

dr inż. Andrzej Kasperski

# **Autoreferat**

**z opisem dorobku i osiągnięć naukowych  
związanych z postępowaniem habilitacyjnym**

**SPIS TREŚCI**

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4. Wskazanie osiągnięcia, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.).....	4
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego .....	4
4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy (wg roku wydania) .....	4
4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników .....	5
4.3.1. Cel badań i hipoteza badawcza .....	5
4.3.2. Charakterystyka osiągnięcia naukowego .....	7
4.3.3. Omówienie wyników .....	12
4.3.4. Możliwość wykorzystania uzyskanych wyników.....	19
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych .....	19

## 1. Imię i nazwisko

**Andrzej Kasperski**

ORCID ID: [orcid.org/0000-0003-2590-6688](https://orcid.org/0000-0003-2590-6688)

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

**Magister inżynier:** Politechnika Wroclawska, Wydział Elektroniki, kierunek: Informatyka, specjalność: Systemy Mikroprocesorowe i Mikrokomputerowe, 1993 r.

Tytuł pracy magisterskiej: „Cyfrowy system sterowania hodowlą drożdży piekarskich”

Promotor: dr inż. Jacek Majewski (praca wyróżniona)

**Doktor nauk technicznych w zakresie technologii chemicznej:** Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, 2003 r.

**Tytuł rozprawy doktorskiej:** "Sterowanie procesem hodowli drożdży piekarskich z wykorzystaniem regulatora rozmytego"

Promotor: dr hab. inż. Tadeusz Miśkiewicz

Recenzenci: prof. dr hab. Józef Szopa

dr hab. inż. Krzysztof Szewczyk

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

1997-2001 *asystent*, WSP w Zielonej Górze, Wydział Matematyki, Fizyki i Techniki, Instytut Matematyki, Zakład Informatyki

1999-2001 *administrator lokalnej sieci komputerowej*, WSP w Zielonej Górze

2001-2013 *asystent*, od 01.04.2010 *adiunkt*, Uniwersytet Zielonogórski, Wydział Nauk Ścisłych (od 2004 zmiana nazwy na Wydział Matematyki, Informatyki i Ekonometrii), Zakład Matematyki Dyskretnej, Algebry i Informatyki (od 2007 zmiana nazwy na Zakład Zastosowań Informatyki)

od 2013 *adiunkt*, Uniwersytet Zielonogórski, Wydział Nauk Biologicznych, Katedra Biotechnologii

#### 4. Wskazanie osiągnięcia, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 z póź. zm.)

##### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

Moim osiągnięciem, będącym podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego jest cykl 9 publikacji naukowych (oryginalne prace twórcze), powiązanych tematycznie i ujętych pod wspólnym tytułem:

**„Projektowanie, analiza, symulacje i optymalizacja procesów bioreaktorowych z pulsacyjnym dozowaniem substratu”**

##### 4.2. Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe, o którym mowa w art. 16 ust. 2 ustawy (wg roku wydania)

1. **Kasperski A.**, Kasperska R. (2018), *Bioenergetics of life, disease and death phenomena*, Theory in Biosciences, Vol. 137, 155–168.  
(JCR,  $IF_{2017} = 1.552$ , MNiSW = 25, autor korespondencyjny)
2. **Kasperski A.**, Sun K., Tian Y. (2016), *New Approach to Control of the Dissolved Oxygen Concentration in a Biomass-Driven Self-Cycling Biochemical Process*, Chemical Engineering Communications, Vol. 203, no 1, 75–93.  
(JCR,  $IF_{2016} = 1.297$ , MNiSW = 20 pkt.)
3. Sun K., **Kasperski A.**, Tian Y. (2014), *Studies on generalized kinetic model and Pareto optimization of a product-driven self-cycling bioprocess*, Bioprocess and Biosystems Engineering, Vol. 37, 1971–1987.  
(JCR,  $IF_{2014} = 1.997$ , MNiSW = 25 pkt.)
4. Sun K., **Kasperski A.**, Tian Y., Chen L. (2011), *Modelling of the Corynebacterium glutamicum biosynthesis under aerobic fermentation conditions*, Chemical Engineering Science, Vol. 66, no 18, 4101–4110.  
(JCR,  $IF_{2011} = 2.431$ , MNiSW = 35 pkt., autor korespondencyjny)
5. Tian Y., **Kasperski A.**, Sun K., Chen L. (2011), *Theoretical approach to modelling and analysis of the bioprocess with product inhibition and impulse effect*, BioSystems, Vol. 104, no 2-3, 77–86.  
(JCR,  $IF_{2011} = 1.784$ , MNiSW = 25 pkt., autor korespondencyjny)
6. Sun K., **Kasperski A.**, Tian Y., Chen L. (2011), *Modelling and optimization of a continuous stirred tank reactor with feedback control and pulse feeding*, Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, Vol. 50, no 7, 675–686.  
(JCR,  $IF_{2011} = 1.924$ , MNiSW = 30 pkt., autor korespondencyjny)

7. Tian Y., Chen L., **Kasperski A.** (2010), *Modelling and simulation of a continuous process with feedback control and pulse feeding*, Computers and Chemical Engineering, Vol. 34, 976–984.  
(JCR,  $IF_{2010} = 2.072$ , MNiSW = 32 pkt.)
8. **Kasperski A.**, Miśkiewicz T. (2008), *Optimization of pulsed feeding in a Baker's yeast process with dissolved oxygen concentration as a control parameter*, Biochemical Engineering Journal, Vol. 40, no 2, 321–327.  
(JCR,  $IF_{2008} = 1.889$ , MNiSW = 24 pkt., autor korespondencyjny)
9. **Kasperski A.** (2008), *Modelling of cells bioenergetics*, Acta Biotheoretica, Vol. 56, no 3, 233–247.  
(JCR,  $IF_{2008} = 0.735$ , MNiSW = 15 pkt., autor korespondencyjny)

### 4.3. Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

#### 4.3.1. Cel badań i hipoteza badawcza

**Głównym celem prac, stanowiących moje osiągnięcie habilitacyjne, było zaprojektowanie oraz wykonanie analiz i symulacji procesów bioreaktorowych z pulsacyjnym dozowaniem substratu, w szczególności określenie warunków stabilności tych procesów oraz ustalenie warunków intensyfikacji produktywności biomasy oraz minimalizacji strat substratu.**

W związku z powyższym postawiono następujące *hipotezy badawcze*:

- H1.** Zaprojektowanie oraz analizę nowej technologii bioreaktorowej może ułatwić określenie uniwersalnego sposobu interpretacji zjawisk i efektów bioenergetycznych. Zjawiska i efekty bioenergetyczne, występujące w trakcie procesu bioreaktorowego (w tym procesie z pulsacyjnym dozowaniem substratu), mogą być interpretowane w uniwersalny sposób na podstawie zmian poziomu wewnątrz-mitochondrialnego NADH (mtNADH).
- H2.** W chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu i pulsacyjnym usuwaniem medium bioreaktorowego istnieją takie warunki, w których okres oscylacji stężenia biomasy jest stały i stabilny. Zastosowanie tego typu chemostatu eliminuje wpływ niepożądanego zjawiska występowania samoistnych oscylacji na proces, co ułatwia wykonanie analiz, w tym optymalizację procesu.
- H3.** Produktywność biomasy oraz strata substratu w chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu i pulsacyjnym usuwaniem medium bioreaktorowego zależą od ilości medium, jaka jest usuwana z bioreaktora podczas każdego impulsu, oraz od

stężenia dozowanego substratu. Umożliwia to określenie rozwiązań Pareto-  
optymalnych dla tego procesu.

- H4.** W chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu i pulsacyjnym usuwaniem medium bioreaktorowego poprzez odpowiednie ustalenie stężenia dozowanego substratu oraz wartości zadanej stężenia biomasy możliwe jest zapewnienie optymalnego dla wzrostu komórek poziomu stężenia tlenu rozpuszczonego w medium bioreaktorowym.

W ramach weryfikacji poszczególnych hipotez:

**Ad. H1**

Opracowano metodę pozwalającą na uniwersalną interpretację efektów bioenergetycznych (m.in. efektów Pasteura, Crabtree, glukozowego, Kluyvera), które mogą wystąpić podczas procesów bioreaktorowych, w tym procesów z pulsacyjnym dozowaniem substratu. Metodę opracowano na podstawie przeprowadzonych procesów *fed-batch* z pulsacyjnym dozowaniem substratu, w których dążono do maksymalizacji wydajności biomasy i maksymalizacji właściwej szybkości wzrostu drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*.

