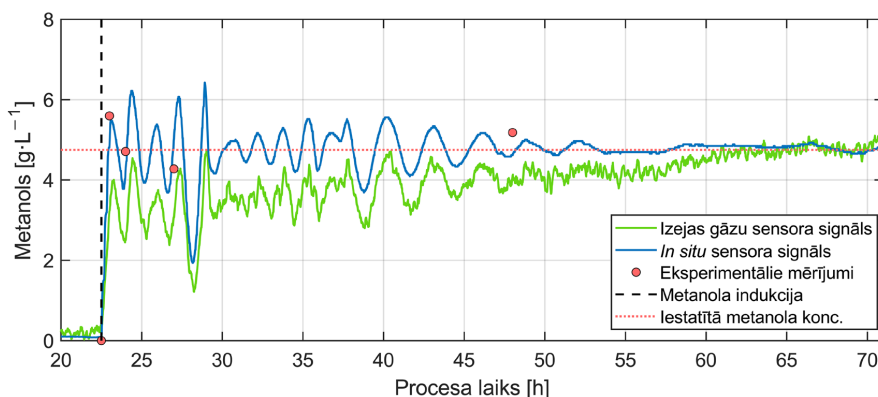
Kā redzams 2.1. attēlā, optiskā biomasas sensora signāls cieši sakrīt ar eksperimentāli noteiktajām šūnu biomasas vērtībām, demonstrējot spēcīgu korelāciju ( $R^2 = 0,99$ ). Turpretī dielektriskās spektroskopijas zondes signāls līdz metanola indukcijai cieši seko gan optiskā sensora, gan eksperimentālajiem biomasas mērījumiem, pēc kuras tas uzrāda strauju kritumu un pēc aptuveni 85. kultivācijas stundas sasniedz plato, vairs būtiski nepieaugot. Šī uzvedība atspoguļo izmaiņas šūnu dzīvotspējā. Glicerīna augšanas fāzē šūnu dzīvotspēja joprojām ir augsta (tuvu 100 %), un tā rezultātā starp visām trim mērīšanas metodēm pastāv cieša korelācija [45, 55]. Tomēr pēc metanola indukcijas korelācija samazinās metanola citotoksiskās ietekmes dēļ, kas samazina dzīvotspējīgo šūnu frakciju adaptācijas fāzē (pirmajās stundās pēc indukcijas). Adaptācijai progresējot un atsākoties augšanai, signāli atkal uzrāda līdzīgas tendences, lai gan dielektriskās spektroskopijas signāls joprojām ir nedaudz zemāks, atspoguļojot mirušo šūnu populācijas klātbūtni. Aptuveni 85. procesa stundā dielektriskā sensora signāls sasniedz plato, kas liecina, ka šūnu augšanas un mirstības rādītāji ir sasnieguši līdzsvaru. Šis plato netiek novērots optiskajā sensorā vai eksperimentālajos mērījumos, jo abos gadījumos tiek ņemta vērā kopējā biomasas, tostarp mirušo šūnu frakcija.

Procesu monitorings, izmantojot biomasas zondes, ne tikai atbalsta fermentācijas procesa vadību, nodrošinot savlaicīgu atgriezenisko saiti procesa parametru pielāgošanai, bet arī kalpo

kā bagātīgs datu avots datos balstītu procesa modeļu izstrādei un pilnveidošanai [56, 57]. Proti, optisko un dielektrisko spektroskopijas zonžu kombinēta izmantošana sniedz visaptverošāku biomasu sastāva perspektīvu, nošķirot kopējās un dzīvotspējīgās šūnu populācijas. Šī divu sensoru pieeja sniedz jaunu iespēju turpmākiem pētījumiem, kur abu signālu vienlaikus integrācija varētu palīdzēt ņemt vērā šūnu populācijas nevienmērīgumu [58]. Šāda pieeja varētu uzlabot hibrīdo modeļu prognozējamo precizitāti un nodrošināt informētākas procesa vadības stratēģijas rekombinantās *P. pastoris* fermentācijās.

## 2.2. Metanola koncentrācijas mērījumi

Papildus biomasas mērījumiem šajā promocijas darbā pētīto fermentācijas procesu būtiska sastāvdaļa bija arī metanola koncentrācijas mērīšana reāllaikā. *P. pastoris* konstrukcijām, kas utilizē AOX1 promoteru, metanols kalpo gan kā oglekļa avots, gan kā rekombinanto proteīnu ekspresijas inducētājs. Tāpēc ir būtiski precīzi uzraudzīt un kontrolēt tā koncentrāciju kultivācijas vidē, jo pārmērīga metanola koncentrācija var kavēt šūnu augšanu un negatīvi ietekmēt produktivitāti. Lai izsekotu metanola uzkrāšanās dinamiku, tika izmantoti divi dažādi sensori – gāzes fāzes sensors (*BGP-EtOH*, *BlueSens*), kas mēra metanola koncentrāciju reaktora izejas gāzēs, un *in situ* šķidrās fāzes zonde (*MeOH sensor*, *Raven Biotech*), kas tieši kvantificē metanola līmeni barotnē. 2.2. attēlā redzams abu sensoru veikspējas salīdzinājums fermentācijas laikā.



2.2. att. Izejas gāzu un *in situ* metanola sensoru signālu salīdzinājums *P. pastoris* fermentācijā ar metanola koncentrācijas kontroli.

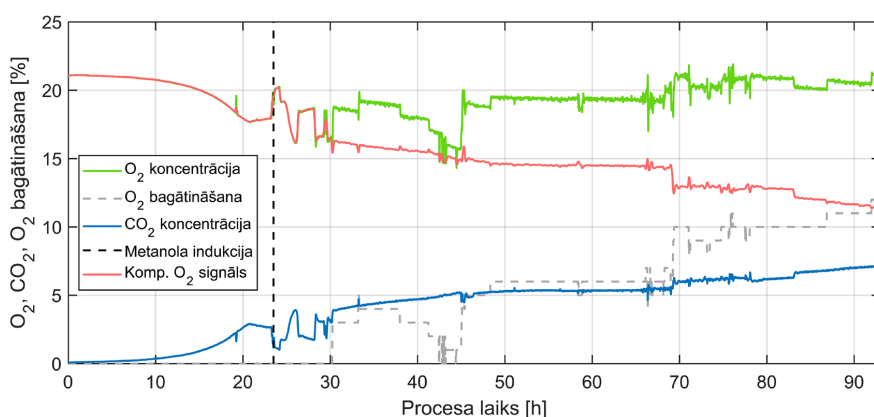
2.2. attēlā redzams detalizēts sensoru veikspējas salīdzinājums fermentācijas procesa gaitā. *In situ* metanola sensors acīmredzami pārspēj tā izplūdes gāzēs balstīto analogu tādos galvenajos aspektos kā atbildes laiks, precizitāte un signāla kvalitāte. Galvenais izplūdes gāzu sensora ierobežojums ir tā trokšņainais signāls, kamdēļ nepieciešams lietot signāla trokšņa filtrēšanas metodes, lai gūtu skaidru priekšstatu par signāla tendencēm. Taču šīs apstrādes metodes negatīvi ietekmē jau tā salīdzinoši ilgo signāla atbildes laiku. Šajā pētījumā tika izmantots vienkāršs slīdošais vidējais filtrs (loga izmērs – 10), ievērojami uzlabojot signāla kvalitāti, samazinot tā svārstības par 63 % (no  $\pm 0,27$  līdz  $\pm 0,10$  [g·L<sup>-1</sup>]), bet vēl vairāk paildzinot

kopējo sensora signāla atbildes laiku [4, 59]. Turklāt šis sensors tieši nemēra apstākļus šķidrā barotnē; tā vietā tas nosaka metanola koncentrāciju gāzveida fāzē virs šķidruma virsmas. Lai gan tā signāls korelē ar metanola līmeni barotnē, šī korelācija ir pakļauta ievērojamai laika nobīdei, kas ierobežo tā lietderību reāllaika procesa vadības lietojumos. Turklāt, lai gan signāla dinamika būtībā atspoguļo *in situ* sensora dinamiku, aplēstās koncentrācijas pastāvīgi ir zemākas, jo īpaši metanola indukcijas sākumposmā, un pakāpeniski stabilizējas fermentācijas beigās. Šī neatbilstība var liecināt par sensora signāla novirzi vai aizkavētu mērījuma līdzsvarošanu starp gāzes un šķidruma fāzēm.

Precīzs reāllaika metanola koncentrācijas mērījums ļauj labāk kontrolēt piebarošanas stratēģijas, uzlabo procesa stabilitāti un atkārtotamību, sekmējot rekombinanto proteīnu ražošanu [12, 59]. Starp pieejamajām tehnoloģijām *in situ* metanola sensori nodrošina izcilu reaģētspēju un tiešu ieskatu kultūras vidē, padarot tos īpaši vērtīgus procesu optimizācijai un uzlabotos procesa vadības lietojumos [59].

### 2.3. Reaktora izejas gāzu sastāva analīze

Reaktora izejas gāzu sastāva analīze ir svarīgs fermentācijas uzraudzības aspekts, kas sniedz reāllaika ieskatu par mikrobu respirāciju un substrāta patēriņa ātrumu. Mērot svarīgo gāzu – skābekļa ( $O_2$ ) un oglekļa dioksīda ( $CO_2$ ) – koncentrācijas, šī pieeja ļauj aprēķināt šūnu metabolisma ātrumus, tostarp skābekļa uzņemšanas ātrumu (*OUR*), oglekļa dioksīda evolūcijas ātrumu (*CER*) un elpošanas koeficientu (*RQ*). Šie parametri ir būtiski šūnu aktivitātes novērtēšanai, vielmaiņas izmaiņu noteikšanai un procesu vadības stratēģiju realizācijai gan laboratorijās, gan rūpnieciskās ražošanas procesos. Šajā darbā tika izmantots izplūdes gāzu analizators (*BlueInOneFerm*, *BlueSens*), lai pastāvīgi uzraudzītu  $O_2$  un  $CO_2$  koncentrāciju bioreaktora izejas gaisa plūsmā. Šie mērījumi sniedza vērtīgus reāllaika datus par šūnu respiratoro dinamiku fermentācijas laikā. Tipiskie izplūdes gāzu profili, kas novēroti reprezentatīvas fermentācijas laikā, redzami 2.3. attēlā.



2.3. att.  $O_2$  un  $CO_2$  koncentrācijas bioreaktora izejas gāzu plūsmā un ieejas gaisa bagātināšanas ar  $O_2$  fermentācijas procesā.

*P. pastoris* fermentācija ierasti sākas ar *batch* fāzi, kurā par oglekļa avotu kalpo glicerīns, kam seko fāze ar papildu glicerīna piebarošanu, lai sasniegtu pietiekami augstu biomasas līmeni pirms metanola indukcijas. Pārslēdzot substrāta padevi uz metanolu, šūnām nepieciešams laiks, lai pielāgotu metabolismu, kas skaidri atspoguļojas izplūdes gāzu analizatora rādījumos (2.3. att.). Uzreiz pēc metanola padeves sākšanas tiek novērots straujš CO<sub>2</sub> koncentrācijas kritums, kas liecina par samazinātu metabolisko aktivitāti adaptācijas laikā. Kad CO<sub>2</sub> līmenis atkal sāk pieaugt, tas norāda, ka šūnas pielāgojas metanolam un atsāk augšanu. Šo reāllaika izplūdes gāzu dinamiku var izmantot, lai pielāgotu metanola piebarošanas stratēģiju ātrākai un efektīvākai šūnu adaptēšanai, piedāvājot elastīgāku alternatīvu parasti izmantotajam, bet bieži vien pārāk konservatīvam trīspakāpju indukcijas protokolam.

Ja pietiekamu skābekļa piesātinājumu vairs nevar uzturēt, palielinot tikai maisīšanas ātrumu, bioreaktora sistēma sāk ieplūdes gaisa bagātināšanu ar tīru skābekli. Lai gan šī ir standarta procedūra augsta šūnu blīvuma fermentācijās, rezultātā pieaugošā skābekļa koncentrācija ieejā ietekmē arī izplūdes gāzu analizatora rādījumus. Kā redzams 2.3. attēlā, katrs pēkšņas bagātināšanas solis izraisa atbilstošu O<sub>2</sub> koncentrācijas lēcieni izejas gāzēs.

Lai kompensētu šo ietekmi un nodrošinātu precīzu elpošanas aktivitātes interpretāciju, O<sub>2</sub> rādījumiem jāpiemēro kompensācijas koeficients, pamatojoties uz skābekļa bagātināšanas procentuālo daudzumu bioreaktora ieplūdes gāzu maisījumā. Analizējot atbilstošo izplūdes gāzu O<sub>2</sub> koncentrācijas pieaugumu ar pieaugošu skābekļa bagātināšanas līmeni, tika noteikta spēcīga lineāra korelācija ( $R^2 = 0,99$ ). Šo attiecību var izmantot, lai izmērītajam O<sub>2</sub> signālam piemērotu korekcijas terminu, pamatojoties uz skābekļa bagātināšanas procentuālo daudzumu, kas efektīvi kompensē ieplūdes gaisa bagātināšanas ietekmi (2.3. att., komp. O<sub>2</sub> signāls). Fermentācijas laikā CO<sub>2</sub> līmenis palielinās līdz ar šūnu blīvumu, bet O<sub>2</sub> līmenis samazinās paaugstināta šūnu skābekļa patēriņa un CO<sub>2</sub> ražošanas dēļ. Šī dinamika netika precīzi atspoguļota neapstrādātā O<sub>2</sub> sensora signālā, bet tika precīzi atainota kompensētajā signālā. Novirze, ko rada O<sub>2</sub> bagātināšana, būtiski ietekmē skābekļa uzņemšanas ātrumu (*OUR*) un elpošanas koeficienta (*RQ*) aprēķinus, potenciāli apdraudot procesa stabilitāti un iznākumu.

#### 2.4. Biomasas sensoru signāla anomāliju noteikšana un korekcija

Ņemot vērā ļoti dinamiskos apstākļus bioreaktorā augsta šūnu blīvuma fermentāciju laikā, *in situ* sensoru signāliem var būt pazemināta kvalitāte (troksnis) vai novērojamas neparedzētas signālu anomālijas. Ņemot vērā to, ka augstas kvalitātes datiem ir izšķiroša nozīme efektīvā datos balstītā modelēšanā, šīs sensoru signāla kvalitātes problēmas nepieciešams identificēt un risināt vēlams reāllaikā, jo īpaši, ja sensora signāls tiek izmantots fermentācijas vadībai.

Dielektriskās spektroskopijas biomasas sensora datu analīze atklāja interesantu sakarību – metanola indukcijas fāzes laikā permitivitātes signālā parādīja pēkšņi, neizskaidrojami signāla lēcieni un kritumi (pīķi) un signāla līmeņa nobīdes (2.4. A att.) [45, 60]. Līdzīga tendence, lai gan mazāk izteikta, bija vērojama arī optiskā vides duļķainības sensora datos. Šīs anomālijas – lielā mērā neizpētīta problēma fermentācijās – var būtiski ietekmēt procesa veiktspēju, jo īpaši, ja substrāta piebarošanas vadībai tiek izmantoti reāllaika sensoru dati. Lai to novērstu, izmantojot iepriekš ievāko eksperimentālo datu kopu, tika izstrādāts robusts algoritms signāla anomāliju noteikšanai un koriģēšanai reāllaikā [60].

