

# بهینه سازی فرایند تخمیر نیمه پیوسته برای تولید آنتی بادی های مونوکلونال از سلول هیبریدوما با الگوریتم ژنتیک

حامد اعظمی، افشار علی حسینی\*<sup>+</sup>

گروه مهندسی شیمی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

**چکیده:** هدف این پژوهش، بهینه سازی فرایند کشت نیمه پیوسته سلول های هیبریدوما برای تولید بیشترین آنتی بادی مونوکلونال به کمک الگوریتم ژنتیک در طول دوره کشت ده روز است. متغیرهای مستقل نرخ خوراک روزانه سویسترات (گلوکز و گلوتامین) در دو حالت ثابت و متغیر و تابع هدف میزان تولید مونوکلونال آنتی بادی است. به منظور مدل سازی فرایند کشت نیمه پیوسته هیبریدوما از یک مدل سینتیکی هفت مرحله ای و برای حل دسته معادله های دیفرانسیل (معادله های حاکم) از روش رانگ کوتای مرتبه چهارم اصلاح یافته (Ode45) در محیط نرم افزار متلب استفاده شد. نتیجه های به دست آمده از پژوهش نشان می دهد میزان مونوکلونال آنتی بادی تولیدی در حالت نرخ خوراک ثابت و متغیر (دوره کشت ده روزه) به ترتیب ۲۳۳ و ۳۱۴ میلی گرم است به عبارتی بهینه سازی خوراک در حالت متغیر نسبت به حالت ثابت نرخ خوراک افزایش ۳۴ درصدی در تولید فرآورده را نشان می دهد. برای صحت سنجی مدل از نتیجه های تجربی به دست آمده از پژوهش های ترمبلی و همکاران و در پژوهش دیگر توسط میگوئل و همکاران استفاده شد. داده های به دست آمده نشان از تطابق خوبی (با اختلاف ۱/۴ درصد) با پژوهش ترمبلی و به نسبت مناسب با پژوهش میگوئل (با اختلاف ۱۳/۲٪) دارد.

**کلیدواژه ها:** کشت نیمه پیوسته، بهینه سازی، مونوکلونال آنتی بادی، الگوریتم ژنتیک.

**KEYWORDS:** Semi-continuous culture; Optimization; Monoclonal antibody; Genetic algorithm.

## مقدمه

بهینه سازی بازدهی کشت سلولی در راکتورهای زیستی معمولی راهبرد بهتری است [۱]. به طور کلی درمان با آنتی بادی های مونوکلونال نیازمند استفاده از آن ها در یک دوره زمانی طولانی است و برای برآورده کردن تقاضای بازار تولید این فرآورده ها باید در مقیاس و گسترده ای با در نظر گرفتن مسایل اقتصادی، مولد بودن و فرایندهای صنعتی پایدار صورت گیرد تا بیماران به موقع از

امروزه در علوم پزشکی آنتی بادی های مونوکلونال از مهم ترین فرآورده های بیودارویی در حال توسعه هستند. تقاضای زیاد برای تولید مونوکلونال در مقیاس صنعتی منجر به توسعه فناوری های نوین در مقیاس وسیع با کشت سلول های پستانداران شده است. گرچه برخی از شرکت ها تلاش کرده اند با ایجاد بیوراکتورها (راکتورهای زیستی) این نیاز در حال افزایش را برآورده کنند ولی به نظر می رسد