**Ad. H2**

Opracowano systemy chemostatów z pulsacyjnym dozowaniem substratu i pulsacyjnym usuwaniem medium bioreaktorowego oraz opracowano modele matematyczne tych procesów. Przedstawiono metody analizy procesów, w tym określenia warunków występowania oscylacji periodycznych oraz sposoby przeprowadzenia optymalizacji. Sprawdzone stabilność różnych typów procesów oraz przeprowadzono symulacje procesów wskazując na wybrane aspekty przebiegu tych procesów.

**Ad. H3**

Przedstawiono sposób określenia rozwiązań optymalnych w sensie Pareto w chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu i pulsacyjnym usuwaniem medium bioreaktorowego. Optymalizację wielokryterialną przeprowadzono dla procesu biosyntezy *Corynebacterium glutamicum* uzyskując dla tego procesu brzeg rozwiązań Pareto-optymalnych. Pokazano, że dla tego procesu maksymalizacja produktywności biomasy oraz minimalizacja strat substratu stanowią cele konfliktowe.

**Ad. H4**

Określono metodę zapewniającą dobre warunki tlenowe w chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu i pulsacyjnym usuwaniem medium bioreaktorowego poprzez monitoring stężenia substratu oraz ograniczenie stężenia biomasy. Przedstawiono zastosowanie opracowanej metody w procesach produkcji biomasy *Acinetobacter calcoaceticus* oraz *Saccharomyces cerevisiae*.

**4.3.2. Charakterystyka osiągnięcia naukowego**

Prace naukowe wskazane jako osiągnięcie naukowe dotyczą badań nad opracowaniem nowych procesów bioreaktorowych z pulsacyjnym dozowaniem substratu ze wskazaniem sposobów analiz zjawisk i efektów bioenergetycznych, które mogą wystąpić podczas procesów oraz badania stabilności, optymalizacji, symulacji tych procesów. Przeprowadzone badania charakteryzuje interdyscyplinarność, w zakresie od modelowania efektów bioenergetycznych, systemów bioreaktorowych oraz celów procesowych, poprzez komputerowo wspomagane analizy i symulacje zaprojektowanych procesów, po badania doświadczalne.

Procesy bioreaktorowe są zazwyczaj realizowane jako procesy okresowe (ang. *batch*), procesy okresowe z zasilaniem (ang. *fed-batch*) i procesy ciągłe (ang. *continuous*). Procesy okresowe należą do najprostszych i najłatwiejszych do zaprojektowania i przeprowadzenia. Procesy okresowe z zasilaniem zapewniają między innymi większą elastyczność prowadzenia procesu, w tym możliwość kontrolowania stężenia substratu w medium hodowlanym. W procesach ciągłych następuje zarówno dozowanie substratu do bioreaktora, jaki i usuwanie medium z bioreaktora. Szczególną odmianą procesu ciągłego jest chemostat, w którym szybkości dozowania substratu i usuwania medium bioreaktorowego są sobie równe, co zapewnia stałą objętość hodowli. Zaletą procesów ciągłych w stosunku do okresowych i okresowych z zasilaniem jest możliwość uzyskiwania wyższych produktywności biomasy. Zaletą procesów ciągłych jest także ich przebieg w ustalonych warunkach, co sprawia, że procesy te mogą być bardziej efektywne (tj. bliskie optymalnym) oraz łatwiejsze w opracowaniu automatycznej regulacji. W procesach ciągłych populacja mikroorganizmów i produkty metabolizmu są bardziej jednorodne, bardziej równomierne jest też zużycie wody i odprowadzanie ścieków. Ponadto, w procesach ciągłych nakłady pracy na opróżnianie, mycie i sterylizację aparatury (w tym bioreaktora) są mniejsze. Ze względu na swoje zalety w przedstawionych pracach zajmowałem się **procesami ciągłymi i okresowymi z zasilaniem**.

Chemostat stanowi typ szeroko stosowanego w przemyśle i nauce procesu ciągłego. Chemostat może być realizowany jako bioprocess z ciągłym dozowaniem substratu, w którym

szybkość dopływu substratu do bioreaktora oraz szybkość usuwania medium bioreaktorowego są takie same i równe szybkości rozcieńczania ( $D$ ). Poprzez zwiększanie szybkości rozcieńczania można dążyć do maksymalizacji produktywności biomasy, pod warunkiem, że szybkość rozcieńczania nie przekroczy szybkości krytycznej. Przekroczenie szybkości krytycznej powoduje, że szybkość usuwania biomasy z bioreaktora przewyższa szybkość jej powstawania. W takich warunkach istnieje ryzyko usunięcia nadmiernej ilości lub całej biomasy z bioreaktora.

Chemostat może być również realizowany jako bioprocess z pulsacyjnym dozowaniem substratu oraz z pulsacyjnym usuwaniem części medium bioreaktorowego (tj. chemostat z pulsacyjnym dozowaniem substratu). W takim procesie objętość dozowanej porcji substratu musi być równa objętości medium bioreaktorowego usuwanego w czasie impulsu. Chemostat z pulsacyjnym dozowaniem substratu może być realizowany jako proces zależny od stanu (ang. *state-dependent process*) oraz proces z periodycznym, zależnym od czasu, dozowaniem substratu i usuwaniem części medium bioreaktorowego (ang. *time-dependent process*). Czas pomiędzy kolejnymi impulsami doprowadzającymi substrat i odprowadzającymi część medium z bioreaktora określany jest w pracy jako okres oscylacji ( $T$ ). W procesie zależnym od stanu kolejne impulsy mogą następować na przykład gdy a) stężenie biomasy przekroczy przyjętą wartość zadaną (ang. *biomass-driven bioprocess*), b) stężenie substratu spadnie poniżej wartości przyjętej jako minimalna (ang. *substrate-driven bioprocess*), c) stężenie tlenu rozpuszczonego (ang. *dissolved oxygen concentration*, DOC) spadnie poniżej wartości zadanej (ang. *DOC-driven bioprocess*), d) stężenie produktu przekroczy przyjętą wartość zadaną (ang. *product-driven bioprocess*). Uzyskanie wysokich właściwych szybkości wzrostu, wydajności biomasy, produktywności biomasy wymaga prowadzenia bioprocessu w odpowiednich warunkach środowiskowych oraz dozowania substratu w sposób zapewniający jego maksymalną asymilację przez komórki oraz przemianę w biomasę. Pulsacyjne dozowanie substratu pozwala na monitorowanie bioprocessu w sposób ciągły. Na podstawie dynamiki zmian okresu oscylacji oraz minimalnej wartości stężenia tlenu rozpuszczonego podczas tego okresu ( $DOC_{min}$ ), można określić aktywność oddechową komórek oraz typ metabolizmu, jaki wystąpił w wyniku kolejnych dozowań. Na przykład, jeżeli w wyniku ostatniego dozowania minimalna wartość stężenia tlenu rozpuszczonego ( $DOC_{min}$ ) uległa:

- a) zmniejszeniu (tj.  $DOC_{min} \downarrow$ ) oraz okres oscylacji uległ zmniejszeniu (tj.  $T \downarrow$ ), to nastąpił wzrost aktywności oddechowej komórek,
- b) zwiększeniu (tj.  $DOC_{min} \uparrow$ ) oraz okres oscylacji uległ zwiększeniu ( $T \uparrow$ ), to nastąpiło zmniejszenie aktywności oddechowej komórek,
- c) zwiększeniu (tj.  $DOC_{min} \uparrow$ ) oraz  $T \downarrow$ , to nastąpiła fermentacja tlenowa w wyniku zadozowania większej porcji (lub nastąpiło zmniejszenie wielkości porcji),



d) zmniejszeniu (tj.  $DOC_{\min} \downarrow$ ) oraz  $T \uparrow$ , to mogła nastąpić asymilacja nadmiaru substratu. Ponadto aktywność oddechową komórek można określić na podstawie szybkości zmian DOC po zadozowaniu kolejnej porcji substratu, tj. dynamiki zbocza opadającego podczas oscylacji DOC. W chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu, dla odpowiednio dużej częstotliwości impulsów (w stosunku do wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych), przepływ medium przez bioreaktor może być traktowany jako praktycznie ciągły, będąc w rzeczywistości przepływem pulsacyjnym. W chemostacie z periodycznym, zależnym od czasu dozowaniem substratu i usuwaniem części medium bioreaktorowego, kolejne impulsy następują co pewien określony czas. Czas ten może być również określony dla chemostatu zależnego od stanu w warunkach jego stabilności. W pracy pokazano, że poprzez określenie okresu oscylacji dla tego procesu możliwe jest przejście na sterowanie z periodycznym, zależnym od czasu, dozowaniem substratu i usuwaniem części medium bioreaktorowego, co upraszcza procedurę sterowania oraz pozwala na stosunkowo łatwe monitorowanie bioprocessu.