Vienkāršas filtrēšanas metodes, piemēram, slidošais vidējais, bieži vien nav pietiekamas, lai tiktu galā ar sarežģītību un mainīgumu, kas novērojams reālu bioprocesu datos. Lai pārvarētu šos ierobežojumus, tika izstrādāta strukturēta trīspakāpju pieeja: 1) signāla priekšapstrāde, lai samazinātu troksni un novērstu kontekstuālās atkarības; 2) anomāliju noteikšana, izmantojot sliekšņos balstītus kritērijus; 3) anomāliju korekcija un validācija.

### 1. Signāla priekšapstrāde

Lai optimizētu permittivitātes signāla trokšņu filtrēšanu *P. pastoris* fermentācijā reāllaikā, tika izvērtētas vairākas filtrēšanas metodes attiecībā pret manuāli atlasītu beztrokšņa references signālu. Veiktspēja tika novērtēta, izmantojot normalizētu vidējo kvadrātisko kļūdu (*NRMSE*) un signāla aizkaves analīzi, kas ļāva identificēt filtrēšanas metodes un parametrus, kas efektīvi samazināja troksni, neapdraudot signāla precizitāti un neradot pārmērīgu nobīdi atbildes laikā.

### 2. Anomāliju noteikšana

Lai izceltu signāla novirzes, vienlaikus linearizējot signālu un noņemot kontekstuālo atkarību, tika izmantots dubultā slidošā vidējā (*DRA*) metode. Lai noteiktu piemērotas sliekšņa robežvērtības, tika izvērtētas gan statiskās, gan dinamiskās metodes, tostarp manuāla sliekšņa vērtības izvēle un statistiskas pieejas, piemēram, trīs standartnoviržu likums, mediānas absolūtā novirze (*MAD*) un interkvartīļu diapazons (*IQR*), un katra no tām tika pārbaudīta vairākos logu izmēros. Lai noteiktu visstabilāko noteikšanas metodi, katra stratēģija tika salīdzināta ar manuāli anotētām signāla anomālijām, aprēķinot F1 testa rezultātu.

### 3. Signāla korekcija un validācija

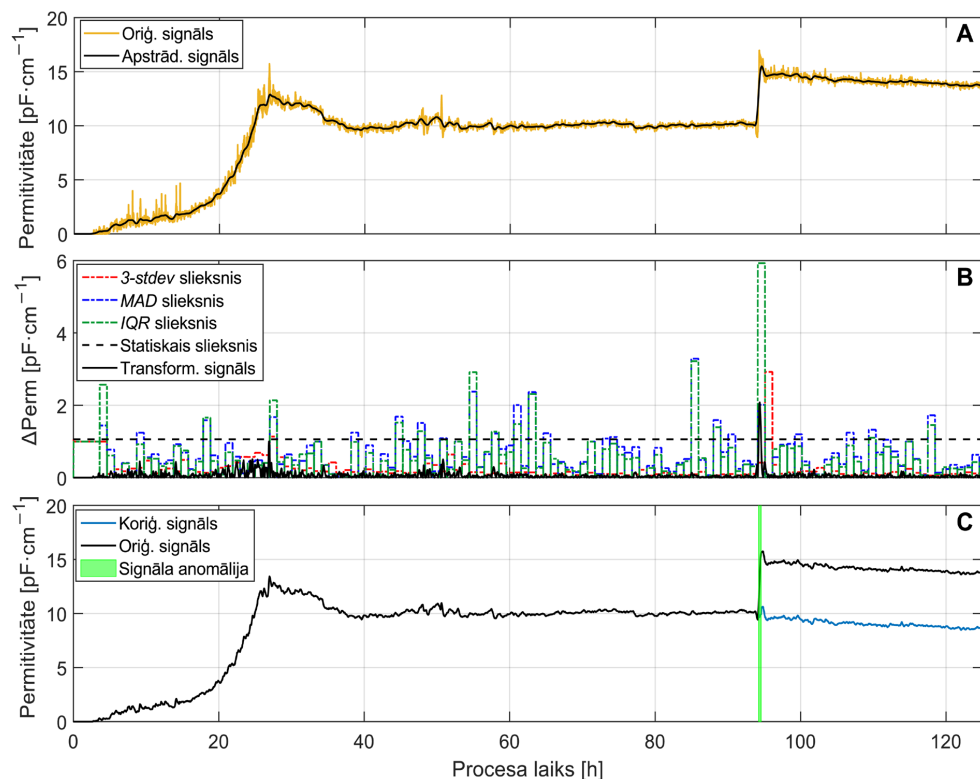
Konstatējot anomāliju, ietekmētais datu punkts tiek koriģēts, aizstājot to ar vidējo no 15 iepriekšējām vērtībām. Tam seko 15 minūšu validācijas logs, lai noteiktu signāla jauno bāzes līniju, izmantojot starpību starp līmeņiem pirms un pēc anomālijas kā dinamisku korekcijas terminu, lai nodrošinātu nepārtrauktību un samazinātu signāla novirzi.

Dažādu filtrēšanas metožu veiktspēja tika novērtēta, izmantojot *NRMSE* un signāla atbildes laika aizkaves laiku, kas tika aprēķināts, izmantojot krustenisko korelāciju starp neapstrādātiem un filtrētiem signāliem reāllaika procesa simulācijās. Starp pārbaudītajām pieejām Gausa filtrs ar loga izmēru 70 piedāvāja vislabāko kompromisu starp trokšņa samazināšanu un reaģētspēju, sasniedzot vidējo *NRMSE*  $4,56 \pm 1,40$  % (33 % signāla trokšņa samazinājums) un pieņemamu signāla atbildes aizkavi par 6,4 minūtēm (2.4. A. att.) [60]. Citas metodes vai nu nespēja sasniegt tik augstu signāla trokšņa samazinājumu, radot ilgāku aizkaves laiku, vai arī skaitļošanas ziņā bija pārāk prasīgas, lai tās varētu izmantot reāllaikā.

Visaugstākā anomāliju noteikšanas efektivitāte tika sasniegta, izmantojot statistiska sliekšņa pieeju, kas F1 testā sasniedza vērtējumu 0,79 (loga izmēri  $w_1 = 1$ ,  $w_2 = 15$ , sliekšnis –  $1,06 \text{ pF} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Šī metode ne tikai demonstrēja spēcīgu signāla anomāliju noteikšanas spēju, bet arī prasīja minimālus skaitļošanas resursus, padarot to piemērotu ieviešanai reāllaikā. Turpretī dinamiskās sliekšņa aprēķināšanas metodes nebija pietiekami efektīvas, jo tās lielā mērā ir atkarīgas no vēsturiskajām signāla vērtībām, uzrādot F1 vērtējumus diapazonā no 0,31 līdz

0,47. Tā rezultātā pēkšņi signāla lēcieni vai kritumi netika nekavējoties atspoguļoti dinamiskajā sliekšņī, izraisot tā nobīdi un palikšanu pārāk zemu, rezultējot kļūdaini pozitīvos signālos permitivitātes signāla svārstību laikā (2.4. B att.) [60]. Iespējams, ka nepieciešama kāda papildu prognozējoša kritērija iekļaušana, lai šīs metodes darbotos salīdzināmā līmenī.

Pēdējā korekcijas posmā konstatētās novirzes permitivitātes signālā tiek aizstātas ar vidējo no 15 iepriekšējām vērtībām, lai nepieļautu, ka straujas signāla fluktuācijas negatīvi ietekmē potenciālos substrāta piebarošanas ātruma aprēķinus. Bez korekcijas šādus artefaktus varētu nepareizi interpretēt kā strauju dzīvotspējīgas biomasas pieaugumu, kas var izsaukt pārmērīgu substrāta padeves pieprasījumu, tālāk apdraudot procesa stabilitāti vai pat rezultējoties fermentācijas pārtraukšanā. Katrai konstatētajai anomālijai seko 15 minūšu validācijas logs, kura laikā tiek turpinātas korekcijas. Ja tiek novērots signāla pīķis, ko raksturo straujš pieaugums un atbilstošs kritums, abi notikumi tiek uzskatīti par vienu anomāliju, lai izvairītos no liekiem koriģējošiem pasākumiem, jo signāls atgriežas sākotnējā stāvoklī. Signāla anomāliju noteikšanas un korekcijas algoritma veikspēja demonstrēta reāllaika fermentācijas procesa simulācijā (2.4. C att.).



2.4. att. Algoritma darbības vizuāls pārskats: (A) signāla kvalitātes uzlabošana ar priekšapstrādi; (B) anomāliju detektēšanas metožu sliekšņu salīdzinājums ar *DRA* transformētajam signālam; (C) algoritma darbība reāllaika fermentācijas simulācijā.

Izvēlētā trīs soļu pieeja tika veiksmīgi izmantota rekombinanta *P. pastoris* fermentāciju simulācijās, nodrošinot precīzu un stabilu sensora signālu, neraugoties uz traucējumiem. Izmantojot statisko sliekšni  $1,06 \text{ (pF} \cdot \text{cm}^{-1})$  un *DRA* metodi (logu izmēri  $w_1 = 1$ ,  $w_2 = 15$ ), pieeja sasniedza F1 testa vērtējumu 0,79 (faktiski nodrošinot 79 % precizitāti), demonstrējot spēcīgu signāla anomāliju detektēšanas veikspēju. Tā vienkāršība, zemās skaitļošanas izmaksas un pielāgošanās spēja padara to labi piemērotu reāllaika procesu monitoringam un vadībai dažādās fermentācijās ar dažādiem sensoriem [60]. Tomēr, lai gan šāda signālu apstrāde ievērojami uzlabo procesu vadības uzticamību, vienlīdz svarīgi ir identificēt un risināt sensoru anomāliju pamatcēloņus, lai nodrošinātu mērījumu ilgtermiņa stabilitāti un procesa noturību.

### 3. *P. pastoris* fermentāciju modelēšana

Publikācijas

- **Bolmanis, E.**; Grigs, O.; Kazaks, A.; Galvanauskas, V. High-Level Production of Recombinant HBcAg Virus-like Particles in a Mathematically Modelled *P. pastoris* GS115 Mut+ Bioreactor Process under Controlled Residual Methanol Concentration. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2022**, *45*, 1447–1463 kā [4].
- **Bolmanis, E.**; Bogans, J.; Akopjana, I.; Suleiko, A.; Kazaka, T.; Kazaks, A. Production and Purification of Soy Leghemoglobin from *Pichia pastoris* Cultivated in Different Expression Media. *Processes* **2023**, *11*, 3215 kā [56].
- **Bolmanis, E.**; Galvanauskas, V.; Grigs, O.; Vanags, J.; Kazaks, A. Leveraging Historical Process Data for Recombinant *P. pastoris* Fermentation Hybrid Deep Modeling and Model Predictive Control Development. *Fermentation* **2025**, *11*, 411 kā [57].

Procesa matemātiskā modelēšana ir būtiska *P. pastoris* fermentācijas labākai izpratnei, optimizēšanai un vadībai. Modelēšanas pieejas aptver gan mehānistiskus modeļus, kas apraksta bioloģiskos procesus, izmantojot bioķīmiskos un fizioloģiskos pamatprincipus, gan datus balstītus modeļus, piemēram, statistikas un mašīnmācīšanās metodes, kas empīriskas attiecības atvasina no procesa datiem. Mehānistiskie modeļi sniedz ieskatu sistēmas darbībā, bet tiem nepieciešamas padziļinātas zināšanas par pašu sistēmu un detalizēta parametru noteikšanas procedūra [23]. No otras puses, datus balstītie modeļi spēj apstrādāt un interpretēt sarežģītu, nelineāru procesa dinamiku ar minimālām iepriekšējām zināšanām, lai gan tie lielā mērā ir atkarīgi no datu kvalitātes un pēc savas būtības ir “melnā kaste” [48]. Lai novērstu šos ierobežojumus, arvien vairāk tiek lietoti hibrīdie modeļi, kuros mehānistiskā izpratne ir integrēta datus balstītā elastībā [29, 49, 50]. Efektīva modelēšana atbalsta procesu izstrādi, mērogošanu un reāllaika vadību, uzlabojot produktivitāti, produktu kvalitāti un atkārtojamību gan laboratorijas, gan rūpnieciskā mēroga fermentācijās.

#### 3.1. Mehānistiskā modelēšana

Mehānistiskais bioreaktora modelis tika izstrādāts, izmantojot fermentācijas datu kopu *P. pastoris* celmam, kas ražo HBcAg. Šeit nav atspoguļoti glicerīna fāzes modelēšanas rezultāti, jo metanola indukcijas fāze ir svarīgāka rekombinanto proteīnu ražošanas kontekstā; pilnīgs pārskats par modelēšanas rezultātiem, tostarp glicerīna fāzi, sniegts oriģinālpublikācijā [4].

Tika izstrādāts makrokinētisks procesa modelis, kas aptver intracelulārās enerģijas un metabolītu līdzsvaru metanola metabolisma laikā, pamatojoties uz Ren *et al.* formulējumu [61]:

$$\begin{bmatrix} \frac{3}{1-\varphi} & \frac{3}{1-\varphi} - K_1 & 0 & 0 \\ \frac{5\varphi+1}{1-\varphi} & \frac{6\varphi}{1-\varphi} - K_1 - 4K_2 & 5 & -2 \\ -1 & -3K_1 - K_2 - \frac{1}{Y_{ATP}} & 1 & 2P/O \\ 1 & 0 & -1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} q_G \\ \mu \\ q_{Ac} \\ q_{O_2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} q_{MeOH} \\ 0 \\ mATP_{MeOH} \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (3.1.)$$

kur  $\phi$  – formaldehīda frakcija, kas oksidēta līdz formiātam;  $K_1$  un  $K_2$  – modeļa parametri;  $Y_{ATP}$  –  $ATP$  ražības koeficients [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ];  $P/O$  – oksidatīvās fosforilēšanas efektivitātes koeficients;  $q_G$  – īpatnējais glikolīzes ātrums [ $\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ];  $\mu$  – īpatnējais augšanas ātrums [ $\text{h}^{-1}$ ];  $q_{Ac}$  – īpatnējais acetil-CoA ražošanas ātrums [ $\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ];  $q_{O_2}$  – īpatnējais skābekļa uzņemšanas ātrums [ $\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ].