\*عاهده دار مکاتبات

+E-mail: Afs.alihosseini@iauctb.ac.ir

گوناگونی از جمله: رابوس و همکاران [۸]، کوکوس [۹]، چپو و همکاران [۱۱]، جایارامان و همکاران [۱۰]، وانگ و چنگ [۱۲] از الگوریتم‌های گرادیان مرتبه اول<sup>(۵)</sup> و برنامه‌نویسی دینامیکی<sup>(۶)</sup>، الگوریتم شبیه‌سازی تبرید<sup>(۷)</sup>، الگوریتم تکاملی تفاضلی<sup>(۸)</sup> برای بهینه‌سازی تخمیر نیمه‌پیوسته تولید بیو اتانول استفاده کرده اند نتیجه پژوهش‌های آن‌ها نشان می‌دهد که الگوریتم‌های تصادفی پاسخ بهتری برای کاربردهای زیست‌فرایندی است. برای پیش‌بینی پارامترهای سینتیک یک مدل تخمیر الکلی از الگوریتم تکامل تفاضلی جواب بهتری دریافت شده است. عملکرد الگوریتم‌های فرگشتی<sup>(۹)</sup>، تکامل تفاضلی و روش بهینه‌سازی ازدحام ذره‌ها<sup>(۱۰)</sup> را برای مطالعه موردی چهار مورد فرایند زیستی گوناگون که از مراجع علمی اقتباس شده بودند مورد مقایسه قرار گرفته است که روش تکامل تفاضلی<sup>(۱۱)</sup> در قیاس با سایر الگوریتم‌ها عملکرد بهتری دارد [۱۳-۱۷]. در سال‌های اخیر تعداد زیادی الگوریتم جدید الهام گرفته شده از طبیعت از جمله روش بهینه‌سازی ازدحام ذره‌های (PSO)، روش بهینه‌سازی کلونی زنبور عسل<sup>(۱۲)</sup>، الگوریتم جستجوی فاخته<sup>(۱۳)</sup>، الگوریتم کرم شب‌تاب<sup>(۱۴)</sup> و الگوریتم جلبک مصنوعی<sup>(۱۵)</sup> پدیدار شده‌اند [۱۸-۲۳]. به تازگی توسط سیویسولگو [۲۴] الگوریتم بهینه‌سازی جستجوی پس‌گرد<sup>(۱۶)</sup> پیشنهاد شده است، این روش برای حل مسئله‌های بهینه‌سازی عددی با مقدارهای حقیقی و بر مبنای رفتار موجودهای زنده‌ای که در گروه‌های اجتماعی زندگی می‌کنند توسعه یافته است به عنوان نمونه گروه‌ها متناسب با نیاز به تامین غذا به صورت تصادفی هم‌دیگر را پیدا می‌کنند. الگوریتم بهینه‌سازی جستجوی پس‌گرد بر مبنای روش تکامل تفاضلی توسعه داده شده و عنصرهای بسیاری همانند با روش تکامل تفاضلی دارد. با این حال با وارد کردن عنصرهای نوینی مانند عملگرهای تقاطعی و جهشی بهبود یافته و همچنین استفاده از یک جمعیت دوگانه این روش نسبت به روش تکامل تفاضلی دلخواه‌تر است. الگوریتم بهینه‌سازی جستجوی پس‌گرد برای تنظیم دلخواه تنها یک پارامتر کنترلی نیاز دارد

برتری‌های آن بهره مند شوند [۲]. با این هدف سامانه‌های تولیدی بسیاری با به روزرسانی و اصلاح‌های مکرر منجر به پدید آمدن طیف گسترده‌ای از فناوری‌های موجود برای تولید گسترده مونوکلونال آنتی بادی شده است [۳]. در سال‌های اخیر بهینه‌سازی فرایند تخمیر نیمه‌پیوسته به شکل جدی مورد مطالعه قرار گرفته است. چن و همکاران [۴] پیشنهاد دادند برای بهینه‌سازی یک راکتور زیستی نیمه‌پیوسته از یک مدل شبکه عصبی بازگشتی آشکاری<sup>(۱)</sup> و الگوریتم ژنتیک<sup>(۲)</sup> اصلاح شده استفاده شود. آن‌ها روش خود را بر تخمیر نیمه‌پیوسته یک گونه مخمر متداول در صنایع غذایی با نام ساکارومایسس سرویزیه اعمال کردند. لویسانوسکاس و همکاران [۵] با استفاده از توابع تقریب پروفیل زمانی نرخ خوراک و روش بهینه‌سازی پارامتری، فرایندهای تخمیر نیمه‌پیوسته گوناگون را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش چهار نوع از تابع‌های زمانی با نام‌های تابع نرخ خوراک ثابت، تابع شیب، تابع نمایی و توابع پایه شعاعی مقایسه شدند. مسئله‌های بهینه‌سازی پارامتری با استفاده از الگوریتم جستجوی تصادفی کموتاکسی حل شده و با استفاده از یک شبکه عصبی مصنوعی، الگوریتم ژنتیک<sup>(۳)</sup> و طراحی یکنواخت<sup>(۴)</sup> فرایند تخمیر نیمه‌پیوسته آنتی‌بیوتیک iturin A را بررسی کردند و نتیجه‌های آن‌ها نشان داد که در شبیه‌سازی تخمیر نیمه‌پیوسته، نرخ خوراک سوبسترا یک متغیر کلیدی در فرایند بهینه‌سازی است. این متغیر پروفیل تغذیه را برای راکتور زیستی فراهم می‌کند تا در زمان فرایند تخمیر مقدار مشخصی از ورودی در یک زمان مشخص فراهم شود [۷، ۶]. در مدل ریاضی پارامترهای عملکردی مانند متغیرهای ورودی‌ها، فراورده‌های حد واسط؛ زیست‌توده و فراورده، اجزای سامانه را تشکیل می‌دهند. مناسب‌ترین راهبرد بهینه‌سازی استفاده از روش‌های عددی مبتنی بر الگوریتم‌های تصادفی است زیرا پیچیدگی رویکردهای تحلیلی با افزایش تعداد حالت‌ها و متغیرهای کنترلی افزایش و الگوریتم‌های قطعی، هزینه‌های محاسباتی بالا و همچنین احتمال همگرایی به بهینه محلی را دارند. پژوهشگران