Chemostat może być także zrealizowany jako proces z pulsacyjno-ciągłym dozowaniem substratu oraz z pulsacyjno-ciągłym odprowadzaniem medium bioreaktorowego (chemostat z pulsacyjno-ciągłym dozowaniem substratu). Ideą zastosowania takiego bioprocessu jest dążenie do maksymalizacji właściwej szybkości wzrostu i produktywności biomasy poprzez m.in. stopniowe zwiększanie szybkości rozcieńczania związanej z ciągłym przepływem medium przez bioreaktor oraz dążenie do uzyskania wysokiej wydajności biomasy poprzez odpowiedni dobór parametrów dozowania pulsacyjnego.

Zrozumienie charakterystyki wzrostu biomasy odgrywa kluczową rolę podczas opracowywania nowych technologii bioreaktorowych. Istnieje wiele modeli opisujących szybkość wzrostu biomasy, m.in. modele Monoda, Tessiera, Mosera, Contois i Andrews. Modele te służą do określenia kinetyki bioprocessu wyrażonej właściwą szybkością wzrostu biomasy. W analizach literaturowych często przyjmuje się, że wydajność biomasy jest stała podczas bioprocessu. W rzeczywistości w chemostacie z ciągłym dozowaniem substratu i ciągłym usuwaniem medium bioreaktorowego mogą wystąpić naturalne samoistne oscylacje, m.in. oscylacje stężenia biomasy oraz substratu w medium bioreaktorowym. Przyjęcie stałej wartości wydajności biomasy uniemożliwia wytłumaczenie zjawiska występowania tych oscylacji. Występowanie samoistnych oscylacji jest naturalną, lecz niepożądaną cechą chemostatu. Okres samoistnych oscylacji oraz amplituda zmian stężenia substratu i biomasy w dużej mierze zależą m.in. od stężenia dozowanego substratu. Wprowadzenie sprzężenia zwrotnego może osłabić lub wyeliminować te oscylacje. Występowanie samoistnych oscylacji może być wyjaśnione poprzez przyjęcie formuły uzależniającej wydajność biomasy od stężenia substratu. W procesie, charakterystyka pojawiających się samoistnych oscylacji zależy od rzeczywistej zależności wydajności

biomasy od stężenia substratu. Z tego powodu w literaturze podawane są różne formuły opisujące zależność wydajności biomasy od stężenia substratu. W niniejszej pracy analizy chemostatu z pulsacyjnym oraz pulsacyjno-ciągłym dozowaniem substratu przeprowadzono przyjmując **liniowe i sigmoidalne** (w tym autorskie) **zależności wydajności biomasy od stężenia substratu**.

Występowanie oscylacji (m.in. oscylacji stężenia biomasy i substratu) w chemostacie z pulsacyjnym (oraz pulsacyjno-ciągłym) dozowaniem substratu jest naturalną cechą tego bioprocessu. W przeciwieństwie do naturalnych samoistnych oscylacji występujących w chemostacie, pulsacyjne dozowanie substratu i pulsacyjne usuwanie medium bioreaktorowego umożliwia zapewnienie ścisłej kontroli oscylacji (stały i stabilny okres oscylacji, stałe amplitudy zmian stężenia substratu, biomasy i DOC). Przed wdrożeniem produkcyjnym technologii bioreaktorowej, niezbędne jest określenie stabilności opracowanego bioprocessu. Sprawdzenie stabilności procesu polega na sprawdzeniu wpływu małych zmian warunków prowadzenia procesu na jego zachowanie. Stabilność procesu bioreaktorowego może być określona np. poprzez sprawdzenie wpływu małych zmian stężenia substratu lub stężenia biomasy na przebieg procesu. W przypadku stabilnego procesu, po wystąpieniu zewnętrznych zaburzeń powodujących chwilowe zmiany stężenia substratu lub stężenia biomasy (związanych np. z nierównomiernym dozowaniem substratu i usuwaniem medium bioreaktorowego przez pompy, nierównomiernym mieszaniem, napowietrzaniem), proces automatycznie powraca do stanu sprzed wystąpienia tych zaburzeń z takim samym okresem oscylacji stężenia biomasy i stężenia substratu, jak przed wystąpieniem zaburzeń. W pracy pokazano sposób zastosowania kryterium Poincaré'go (ang. *analogue of Poincaré' Criterion*) do określenia stabilności chemostatów z pulsacyjnym dozowaniem substratu. Kryterium to umożliwia sprawdzenie orbitalnie asymptotycznej stabilności (ang. *orbital asymptotic stability*) okresu oscylacji, tj. sprawdzenie, czy okres oscylacji biomasy, substratu, DOC jest orbitalnie asymptotycznie stabilny.

Jednym z celów pracy jest **optymalizacja procesów bioreaktorowych z pulsacyjnym dozowaniem substratu**. Przeprowadzenie optymalizacji wymaga określenia odpowiedniej funkcji celu oraz ustalenia takiego sposobu prowadzenia procesu, który umożliwia odpowiednio maksymalizację lub minimalizację tej funkcji. Zapewnienie optymalnych warunków środowiskowych, tj. optymalnych wartości pH, temperatury, stężenia tlenu rozpuszczonego jest ważne dla realizacji celu bioprocessu, tj. maksymalizacji bądź minimalizacji wartości wskaźników informujących o efektywności bioprocessu. W procesach bioreaktorowych wskaźnikami, które wymagają optymalizacji mogą być np. właściwa szybkość wzrostu biomasy ( $\mu$ ), wydajność biomasy ( $Y_{x/s}$ ), produktywność biomasy, koszt produkcji związany ze stratami substratu i inne. W pracy przeprowadzono zarówno optymalizację jednokryterialną, jak i wielokryterialną dla wybranych procesów. Podczas

optymalizacji jednokryterialnej tylko jedno wybrane kryterium jest brane pod uwagę, np. maksymalizacja produktywności biomasy lub minimalizacja strat substratu. Podczas optymalizacji wielokryterialnej pod uwagę jest branych równocześnie kilka kryteriów, np. jednoczesna maksymalizacja produktywności biomasy i minimalizacja strat substratu. W pracy zostało pokazane w jaki sposób w optymalizacji wielokryterialnej procesów bioreaktorowych można zastosować kryterium Pareto (kryterium wagowe) służące do określenia rozwiązań Pareto-optymalnych.