Biomases īpatnējais augšanas ātrums ( $\mu$ ) tika iegūts, atrisinot vienādojumu sistēmu ar lineāras algebras metodēm. Īpatnējais metanola uzņemšanas ātrums ( $q_{MeOH}$ ) tika aprēķināts, izmantojot nemonotoni pieaugošu funkciju, ko sākotnēji ierosināja *Jackson & Edwards* [62]:

$$q_{MeOH} = \frac{q_{max} \times S}{K_S + S + (S^2/K_I)} \times M, \quad (3.2.)$$

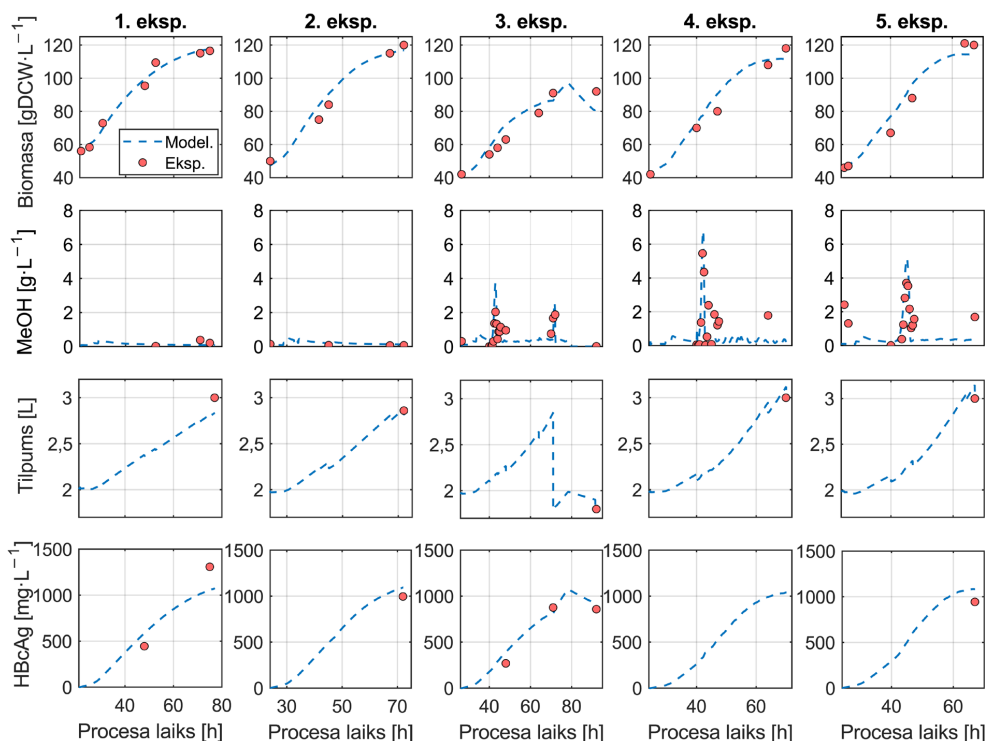
kur  $q_{max}$  – maksimālais īpatnējais metanola uzņemšanas ātrums [ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ];  $S$  – metanola koncentrācija barotnē [ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ];  $K_S$  – metanola piesātinājuma konstante [ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ];  $K_I$  – metanola inhibīcijas konstante [ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ];  $M$  – metanola molmasa [ $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ].

Produkta uzkrāšana ( $q_P$ ) tika aprakstīta, izmantojot *Luedeking-Piret* modeli, kas saista produkta veidošanos gan ar augšanu saistītiem, gan ar augšanu nesaistītiem mehānismiem:

$$q_P = \mu \times Y_{PX}, \quad (3.3.)$$

kur  $\mu$  – īpatnējais šūnu augšanas ātrums [ $\text{h}^{-1}$ ];  $Y_{PX}$  – īpatnējais produkta iznākuma koeficients [ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ].

Aprēķinātais augšanas, substrāta uzņemšanas un produkta veidošanās ātrums tika iekļauts bioreaktora masas bilances diferenciālvienādojumos, lai simulētu šūnu biomasas ( $X$ ), metanola koncentrācijas ( $S$ ), kultūras tilpuma ( $V$ ) un produkta uzkrāšanās ( $P$ ) dinamiku fermentācijas procesā. Optimālie modeļa parametri tika noteikti, pamatojoties uz zinātniskajā literatūrā atspoguļotajām vērtībām, un precizēti, izmantojot fermentācijas datus balstītu parametru atlases procedūru. Izstrādātais modelis spēja veiksmīgi reproducēt galveno procesa parametru dinamiku *P. pastoris* fermentācijas procesa metanola indukcijas fāzē [4]. Attiecīgie simulācijas rezultāti parādīti 3.1. attēlā.



3.1. att. Mehānistiskās modelēšanas rezultāti, kuros atainota šūnu biomasas, metanola koncentrācijas, reaktora tilpuma un produkta (HBcAg) koncentrācijas dinamika piecās *P. pastoris* fermentācijās.

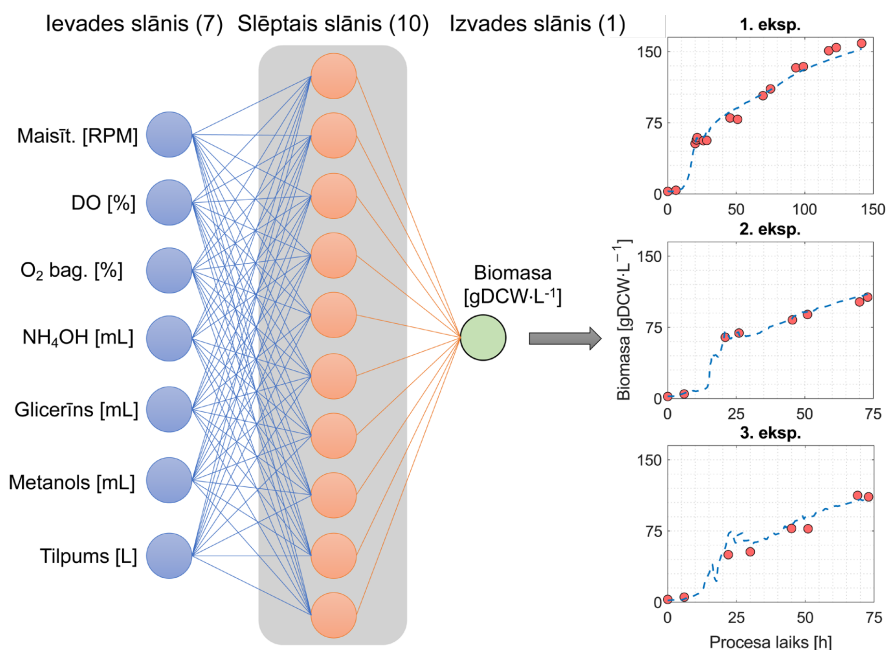
Modelis demonstrēja labu precizitāti attiecībā uz biomasu (5,05 % *NRMSE*), reaktora tilpumu (5,65 %) un produkta koncentrāciju (8,57 %). Tomēr tas bieži vien pārāk zemu novērtēja metanola koncentrāciju pēc šūnu adaptācijas, un tā rezultātā tika ietekmēta precizitāte (20,83 %) [4]. Neskatoties uz to, metanola uzkrāšanās paaugstināta substrāta piebarošanas ātruma laikā tika atspoguļota precīzi. Lai gan ir nepieciešama turpmāka pilnveide, šis modelis demonstrē retu mēģinājumu modelēt metanola koncentrācijas dinamiku *P. pastoris* fermentācijā.

Noslēgumā tika veikta modeļa parametru jutīguma analīze, lai novērtētu modeļa stabilitāti un noteiktu svarīgākos modeļa parametrus. Rezultāti liecināja, ka dažiem parametriem bija augsta jutība, kur pat nelielas novirzes būtiski ietekmēja modeļa precizitāti. Vislielākā jutība tika novērota parametriem glicerīna augšanas fāzē, kuru sākotnēji nelielās kļūdas vērtības visā turpmākajā fermentācijas procesā mēdza uzkrāties un pieaugt, kas radīja negatīvu ietekmi uz modeļa precizitāti [4]. Šie secinājumi liecina, ka modelis ir vispiemērotākais lietošanai tieši metanola indukcijas fāzē, kur tas demonstrē lielāku stabilitāti un augstāku precizitāti.

### 3.2. Dato balstīta modelēšana

Datos balstītā modelēšanā tiek izmantoti vēsturiskie procesa dati, lai atklātu empīriskas sakarības un prognozētu sistēmas uzvedību, nepaļaujoties uz detalizētām mehāniskām zināšanām [63]. Šī pieeja ir īpaši vērtīga sarežģītas dabas biotehnoloģiskos procesos, piemēram, *P. pastoris* fermentācijās, kur procesa kritisko parametru nelineārā dinamika un limitētā procesa izpratne ierobežo tīri mehānistisku modelēšanu. Izmantojot mašīnmācīšanās metodes, datos balstīti modeļi procesu datus spēj atrast sarežģītas ievades-izvades sakarības, atbalstīt fermentācijas reāllaika monitoringu (matemātiskie sensori) un uzlabot prognozēšanas precizitāti ar nosacījumu, ka ir pieejamas augstas kvalitātes reprezentatīvas datu kopas [56, 63].

Šūnu biomasas koncentrācijas novērtēšanai tika izveidots matemātiskais (*software*) sensors uz mākslīgo neironu tīklu (*ANN*) bāzes, izmantojot tikai standarta bioreaktora mērījumus no diviem fermentācijas procesiem [56]. Ievades dati ietvēra maisītāja ātrumu (*RPM*), *DO* (%), ieejas gaisa  $O_2$  bagātināšanas pakāpi (%), pievadīto bāzes, glicerīna un metanola tilpumu (*mL*) un reaktora tilpumu (*L*). Savukārt reāllaika *in situ* optiskās biomasas zondes dati kalpoja kā mērķa datu kopa apmācībai. Datu kopa tika sadalīta, atvēlot 70 % datu apmācībai, 15 % testēšanai un 15 % validācijai. Lai samazinātu pēkšņas svārstības un troksni izstrādātajā biomasas matemātiskajā sensorā, tika izmantots *Savitzky-Golay* filtrs ar pirmās kārtas polinomu un loga izmēru 29. Modeļu apmācībai tika izmantots divu slāņu neironu tīkls ar 10 sigmoidālās funkcijas aktivētiem slēptiem neironiem un vienu lineāru izejas neironu, kā parādīts 3.2. attēlā.



3.2. att. *ANN* balstītā matemātiskā biomasas sensora struktūra un modelēšanas rezultāti.

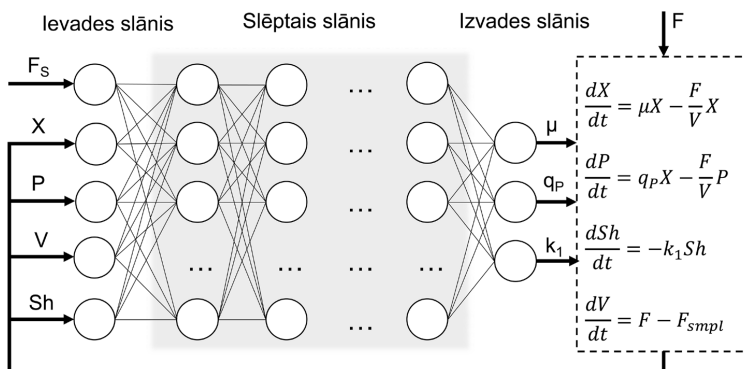
Izstrādātais datos balstītais modelis precīzi atspoguļoja šūnu biomasas dinamiku apskatītajās fermentācijās, demonstrējot labu atbilstību gandrīz visos eksperimentos (3.2. att.).

Kopējā precizitāte modeļa apmācībai izmantotajā datu kopā tika lēsta 3,72 % *NRMSE* apmērā; tomēr metodoloģiskas kļūdas dēļ netika novērtēta tās spēja vispārināt iepriekš neredzētus datus. Izstrādātais matemātiskais sensors ļauj tas tikai uz standarta bioreaktora mērījumiem un neietver papildu signālus, piemēram, CO<sub>2</sub> koncentrāciju reaktora izejas gāzu plūsmā kā citos līdzīgos lietojumos [46, 64]. Lai gan tas var nedaudz ierobežot precizitāti, tas likvidē nepieciešamību pēc papildu sensoriem. Kopumā sasniegto veikspēju var uzskatīt par pietiekamu izmantošanai rekombinantā *P. pastoris* kultivēšanā kā papildu mērījumu eksperimentālajām analīzēm.

### 3.3. Hibrīdā modelēšana

Bioloģisko sistēmu augstā sarežģītība un nelineārā augšanas dinamika biotehnoloģisko procesu monitoringa un vadības jomās joprojām rada būtiskas grūtības. Reaģējot uz to, hibrīdās modelēšanas pieejas, apvienojot mehānistisku un datus balstītu modeļu stiprās puses, ir kļuvas par spēcīgiem rīkiem fermentāciju modelēšanā. Šiem modeļiem ir būtiska nozīme biotehnoloģiskās ražošanas digitālajā evolūcijā, jo īpaši tāpēc, ka mašīnmācīšanās kļūst arvien nozīmīgāka attiecībā uz spēju uztvert procesa dinamiku, neprasot pilnīgas sistēmas zināšanas [29, 49]. Optimālas neironu tīkla arhitektūras izvēle ir ļoti svarīga, lai panāktu augstu modeļa precizitāti un vispārināšanu dziļās mācīšanās lietojumos.

*P. pastoris* fermentācijai tika izstrādāts universāls hibrīdais procesa modelis, izmantojot vēsturisko procesu datu kopu, kas ietver 17 fermentācijas eksperimentus, kas tika veikti šī promocijas darba izstrādes gaitā [57]. Hibrīdā procesa modeļa struktūra redzama 3.3. attēlā.



3.3. att. Izveidotā hibrīdā fermentācijas procesa modeļa struktūras shematisks attēlojums.

Modeļa ievades slāni veido pieci ievades parametri: substrāta (metanola) piebarošanas ātrums ( $F_s$ , mL·min<sup>-1</sup>); sausu šūnu biomasas koncentrācija ( $X$ , gDCW·L<sup>-1</sup>); produkta koncentrācija ( $P$ , mg·L<sup>-1</sup>); kultūras tilpums ( $V$ , L); empīrisks metanola šoka faktors ( $Sh$ ). Šoka faktors, kas sākotnēji definēts kā  $Sh(0) = 1$ , raksturo metanola piebarošanas kumulatīvo citotoksisko ietekmi uz šūnām un var tikt uzskatīts par neizmēramu iekšējā stāvokļa parametru. Modelis ģenerē trīs izvades parametrus – īpatnējo šūnu augšanas ātrumu ( $\mu$ ), īpatnējo produkta ražošanas ātrumu ( $q_p$ ) un šoka faktora izmaiņu tempu ( $k_1$ ). Pēc tam šie rezultāti tiek nodoti modeļa parametriskajam komponentam, kas formulēts kā vienkāršu diferenciālvienādojumu

(*ODE*) sistēma, balstoties bioreaktora materiālajā bilancē un fizikālķīmiskos pieņēmumos. Šajā struktūrā vienīgie ārējās ievades parametri ir substrāta piebarošanas ātrums ( $F_s$ ), paraugu ņemšanas ātrums ( $F_{\text{smpl}}$ ) un kopējās tilpuma plūsmas ātrums ( $F$ ).

Lai efektīvi optimizētu hibrīda modeļa slēptā slāņa arhitektūru, tika izmantota stratēģija, kas ietver trīs soļus. Pirmkārt, Beijesa optimizācija nodrošināja ātru galveno modeļa hiperparametru izpēti, proti, slāņu tipu (*LSTM* vai pilnībā savienotu (*FC*)), slāņu skaitu, aktivācijas funkciju un neironu skaitu. Hibrīdie modeļi tika apmācīti paralēli 10 ciklu garumā ar paaugstinātu mācīšanās ātrumu, un optimālās arhitektūras tika izvēlētas, pamatojoties uz validācijas kļūdas un Akaike informācijas kritērija (*AICc*) vērtībām, lai efektīvi līdzsvarotu modeļa precizitāti ar tā sarežģītību. Pēc tam iegūtās likumsakarības tika izmantotas, lai samazinātu arhitektūru kombināciju skaitu nākamajā solī, kur fokusētā veidā tika atlasīti labākie kandidāti, novērtējot 200 aktivācijas funkciju kombinācijas (*LeakyReLU*, *ReLU*, *Tanh* vai bez), *LSTM* slāņa (1–5) un pilnībā savienotu slāņu (1–10) neironu skaitu. No šiem kandidātiem tika atlasīti pieci labākie modeļi. Noslēgumā šie modeļi tika pilnībā apmācīti (20 000 iterāciju), un tika izvēlēts visefektīvākais modelis; tika novērtēta arī *dropout* slāņa izmantošana, lai uzlabotu noturību un vispārināšanu.