(۱) Cascading Recurring Neural Network (RNN)

(۲) Genetic Algorithm (GA)

(۳) Artificial Neural Network Genetic Algorithm (ANN-GA)

(۴) Uniform Design (UD)

(۵) First order gradient algorithms

(۶) Dynamic Programming

(۷) Refrigeration Simulation Algorithm

(۸) Differential evolutionary algorithm

(۹) Evolutionary Algorithms (EA)

(۱۰) Particle Swarm Optimization (PSO)

(۱۱) Difference Evolution (DE)

(۱۲) Algorithm Bee colony optimization (ABC)

(۱۳) Cuckoo Search Algorithm (CS)

(۱۴) Firefly Algorithm (FA)

(۱۵) Artificial Algae Algorithm (AAA)

(۱۶) Roundup Search Optimization Algorithm (BSA)

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - k_d) - \frac{(F_1 + F_2)}{V} X_v \quad (1)$$

$$\frac{dGlc}{dt} = \frac{F_1}{V} Glc_{in} - \frac{(F_1 + F_2)}{V} Glc - q_{Glc} X_v \quad (2)$$

$$\frac{dGln}{dt} = \frac{F_2}{V} Gln_{in} - \frac{(F_1 + F_2)}{V} Gln - q_{Gln} X_v \quad (3)$$

$$\frac{dLac}{dt} = q_{Lac} X_v - \frac{(F_1 + F_2)}{V} Lac \quad (4)$$

$$\frac{dAmm}{dt} = q_{Amm} X_v - \frac{(F_1 + F_2)}{V} Amm \quad (5)$$

$$\frac{dMAB}{dt} = q_{MAB} X_v - \frac{(F_1 + F_2)}{V} MAB \quad (6)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_1 + F_2 \quad (7)$$

در این معادله ها:  $X_v$ : غلظت در سلول های زیست پذیر ؛  $Glc$ : غلظت گلوکز ؛  $Gln$ : غلظت گلوتامین ؛  $Lac$ : غلظت لاکتات؛  $Amm$ : غلظت آمونیاک ؛  $MAB$ : غلظت مونوکلونال؛  $V$ : حجم محفظه تخمیر ؛  $F_1$  و  $F_2$ : نرخ خوراک حجمی گلوکز و گلوتامین و  $Glc_{in}$  و  $Gln_{in}$  غلظت های گلوکز و گلوتامین در جریان خوراک هستند. عبارتهای ریاضی برای نرخ های مخصوص  $\mu$ ،  $k_d$ ،  $q_{Glc}$ ،  $q_{Gln}$ ،  $q_{Lac}$ ،  $q_{Amm}$  و  $q_{MAB}$  در جدول ۱ ارائه شده است.

همان گونه که گفته شد در این پژوهش با یک دسته معادله های دیفرانسیل معمولی ۷ تایی روبرو هستیم که برای حل نیاز به شرایط اولیه دارند که جدول ۲ شرایط اولیه معادله (اقتباس شده از پژوهش ترمبلی) را نشان می دهد [۳۵]. در واقع شرایط اولیه زیر غلظت های اولیه واکنش دهنده ها و فراورده ها در لحظه آغازی در محیط کشت هستند ( $t=0$ ). همچنین جدول ۳ غلظت های گلوکز و گلوتامین در جریان خوراک ورودی به راکتور زیستی را نشان می دهد.

### بهینه سازی

در پژوهش حاضر بهینه سازی برای دو حالت گوناگون: ۱- زمانی که نرخ خوراک سوپسترا (شدت جریان) در طول ده روز ثابت ۲- زمانی که نرخ خوراک سوپسترا در طول ده روز متغیر است انجام شده است. برای هر دو حالت تابع هدف و قیدهای مساله یکسان ولی تعداد متغیرهای مستقل حالت اول ۲ و تعداد متغیرهای مستقل حالت دوم برابر ۲۰ است که در ادامه بیان خواهد شد.