Umiejętność interpretacji przyczyn występowania efektów bioenergetycznych występujących podczas procesów bioreaktorowych jest niezbędna podczas projektowania nowych technologii. Ze względu na dużą dynamikę zmian (np. stężenia substratu, stężenia biomasy, stężenia tlenu rozpuszczonego) procesy z pulsacyjnym dozowaniem substratu wymagają prawidłowej interpretacji zjawisk i efektów występujących podczas ich prowadzenia. Możliwość pojawienia się każdego z efektów wynika z olbrzymiej złożoności oraz potencjału szlaków metabolicznych komórek. **Efekt Pasteura** określa szybkość metabolizmu w zależności od warunków tlenowych. Efekt ten polega na inhibicji fermentacji podczas zwiększania stężenia tlenu. Oddychanie tlenowe zapewnia większy zysk energetyczny, powodując uzyskiwanie większej ilości ATP z tej samej ilości substratu. W takich warunkach mniejsza ilość substratu jest wystarczająca do zaspokojenia potrzeb energetycznych komórek. W rezultacie poprawa warunków tlenowych powoduje zmniejszenie szybkości przyswajania substratu przez komórki. Pogorszenie warunków tlenowych powoduje stymulację fermentacji, co powoduje zmniejszenie zysku energetycznego z przyswojonego przez komórki substratu. W takich warunkach większa ilość substratu jest konieczna do zaspokojenia potrzeb energetycznych komórek. W rezultacie pogorszenie warunków tlenowych powoduje zwiększenie szybkości przyswajania substratu przez komórki. **Efekt Crabtree**, który często pojawia się podczas procesów bioreaktorowych, polega na występowaniu zjawiska fermentacji nawet przy zapewnieniu dobrych warunków tlenowych. Fermentacja występująca w dobrych warunkach tlenowych określana jest jako fermentacja tlenowa. Występowanie tlenowej fermentacji zmniejsza ilość generowanego ATP z cząsteczki przyswojonego substratu. W wyniku występowania efektu Crabtree następuje zmniejszenie wydajności biomasy oraz może dojść do zmniejszenia właściwej szybkości wzrostu oraz w rezultacie zmniejszenia produktywności biomasy. Gdy głównym celem podczas tworzenia nowej technologii jest uzyskanie wysokiej produktywności biomasy, należy zapewnić odpowiednio wysokie stężenie substratu w dobrych warunkach tlenowych. Wzrost stężenia substratu może doprowadzić do nadmiernego wzrostu stężenia pirogronianu i spowodować fermentację, tzn. zbyt wysokie stężenie substratu może spowodować wystąpienie efektu Crabtree. Występująca w takich warunkach fermentacja ma na celu restytucję NAD koniecznego do zachodzenia glikolizy.

**Efekt glukozowy** występuje, gdy w skład pożywki hodowlanej wchodzi różne źródła węgla i energii. W takim przypadku glukoza przyswajana jest jako pierwsza. Inne związki (np. galaktoza, maltoza, etanol) przyswajane są dopiero po przyswojeniu glukozy. **Efekt Kluyvera** mówi, że tlenowa fermentacja może wystąpić, gdy glukoza stanowi źródło węgla i energii, jednak nie występuje dla innych cukrów (np. galaktozy, maltozy). Ponadto podczas procesu bioreaktorowego mogą wystąpić inne efekty i zjawiska, przy czym dążenie do stworzenia uniwersalnego modelu ich występowania jest przedmiotem badań naukowców. W niniejszej pracy opracowano i przedstawiono **nową koncepcję umożliwiającą uniwersalną integrację przyczyn występowania efektów bioenergetycznych**, z myślą o ułatwieniu zarówno projektowania nowych technologii, jak i wykonywania analiz, w tym optymalizacji już istniejących bioprocessów.

#### **Publikacje [1] – [9]**

#### **4.3.3. Omówienie wyników**

Poszczególne etapy realizacji pracy polegały na projektowaniu nowych procesów bioreaktorowych służących głównie do produkcji biomasy. Prace rozpoczęto od zaprojektowania i analizy procesu *fed-batch* z pulsacyjnym dozowaniem substratu, tj. procesu okresowego z pulsacyjnym zasilaniem. Następnie projektowano i analizowano procesy ciągłe z pulsacyjnym dozowaniem substratu oraz z pulsacyjnym usuwaniem części medium bioreaktorowego. W kolejnych etapach realizacji pracy wskazywano na możliwości rozbudowy systemu poprzez dodawanie nowych funkcjonalności. Systemy opisywano za pomocą układu równań różniczkowych przedstawiających dynamikę procesów oraz wykonywano analizy m.in. okresu oscylacji stężenia biomasy, stężenia substratu oraz stężenia tlenu rozpuszczonego (DOC). Określano także warunki występowania i stabilności tych oscylacji. Ponadto zaproponowano autorskie funkcje celów służące do wykonania jedno i wielokryterialnej optymalizacji. Stopniowe unowocześnianie sposobów optymalizacji pozwoliło na określenie frontu Pareto dla optymalizacji chemostatu z pulsacyjnym dozowaniem substratu. Przedstawione w pracach symulacje procesów oraz dwu i trójwymiarowe wykresy służą do zaprezentowania wybranych aspektów przebiegu procesów oraz pokazania wpływu poszczególnych parametrów na uzyskiwane wyniki.

#### **Ad. H1**

W czasie procesów bioreaktorowych może wystąpić szereg efektów bioenergetycznych, których znajomość oraz umiejętność przewidywania skutków ich wystąpienia jest niezbędna do ustalenia prawidłowego algorytmu sterownia procesem. W pracy podjęto próbę wyjaśnienia przyczyn występowania efektów bioenergetycznych (m.in. efektów Pasteura,

Crabtree, glukozowego, Kluivera) i możliwości interpretacji skutków ich występowania, przede wszystkim podczas procesów bioreaktorowych z pulsacyjnym dozowaniem substratu. W pracy przedstawiono nową koncepcję, według której poziom wewnątrz-mitochondrialnego NADH (mtNADH) decyduje o tym, czy komórka uzyskuje ATP na drodze fosforylacji oksydacyjnej, czy też fosforylacji na poziomie substratowym. Pokazano, że z wykorzystaniem tej koncepcji możliwe jest uniwersalne interpretowanie występujących podczas procesów bioreaktorowych zjawisk i efektów bioenergetycznych, co ułatwia określenie przyczyn i przewidywanie skutków wystąpienia tych zjawisk i efektów, co w rezultacie ułatwia sterowanie procesami.

**Wyniki:** Cel pracy realizowano przeprowadzając serię procesów *fed-batch* z pulsacyjnym dozowaniem substratu, dążąc do równoczesnej maksymalizacji właściwej szybkości wzrostu i maksymalizacji wydajności biomasy. Procesy *fed-batch* z pulsacyjnym dozowaniem substratu cechują się bardzo dużą dynamiką zmian, m.in. stężenia substratu stężenia biomasy oraz stężenia tlenu rozpuszczonego, co umożliwia ciągłe monitorowanie oraz analizę stanu fizjologicznego komórek. W pracy stwierdzono, że równoczesna maksymalizacja właściwej szybkości wzrostu i maksymalizacja wydajności biomasy są kryteriami konfliktowymi. Pokazano, że stopniowy wzrost wielkości porcji może powodować wzrost właściwej szybkości, ale też może być przyczyną wystąpienia efektu Crabtree, powodującego początkowo pogorszenie wydajności biomasy, a następnie (tj. przy dalszym wzroście wielkości porcji) także pogorszenie właściwej szybkości wzrostu. W pracy pokazano, że wystąpienie efektu Crabtree może mieć nagły charakter. Zwrócono także uwagę, że efekt Crabtree może wystąpić przy dozowaniu porcji małych (tj. wywołujących małe stężenie glukozy w stosunku do stężenia krytycznego glukozy), jak i dużych porcji (tj. wywołujących duże stężenie glukozy w stosunku do stężenia krytycznego glukozy). Może to świadczyć o tym, że stężenie krytyczne glukozy, którego przekroczenie powoduje fermentację, nie jest stałe w trakcie całego procesu, lecz zmienia się w zależności od stanu fizjologicznego komórek. W pracy wprowadzono pojęcie  **dodatniego sprzężenia zwrotnego dla ATP** (fATP), które występuje w komórkach. Pokazano, że dodatnie sprzężenie zwrotne dla ATP może zostać wywołane poprzez wzrost stężenia substratu (glukozy) oraz także poprzez wzrost stężenia tlenu rozpuszczonego. Sprzężenie to wpływa na ilość generowanego ATP, powodując wzrost lub zmniejszenie poziomu mtNADH. W pracy pokazano, że wzrost poziomu mtNADH powoduje stymulację fermentacji oraz inhibicję cyklu Krebsa. Zmniejszenie poziomu mtNADH powoduje inhibicję fermentacji oraz stymulację cyklu Krebsa. Na podstawie koncepcji dodatniego sprzężenia zwrotnego dla ATP przedstawiono (z wykorzystaniem kwantyfikatorów) interpretację efektów Pasteura, Crabtree, glukozowego, Kluivera oraz formuły Wang'a. Ponadto pokazano sposób interpretacji efektów bioenergetycznych, które wystąpiły podczas przeprowadzonych procesów *fed-batch*.