Beijesa optimizācija efektīvi identificēja daudzsološas hibrīda modeļu arhitektūras, koncentrējot meklēšanu uz augstas veiktspējas hiperparametru reģioniem, ievērojami samazinot izvērtēto modeļu skaitu. Vislabākās modeļu arhitektūras konsekvēnti sastāvēja no *LSTM* slāņa, kam sekoja viens *FC* slānis. Turpmākā visaptverošā meklēšana precizēja modeļa atlasī, novērtējot visas iespējamās slēpto neironu skaita un aktivācijas funkciju kombinācijas. Izmantojot gan validācijas kļūdas, gan *AICc* vērtības, no Pareto frontes tika atlasīti pieci līdzsvaroti modeļi, kas demonstrēja gan augstu prognozēšanas precizitāti, gan mērenu sarežģītību, tādējādi nodrošinot vispārināmību un skaitļošanas efektivitāti (3.1. tabula).

3.1. tabula

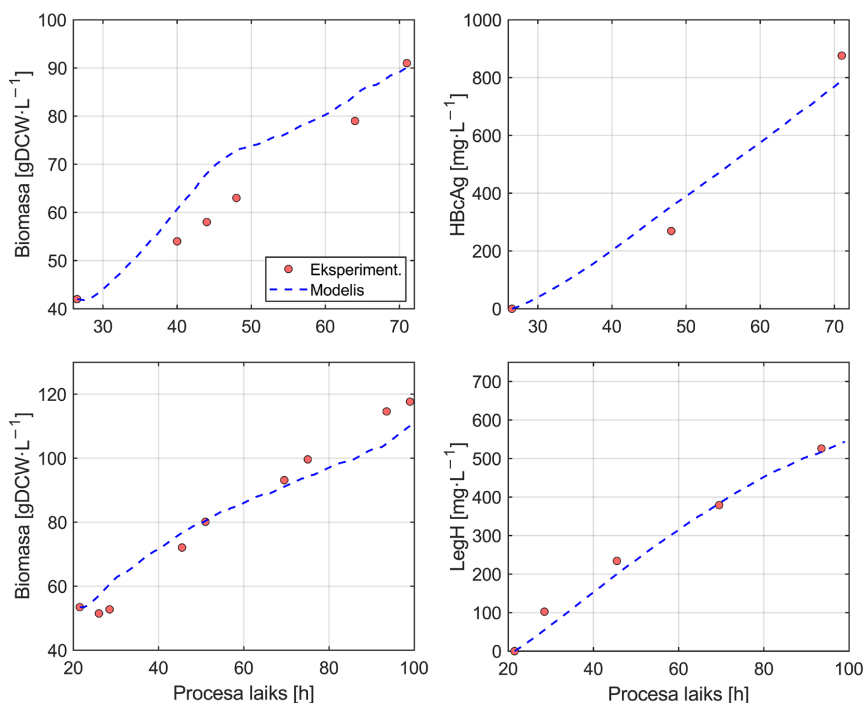
Labāko modeļa arhitektūru apkopojums

| <i>LSTM</i> neironi | <i>FC</i> neironi | Aktivācijas funkcija | Validācijas kļūda [%] | Parametru skaits | <i>AICc</i> |
|---------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|------------------|-------------|
| 3                   | 5                 | <i>LeakyReLU</i>     | 7,28                  | 146              | 1294        |
| 2                   | 10                | <i>LeakyReLU</i>     | 6,37                  | 127              | 1155        |
| 2                   | 9                 | <i>Tanh</i>          | 8,14                  | 121              | 1236        |
| <b>2</b>            | <b>8</b>          | <b><i>ReLU</i></b>   | <b>4,93</b>           | <b>115</b>       | <b>998</b>  |
| 1                   | 9                 | <i>Tanh</i>          | 8,27                  | 76               | 1090        |

Pēdējā optimizācijas solī katra no piecām atlasītajām arhitektūrām tika apmācīta 10 reizes (20 000 iterācijās), lai novērtētu noturību un veiktspējas konsekvenci pie dažādām nejauša rakstura inicializācijām (3.1. tabula). Visefektīvākais modelis sastāvēja no diviem *LSTM* slāņiem un astoņiem neironiem *FC* slānī, kas aktivēti ar *ReLU* aktivācijas funkciju. Šis modelis uzrādīja vismazāko validācijas kļūdu (4,93 %) un *AICc* (998) vērtību, nodrošinot optimālu kompromisu starp prognozēšanas precizitāti un vienkāršību (3.4. att.). *Dropout* slāņa

ieviešana (ar 0,1–0,5 varbūtību) konsekventi pasliktināja veiktspēju, liecinot, ka modelis jau bija pietiekami robusts.

Kā redzams 3.4. attēlā, modelis efektīvi atspoguļo gan šūnu biomasas, gan produktu koncentrāciju dinamiku fermentācijas procesa gaitā. Tomēr tas nespēj pilnībā izskaidrot nelielo biomasas koncentrācijas samazinājumu uzreiz pēc metanola indukcijas, kas atspoguļo šūnu pielāgošanos metanola metabolismam. Tas rezultējās nelielā biomasas koncentrācijas pārvērtēšanā agrīnajā metanola indukcijas fāzē. Sakarā ar minimālo šūnu biomasas pieaugumu metanola adaptācijas fāzē biomasas paraugu ņemšana netika veikta pietiekami bieži; tomēr šādi mērījumi ir būtiski, lai modelis varētu precīzi mācīties un atspoguļot šim posmam raksturīgo izaugsmes stagnāciju. Lai gan eksperimentālo produktu koncentrāciju mērījumu pieejamība ir limitēta, modelis demonstrē labu precizitāti arī produkta koncentrācijas novērtēšanā.



3.4. att. Ar atlasīto hibrīdo modeli noteiktās šūnu biomasas un produktu koncentrācijas HBcAg (augšējā rinda) un LegH (apakšējā rinda) fermentācijas procesiem.

### 3.4. Modeļu veidu salīdzinājums

Lai būtu iespējams adekvāti un jēgpilni salīdzināt mehānistiskās, datus balstītās un hibrīdās modelēšanas pieejas, visi trīs modeļu tipi tika novērtēti, izmantojot vienu un to pašu datu kopu. Lai gan iepriekšējās nodaļās katra modeļa spējas tika demonstrētas atsevišķi, izmantojot dažādas datu kopas, lai tieši varētu salīdzināt modelēšanas precizitāti, ir nepieciešami vienādi apmācības un testēšanas nosacījumi. Tāpēc tika izvēlēta vienota datu kopa (20 eksperimenti), lai nodrošinātu to, ka visi modeļi izmanto vienu un to pašu ievades informāciju. Šī standartizētā

pieeja ļauj objektīvi novērtēt modeļu prognozēšanas precizitāti, vispārināšanas spēju un modeļa sarežģītību dažādās modelēšanas paradigmās.

Ņemot vērā to, ka promocijas darba tapšanas gaitā tika pētīti trīs atšķirīgi rekombinanti produkti, katram produktam raksturīgie parametri tika optimizēti neatkarīgi katrā attiecīgā eksperimentālajā apakškopā, lai nodrošinātu precīzu un objektīvu produkta koncentrācijas novērtējumu. Visbeidzot, lai pilnībā izmantotu pieejamos datus, tika izmantota četrkārsa savstarpējā validācija, nejauši sadalot datu kopu četrās apakškopās, no kurām katrai ir atsevišķi apmācības un testēšanas nodaļumi. Katra testēšanas kārtā ietvēra divus eksperimentus ar HBcAg producentu, divus ar LegH producentu un vienu ar Q $\beta$  producentu, nodrošinot līdzsvarotu un reprezentatīvu novērtējumu visiem produktu veidiem. Modeļa veikspēja tika novērtēta kā testēšanas rezultātu vidējā vērtība  $\pm$  standartnovirze visās savstarpējās validācijas kopās. Visa eksperimentālo datu kopa apkopota 3.2. tabulā.

3.2. tabula

Eksperimentālo datu kopa modeļu salīdzināšanai

| Eksp. Nr. | Celms, produkts | Indukcijas ilgums [h] | Biomasa [gDCW·L <sup>-1</sup> ] | Piebarošanas ātr. [mL·min <sup>-1</sup> ] | V <sub>beigu</sub> [L] |
|-----------|-----------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|------------------------|
| 1.        | GS115, HBcAg    | 65                    | 37,5–101,6                      | 0,12–0,78                                 | 2,85                   |
| 2.        | GS115, HBcAg    | 45                    | 40,6–113,5                      | 0,12–1,00                                 | 3,09                   |
| 3.        | GS115, HBcAg    | 43                    | 41,2–120,1                      | 0,12–0,98                                 | 3,13                   |
| 4.        | GS115, HBcAg    | 50                    | 59,2–120,1                      | 0,12–0,36                                 | 2,54                   |
| 5.        | GS115, HBcAg    | 51                    | 41,4–96,6                       | 0,12–0,36                                 | 2,87                   |
| 6.        | GS115, HBcAg    | 48                    | 49,1–120,0                      | 0,12–0,50                                 | 2,88                   |
| 7.        | GS115, HBcAg    | 43                    | 53,7–101,5                      | 0,12–0,36                                 | 2,74                   |
| 8.        | GS115, HBcAg    | 54                    | 44,1–84,0                       | 0,12–0,56                                 | 2,75                   |
| 9.        | X-33, LegH      | 65                    | 55,4–123,2                      | 0,12–0,36                                 | 2,57                   |
| 10.       | X-33, LegH      | 46                    | 49,5–95,4                       | 0,12–0,60                                 | 2,98                   |
| 11.       | X-33, LegH      | 65                    | 48,9–111,2                      | 0,12–0,36                                 | 2,85                   |
| 12.       | X-33, LegH      | 50                    | 45,3–101,3                      | 0,12–0,36                                 | 2,61                   |
| 13.       | X-33, LegH      | 45                    | 52,9–103,1                      | 0,12–0,36                                 | 2,55                   |
| 14.       | X-33, LegH      | 46                    | 45,1–101,3                      | 0,12–0,36                                 | 2,52                   |
| 15.       | X-33, LegH      | 65                    | 51,0–101,7                      | 0,12–0,36                                 | 2,66                   |
| 16.       | X-33, LegH      | 46                    | 50,6–92,4                       | 0,12–0,60                                 | 3,00                   |
| 17.       | X-33, Q $\beta$ | 65                    | 52,5–117,6                      | 0,12–0,49                                 | 3,23                   |
| 18.       | X-33, Q $\beta$ | 48                    | 49,3–117,2                      | 0,12–1,00                                 | 3,40                   |
| 19.       | X-33, Q $\beta$ | 55                    | 50,1–107,7                      | 0,12–0,36                                 | 2,84                   |
| 20.       | X-33, Q $\beta$ | 52                    | 52,9–112,6                      | 0,12–0,87                                 | 3,45                   |

Nav pārsteidzoši, ka modelēšanas sniegums dažādiem modeļu veidiem ievērojami atšķirās. Katra modeļa tipa apmācības un testēšanas kļūdu dati apkopoti 3.3. tabulā.

3.3. tabula

Modeļu snieguma salīdzinājums, vidējā precizitāte (NRMSE)

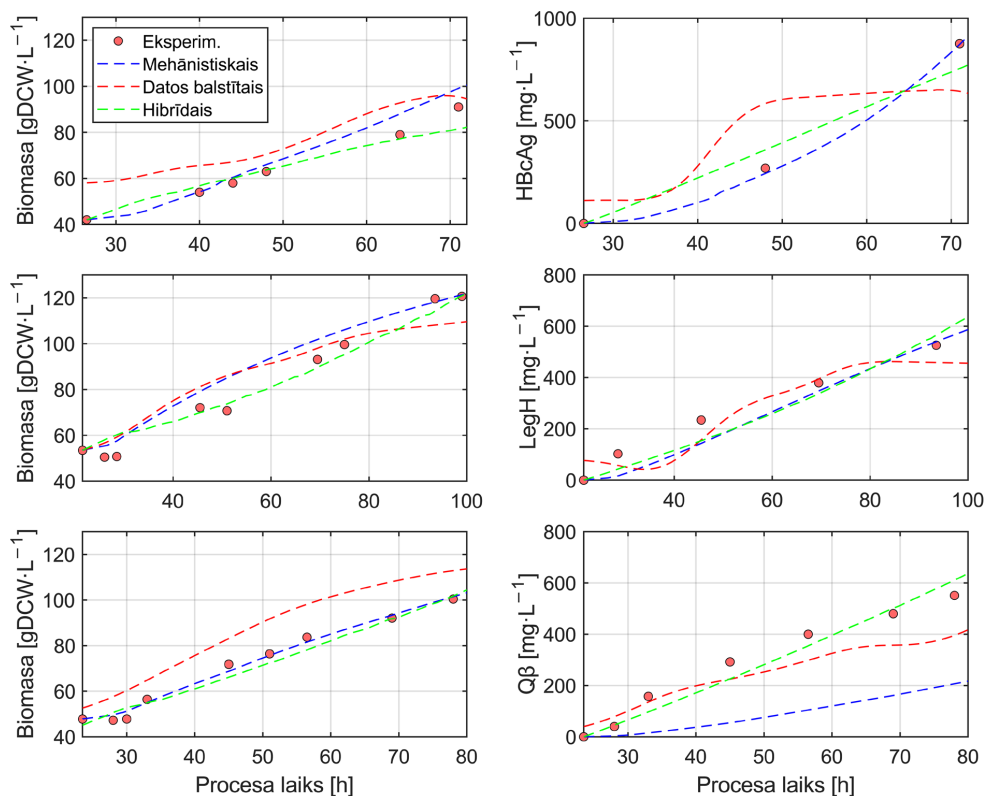
| Modelis        | Metrika    | Biomasa [%] | Produkts [%] | Vidējais [%]       |
|----------------|------------|-------------|--------------|--------------------|
| Mehānistisks   | Apmācības  | 10,9 ± 2,0  | 19,6 ± 2,7   | 15,3 ± 2,2         |
|                | Testēšanas | 13,1 ± 4,4  | 65,4 ± 33,8  | <b>39,2 ± 18,9</b> |
| Datos balstīts | Apmācības  | 7,9 ± 1,3   | 7,7 ± 2,2    | 7,8 ± 0,5          |
|                | Testēšanas | 14,8 ± 2,3  | 41,7 ± 9,2   | <b>28,2 ± 5,4</b>  |
| Hibrīds        | Apmācības  | 9,1 ± 1,9   | 11,7 ± 3,1   | 10,4 ± 2,5         |
|                | Testēšanas | 9,1 ± 2,0   | 13,1 ± 5,5   | <b>11,1 ± 2,6</b>  |

3.3. tabulā novērojamas vairākas atšķirības starp trim modeļu veidiem. Visi modeļi uzrādīja pietiekamu precizitāti biomasas koncentrācijas prognozēšanā apmācības laikā, un *NRMSE* svārstījās no 7,9 % līdz 10,9 %. Tomēr hibrīda modelis sasniedza zemāko biomasas prognozēšanas testa kļūdu (9,1 %), kas liecina par labāku vispārināšanu attiecībā uz jauniem, iepriekš modelim neredzētiem datiem, salīdzinot ar mehānistiskajiem (13,1 %) un datus balstītajiem (14,8 %) modeļiem. Tas liecina, ka mehānisku sakarību integrēšana datus balstītā modelēšanas pieejā nodrošina lielāku robustumu, jo īpaši biomasas dinamikas atspoguļošanā dažādos procesa apstākļos.