در صورتی که الگوریتم تکامل تفاضلی برای تنظیم دلخواه به دو پارامتر نیاز دارد در نتیجه می توان انتظار داشت که روش بهینه سازی جستجوی پس گرد نسبت به روش تکامل تفاضلی عملکرد بهتری داشته باشد. روش بهینه سازی جستجوی پس گرد دارای نتیجه های امیدوارکننده ای در زمینه حل مسائل مقید مرزی معیار می باشد و به دلیل عملکرد مناسب آن مطالعه های بسیاری برای بررسی قابلیت های این روش در حل مسائل مهندسی گوناگون انجام گرفته است [۲۹-۲۵]. الگوریتم ژنتیک از جمله روش هایی است که به کارگیری آن در کنار یک شبیه ساز ابزاری قدرتمند در بهینه سازی فرایندها است [۳۱، ۳۰]. هدف از پژوهش حاضر تعیین شرایط بهینه ی خوراک یک راکتور زیستی کشت نیمه پیوسته سلول هیبریدوما برای تولید بیش ترین مونوکلونال می باشد برای این هدف بهینه سازی در دو حالت گوناگون: ۱- با نرخ سوپسترات ثابت (در طول ده روز) ۲- با نرخ سوپسترات متغیر (در طول ده روز) بررسی می شود. برای هر دو حالت تابع هدف و قیدهای مسئله یکسان اما در حالت اول ۲ متغیر مستقل و در حالت ۲ تعداد متغیرهای مستقل ۲۰ می باشد که این ۲۰ متغیر در واقع نرخ شدت جریان خوراک روزانه گلوکز و گلوتامین در ۱۰ روز دوره ی کشت سلول هیبریدوما می باشد. در این راه برای بهینه سازی نرخ خوراک از الگوریتم ژنتیک که اهمیت آن در مقدمه گفته شد استفاده می شود و همچنین معادله های حاکم دیفرانسیلی به دست آمده از سینتیک به روش حل عددی رانگ کوتاه مرتبه ۴ اصلاح یافته (Ode45) بررسی می شوند.

### فرمول بندی مسئله

مدل سینتیکی هفت مرحله ای مطابق معادله های زیر برای مطالعه بهینه سازی نتیجه های کشت ناپیوسته و نیمه پیوسته هیبریدوما استفاده شد در این مدل غلظت های گلوکز و گلوتامین، هر دو برای توصیف عبارت نرخ رشد ویژه ( $\mu$ ) استفاده شد. نرخ مرگ سلول ها  $k_d$  تابع غلظت لاکتات، آمونیاک و گلوتامین است. نرخ تولید ویژه مونوکلونال که با  $q_{MAB}$  نشان داده می شود توسط یک مدل با ضریب بازدهی متغیر که با نرخ رشد ویژه به حالت فیزیولوژیکی کشت مرتبط می شود پیش بینی شده است. معادله های موازنه جرم سامانه در وضعیت خوراک دهی ناپیوسته که به ترتیب شامل دو خوراک  $F_1$  و  $F_2$  برای گلوکز و گلوتامین می شود به شکل زیر فرمول بندی شده است [۳۳-۳۲].

جدول ۱- عبارتهای ریاضی ضریبهای سینتیکی مسئله [۳۴].

$\mu = \mu_{max} \left[ \frac{Glc}{K_{Glc} + Glc} \right] \left[ \frac{Gln}{K_{Gln} + Gln} \right]$	(۸)
$k_d = k_{d_{max}} (\mu_{max} - k_{d_{lac}} Lac)^{-1} (\mu_{max} - k_{d_{amm}} Amm)^{-1} \frac{k_{d_{gln}}}{k_{d_{gln}} + Gln}$	(۹)
$q_{Gln} = \frac{\mu}{Y_{x_p/Gln}}$	(۱۰)
$q_{Glc} = \frac{\mu}{Y_{x_p/Gln}} + m_{glc} \left[ \frac{Glc}{k_{m_{glc}} + Glc} \right]$	(۱۱)
$q_{Lac} = Y_{lac/glc} q_{glc}$	(۱۲)
$q_{Amm} = Y_{amm/gln} q_{gln}$	(۱۳)
$q_{Mab} = \alpha' + \beta \quad \text{where } \alpha' = \frac{\alpha_0}{k_{\mu} + \mu}$	(۱۴)

جدول ۲- شرایط اولیه معادلههای دیفرانسیل حاکم بر مسئله.

متغیر	$V_0$	$Mab_0$	$Amm_0$	$Lac_0$	$Gln_0$	$Glc_0$	$X_{v0}$
واحد	L	mM	mM	mM	mM	mM	Cells/ml
مقدار	0.8	0	0	0	4	25	$2 \times 10^5$

جدول ۳- مقدارهای غلظت‌های گلوکز و گلوتامین در جریان خوراک ورودی به راکتور زیستی.