Przedstawiono sposób, w jaki można zinterpretować nagłe zatrzymanie oscylacji DOC w czasie procesu i wystąpienie podczas tego zatrzymania zjawiska intensywnej fermentacji. Przedstawiono także interpretację efektu Crabtree występującego podczas procesów i zgodność tej interpretacji z formułą Wanga.

Kolejne prace pozwoliły na rozszerzenie opracowanej koncepcji i doprowadziły do opracowania **koncepcji zunifikowanej bioenergetyki komórki**. Zunifikowana bioenergetyka komórki umożliwiła interpretację wybranych zjawisk, zachodzących także w organizmach wielokomórkowych (w tym wybranych chorób), oraz potwierdziła możliwość interpretacji efektów zachodzących podczas procesów bioreaktorowych na podstawie koncepcji dodatniego sprzężenia zwrotnego dla ATP. Obecnie prace nad tą tematyką kontynuuję we współpracy z SEIKO Life Science Laboratory, SRI, Osaka, Japan.

### Publikacje [1][8][9]

#### Ad. H2

Zbyt duże stężenie biomasy może spowodować spadek stężenia tlenu rozpuszczonego w medium bioreaktorowym poniżej minimum niezbędnego dla optymalnego wzrostu komórek. Z tego powodu w kolejnym etapie badań wykonano analizę chemostatu z pulsacyjnym dozowaniem substratu (i pulsacyjnym usuwaniem medium bioreaktorowego) z ograniczeniem stężenia biomasy w medium bioreaktorowym do ustalonej wartości zadanej. Celem takiego ograniczenia było przede wszystkim zapewnienie dobrych warunków tlenowych. W analizach przyjęto kinetykę wzrostu biomasy zgodną z **modelem Monoda**, który określa wpływ stężenia substratu na właściwą szybkość wzrostu biomasy. Wydajność biomasy obliczano za pomocą formuły uzależniającej w sposób liniowy wydajność biomasy od stężenia substratu, tj.  $Y_{x/s} = a + bS$  (dla  $a > 0$  i  $b \geq 0$ ) [7]. Jest to często stosowana formuła, która umożliwia interpretację przyczyny występowania w chemostacie (w którym substrat jest dozowany w sposób ciągły ze stałą szybkością, tj. szybkością rozcieńczenia, równą szybkości usuwania medium bioreaktorowego) naturalnych samoistnych oscylacji stężenia substratu i stężenia biomasy oraz symulację tych oscylacji. Następnie wykonano analizę procesu proponując bardziej uniwersalne (umożliwiające elastyczne dostosowanie do rzeczywistych danych eksperymentalnych), sigmoidalne zależności wydajności biomasy od stężenia substratu.

**Wyniki:** W pracy pokazano, że przyjęcie stałej wydajności biomasy (tj. dla  $b = 0$ ) prowadzi do wystąpienia tylko stabilnych oscylacji [7]. Określono warunki wystąpienia oscylacji stabilnych oraz podano wzór na okres tych oscylacji (Theorem 8 i wzór 11 [7]).

Następnie pokazano, że przyjęcie współczynnika  $b > 0$ , tj. przyjęcie bardziej rzeczywistej formuły na wydajność biomasy, może prowadzić do:

- wystąpienia tylko oscylacji stabilnych, gdy spełniony jest warunek (1) (Theorem 9 [7]),

- wystąpienia oscylacji stabilnych lub oscylacji niestabilnych, gdy spełniony jest warunek (2) (Theorem 9 [7]).

Wyciągnięto wniosek, że możliwość wystąpienia oscylacji o różnym okresie (wzór 15 [7]) jest cechą charakterystyczną procesu, w którym wydajność biomasy mikroorganizmów jest rosnącą, liniową funkcją stężenia substratu. Dla mikroorganizmów, dla których wydajność biomasy jest rosnącą, liniową funkcją stężenia substratu, mogą wystąpić zarówno oscylacje stabilne o okresie  $T_1$ , jak i niestabilne o okresie  $T_2$ . W rozpatrywanym procesie, po wystąpieniu niestabilnych oscylacji o okresie  $T_2$ , małe zakłócenia stężenia substratu i/lub biomasy (spowodowane czynnikami zewnętrznymi) mogą prowadzić do zaniku oscylacji lub zmiany typu oscylacji na oscylacje o stabilnym okresie  $T_1$ . W pracy pokazano, że istnienie stabilnych oscylacji o okresie  $T_1$  jest cechą charakterystyczną chemostatu z pulsacyjnym dozowaniem substratu zarówno wtedy, gdy wydajność biomasy jest stała, jak i wtedy, gdy jest rosnącą, liniową funkcją stężenia substratu (a także sigmoidalną funkcją stężenia substratu, co pokazano w kolejnych opublikowanych artykułach). Zastosowanie tego typu chemostatu eliminuje wpływ niepożądanego zjawiska występowania samoistnych oscylacji na proces, poprzez wzbudzenie oscylacji stabilnych, o stałym i kontrolowanym okresie oscylacji.

Kontynuacją badań było **sprawdzenie chemostatu, w którym substrat dozowany jest zarówno w sposób pulsacyjny, jak i ciągły** [6]. W pracy przyjęto sigmoidalną zależność wydajności biomasy od stężenia substratu oraz wzór Monoda dla właściwej szybkości wzrostu [6]. Wprowadzenie sigmoidalnej zależności  $Y_{x/s}=f(S)$  miało na celu sprawdzenie procesu dla wydajności biomasy, którą można elastycznie dostosować do rzeczywistych danych eksperymentalnych. W pracy zbadano zachowanie procesu poprzez określenie m.in. warunków jego stabilności. Stwierdzono, że stabilność procesu zależy zarówno od wydajności biomasy, jak i właściwej szybkości wzrostu. Następnie w celu optymalizacji tego typu procesu, **zaproponowano nową, autorską funkcję celu** (wzór 4.1 [6]). Wykonano optymalizację jednokryterialną procesu polegającą na maksymalizacji produktywności biomasy. Jako część optymalizacji procesu zbadano wpływ szybkości rozcieńczania ( $D$ ) oraz  $W_f$  (tj. części medium usuwanej z bioreaktora podczas impulsu) na uzyskiwane wartości produktywności biomasy. Uzyskane wyniki przedstawiono m.in. na rysunkach 10 i 11 [6]. Stwierdzono, że dla ustalonej wartości  $W_f$  wzrost szybkości rozcieńczania ( $D$ ) powoduje wzrost produktywności biomasy, jednak dla dużych wartości  $D$  bliskich  $\mu_{max}$  produktywność biomasy gwałtownie maleje i pojawia się ryzyko całkowitego usunięcia biomasy z bioreaktora. Dla ustalonej wartości  $D < \mu_{max}$  produktywność biomasy można bezpiecznie zwiększać poprzez zmniejszanie wartości  $W_f$ , bez niebezpieczeństwa wystąpienia zjawiska zmniejszenia produktywności biomasy [6].

W kolejnej pracy przeanalizowano **chemostat z pulsacyjnym dozowaniem substratu z uwzględnieniem inhibicji produktem** [5]. Uwzględnienie inhibicji produktem wymagało analizy dynamiki trzech zmiennych: stężenia biomasy, stężenia substratu oraz stężenia produktu. W pracy pokazano sposób, w jaki można taką analizę przeprowadzić. Analizy zostały przedstawione dla procesu produkcji kwasu L-glutaminowego (L-glutamic acid, LGA). W rozpatrywanym procesie impuls występuje, gdy stężenie produktu jest równe wartości zadanej stężenia produktu ( $P_{SET}$  w modelu (4) [5]), co ma na celu ograniczenie inhibicji produktem. W pracy pokazano, że w tym procesie możliwe jest wystąpienie stabilnych oscylacji stężenia biomasy, stężenia substratu i stężenia produktu o ustalonym okresie określonym wzorem 7 [5]. Podano także warunek wystąpienia tych oscylacji wraz ze sprawdzeniem ich stabilności (Theorem 1 i 4 [5]). Wyniki zweryfikowano poprzez wykonanie symulacji, w których wartości parametrów przyjęto na podstawie pracy (Khan *et al.* (2005)) otrzymując zgodność z rzeczywistymi danymi eksperymentalnymi, przedstawionymi w artykule (Suresh *et al.* (2009)). W pracy przedstawiono m.in. zachowanie procesu (tj. zmiany stężenia biomasy, substratu i produktu) w warunkach niestabilności procesu (Fig. 1) oraz przy zapewnieniu warunków stabilności (Fig. 2) [5].