Attiecībā uz produktu koncentrācijas aplēsēm atšķirības starp modeļu veidiem kļuva izteiktākas. Hibrīdais modelis ievērojami pārspēja pārējos modeļus ar 13,1 % testa kļūdu, kas bija salīdzinoši tuva tā apmācības laikā sasniegtajam rezultātam (11,7 %), liecinot par spēcīgu modeļa vispārināšanas spēju un uzticamu produkta biosintēzes dinamikas sakarību apguvi. Turpretī mehānistiskajam modelim bija ievērojama veikspējas atšķirība ar salīdzinoši augstu apmācības kļūdu (19,6 %) un ļoti lielu testa kļūdu (65,4 %), kas atspoguļoja nepietiekamu spēju pielāgoties eksperimentālo datu mainīgumam un ierobežotu spēju uztvert rekombinantās proteīnu ekspresijas dinamiku. Datus balstītais modelis uzrādīja labākus rezultātus nekā mehāniskais modelis (41,7 %), taču tas joprojām būtiski atpalika no hibrīdā analoga, iespējams, tāpēc, ka tam nebija ar fermentācijas procesu saistītu iepriekšēju zināšanu.

Kopumā hibrīdais modelis uzrādīja vislabāko vispārējo veikspēju ar vidējo apmācības kļūdu 10,4 % un testa kļūdu 11,1 %, kas liecina gan par augstu precizitāti, gan spēju sekmīgi vispārināt apgūtās sakarības. Mehānistiskais modelis demonstrēja ierobežotu elastību (39,2 % testa kļūda), savukārt datus balstītais modelis uzrādīja pārmērīgas pielāgošanas (*overfitting*) pazīmes ar zemu apmācības kļūdu (7,8 %), bet salīdzinoši augstu testa kļūdu (28,2 %). Šie rezultāti izceļ hibrīdā modeļa spēju efektīvi apvienot mehānistiskās zināšanas ar datu virzītu apmācību, padarot to par drošu un uzticamu izvēli tādu sarežģītu procesu modelēšanai kā *P. pastoris* fermentācijas.

3.5. attēlā redzama modeļu veiktspēja biomasas un produktu koncentrācijas prognozēšanā reprezentatīvam eksperimentam no katra rekombinantā proteīna producenta. Hibrīdais modelis pastāvīgi nodrošina visprecīzākos rezultātus, efektīvi atspoguļojot gan šūnu biomasas pieauguma, gan produktu uzkrāšanas tendences.



3.5. att. Modeļu veiktspējas salīdzinājums šūnu biomasas un produktu koncentrāciju novērtēšanai katra rekombinantā proteīna producenta vienā reprezentatīvā fermentācijā.

Lai šos rezultātus aplūkotu perspektīvā, jāņem vērā vairāki faktori, jo īpaši datu kopas kvalitāte, daudzveidība un pilnīgums. Dati aptvēra trīs dažādas *P. pastoris* konstrukcijas no diviem atšķirīgiem celmiem GS115 un savvaļas tipa X-33. Lai gan šūnu biomasas augšanas un produkta uzkrāšanās dinamika kopumā bija līdzīga, zināms bioloģiska rakstura mainīgums bija sagaidāms. Turklāt eksperimenti tika veikti laika posmā, kas aptver vairākus gadus, un, lai gan tika ievēroti standartizēti protokoli, pastāv nelielu darbību vai tehnisko neatbilstību iespējamība. Būtiska nozīme bija arī datu iztrūkumam, jo īpaši attiecībā uz rekombinanto proteīnu koncentrāciju. Produkta kvantitatīvā noteikšana ietvēra darbietilpīgas attīrīšanas procedūras, kurām bieži bija nepieciešamas vairākas hromatogrāfijas procedūras, kas būtiski ierobežoja mērījumu biežumu. Tā rezultātā modeļiem dažkārt bija problēmas precīzi atspoguļot produktu uzkrāšanās dinamiku. Kopumā šie faktori varēja veicināt lielāku modelēšanas kļūdu.

Neraugoties uz šīm problēmām, hibrīdais modelis demonstrēja spēcīgu sniegumu, precīzi atspoguļojot gan biomasas, gan produktu dinamiku dažādos apstākļos. Tā spēju vispārināt apstiprināja ciešā atbilstība starp apmācības un testēšanas kļūdām, kas liecināja, ka modelis pārmērīgi nepielāgojās apmācības datiem, bet gan spēja no tiem identificēt būtiskās sakarības un saglabāja prognozējošo noturību arī attiecībā uz iepriekš neredzētiem datiem.

### 3.5. Pārneses mācīšanās

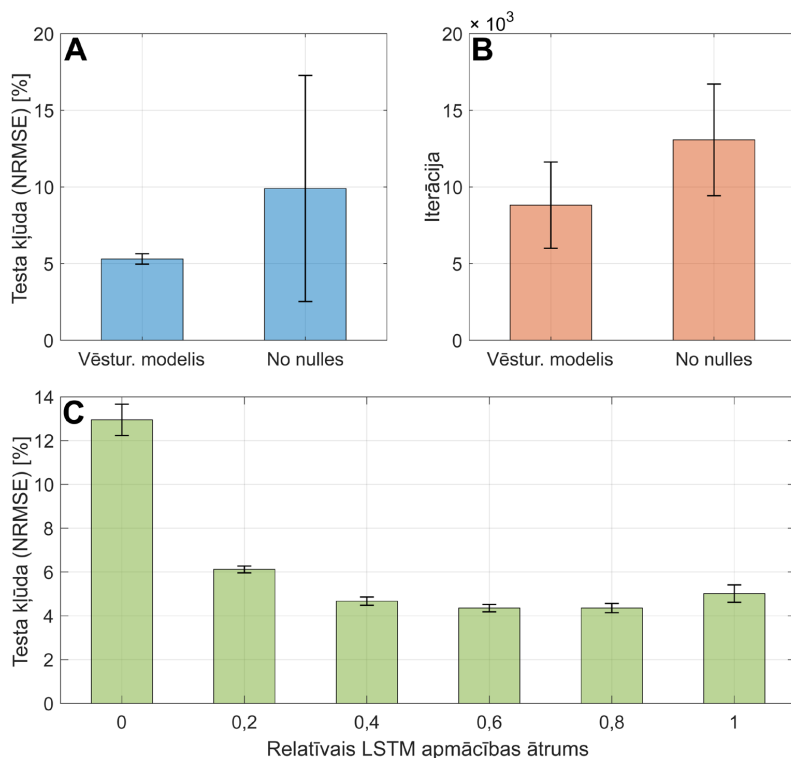
Pārneses mācīšanās ir mašīnmācīšanās tehnika, kas izmanto zināšanas, kas iegūtas, apmācot modeli vienam uzdevumam vai datu kopai, lai uzlabotu veikspēju saistītā, bet atšķirīgā uzdevumā vai datu kopā [65]. Hibrīdas bioprocesu modelēšanas kontekstā tā ļauj pielāgot iepriekš apmācītu modeli jauniem produktiem, celmiem vai procesiem, paātrinot apmācību, samazinot nepieciešamību pēc jauniem lielapjoma datiem un uzlabojot prognozēšanas precizitāti. Tas ir īpaši vērtīgi bioprocesu izstrādē, kur augstas kvalitātes eksperimentālo datu ģenerēšana ir gan laikietilpīga, gan darbietilpīga, padarot pārneses mācīšanos par praktisku stratēģiju modeļa mērogojamības, efektivitātes un lietojamības uzlabošanai dažādos biotehnoloģiskās ražošanas scenārijos [57, 65].

Šajā pētījumā tika lietota pārneses mācīšanās, lai pielāgotu hibrīdo modeli, kas apmācīts ar datu kopu no 17 HBcAg un LegH fermentāciju eksperimentiem, Q $\beta$  ražošanas procesam, izmantojot datus tikai no diviem eksperimentiem (3.2. tab., 17. un 18. eksperiments). Galvenā ideja bija izmantot vēsturisko procesa modeli kā sākotnējo stāvokli Q $\beta$  modeļa apmācībai. Apmācot *LSTM* slāņa parametrus ar samazinātu mācīšanās ātrumu (0–1,0 attiecībā pret pārējo tīklu), modelis saglabāja iepriekš apgūtās parametru laika dinamiku, vienlaikus pielāgojoties jaunajai Q $\beta$  datu kopai. Šī stratēģija ļāva modelim paturēt atmiņā galvenās *P. pastoris* fermentācijas iezīmes no vēsturiskā modeļa, tādējādi uzlabojot vispārināšanu un mazinot ierobežojumus, kas saistīti ar apmācību uz tik neliela datu kopuma.

Vispirms tika novērtēta vēsturiskā hibrīdā modeļa pielāgošana Q $\beta$  datu kopai, salīdzinot tā testa kļūdas vērtību (3.2. tab., 19. eksperiments) un izkliedi ar sākuma modeli, kas apmācīts no nulles ar nejauši inicializētiem parametriem. Rezultāti rāda, ka Q $\beta$  modeļa apmācības inicializēšana ar jau iepriekš apmācītu vēsturisko procesa modeli, nevis apmācība no nulles, radīja ievērojami zemākas testa kļūdas vērtības (vidēji 5,31 % pret 9,90 %) ar būtiski samazinātu mainīgumu (standartnovirze  $\pm 0,34$  pret  $\pm 7,38$ ) (3.6. A att.). Turklāt apmācība tika pabeigta ātrāk, prasot mazāk iterāciju (vidēji 8820 pret 13070) (3.6. B att.). Šie atklājumi liecina, ka vispārīgie procesa modeļi, apmācīti uz līdzīgām datu kopām, var kalpot kā efektīvi sākuma punkti jaunu hibrīdo modeļu izstrādei *P. pastoris* fermentācijās [57, 64]. Saglabājot vēsturisko procesu zināšanas, šādi modeļi ne tikai samazina prognozēšanas kļūdu, bet arī saīsina apmācības laiku, kas ir īpaši vērtīgi, strādājot ar nelielām datu kopām.

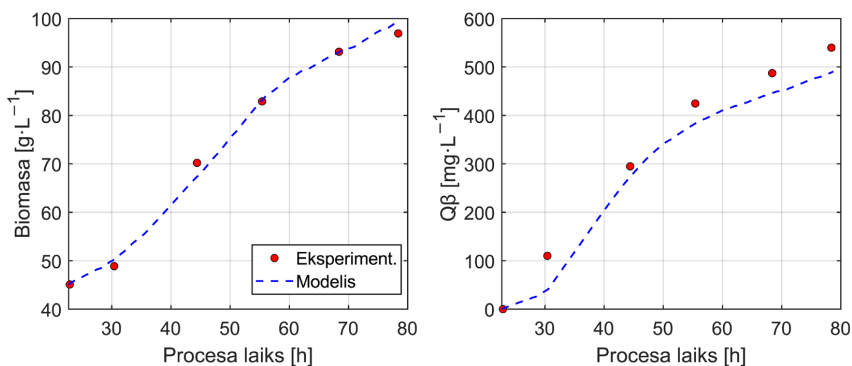
Lai efektīvi realizētu pārneses mācīšanos, optimālais *LSTM* slāņa relatīvais mācīšanās ātrums tika noteikts, sistemātiski pārbaudot visu tā diapazonu. Tā kā *LSTM* slānis “atceras” procesa dinamiku, tā mācīšanās ātruma pielāgošana ļauj modelim saglabāt daļu iepriekšējo zināšanu, vienlaikus pielāgojoties jaunam datu kopumam. Rezultāti liecina, ka *LSTM* slāņa apmācīšana ar 0,6–0,8 no pārējā modeļa mācīšanās ātruma nodrošina vislabāko veikspēju ar vidējo prognozēšanas kļūdu  $4,53 \pm 0,20$  % 10 atkārtojumos (3.6. C att.). Šie atklājumi liecina,

ka tikai daļēja atmiņas slāņu apmācība, nevis to pilnīga iesaldēšana, nodrošina efektīvu līdzsvaru starp iepriekšējā modeļa zināšanu saglabāšanu un jaunā procesa raksturīgo iezīmju uztveršanu [57]. Šajā konkrētajā gadījumā *LSTM* mācīšanās ātruma iestatīšana minētajā diapazonā ļauj efektīvi realizēt pārnese mācīšanos ar minimālu testēšanas kļūdu un izkliedi.



3.6. att. Vidējā prognozēšanas kļūda (A) un apmācības iterāciju skaits (B) hibrīda Qβ procesa modelim, kad tas ir pielāgots no vēsturiskā modeļa vai apmācīts no nulles; vidējais testa zudums kā *LSTM* slāņa relatīvā mācīšanās ātruma funkcija (C).

Galīgais hibrīda procesa modelis, pielāgots no vēsturiskā modeļa ar *LSTM* relatīvo mācīšanās ātrumu 0,6, uzrādīja spēcīgu prognozēšanas veiktspēju, precīzi atspoguļojot galveno mainīgo parametru dinamiku visā Qβ fermentācijas procesā. Kopumā tas sasniedza testēšanas *NRMSE* 4,35 %, ar 3,16 % biomasas koncentrācijai un 5,64 % produkta koncentrācijai, demonstrējot uzticamu abu procesa parametru prognozēšanas spēju (3.7. att.).



3.7. att. Šūnu biomasas un produkta koncentrāciju dinamika, kas prognozēta, izmantojot hibrīdo procesa modeli.

Tā kā biomasas augšanas dinamika ir līdzīga arī dažādiem *P. pastoris* celmiem, galvenais variācijas avots, modelējot fermentācijas dažādos producentos, rodas no atšķirībām produkta uzkrāšanās dinamikā. Tādējādi tieša modeļa pārvešana no viena producenta uz citu bez pielāgošanas var radīt neprecīzas prognozes, jo iegūtā produkta kinētikas reprezentācija var nebūt vispārīga. Lai to risinātu, papildu pārneses mācīšanai ar daļēju slāņa iesaldēšanu var izpētīt līdzīgas stratēģijas, piemēram, iekļaujot modelī papildu adaptācijas modulius, hibrīda modeļa segmentēšanu atsevišķos apakštīklos katram parametram (piemēram, viens modulis biomasai, otrs – produktam utt.) vai produkta specifisko parametru pielāgošanu. Šī pieeja palīdz saglabāt vispārīgas procesa zināšanas, piemēram, biomasas augšanas dinamiku, vienlaikus ļaujot modelim uztvert katram producentam raksturīgas iezīmes, piemēram, rekombinantā produkta uzkrāšanos. Šī pieeja ļauj efektīvi pielāgoties jauniem producentiem pat ar ierobežotiem eksperimentāliem datiem, samazinot nepieciešamību modeļus apmācīt pilnībā no jauna.

Tā kā pieejami tikai divi eksperimenti, treniņu dati ir nepietiekami, lai pilnībā izpētītu procesa parametru telpu. Rezultātā modelis var ļoti darboties tikai apstākļos, kas ir līdzīgi tiem, kas sastapti apmācības laikā, savukārt prognozes neizpētītajā parametru telpā, visticamāk, būs neuzticamas ierobežotās ekstrapolācijas spējas dēļ. Apmācība uz jauna datu kopuma, izmantojot vēsturisko procesa modeli, ļauj modelim saglabāt vērtīgas zināšanas no daudzveidīgākā vēsturiskā datu kopuma, tādējādi uzlabojot veikspēju procesa apstākļos, ko Qβ datu kopums neietver, kā tas demonstrēts šajā darbā.