نوع خوراک	توضیحات	واحد	مقدار
$Glc_{in}$	غلظت‌های گلوکز در جریان خوراک F1	میلی مول / لیتر (mM)	۲۵
$Gln_{in}$	غلظت‌های گلوتامین در جریان خوراک F2	میلی مول / لیتر (mM)	۴

### تابع هدف

تابع هدف مقدار کل آنتی بادی مونوکلونال تولید شده در بازه‌ی زمانی  $Time = [0, t_f]$  است که به صورت معادله (۱۵) تعریف می‌شود. این تابع همان پایه‌ی اصلی سامانه است که می‌بایست بیشینه شود به طور عموم زمان نهایی ( $t_f$ ) ده روز می‌باشد. (مدت زمان تولید یک پیمانانه فراورده‌ی ۱۰ روز است)

$$PI = Mab(t_f) \cdot V(t_f) \quad \text{objective: maximiz} \quad (15)$$

### متغیرهای مستقل

در این پژوهش ۲۰ متغیر مستقل در نظر گرفته شد. این ۲۰ متغیر در واقع نرخ شدت جریان خوراک روزانه گلوکز و گلوتامین در ۱۰ روز دوره‌ی کشت سلول هیبریدوما می‌باشد. متغیرهای مستقل به صورت  $F_i (i=1,2,\dots,10)$  در نظر گرفته شده است (مربوط به گلوکز و  $i=1,2,\dots,10$ ) و  $i=11,12,\dots,20$  مربوط به گلوتامین).

### قیدها

قیدهای مسئله بهینه‌سازی شامل میزان بیش‌ترین نرخ خوراک روزانه و میزان بیش‌ترین حجم نمونه کشت پس از ۱۰ روز است که به صورت زیر ارایه می‌شود.

$$0 \leq F_i \leq 0.5 \text{ Litr / day} \quad (16)$$

$$V(t_f) \leq 2 \text{ liter} \quad (17)$$

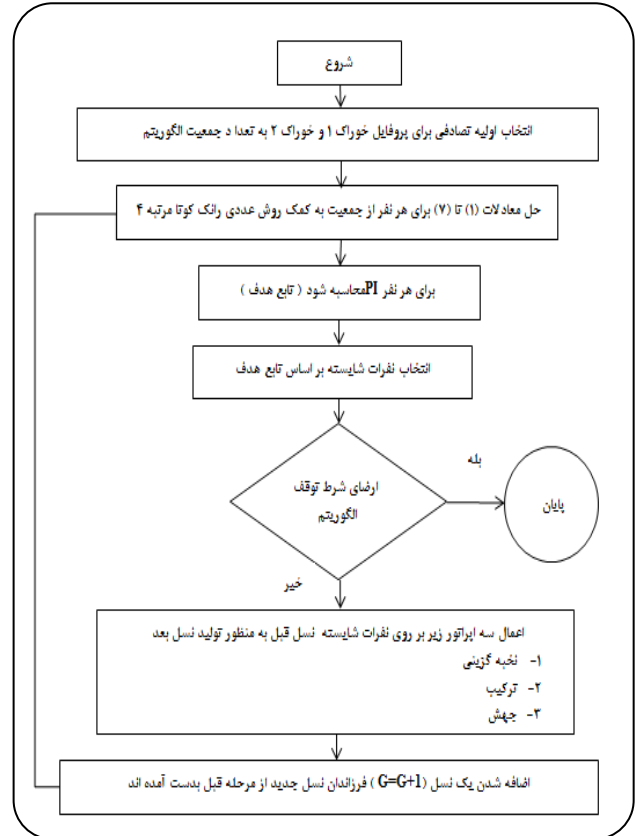
### روش حل عددی

از روش رانگ گوتای مرتبه چهارم اصلاح یافته (Ode45) به منظور حل دسته معادله‌های دیفرانسیل با شرایط اولیه مطابق شکل ۱ (شمای فلوچارت حل مسئله) استفاده شد.

زیرا به دلیل اینکه سلول های زنده درون راکتور زیستی خود را با شرایط محیط کشت وفق می دهند و هنوز وارد فاز رشد نشده اند. در روز دوم مقدار  $0.4/0$  لیتر گلوکز و مقدار  $0.48/0$  لیتر گلوتامین به راکتور زیستی تزریق می شود. در ادامه در روزهای بعد مطابق پروفیل خوراک سوپرسترا، گلوکز و گلوتامین به محیط کشت تزریق می شود.