### Publikacje [5][6][7]

#### Ad. H3

Proces biosyntezy *Corynebacterium glutamicum* jest procesem tlenowym, podczas którego może wystąpić tlenowa fermentacja. W rezultacie tlenowej fermentacji powstaje kwas L-glutaminowy (L-glutamic acid, LGA) oraz występuje zjawisko inhibicji produktem. Z tego powodu w kinetyce wzrostu *C. glutamicum* należy uwzględnić wpływ inhibicji produktem. W pracy przedstawiono analizę biosyntezy *C. glutamicum* w chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu i pulsacyjnym usuwaniem medium bioreaktorowego. Podjęto próbę m.in. stwierdzenia jak głęboka, kontrolowana penetracja w obszar tlenowej fermentacji, jest konieczna dla uzyskania optymalnej szybkości biosyntezy *C. glutamicum*. Dążąc do określenia frontu Pareto dla tego procesu, przeprowadzono optymalizację dwukryterialną, polegającą na jednoczesnej maksymalizacji produktywności biomasy oraz minimalizacji strat substratu.

**Wyniki:** Optymalizacja jednokryterialna procesu pozwoliła na określenie warunków niezbędnych do uzyskania maksymalnej produktywności biomasy *C. glutamicum* (wzór 12 [4]) oraz na stwierdzenie, że maksimum to jest osiągnięte dla wartości zadanej stężenia produktu równej  $P_{set}=50\%P_{critical}$  dla małych wartości  $W_f$  (Note 2 [4]). Oznacza to, że maksymalizacja biosyntezy *C. glutamicum* wymaga limitowania tlenowej fermentacji i utrzymywana jej na niskim poziomie. Przedstawiono także zależność produktywności biomasy *C. glutamicum* od  $W_f$  (tj. części medium usuwanej z bioreaktora podczas impulsu)



i  $P_{\text{set}}$  (Fig. 5 [4]). Optymalizację dwukryterialną, polegającą na jednoczesnej maksymalizacji produktywności biomasy oraz minimalizacji strat substratu, przeprowadzono początkowo dla równych priorytetów tych dwóch kryteriów. W tym celu określono autorską znormalizowaną funkcję celu  $F$  (wzór 13 [4]), którą maksymalizowano w procesie optymalizacji. Stwierdzono m.in., że w optymalizacji jednokryterialnej, jak i dwukryterialnej optymalna wartość  $P_{\text{set}}$  zależy od  $W_f$ , tj. zwiększanie  $W_f$  powoduje wzrost optymalnej wartości  $P_{\text{set}}$  (Fig. 6 i Theorem 8 [4]). Wynika z tego, że w praktycznych rozwiązaniach dla dowolnej wartości  $W_f$  biosynteza *C. glutamicum* może być kontrolowana za pomocą odpowiednio ustalonej wartości  $P_{\text{set}}$ . Optymalizacja dwukryterialna (jednoczesna maksymalizacja produktywności biomasy oraz minimalizacji strat substratu) dla różnych priorytetów kryteriów wymagała określenia nowej autorskiej funkcji celu (wzór 15 [3]). Następnie maksymalizując funkcję celu dla różnych wag uzyskano front Pareto, zawierający zbiór rozwiązań Pareto-optymalnych (Rysunek 7 [3]). Istnienie frontu Pareto wskazuje na konfliktowość kryteriów maksymalizacji produktywności biomasy oraz minimalizacji strat substratu w procesie produkcji *C. glutamicum*. W celu uzyskania jak najlepszego dopasowania do danych eksperymentalnych front Pareto został określony dla trzech kinetyk, określających dynamikę wzrostu biomasy przy inhibicji produktem. Dla każdej z tych kinetyk uzyskano dobre dopasowanie do rzeczywistych danych eksperymentalnych (Fig. 1 [3]). Pokazano, że dobre dopasowanie do danych eksperymentalnych można uzyskać poprzez ustalenie właściwych wartości parametrów produkcji biomasy ( $\mu_m$ ,  $K_S$ ,  $K_P$ ) dla tych samych parametrów utylizacji substratu ( $Y_{x/s}$ ,  $Y_{p/s}$ ) i produkcji produktu ( $Y_{p/x}$ ) (Tab. 2 [3]). Wykonano symulacje procesu, przedstawiając dynamikę procesu (tj. zmiany stężenia substratu, biomasy i produktu) w procesie niestabilnym (Fig. 3 [3]) oraz w procesie stabilnym (Fig. 4, 5 [3]). W pracy pokazano także, że front Pareto zależy od wartości zadanej stężenia produktu (Fig. 8, 9, 10 [3]).

Żądana produktywność biomasy przy najmniejszych możliwych stratach substratu może być osiągnięta poprzez ustalenie optymalnych wartości  $W_f$  i stężenia dozowanego substratu ( $S_R$ ). Dla przedstawionych kinetyk zostały otrzymane rozwiązania preferowane za pomocą metody minimalnego dystansu (Tab. 3, 4, 5 [3]). Poprzez przesuwanie się wzdłuż frontu Pareto można uzyskać rozwiązanie optymalne, zgodne z oczekiwanymi preferencjami. Zwiększanie znaczenia kryterium produktywności biomasy (tj. zwiększanie wagi pierwszego kryterium) i zmniejszanie znaczenia kryterium strat substratu (tj. zmniejszenie wagi kryterium drugiego) powoduje zmniejszanie optymalnej wartości  $W_f$  i zwiększanie optymalnej wartości  $S_R$ . Zmniejszanie znaczenia kryterium produktywności biomasy oraz zwiększanie znaczenia kryterium strat substratu powoduje zwiększanie optymalnej wartości  $W_f$  i zmniejszanie optymalnej wartości  $S_R$  (Fig. 7 [3]).

### Publikacje [3][4]

**Ad. H4**

W chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu oraz z pulsacyjnym usuwaniem części medium bioreaktorowego, przy impulsie występującym na podstawie zmian stężenia biomasy (ang. *biomass-driven bioprocess*), stężenie tlenu rozpuszczonego (DOC) jest kontrolowane pośrednio poprzez kontrolę stężenia biomasy. Ponieważ DOC zależy nie tylko od stężenia biomasy, lecz także m.in. od stężenia substratu oraz efektywności systemu napowietrzania, rozwiązanie to może powodować ryzyko zmniejszenia DOC poniżej stężenia krytycznego (tj. poniżej minimalnego stężenia koniecznego do optymalnego wzrostu komórek). W pracy pokazano **sposób monitorowania DOC** w chemostacie z pulsacyjnym dozowaniem substratu oraz z pulsacyjnym usuwaniem części medium bioreaktorowego przy impulsie określającym na podstawie zmian stężenia biomasy [2].

**Wyniki:** W pracy opracowano model chemostatu z pulsacyjnym dozowaniem substratu i pulsacyjnym usuwaniem części medium bioreaktorowego przy impulsie występującym na podstawie zmian stężenia biomasy [2]. Poprawność modelu została potwierdzona dla wyników eksperymentalnych procesu *Acinetobacter calcoaceticus*. Określono warunki zapewniające stabilność procesu (Proposition 3 [2]) oraz maksymalne stężenie dozowanego substratu, którego przekroczenie może spowodować zmniejszenie stężenia tlenu rozpuszczonego w medium bioreaktorowym poniżej stężenia krytycznego. Ograniczenie stężenia dozowanego substratu do tej maksymalnej wartości zapobiega zmniejszeniu DOC poniżej stężenia krytycznego oraz ogranicza ryzyko występowania efektu Crabtree (Proposition 4 [2]). Wykonano szereg symulacji przedstawiających dynamikę procesu (tj. zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego, biomasy i substratu) dla procesu niestabilnego (Fig. 3 dla procesu *A. calcoaceticus*, Fig. 9 dla procesu *S. cerevisiae*) oraz stabilnego (np. Fig. 4 dla procesu *A. calcoaceticus*, Fig. 10 dla procesu *S. cerevisiae*) [2].