Šis pētījums parāda, ka pārneses mācīšanās, izmantojot vēsturisku hibrīdo modeli, ir efektīva stratēģija, lai veiksmīgāk izstrādātu modeļus jauniem *P. pastoris* fermentācijas procesiem ar ierobežotām eksperimentālo datu kopām. Sākot Qβ modeļa apmācību, par pamatu ņemot iepriekš apmācītu vēsturisko modeli un daļēji pielāgojot LSTM slāni ar optimizētu relatīvo mācīšanās ātrumu, bija iespējams saglabāt vispārējās parametru dinamikas, vienlaikus pielāgojoties celma specifiskai produkta uzkrāšanai. Šī metode ne tikai samazināja testa kļūdu un mainīgumu, salīdzinot ar apmācību no nulles, bet arī paātrināja apmācību, nodrošinot galīgo modeli, kas spēj precīzi prognozēt gan biomasas, gan produkta koncentrācijas. Šie rezultāti uzsvēr iepriekšējo zināšanu izmantošanas vērtību hibrīdo modeļu pārneses apmācībā, lai uzlabotu modeļa vispārināšanu un efektivitāti bioprocesu lietojumos.

## 4. Fermentācijas procesu vadība

### Publikācijas

- **Bolmanis, E.;** Grigs, O.; Kazaks, A.; Galvanauskas, V. High-Level Production of Recombinant HBcAg Virus-like Particles in a Mathematically Modelled *P. pastoris* GS115 Mut+ Bioreactor Process under Controlled Residual Methanol Concentration. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2022**, *45*, 1447–1463 kā [4].
- **Bolmanis, E.;** Galvanauskas, V.; Grigs, O.; Vanags, J.; Kazaks, A. Leveraging Historical Process Data for Recombinant *P. pastoris* Fermentation Hybrid Deep Modeling and Model Predictive Control Development. *Fermentation* **2025**, *11*, 411 kā [57].

Substrāta piebarošanas ātruma kontrole ir kritisks aspekts fermentācijas procesu vadībā, tieši ietekmējot šūnu augšanu, produkta veidošanos un kopējo procesa produktivitāti. Precīza substrāta piebarošana, piemēram, glikozes, glicerīna vai metanola, nodrošina to, ka mikroorganismi saņem optimālu barības vielu piegādi, lai uzturētu vielmaiņas aktivitāti, vienlaikus izvairoties no paaugstināta substrāta koncentrācijas radītas inhibīcijas vai barības vielu trūkuma. Efektīvas piebarošanas ātruma stratēģijas palīdz uzturēt vēlamu augšanas ātrumu, novērš toksisku blakusproduktu uzkrāšanos šūnās un uzlabot procesa produktivitāti. Ir izstrādātas dažādas vadības pieejas – no vienkāršiem piebarošanas profiliem līdz uzlabotām, uz sarežģītiem procesa modeļiem balstītām un reāllaika atgriezeniskās saites kontroles sistēmām, kuru mērķis ir optimizēt substrāta piegādi un stabilizēt fermentācijas dinamiku [18, 33]. Tādējādi robusta substrāta piebarošanas kontrole ir būtiska, lai nodrošinātu reproducējamus un efektīvi mērojamus fermentācijas procesus.

### 4.1. Metanola koncentrācijas kontrole

Metanola koncentrācijas kontrole *P. pastoris* fermentācijās ir būtiska, lai optimizētu rekombinanto proteīnu ražošanu, vienlaikus izvairoties no substrāta inhibīcijas vai toksitātes [12, 66]. Precīza kontrole nodrošina to, ka metanols tiek uzturēts līmenī, kas atbalsta šūnu metabolismu un proteīnu ekspresiju, neradot šūnām papildu stresu vai pārmērīgu substrāta uzkrāšanos. Bieži izmantotās stratēģijas ietver tiešsaistes metanola sensoru izmantošanu kombinācijā ar vadības algoritmiem, piemēram, vienkāršiem PID cilpas kontrolieriem, lai dinamiski pielāgotu metanola piebarošanas ātrumu un uzturētu optimālu substrāta koncentrāciju visā indukcijas fāzē [33].

Lai izpētītu metanola koncentrācijas ietekmi uz rekombinantā proteīna biosintēzi, tika veikta virkne eksperimentu, kuros tika pētīta HBcAg produktivitāte, ja metanola līmenis ir  $0,01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  un  $2,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  [4]. Lai metanola koncentrāciju uzturētu nemainīgā līmenī, tika izstrādāts PI (proporcionālais-integrālais) kontrolieris, kas balstīts uz metanola sensora (*BCP-EtOH*, *BlueSens*) signālu. Metanola sensora tiešsaistes signāls tika iepriekš apstrādāts, izmantojot 2.2. apakšnodaļā aprakstīto slidošā vidējā algoritmu. Kontroles algoritms regulēja metanola piebarošanas ātrumu ar mērķi stabilizēt sensora signālu ap vēlamu iestatījuma punktu (izvēlēto koncentrāciju), izmantojot atgriezeniskās saites kontroles vienādojumu, kas iekļauj PI algoritmu:

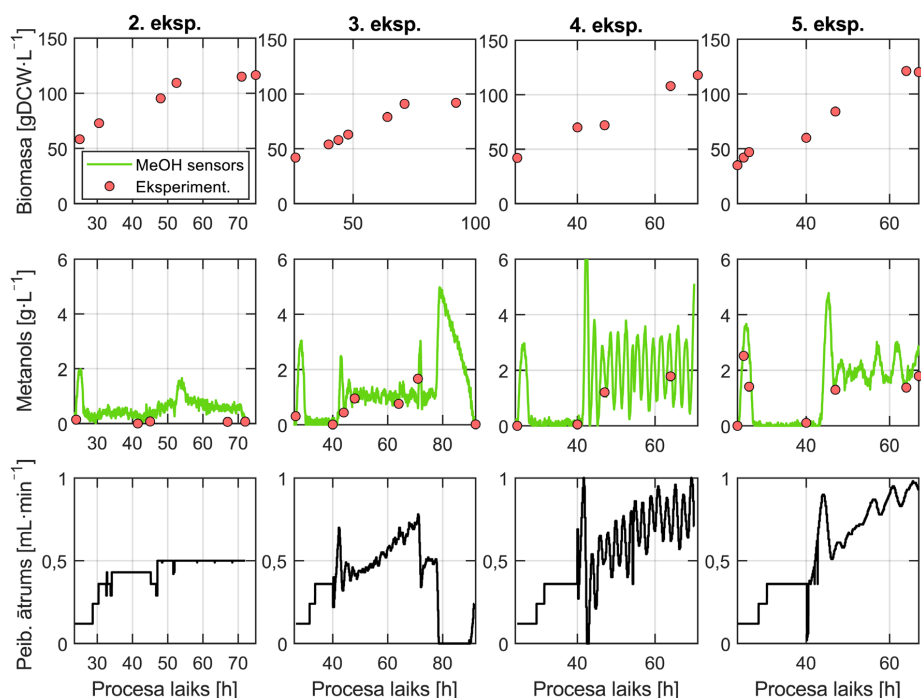
$$F_{t+\Delta t} = F_t - \frac{V}{(S_0 - S)} \times \frac{dS}{dt} + K_p \left[ (\varepsilon_t - \varepsilon_{t-1}) + \frac{\Delta t}{\tau_I} \varepsilon_t \right], \quad (4.1.)$$

kur  $F_t$  – substrāta piebarošanas ātrums pašreizējā laikā  $t$  [ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ];  $V$  – reaktora tilpums [L];  $S_0$  – substrāta koncentrācija piebarošanas šķīdumā [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ];  $S$  – substrāta koncentrācija barotnē [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ];  $K_p$  – proporcionālā pieauguma parametrs [ $\text{L}^2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ];  $\varepsilon$  – starpība starp izmērīto un iestatīto koncentrāciju [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ];  $\Delta t$  – laika intervāls starp soļiem [min];  $\tau_I$  – integrālā laika konstante [min].

Modeļa integrēšana ar PI vadības algoritmu ļāva saglabāt nemainīgus parametrus  $K_p$  un  $\tau_I$  visā kultivēšanas procesā. Tomēr metanola kontroles precizitāte bija ļoti jutīga pret izvēlēto  $K_p$  skaitlisko vērtību. Šis parametrs, kura vērtība svārstījās no 0,02 līdz 0,05 [ $\text{L}^2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ], tika pielāgots, pamatojoties uz vēlamo metanola koncentrāciju. Pretstatā tam integrālās laika konstantes  $\tau_I$  vērtība visos eksperimentos tika noteikta – 10 minūtes.

2. eksperimentā netika piemērota metanola kontrole. Metanola piebarošanas ātrums tika nedaudz palielināts, lai novērtētu tā ietekmi uz HBcAg produktivitāti, nodrošinot bāzes līnijas datus salīdzināšanai. 3. eksperimentā, sākot no 40. kultivācijas stundas, metanola koncentrācija tika kontrolēta 1,0 [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ] līmenī, izmantojot PI kontrolieri. Kontrolieris veiksmīgi uzturēja metanola koncentrāciju noteiktajā apmērā ar vidējo novirzi  $\pm 0,28$  [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ] (28 % *NRMSE*) līdz 72. kultivācijas stundai, kad no bioreaktora tika aizvadīts 1 [L] kultūras, izraisot īslaicīgu metanola pieaugumu. Lai gan kontrolieris sākotnēji pielāgojās, metanola līmenis drīz atkal pieauga, liecinot par iespējamu kultūras pārbarošanu.

4. eksperimentā metanola koncentrācijas uzstādījums tika palielināts līdz 2,0 [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ], bet tika saglabāta tā pati kontroles parametru vērtība ( $K_p = 0,05$  [ $\text{L}^2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ]), kas izraisīja ievērojamu nestabilitāti, metanolam svārstoties starp 1,0 un 3,0 [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ] ar vidējo novirzi  $\pm 1,26$  [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ]. Samazinot  $K_p$  vērtību līdz 0,002 [ $\text{L}^2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ] 5. eksperimentā, ievērojami uzlabojās vadības kvalitāte un vidējā novirze bija  $\pm 0,67$  [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ] (63 % *NRMSE*). Šie rezultāti, kas redzami 4.1. attēlā, apliecina, ka PI kontrolieris metanola līmeni spēj kontrolēt ar apmierinošu precizitāti, ja tas ir pareizi noregulēts. Tomēr tā efektivitāte bija ļoti jutīga pret kontroles parametru izvēli, īpaši proporcionālā pieauguma parametru. Lai gan kontrolieris demonstrēja zināmu pielāgošanās spēju procesa traucējumiem, stabilitāte tika apdraudēta, ja parametru vērtības nebija optimālas vai procesa izmaiņas bija pēkšņas. Šie novērojumi ilustrē vajadzību pēc rūpīgas un adaptīvas kontroles iestatījumu pielāgošanas, lai nodrošinātu stabilu metanola regulēšanu fermentācijās.



4.1. att. Šūnu biomasas, metanola koncentrācijas un metanola piebarošanas ātruma dinamika *P. pastoris* fermentācijas eksperimentos ar metanola koncentrācija PI-kontroli.

PI algoritma balstītais metanola piebarošanas ātruma kontrolieris izrādījās efektīvs rekombinantās *P. pastoris* fermentācijās. Precīzi noregulēts, izmantojot izplūdes gāzu metanola sensora signālu kā atgriezeniskās saites elementu, tas ļāva kontrolēt metanola koncentrāciju izvēlētajā līmenī ar vidējo novirzi  $\pm 0,28\text{--}0,67 \text{ [g·L}^{-1}\text{]}$ , kas atbilst *NRMSE* 28–63 %. Tomēr, ņemot vērā tā augsto jutību pret kontroles parametru skaitlisko vērtību izvēli, ieteicams ieviest automatizētu regulēšanas procedūru, lai nodrošinātu stabilu veiktspēju dažādos metanola līmeņos. Kontroles precizitāti varētu vēl vairāk uzlabot, iekļaujot *in situ* metanola sensora zondi, kas nodrošina precīzāku mērījumu ar ātrāku atbildes laiku.

#### 4.2. Uz modeli balstīta prognozējošā vadība

Hibrīdās *MPC* sistēmas integrē datus balstītus modeļus, piemēram, neironu tīklus, ar pamatprincipu zināšanām, lai nodrošinātu precīzu prognozēšanas spēju un reāllaika optimizāciju sarežģītos biotehnoloģiskos procesos. Šie kontrolieri izmanto gan mehānistiskās izpratnes, gan mašīnmācīšanās stiprās puses, lai risinātu nelineāru procesa dinamiku, neprognozētus procesa traucējumus un mērījumu troksni fermentācijās. Biotehnoloģiskajā ražošanā hibrīda *MPC* ir īpaši piemērota pieeja fermentācijās ar piebarošanu, kur fizioloģiskā mainība un substrātu-produktu mijiedarbības ir grūti atspoguļojamas tikai ar mehānistiskiem modeļiem [67, 68].

Pamatojoties uz hibrīdo procesa modeli, tika izstrādāts *MPC* ietvars, lai regulētu šūnu augšanu tuvu maksimālajam īpatnējam augšanas ātrumam [69]. *MPC* aprēķināja optimālo

substrāta piebarošanas ātrumu  $F_S(t)$ , kas nepieciešams, lai sekotu iepriekš noteiktai augšanas trajektorijai  $\mu_{set}(t)$ . Tā kā hibrīdais modelis, kur  $F_S$  ir ievade un  $\mu$  ir izvide, nav tieši invertējams, katrā vadības solī tika lietota skaitliskā optimizācija, izmantojot *MATLAB* *fminbnd* funkciju noteiktajās robežās  $F_S \in [0.36, 1.00] \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ :

$$\min_{F_S \in [0.36, 1.00] \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}} \sum_{k=1}^{N_p} [\mu(k) - \mu_{set}(k)]^2, \quad (4.2.)$$

ņemot vērā hibrīdā modeļa dinamiku:

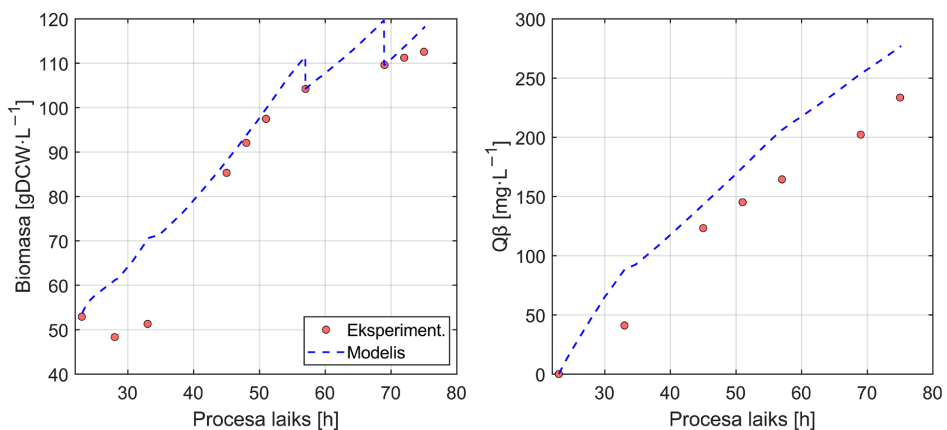
$$x(k+1) = f_{\text{hybrid}}(x(k), F_S(k)), \quad (4.3.)$$

kur  $x(k)$  apzīmē funkcijas stāvokļa vektoru un  $\mu(k)$  ir prognozētais pieauguma temps laika solī  $k$ . Kontroles un prognozēšanas horizonti tika iestatīti uz  $N_C = 1$  stundu un  $N_p = 12$  stundām, attiecīgi. Hibrīdais modelis tika simulēts ar 1 minūtes paraugu ņemšanas intervālu, lai nodrošinātu precīzas prognozes.