همان گونه که نمودارهای فوق نشان می دهد نرخ خوراک ورودی برای حالت متغیر در مورد گلوکز و گلوتامین در روزهای فعالیت راکتور زیستی به صورت نوسانی و یا ضربانی می باشد در روز چهارم از فعالیت راکتور زیستی نرخ خوراک گلوکز بیشترین مقدار ( $0.2/0$  لیتر /روز) و در روز دوم خوراک گلوتامین بیشترین نرخ ( $0.48/0$  لیتر /روز) به راکتور زیستی تزریق شده است به عبارتی بیشترین ضریب رشد سلول هیبریدوما در این روزها متناسب با نوع خوراک ورودی به راکتور زیستی اتفاق می افتد اگر چه در ادامه تولید سلول بیشتر شده اما ضریب رشد سلولی کاهش می یابد و سوپرسترات کمتری برای ادامه حیات نیاز دارد. نمودار ۳ نرخ تغییرهای حجم محیط کشت برحسب زمان برای دو حالت شدت جریان ثابت و متغیر را نمایش می دهد. همان گونه که دیده می شود نمونه باحجم اولیه  $0.4/0$  لیتر می باشد که حجم نهایی محیط کشت برای حالت ثابت و متغیر پس از دوره ۱۰ روزه به ۲ لیتر می رسد. برای حالت شدت جریان ثابت نرخ خوراک  $F_1$  و  $F_2$  ثابت است بنابراین مطابق معادله (۷) نرخ افزایش حجم ثابت است و حجم کشت به صورت خطی افزایش می یابد. در روز اول، مطابق نمودار (۱ و ۲) خوراکی به محیط کشت تزریق نمی شود و نرخ خوراک  $F_1 = 0$  و  $F_2 = 0$  می باشد بنابراین  $\frac{dv}{dt} = 0$  و حجم نمونه تغییر نمی کند و مقدار آن در روز اول همان  $0.4/0$  لیتر باقی می ماند و در روز دوم به دلیل تزریق بیشتری گلوتامین به محیط کشت (  $0.48/0$  لیتر در روز) حجم نمونه با شیب زیادی افزایش می یابد. در نتیجه مطابق آن چه در نمودارهای تزریق خوراک بیان شد بیشترین ضریب رشد برای گلوتامین در روز دوم ( محیط کشت به عنوان نمادی از ضریب رشد سلول هیبریدوما مونوکلونال ) اتفاق می افتد که شیب خط مماس بر منحنی بهینه خوراک بیشترین مقدار خود را دارا می باشد و و در انتهای دوره بین روزهای نهم و دهم رفتار نرخ خوراک ثابت و متغیر بر هم منطبق می شود.

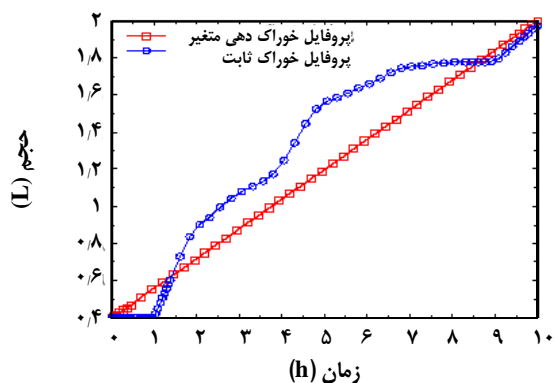
نمودار ۴ تغییر تعداد سلول های زنده در محیط کشت در واحد حجم در طول دوره کشت بر حسب زمان را نمایش می دهد.



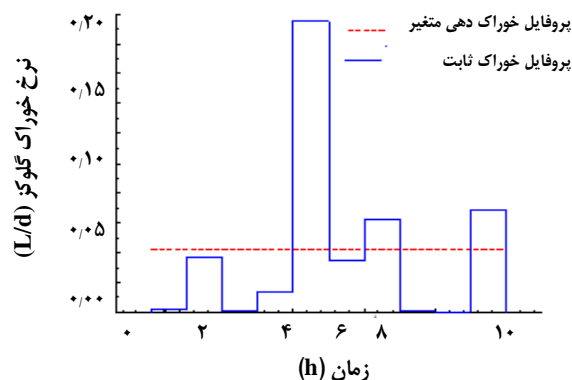
شکل ۱- فلوجارت بهینه سازی فرایند کشت نیمه پیوسته سلول هیبریدوما برای تولید مونوکلونال به کمک الگوریتم ژنتیک