Ponadto przeprowadzone analizy pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków [2]:

- a) Przeprowadzone symulacje, wykonane w oparciu o zaproponowany model, są zgodne z danymi eksperymentalnymi dla procesu *A. calcoaceticus*.
- b) Zwiększenie stężenia substratu w medium bioreaktorowym, przy braku monitoringu stężenia tlenu rozpuszczonego, może prowadzić do zmniejszenia DOC poniżej stężenia krytycznego (Fig. 14).
- c) Przy zapewnieniu dobrych warunków tlenowych, właściwa szybkość wzrostu mikroorganizmów praktycznie nie zależy od stężenia tlenu rozpuszczonego w medium bioreaktorowym.
- d) Dla ustalonej wartości stężenia dozowanego substratu, minimalna wartość stężenia tlenu rozpuszczonego w czasie trwania okresu oscylacji zależy w sposób bezpośredni od wartości zadanej stężenia biomasy. Wzrost wartości zadanej stężenia biomasy

powoduje zmniejszenie wartości stężenia tlenu rozpuszczonego, co zostało przedstawione dla procesu *A. calcoaceticus* (Fig. 6).

- e) Dla ustalonej wartości zadanej stężenia biomasy, początkowy wzrost stężenia dozowanego substratu powoduje zmniejszenie średniej wartości stężenia tlenu rozpuszczonego w cyklu dozowania, co zostało przedstawione dla procesu *A. calcoaceticus* (Fig. 7). Dalszy wzrost stężenia dozowanego substratu ma mały wpływ na wartość stężenia tlenu rozpuszczonego, co można wytłumaczyć zjawiskiem występowania nasycenia substratem dla wyższych stężeń substratu.
- f) Minimalna wartość stężenia tlenu rozpuszczonego w czasie okresu oscylacji praktycznie nie zależy od tego, jaka część medium jest usuwana z bioreaktora ( $W_f$ ). Średnia wartość stężenia tlenu rozpuszczonego w czasie okresu oscylacji zależy od  $W_f$  (Fig. 8).
- g) Maksymalizację produktywności biomasy (*S. cerevisiae* i *A. calcoaceticus*) można uzyskać poprzez wzrost stężenia dozowanego substratu, wzrost wartości zadanej stężenia biomasy oraz zmniejszanie  $W_f$  przy zapewnieniu dobrych warunków tlenowych oraz niedopuszczeniu do wystąpienia tlenowej fermentacji.

## Publikacja [2]

### 4.3.4. Możliwość wykorzystania uzyskanych wyników

Uzyskane wyniki (m.in. przedstawione modele procesów i ich analizy oraz koncepcja zunifikowanej bioenergetyki komórki) stwarzają możliwości wszechstronnej analizy procesów bioreaktorowych, zarówno na etapie ich projektowania, jak i optymalizacji już istniejących procesów. Zunifikowana bioenergetyka komórki pozwala również na interpretację zjawisk i efektów bioenergetycznych (w tym wybranych chorób) zachodzących w organizmach wielokomórkowych stwarzając możliwości np. zaprojektowania nowych typów leków.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

Moje zainteresowania i osiągnięcia naukowe dotyczą również takich zagadnień, jak:

- a) Analiza zmienności genetycznej organizmów, w tym organizmów o znaczeniu przemysłowym.
- b) Analiza ewolucji organizmów, w tym organizmów o znaczeniu przemysłowym.
- c) Opracowanie nowych technologii bioreaktorowych.
- d) Analiza chemostatu z recyrkulacją biomasy oraz analiza chemostatu po wystąpieniu zakażeń.
- e) Analiza wpływu stosowania nawozów i herbicydów na naturalność pól ornych.

- f) Zastosowania metod sztucznej inteligencji w projektowaniu bioprocessów, identyfikacji szlaków metabolicznych oraz w analizach i ocenach wybranych biotechnologii.
- g) Symulacje i analizy wybranych bioprocessów.

**Ad. a)**

Prace dotyczyły opracowania nowej metody służącej do analizy zmienności genetycznej organizmów, w tym organizmów o znaczeniu przemysłowym. W opracowanej i zaimplementowanej metodzie (jako program o nazwie dotPicker) porównywanie sekwencji następuje na dwóch poziomach, tj. na poziomie aminokwasowym i na poziomie kodonów aminokwasów, gdy porównywane aminokwasy są różne. Automatyczne przejścia pomiędzy tymi poziomami zostały umożliwione poprzez opracowane mechanizmy semihomologizacji i desemihomologizacji. Implementacja nowej metody rozszerza możliwości standardowej metody macierzy kropkowej (ang. *Dot-Matrix method*) oraz usuwa jej ograniczenia umożliwiając m.in.:

- przyrównanie dowolnej ilości sekwencji, co uzyskano poprzez opracowanie algorytmu n-wymiarowej macierzy kropkowej,
- uwzględnienie podejścia semihomologicznego,
- zapamiętywanie współrzędnych odnalezionych fragmentów identyczności,
- ocenę otrzymanych fragmentów identyczności,
- analizę cech fizykochemicznych porównywanych aminokwasów.

W pracach pokazano sposób, w jaki zastosowanie nowej metody może ułatwić interpretację uzyskanych wyników, m.in. w kontekście jednopunktowej mutacji. Opracowana metoda została wykorzystana do oceny dynamiki zmian inhibitorów proteinaz z nasion dyniowatych oraz sekwencji cytochromu c roślin uprawnych. W pracach wskazano również na zgodność dynamiki zmian określonej za pomocą nowej metody, z wynikami uzyskanymi dla drzew filogenetycznych.

Publikacje:

**Kasperski A.**, Kasperska R., *Identification of protein family representatives*, Current Bioinformatics, 2014, Vol. 9, no 4, 414–425;

**Kasperski A.**, Kasperska R., *A novel method of sequence similarity evaluation in n-dimensional sequence space*, Current Bioinformatics, 2012, Vol. 7, no 3, 295–303;

**Kasperski A.**, Kasperska R., *Zastosowanie n-wymiarowej macierzy kropkowej do analizy zmienności genetycznej roślin*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 2015, nr 276, 69–83.

**Ad. b)**

Prace dotyczyły opracowania nowej metody służącej do rekonstrukcji filogenezy organizmów w tym organizmów o znaczeniu przemysłowym. Metoda może stanowić alternatywę dla istniejących metod obliczeniowych (tj. metod Neighbor Joining, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood, Bayesian Inference) wykorzystywanych do rekonstrukcji pochodzenia i zmian ewolucyjnych organizmów. W pracy wskazano na wady tych metod obliczeniowych, np. w praktyce nie jest możliwe wygenerowanie i oszacowanie wszystkich możliwych drzew filogenetycznych dla większej ilości taksonów (np. dla ponad 50'ciu taksonów). Oznacza to, że dla większej ilości taksonów otrzymywany wynik bazuje na analizie tylko części drzew, które można było oszacować w zadanym czasie. Ideą nowej metody było dążenie do ustalenia możliwości rozpoznawania ewolucji organizmów na zasadzie rozpoznawania wzorców. W opracowanej i zaimplementowanej metodzie (jako program o nazwie EvolutionXXI) wykorzystano mechanizmy sztucznych sieci neuronowych. Sztuczną sieć neuronową uczono wykorzystując sekwencje cytochromu b 32 organizmów. Organizmy te cechował szeroki zakres ewolucji (tj. od organizmów prymitywnych do organizmów zaawansowanych ewolucyjnie). Cytochromy b tych organizmów stanowiły wzorce uczące, które następnie wykorzystywano w procesie określania ewolucji badanych organizmów. Opracowana metoda umożliwia automatyczne przeanalizowanie ewolucji organizmów, co zostało przedstawione na przykładzie odtworzenia m.in. ewolucji naczelnych (w tym człowieka) oraz drożdży. W pracy zrekonstruowano ewolucję drożdży o dużym znaczeniu przemysłowym, m.in. *Saccharomyces cerevisiae* i *Yarrowia lipolytica*. W pracy pokazano, że *S. cerevisiae* należą do jednych z najbardziej zaawansowanych ewolucyjnie drożdży. Wskazano także na ewolucyjne pokrewieństwo pomiędzy *S. cerevisiae*, a grzybami kapeluszowymi. Poprawność działania metody stwierdzono poprzez pokazanie zgodności uzyskanych wyników, dotyczących odtworzenia ewolucji m.in. naczelnych i drożdży, z najnowszymi badaniami prowadzonymi w tym zakresie. Tematyka przedstawiona w tym podpunkcie stanowi m.in. część zajęć z przedmiotu „Techniki rekonstrukcji filogenezy”. Przedmiot ten prowadzę na studiach II stopnia na kierunku Biologia.