Lai saglabātu augstu pielāgošanās spēju, modelis tika no jauna apmācīts aptuveni trīs reizes dienā pēc katras paraugu ņemšanas, izmantojot jaunus biomasas mērījumus  $X_{\text{meas}}(t)$ . Reāllaika procesa dati, tostarp substrāta piebarošanas ātrums, bāzes un putu dzēsēja padeve, tika integrēti *MATLAB* vidē, kas savienota ar bioreaktora *SCADA* sistēmu, izmantojot *OPC* serveri, iespējot reāllaika slēgtās cilpas vadību.

*MPC* vadība tika sākta pēc metanola adaptācijas fāzes (8–10 h pēc indukcijas). Izvēlētais šūnu augšanas ātruma iestatījums  $\mu_{set}(t)$  tika piemērots pakāpeniski:  $0,04 \text{ h}^{-1}$  (0–12 h),  $0,02 \text{ h}^{-1}$  (12–24 h) un  $0,01 \text{ h}^{-1}$  (24–36 h), līdzsvarojoš produktivitāti un šūnu stresu.

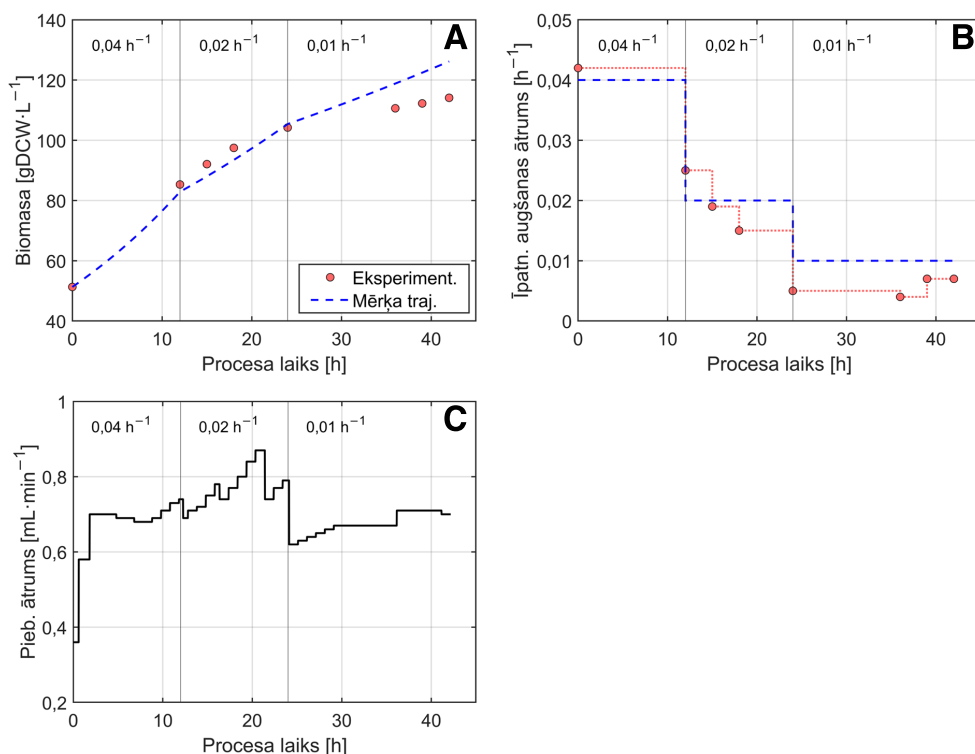
Lai novērtētu hibrīdā *MPC* ietvara praktisko lietojamību, tika veikta eksperimentāla validācija, kontrolējot metanola piebarošanas ātrumu reālā fermentācijas procesā. Tas ļāva novērtēt sistēmas spēju reāllaikā prognozēt un regulēt galvenos fermentācijas procesa parametrus (4.2. att.).



4.2. att. Hibrīdās *MPC* vadības prognozētās un eksperimentāli noteiktās biomasas un produkta koncentrācijas validācijas fermentācijā.

Biomasa prognozēšanas precizitāte var definēt kā labu, tomēr modelis pārvērtēja biomasas pieaugumu sākotnējās 8–12 stundās pēc indukcijas, kamēr šūnas adaptējas metanola uzņemšanai, un atkal fermentācijas beigās. Manuālas trajektorijas korekcijas izrādījās nepieciešamas fermentācijas beigu daļā un tika veiktas modeļa apmācības laikā, pamatojoties uz eksperimentālajiem datiem, un tā rezultātā kopējais biomasas *NRMSE* sasniedza 6,5 %. Līdzīgi arī produkta koncentrācija tika konsekventi pārvērtēta, uzrādot kļūdu 14,6 % apmērā [57].

Neskatoties uz šiem prognozēšanas ierobežojumiem, hibrīdā *MPC* vadības veikspēja kopumā bija noturīga. Sistēma veiksmīgi ģenerēja substrāta piebarošanas profilus, kas uzturēja vēlamo īpatnējo augšanas ātrumu, demonstrējot efektīvu regulāciju pat modelēšanas neprecizitāšu klātbūtnē. Kontroliera izvēlētās šūnu biomasas izsekošanas veikspēja redzama 4.3. attēlā.



4.3. att. Mērķa un eksperimentālās biomasas augšanas (A), īpatnējā augšanas ātruma (B) un substrāta piebarošanas ātruma (C) grafiki. Vertikālās līnijas norāda  $\mu$  izmaiņas.

Hibrīdā *MPC* sistēma demonstrēja labu sniegumu, izsekojot īpatnējā augšanas ātruma iestatījumam visā fermentācijas procesā ar vidējo kļūdu 10,6 % *NRMSE*. Tomēr neliela novirze no mērķa biomasas trajektorijas tika novērota pēdējās 12 stundās, īpaši pēc tam, kad augšanas ātrums tika samazināts līdz 0,01 h<sup>-1</sup>. Šī novirze, visticamāk, ir saistīta ar metanola citotoksisko efektu uz šūnām, kas var kavēt šūnu metabolismu un biomasas veidošanos fermentācijas beigās.

fāzē. Šī tendence ir atspoguļota arī augšanas ātruma izsekošanas grafikā, kur mērītais īpatnējais augšanas ātrums šajā periodā pastāvīgi bija zem mērķa.

*MPC* sistēmas veikspēju varētu uzlabot vēl vairāk, veicot visaptverošāku procesa parametru izpēti plašākā diapazonā. Sistemātiska plašāka kultivācijas apstākļu diapazona pārbaude, tostarp piebarošanas ātruma trajektorijas, indukcijas ilgums un īpatnējā augšanas ātruma iestatījumi, palīdzētu identificēt optimālas vadības stratēģijas. Šī papildu informācija uzlabotu kontroliera spēju tikt galā ar procesa mainīgumu un traucējumiem, tādējādi uzlabojot tā robustumu un pielāgojamību dažādos fermentācijas scenārijos. Turklāt visaptverošāks procesa modelis atbalstītu paplašinātas *MPC* lietojumprogrammas, piemēram, optimālo piebarošanas ātrumu novērtēšanu, lai maksimizētu procesa produktivitāti.

Kopumā, neskatoties uz nelielām neatbilstībām procesa beigās, *MPC* sistēma lielākajā daļā fermentācijas uzturēja precīzu augšanas regulāciju, izceļot tās robustumu, uzticamību un potenciālo lietojumu rekombinantu *P. pastoris* fermentāciju vadībā.

## SECINĀJUMI

1. Reāllaika sensoru signālu priekšapstrāde būtiski uzlabo signāla kvalitāti – metanola sensora svārstības tika samazinātas par 63 %, bet dielektriskās spektroskopijas trokšņu līmenis par 33 %. Turklāt permitivitātes anomāliju noteikšanas un novēršanas algoritms uzrādīja 79 % precizitāti, stiprinot sensoru uzticamību monitoringa un vadības lietojumos.
2. Modelējot *P. pastoris* fermentāciju procesus, hibrīdie modeļi precizitātē pārspēja mehānistiskās un datus balstītās pieejas, sasniedzot zemāko testa *NRMSE* ( $11,1 \pm 2,6$  %), salīdzinot ar attiecīgi  $39,2 \pm 18,9$  % un  $28,2 \pm 5,4$  %.
3. Pielāgojot vēsturisko hibrīdo procesa modeli Qβ datu kopai ar 0,6 relatīvo mācīšanās ātrumu, tika uzrādīts labāks rezultāts nekā modeļa apmācībā no nulles, samazinot vidējo testa kļūdu un novirzi (no  $9,90 \pm 7,38$  % līdz  $5,31 \pm 0,34$  %) ar mazāku iterāciju skaitu (8820 pret 13 070) un demonstrējot testa *NRMSE* 4,35 %, pārneses mācīšanās rezultātā nodrošinot precīzas modeļa prognozes ar ierobežotu datu apjomu no tikai trīs eksperimentiem.
4. PI piebarošanas ātruma kontrolieris uzrādīja vidēju precizitāti metanola koncentrācijas regulācijā ar aprēķinātajām *NRMSE* vērtībām 28 % un 63 % pie  $1 \text{ [g}\cdot\text{L}^{-1}]$  un  $2 \text{ [g}\cdot\text{L}^{-1}]$ , attiecīgi. Tā parametru jutīgums uzsvēr nepieciešamību pēc automatizētas parametru pielāgošanas procedūras un *in situ* sensora iekļaušanas, lai uzlabotu veiktspēju, paātrinot sensora reakcijas laiku un uzlabojot signāla kvalitāti dinamiskos fermentācijas apstākļos.
5. Hibrīdais *MPC* demonstrēja robustu *P. pastoris* fermentācijas vadību, saglabājot vēlamo īpatnējo augšanas ātrumu ar vidējo izsekošanas kļūdu 10,6 % *NRMSE*, neskatoties uz modelēšanas neprecizitātēm. Tā kā *MPC* veiktspēja lielā mērā bija atkarīga no procesa modeļa kvalitātes, šie rezultāti uzsvēr, ka augsta modeļa kvalitāte ir kritiska veiksmīgai *MPC* ieviešanai biotehnoloģiskos procesos un pamato turpmāku hibrīdā *MPC* izpēti *P. pastoris* fermentāciju kontekstā.

## LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Jayakrishnan, A.; Wan Rosli, W. R.; Tahir, A. R. M.; Razak, F. S. A.; Kee, P. E.; Ng, H. S.; Chew, Y. L.; Lee, S. K.; Ramasamy, M.; Tan, C. S.; et al. Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review. *Sci* **2024**, *6*.
2. Tripathi, N.K.; Shrivastava, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front Bioeng Biotechnol* **2019**, *7*, doi:10.3389/fbioe.2019.00420.
3. Mordor Intelligence. Biologics Market Size & Share Analysis – Growth Trends and Forecast (2026–2031). **2025**.
4. Bolmanis, E.; Grigs, O.; Kazaks, A.; Galvanauskas, V. High-Level Production of Recombinant HBcAg Virus-like Particles in a Mathematically Modelled *P. Pastoris* GS115 Mut+ Bioreactor Process under Controlled Residual Methanol Concentration. *Bioprocess Biosyst Eng* **2022**, *45*, 1447–1463, doi:10.1007/s00449-022-02754-4.
5. Letourneur, O.; Watelet, B. HBcAg Expression and Diagnostic and Therapeutic Uses. EP Patent No. EP1256804A1, **2001**.
6. Freivalds, J.; Dislers, A.; Ose, V.; Skrastina, D.; Cielens, I.; Pumpens, P.; Sasnauskas, K.; Kazaks, A. Assembly of Bacteriophage Q $\beta$  Virus-like Particles in Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* and *Pichia Pastoris*. *J Biotechnol* **2006**, *123*, 297–303, doi:10.1016/j.jbiotec.2005.11.013.
7. Spohn, G.; Keller, I.; Beck, M.; Grest, P.; Jennings, G. T.; Bachmann, M. F. Active Immunization with IL-1 Displayed on Virus-like Particles Protects from Autoimmune Arthritis. *Eur J Immunol* **2008**, *38*, 877–887, doi:10.1002/eji.200737989.
8. Vuitika, L.; Côrtes, N.; Malaquias, V. B.; Silva, J. D. Q.; Lira, A.; Prates-Syed, W. A.; Schimke, L. F.; Luz, D.; Durães-Carvalho, R.; Balan, A.; et al. A Self-Adjuvanted VLPs-Based Covid-19 Vaccine Proven Versatile, Safe, and Highly Protective. *Sci Rep* **2024**, *14*, doi:10.1038/s41598-024-76163-w.
9. Fraser, R. Z.; Shitut, M.; Agrawal, P.; Mendes, O.; Klapholz, S. Safety Evaluation of Soy Leghemoglobin Protein Preparation Derived From *Pichia Pastoris*, Intended for Use as a Flavor Catalyst in Plant-Based Meat. *Int J Toxicol* **2018**, *37*, 241–262, doi:10.1177/1091581818766318.
10. Reyes, T. F.; Chen, Y.; Fraser, R. Z.; Chan, T.; Li, X. Assessment of the Potential Allergenicity and Toxicity of *Pichia* Proteins in a Novel Leghemoglobin Preparation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2021**, *119*, 104817, doi:10.1016/j.yrtph.2020.104817.
11. Cregg, J. M.; Cereghino, J. L.; Shi, J.; Higgins, D. R. Recombinant Protein Expression in *Pichia Pastoris*. *Mol Biotechnol* **2000**, *16*, 23–52, doi:10.1385/MB:16:1:23.
12. Potvin, G.; Ahmad, A.; Zhang, Z. Bioprocess Engineering Aspects of Heterologous Protein Production in *Pichia Pastoris*: A Review. *Biochem Eng J* **2012**, *64*, 91–105, doi:10.1016/j.bej.2010.07.017.