## نتیجه ها و بحث

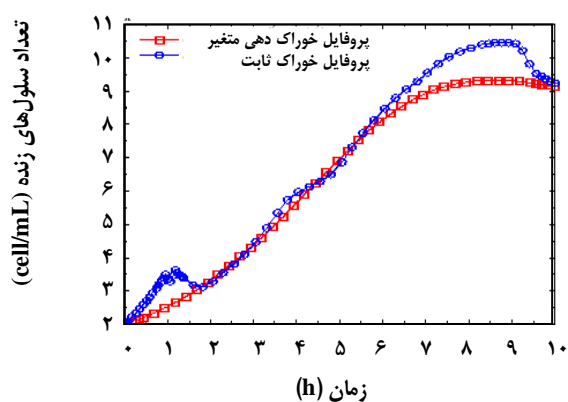
معادله های دیفرانسیل حاکم به روش رانگ کوتای مرتبه چهارم اصلاح یافته (Ode45) به کمک شرایط اولیه حل شده و به کمک الگوریتم ژنتیک پروفیل خوراک بهینه به دست آمد. افزون بر این برای مقایسه خوراک دهی ثابت و متغیر در طی دوره کشت ده روزه، نتیجه های بهینه سازی را برای دو حالت گوناگون بررسی شد. نمودار ۱ و ۲ پروفیل بهینه خوراک سوپرسترا به ترتیب برای گلوکز و گلوتامین در دو حالت ثابت و متغیر با استفاده از الگوریتم ژنتیک را نشان می دهد. داده های به دست آمده از نمودار نشان می دهند که در حالت ثابت مقدار بهینه گلوکز  $0.4/0$  لیتر در روز و مقدار بهینه گلوتامین  $0.12/0$  لیتر در روز در طول دوره کشت ده روزه است. برای حالت متغیر پروفیل خوراک گلوکز و گلوتامین در طی ده روز به صورت متغیر وارد محیط کشت می شود که این پروفیل نشان می دهد نرخ جریان گلوکز و گلوتامین در روز اول برابر صفر است و هیچ خوراکی وارد محیط کشت راکتور زیستی نمی شود



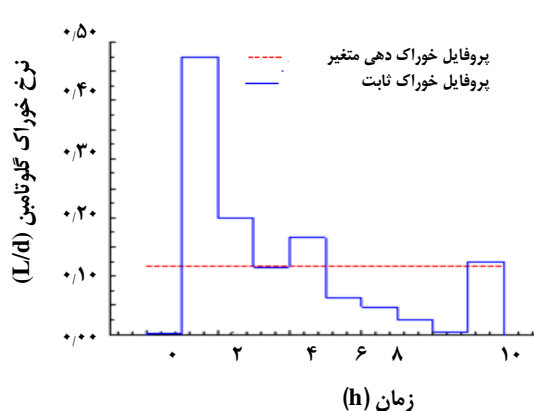
نمودار ۳- پروفیل حجم نمونه کشت در طول دوره کشت ۱۰ روزه برای حالت (۱) و (۲).



نمودار ۱- پروفیل خوراک روزانه گلوکز برای حالت شدت جریان خوراک ثابت و متغیر.



نمودار ۴- پروفیل تعداد سلول‌های زنده در واحد حجم در طول دوره کشت برای حالت (۱) و (۲)



نمودار ۲- پروفیل خوراک روزانه گلوکز برای حالت شدت جریان خوراک ثابت و متغیر

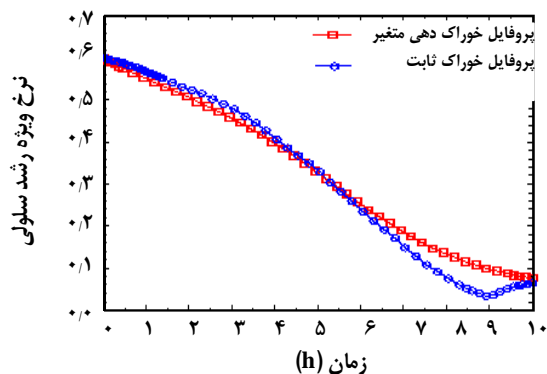
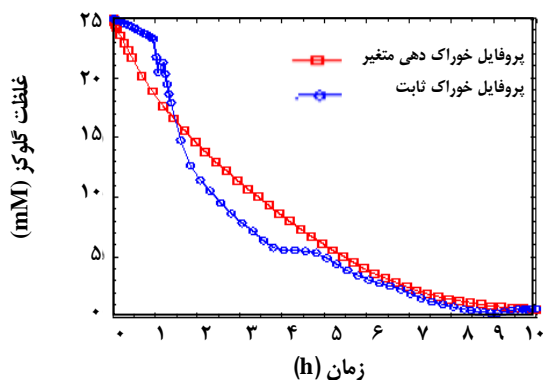
به دست آمده از نمودار ۵ نشان می‌دهد که ضریب رشد سلولی در روز دوم متناسب با افزایش مصرف سوسترات به بیشترین رشد رسیده سپس طول دوره روند رشد سلولی کاهش می‌یابد و در پایان دوره ضریب رشد سلولی برای هر دو حالت نرخ خوراک ثابت و متغیر به کمترین مقدار خود تنزل می‌یابند. نمودار (۶) نرخ مرگ سلولی با گذشت زمان را نمایش می‌دهد که روندی در جهت مخالف ضریب رشد سلولی می‌باشد که روندی به تقریب صعودی (به جز در اواخر دوره) که مرگ سلولی شدت بیشتری به عنوان پیک مرگ سلولی در جریان نرخ خوراک متغیر را نشان می‌دهد به عبارتی در حالت نرخ متغیر خوراک سوسترات به عنوان یک عامل بازدارنده رشد سلولی عمل می‌نماید و مرگ سلولی را سرعت بیشتری می‌بخشد و  $k_d$  به غلظت خوراک سوسترات در هر لحظه وابسته است.