Publikacja:

**Kasperski A.**, Kasperska R., *A new approach to the automatic identification of organism evolution using neural networks*, BioSystems, 2016, Vol. 142–143, 32–42.

**Ad. c)**

Prowadzone przeze mnie badania we współpracy z Parkiem Naukowo-Technologicznym UZ (PNT UZ), w laboratorium biotechnologii, w Centrum Innowacji – „Technologie dla Zdrowia Człowieka”, dotyczą opracowywania nowych technologii bioreaktorowych.

W ramach promocji systemów bioreaktorowych wygłosiłem w PNT UZ m.in. seminarium „Potencjalne zastosowania bioreaktora”. W ramach wykonanych prac uruchomiłem system bioreaktorowy Biostat A oraz zaimplementowałem algorytmy służące m.in. do podstawowej obsługi urządzeń wspomagających działanie systemu Biostat A. Implementacja ta dała możliwość opracowywania i testowania nowych algorytmów sterowania, rozszerzając możliwości dostarczone przez producenta systemu Biostat A. Celem prac jest stworzenie zaawansowanych technologii, które umożliwią przede wszystkim maksymalizację wzrostu biomasy drobnoustrojów oraz oszczędność stosowanych surowców. W ramach badań opracowuję nowe algorytmy sterowania procesami, które następnie implementuję jako programy komputerowe. Programy są pisane najczęściej w językach Java i C#. Docelowo, opracowywane technologie mają mieć potencjał stosowalności w przemyśle. Moim dążeniem jest wykorzystanie metod sztucznej inteligencji, zwłaszcza logiki rozmytej, sztucznych sieci neuronowych i systemów ekspertowych, w nowo powstających technologiach.

**Ad. d)**

Prowadzone badania dotyczą analizy chemostatu z recyrkulacją biomasy oraz efektem pulsacyjnym. Recyrkulacja biomasy umożliwia uzyskanie większej produktywności biomasy, zmniejszenie strat substratu oraz zwiększenie stabilności procesu. Ponadto efekt pulsacyjny daje większe możliwości kontroli procesu. Badania te mają prowadzić do opracowania nowych metod analiz technologii biologicznych oczyszczalni ścieków. Ponadto prowadzone są prace nad analizą chemostatu po wystąpieniu zakażeń. Otrzymane wyniki pokazują m.in. w jaki sposób można usunąć część lub całą zakażoną biomasę z systemu. Usunięcie zakażonej biomasy umożliwia kontynuację procesu ograniczając straty do minimum.

Publikacje:

Sun K., Liu S., **Kasperski A.**, Tian Y., *Dynamics analysis and biomass productivity optimisation of a microbial cultivation process through substrate regulation*, Discrete Dynamics in Nature and Society, 2016, Vol. 2016, 1–13;

Tian Y., Sun H., **Kasperski A.**, *Analysis of a chemostat in the presence of viral infection expressed by a general infection rate*, Communications in Mathematical Biology and Neuroscience, 2015, 1–20.

**Ad. e)**

Prowadzone badania dotyczą opracowania nowej metody, która umożliwi ocenę naturalności pól ornych i wskazania optymalnego sposobu ich uprawiania. Celem prac jest określenie wpływu wykorzystywania nawozów i herbicydów na zachowanie

naturalności pól. Prace dotyczące tej problematyki prowadzę we współpracy z naukowcami z Rzymu (University of Rome, Istituto Superiore di Sanità (ISS), University of Roma Tre). W ramach współpracy opracowuję nowe algorytmy i implementuję zaawansowane obliczeniowo i nowatorskie metody oceny naturalności pól ornych. Otrzymane wyniki świadczą o możliwości określenia naturalności i wskazania optymalnego sposobu uprawiania pól ornych na podstawie rosnącej na nich roślinności. Dotychczasowe badania, których wyniki zostały opublikowane, zostały przeprowadzone dla pól leżących w otoczeniu Rzymu. Celem kolejnych, obecnie prowadzonych badań jest m.in. pokazanie uniwersalności opracowanej metody poprzez wykonanie analiz dla pól położonych na bardzo dużym obszarze oraz dla danych archiwalnych.

Publikacja:

Fanfarillo E., **Kasperski A.**, Giuliani A., Cicinelli E., Latini M., Abbate G., *Assessing naturalness of arable weed communities: a new index applied to a case study in central Italy*, Biological Agriculture & Horticulture: An International Journal for Sustainable Production Systems, 2018, Vol. 34(4), 232–244.

**Ad. f)**

Nurt badań dotyczy zastosowania metod sztucznej inteligencji w projektowaniu bioprocessów, identyfikacji szlaków metabolicznych, analizach i sposobach oceny wybranych biotechnologii, m.in. nowych technologii produkcji komórek macierzystych, szczepionek, przeciwciał. Poprawne zaprojektowanie procesu biotechnologicznego wymaga dogłębnej wiedzy oraz umiejętności jej wykorzystania. Obserwowany rozwój nauk biologicznych pozwolił na lepsze zrozumienie zjawisk, które mogą wystąpić podczas bioprocessów lecz także doprowadził do zgromadzenia bardzo dużej, często szczegółowej, ilości wiedzy. Wraz ze wzrostem ilości wiedzy zostały opracowane nowe narzędzia i technologie komputerowe, które ułatwiają wyszukiwanie, przetwarzanie oraz interpretację zgromadzonej informacji. Implementowane nowe metody są przeznaczone do rozwiązywania specyficznych problemów wymagających profesjonalnej wiedzy. W swoich pracach pokazuję sposób, w jaki można wykorzystać wybrane metody sztucznej inteligencji, przede wszystkim systemy ekspertowe oraz logikę rozmytą, do identyfikacji szlaków metabolicznych oraz do projektowania, analiz i oceny bioprocessów. Tematyka przedstawiona w tym podpunkcie stanowi m.in. część zajęć z przedmiotu „Projektowanie, analiza i symulacje bioprocessów”. Przedmiot ten opracowałem, wprowadziłem i prowadzę na studiach II stopnia na kierunku Biotechnologia.

Konferencje:

Solan A., **Kasperski A.**, *New indexes of evaluation of biotechnology of vaccine and antibody production*, 12th International Conference of Young Naturalists - From Biotechnology to Environmental Protection, Zielona Góra, 2017;

Kempka K., **Kasperski A.**, Kamiński P., *Evaluation of stem cell culture processes carried out in biotechnological laboratories using fuzzy inference*, 12th International Conference of Young Naturalists - From Biotechnology to Environmental Protection, Zielona Góra, 2017;

Kempka K., **Kasperski A.**, Kamiński P., *A new approach to the analysis of development of stem cell technology using artificial intelligence methods*, 11th International Conference of Young Naturalists - From Biotechnology to Environmental Protection, Zielona Góra, 2016;

Kempka K., **Kasperski A.**, Kamiński P., *Analysis of the dynamics of stem cell transplantation technology development*, 10th International Conference of Young Naturalists - From Biotechnology to Environmental Protection, Zielona Góra, 2015;

Kempka K., **Kasperski A.**, *Application of AI methods for the identification and analysis of metabolic pathways*, 9th International Conference of Young Naturalists - From Biotechnology to Environmental Protection, Zielona Góra, 2014.

**Ad. g)**

W swoich pracach zajmuję się symulacjami i analizami wybranych bioprocessów, m.in. wzrostu populacji, systemów bioreaktorowych, reakcji enzymatycznych (w tym odwracalnych i nieodwracalnych reakcji enzymatycznych z różnymi typami inhibicji), ekosystemów (systemów drapieżnik-ofiara), systemów immunologicznych. Tematyka ta stanowi część zajęć z przedmiotów „Programowanie obiektowe w biotechnologii” oraz „Projektowanie, analiza i symulacje bioprocessów”, tj. przedmiotów, które opracowałem, wprowadziłem i prowadzę na studiach II stopnia na kierunku Biotechnologia.

Andrzej Kasperski