13. Yang, Z.; Zhang, Z. Engineering Strategies for Enhanced Production of Protein and Bio-Products in *Pichia Pastoris*: A Review. *Biotechnol Adv* **2018**, *36*, 182–195, doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.002.
14. Karbalaeei, M.; Rezaee, S. A.; Farsiani, H. *Pichia Pastoris*: A Highly Successful Expression System for Optimal Synthesis of Heterologous Proteins. *J Cell Physiol* **2020**, *235*, 5867–5881, doi:10.1002/jcp.29583.
15. Macauley-Patrick, S.; Fazenda, M. L.; McNeil, B.; Harvey, L. M. Heterologous Protein Production Using the *Pichia Pastoris* Expression System. *Yeast* **2005**, *22*, 249–270, doi:10.1002/yea.1208.
16. U. S. Food and Drug Administration *GRAS Notice No. 204. Phospholipase C Enzyme Preparation from Pichia Pastoris Expressing a Heterologous Phospholipase C Gene*; **2006**.
17. Moraes, L. M. P. de; Marques, H. F.; Reis, V. C. B.; Coelho, C. M.; Leitão, M. de C.; Galdino, A. S.; Porto de Souza, T. P.; Piva, L. C.; Perez, A. L. A.; Trichez, D.; et al. Applications of the Methylophilic Yeast *Komagataella Phaffii* in the Context of Modern Biotechnology. *Journal of Fungi* **2024**, *10*.
18. Mears, L.; Stocks, S. M.; Sin, G.; Gernaey, K. V. A Review of Control Strategies for Manipulating the Feed Rate in Fed-Batch Fermentation Processes. *J Biotechnol* **2017**, *245*, 34–46, doi:10.1016/j.jbiotec.2017.01.008.
19. Lindskog, E. K. The Upstream Process: Principal Modes of Operation; Elsevier Ltd., **2018**.
20. Lim, H. C.; Shin, H.S. Introduction to Fed-Batch Cultures. In *Fed-Batch Cultures*; Cambridge University Press, **2018**.
21. Villadsen, J.; Patil, K. R. Optimal Fed-Batch Cultivation When Mass Transfer Becomes Limiting. *Biotechnol Bioeng* **2007**, *98*, 706–710, doi:10.1002/bit.21451.
22. 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 Engineer Quart* **2016**, *30*, 47–60, doi:10.15255/CABEQ.2015.2212.
23. Mears, L.; Stocks, S. M.; Albaek, M. O.; Sin, G.; Gernaey, K. V. Mechanistic Fermentation Models for Process Design, Monitoring, and Control. *Trends Biotechnol* **2017**, *35*, 914–924.
24. Cinar, A.; Parulekar, S. J.; Undey, C.; Birol, G. *Batch Fermentation*; CRC Press, **2003**.
25. Bailey, J. E. Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities. *Biotechnol Prog* **1998**, *14*, 8–20, doi:10.1021/bp9701269.
26. Noll, P.; Henkel, M. History and Evolution of Modeling in Biotechnology: Modeling & Simulation, Application and Hardware Performance. *Comput Struct Biotechnol J* **2020**, *18*, 3309–3323, doi:10.1016/j.csbj.2020.10.018.
27. Helleckes, L. M.; Hemmerich, J.; Wiechert, W.; von Lieres, E.; Grünberger, A. Machine Learning in Bioprocess Development: From Promise to Practice. *Trends Biotechnol* **2023**, *41*, 817–835, doi:10.1016/j.tibtech.2022.10.010
28. Pinto, J.; Mestre, M.; Ramos, J.; Costa, R. S.; Striedner, G.; Oliveira, R. A General Deep Hybrid Model for Bioreactor Systems: Combining First Principles with Deep Neural

- Networks. *Comput Chem Eng* **2022**, *165*, 107952, doi:10.1016/j.compchemeng.2022.107952.
29. Agharafeie, R.; Ramos, J. R. C.; Mendes, J. M.; Oliveira, R. From Shallow to Deep Bioprocess Hybrid Modeling: Advances and Future Perspectives. *Fermentation* **2023**, *9*, 1–22, doi:10.3390/fermentation9100922.
  30. Pinto, J.; Ramos, J. R. C.; Costa, R. S.; Oliveira, R. Hybrid Deep Modeling of a GS115 (Mut<sup>+</sup>) *Pichia Pastoris* Culture with State–Space Reduction. *Fermentation* **2023**, *9*, doi:10.3390/fermentation9070643.
  31. Pinto, J.; Ramos, J. R. C.; Costa, R. S.; Rossell, S.; Dumas, P.; Oliveira, R. Hybrid Deep Modeling of a CHO-K1 Fed-Batch Process: Combining First-Principles with Deep Neural Networks. *Front Bioeng Biotechnol* **2023**, *11*, doi:10.3389/fbioe.2023.1237963.
  32. Ramos, J. R. C.; Pinto, J.; Poiaraes-Oliveira, G.; Peeters, L.; Dumas, P.; Oliveira, R. Deep Hybrid Modeling of a HEK293 Process: Combining Long Short-Term Memory Networks with First Principles Equations. *Biotechnol Bioeng* **2024**, *121*, 1554–1568, doi:10.1002/bit.28668.
  33. Bolmanis, E.; Dubencovs, K.; Suleiko, A.; Vanags, J. Model Predictive Control – A Stand Out among Competitors for Fed-Batch Fermentation Improvement. *Fermentation* **2023**, *9*, 206, doi:10.3390/fermentation9030206.
  34. Schwenzer, M.; Ay, M.; Bergs, T.; Abel, D. Review on Model Predictive Control: An Engineering Perspective. *J Adv Manuf Technol* **2021**, *117*, 1327–1349.
  35. Jelsch, M.; Roggo, Y.; Kleinebudde, P.; Krumme, M. Model Predictive Control in Pharmaceutical Continuous Manufacturing: A Review from a User’s Perspective. *Eur J Pharm* **2021**, *159*, 137–142, doi:10.1016/j.ejpb.2021.01.003.
  36. Craven, S.; Whelan, J.; Glennon, B. Glucose Concentration Control of a Fed-Batch Mammalian Cell Bioprocess Using a Nonlinear Model Predictive Controller. *J Process Control* **2014**, *24*, 344–357, doi:10.1016/j.jprocont.2014.02.007.
  37. Dubencovs, K.; Suleiko, A.; Sile, E.; Petrovskis, I.; Akopjana, I.; Suleiko, A.; Galvanauskas, V.; Tars, K.; Vanags, J. The Application of Adaptive Model Predictive Control for Fed-Batch *Escherichia Coli* BL21 (DE3) Cultivation and Biosynthesis of Recombinant Proteins. *Fermentation* **2023**, *9*, doi:10.3390/fermentation9121015.
  38. Ashoori, A.; Moshiri, B.; Khaki-Sedigh, A.; Bakhtiari, M. R. Optimal Control of a Nonlinear Fed-Batch Fermentation Process Using Model Predictive Approach. *J Process Control* **2009**, *19*, 1162–1173, doi:10.1016/j.jprocont.2009.03.006.
  39. Reyes, S. J.; Durocher, Y.; Pham, P. L.; Henry, O. Modern Sensor Tools and Techniques for Monitoring, Controlling, and Improving Cell Culture Processes. *Processes* **2022**, *10*, 189, doi:10.3390/pr10020189.
  40. Niu, S. S.; Xiao, D. *Process Control*; Springer International Publishing, **2022**.
  41. Vojinović, V.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P. Real-Time Bioprocess Monitoring: Part I: *In Situ* Sensors. *Sens Actuators B Chem* **2006**, *114*, 1083–1091, doi:10.1016/j.snb.2005.07.059.
  42. Sundström, H.; Enfors, S. O. Software Sensors for Fermentation Processes. *Bioprocess Biosyst Eng* **2008**, *31*, 145–152, doi:10.1007/s00449-007-0157-5.

43. Panda, S.; Mehlawat, S.; Dhariwal, N.; Sanger, A.; Kumar, A. Comprehensive Review on Gas Sensors: Unveiling Recent Developments and Addressing Challenges. *Materials Science and Engineering: B* **2024**, *308*.
44. Biechele, P.; Busse, C.; Solle, D.; Scheper, T.; Reardon, K. Sensor Systems for Bioprocess Monitoring. *Eng Life Sci* **2015**, *15*, 469–488, doi:10.1002/elsc.201500014.
45. Grigs, O.; Bolmanis, E.; Galvanauskas, V. Application of *In-Situ* and Soft-Sensors for Estimation of Recombinant *P. Pastoris* GS115 Biomass Concentration: A Case Analysis of HBcAg (Mut<sup>+</sup>) and HBsAg (Mut<sup>S</sup>) Production Processes under Varying Conditions. *Sensors* **2021**, *21*, 1268, doi:10.3390/s21041268.
46. Beiroti, A.; Hosseini, S. N.; Norouzian, D.; Aghasadeghi, M. R.; Jajan, L. H. G. Development of Soft Sensors for Online Biomass Prediction in Production of Hepatitis B Vaccine. *Biointerface Res Appl Chem* **2023**, *13*, 1–13, doi:10.33263/BRIAC132.194.
47. Mandenius, C. F.; Gustavsson, R. Mini-Review: Soft Sensors as Means for PAT in the Manufacture of Bio-Therapeutics. *J Chem Technol Biotechnol* **2015**, *90*, 215–227, doi:10.1002/jctb.4477.
48. Tsopanoglou, A.; Jiménez del Val, I. Moving towards an Era of Hybrid Modelling: Advantages and Challenges of Coupling Mechanistic and Data-Driven Models for Upstream Pharmaceutical Bioprocesses. *Curr Opin Chem Eng* **2021**, *32*, doi:10.1016/j.coche.2021.100691.
49. von Stosch, M.; Glassey, J. *Hybrid Modeling in Process Industries*; CRC Press, **2018**.
50. Schweidtmann, A. M.; Zhang, D.; von Stosch, M. A Review and Perspective on Hybrid Modeling Methodologies. *Digit Chem Eng* **2024**, *10*, 100136, doi:10.1016/j.dche.2023.100136.
51. Roeva, O.; Slavov, T. PID Controller Tuning Based on Metaheuristic Algorithms for Bioprocess Control. *Biotechnol Biotechnol Equip* **2012**, *26*, 3267–3277, doi:10.5504/BBEQ.2012.0065.
52. Nagy, Z. K. Model Based Control of a Yeast Fermentation Bioreactor Using Optimally Designed Artificial Neural Networks. *Chem Eng J* **2007**, *127*, 95–109, doi:10.1016/j.cej.2006.10.015.
53. Eaton, J. W.; Rawlings, J. B. Model-Predictive Control of Chemical Processes. *Chem Eng Sci* **1992**, *47*, 705–720, doi:10.1016/0009-2509(92)80263-C.
54. Findeisen, R.; Allgöwer, F. An Introduction to Nonlinear Model Predictive Control. In Proceedings of the 21st Benelux Meeting on Systems and Control; Veldhoven, **2002**.
55. Horta, A. C. L.; Da Silva, A. J.; Sargo, C. R.; Cavalcanti-Montaño, I. D.; Galeano-Suarez, C. A.; Velez, A. M.; Santos, M. P.; Gonçalves, V. M.; Giordano, R. C.; Zangirolami, T. C. On-Line Monitoring of Biomass Concentration Based on a Capacitance Sensor: Assessing the Methodology for Different Bacteria and Yeast High Cell Density Fed-Batch Cultures. *Braz J Chem Eng* **2015**, *32*, 821–829, doi:10.1590/0104-6632.20150324s00003534.
56. Bolmanis, E.; Bogans, J.; Akopjana, I.; Suleiko, A.; Kazaka, T.; Kazaks, A. Production and Purification of Soy Leghemoglobin from *Pichia Pastoris* Cultivated in Different Expression Media. *Processes* **2023**, *11*, 3215, doi:10.3390/pr11113215.

57. Bolmanis, E.; Galvanauskas, V.; Grigs, O.; Vanags, J.; Kazaks, A. Leveraging Historical Process Data for Recombinant *P. Pastoris* Fermentation Hybrid Deep Modeling and Model Predictive Control Development. *Fermentation* **2025**, *11*, 411, doi:10.3390/fermentation11070411.
58. Pentjuss, A.; Bolmanis, E.; Suleiko, A.; Didrihsone, E.; Suleiko, A.; Dubencovs, K.; Liepins, J.; Kazaks, A.; Vanags, J. *Pichia Pastoris* Growth – Coupled Heme Biosynthesis Analysis Using Metabolic Modelling. *Sci Rep* **2023**, *13*, 15816, doi:10.1038/s41598-023-42865-w.
59. Grigs, O.; Bolmanis, E.; Kazaks, A. HBsAg Production in Methanol Controlled *P. Pastoris* GS115 Mut<sup>S</sup> Bioreactor Process. *Key Eng Mater* **2021**, *903*, 40–45, doi:10.4028/www.scientific.net/KEM.903.40.
60. Bolmanis, E.; Uhlendorff, S.; Pein-Hackelbusch, M.; Galvanauskas, V.; Grigs, O. Anomaly Detection and Removal Strategies for In-Line Permittivity Sensor Signal Used in Bioprocesses. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2025**, *13*, doi: 10.3389/fbioe.2025.1609369.
61. Ren, H. T.; Yuan, J. Q.; Bellgardt, K. H. Macrokinetic Model for Methylophilic *Pichia Pastoris* Based on Stoichiometric Balance. *J Biotechnol* **2003**, *106*, 53–68, doi:10.1016/j.jbiotec.2003.08.003.
62. Jackson, J. V.; Edwards, V. H. Kinetics of Substrate Inhibition of Exponential Yeast Growth. *Biotechnol Bioeng* **1975**, *17*, 943–964, doi:10.1002/bit.260170702.
63. Zhu, X.; Rehman, K. U.; Wang, B.; Shahzad, M. Modern Soft-Sensing Modeling Methods for Fermentation Processes. *Sensors (Switzerland)* **2020**, *20*.
64. Wang, B.; Nie, Y.; Zhang, L.; Song, Y.; Zhu, Q. An Soft-Sensor Method for the Biochemical Reaction Process Based on LSTM and Transfer Learning. *Alex Eng J* **2023**, *81*, 170–177, doi:10.1016/j.aej.2023.09.007.
65. Rogers, A. W.; Vega-Ramon, F.; Yan, J.; del Río-Chanona, E. A.; Jing, K.; Zhang, D. A Transfer Learning Approach for Predictive Modeling of Bioprocesses Using Small Data. *Biotechnol Bioeng* **2022**, *119*, 411–422, doi:10.1002/bit.27980.
66. Gurramkonda, C.; Adnan, A.; Gäbel, T.; Lünsdorf, H.; Ross, A.; Nemani, S. K.; Swaminathan, S.; Khanna, N.; Rinas, U. Simple High-Cell Density Fed-Batch Technique for High-Level Recombinant Protein Production with *Pichia Pastoris*: Application to Intracellular Production of Hepatitis B Surface Antigen. *Microb Cell Fact* **2009**, *8*, 1–8, doi:10.1186/1475-2859-8-13.
67. Wu, Z.; Christofides, P. D.; Wu, W.; Wang, Y.; Abdullah, F.; Alnajdi, A.; Kadakia, Y. A Tutorial Review of Machine Learning-Based Model Predictive Control Methods. *Rev Chem Eng* **2024**.
68. Rathore, A. S.; Mishra, S.; Nikita, S.; Priyanka, P. Bioprocess Control: Current Progress and Future Perspectives. *Life* **2021**, *11*, 557, doi:10.3390/life11060557.



**Emīls Bolmanis** dzimis 1993. gadā Dobelē. Rīgas Tehniskajā universitātē ieguvis bakalaura (2019) un maģistra (2021, ar izcilību) grādu ķīmijas tehnoloģijā. Strādājis Latvijas Valsts koksnes ķīmijas institūta Bioinženierijas laboratorijā. Kopš 2018. gada strādā Latvijas Biomedicīnas pētījumu un studiju centrā (BMC), ieņemot laboranta un zinātniskā asistenta amatus. Patlaban ir pētnieks profesora K. Tāra grupā un BMC Rekombinanto biotehnoloģiju servisa centrā. Zinātniskās intereses saistītas ar biotehnoloģisko procesu inženieriju un fermentāciju optimizāciju ar uzsvaru uz reāllaika procesu monitoringu, datus balstītu modelēšanu (hibrīdā modelēšana, mašīnmācīšanās algoritmi) un prognozējošu vadību (MPC).