همان‌گونه که دیده می‌شود تعداد سلول‌های زنده در فاصله زمانی روز ششم تا نهم برای حالت متغیر نسبت به حالت ثابت بیش‌تر است. مطابق معادله زیر نرخ افزایش تعداد سلول‌های زنده به پارامترهای  $\mu$ ،  $k_d$ ،  $X_v$  و میزان شدت جریان خوراک سوسترات یعنی  $F_1$  و  $F_2$  وابسته است

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - k_d) X_v - \frac{(F_1 + F_2)}{V} X_v \quad ( )$$

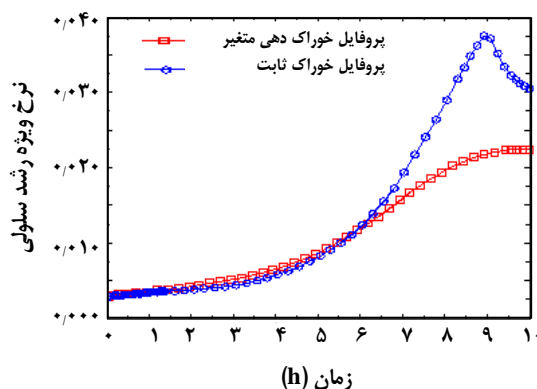
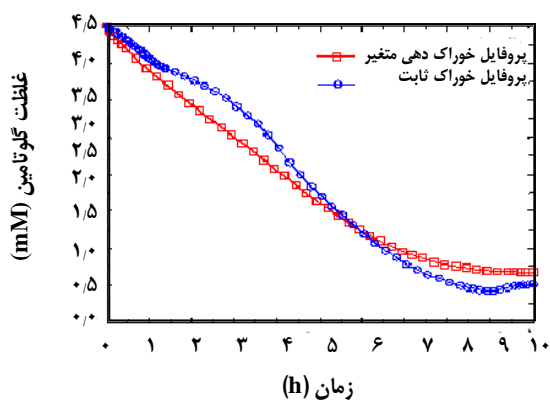
مطابق معادله بالا با افزایش  $X_v$  نرخ رشد آن کاهش می‌یابد و  $\mu$  ارتباط مستقیم با تولید سلول زنده و  $k_d$  ارتباط مستقیم با مرگ سلول دارد که سبب کاهش تعداد سلول در واحد حجم می‌شود.

نمودارهای ۵ و ۶ به ترتیب تغییرهای نرخ رشد ویژه سلولی ( $\mu$ ) و نرخ مرگ سلول‌های زنده ( $k_d$ ) را نمایش می‌دهد. داده‌های



نمودار ۷- پروفیل غلظت گلوکز بر حسب زمان در طول دوره کشت برای حالت ثابت و متغیر از نرخ خوراک.

نمودار ۵- پروفیل نرخ رشد ویژه سلول های زنده در واحد حجم در طول دوره کشت برای حالت ثابت و متغیر از نرخ خوراک.



نمودار ۸- پروفیل غلظت گلوتامین بر حسب زمان در طول دوره کشت برای حالت ثابت و متغیر از نرخ خوراک.

نمودار ۶- پروفیل نرخ مرگ ویژه سلول های زنده در واحد حجم در طول دوره کشت برای حالت ثابت و متغیر از نرخ خوراک.

دارا می باشد هم‌زمان با رشد سلول و افزایش ضریب رشد سلولی در دامنه ۲ تا ۴ روز مصرف گلوکز بیش تر و شیب خط مماس بر منحنی در حالت نرخ متغیر از خوراک بیش ترین می باشد و در ادامه این شیب کاهش و منطبق بر حالت نرخ ثابت از خوراک می شود که در پایان روز دهم همه گلوکز تزریق شده در محیط کشت توسط سلول به مصرف رسیده است

نمودار ۸ که غلظت گلوتامین در طول دوره ده روز فعالیت را کتور زیستی را نشان می دهد مانند نمودار (۷) (تغییرهای غلظت گلوکز- زمان) یک روند نزولی را نمایش می دهد. در این حالت بیش ترین نرخ مصرف گلوتامین در روز دوم از فعالیت سلول هیبریدوما اتفاق می افتد که شیب خط مماس بر منحنی تغییرهای غلظت بیش ترین مقدار را دارا می باشد و در ادامه با افزایش تعداد سلول ها مصرف گلوتامین افزایش می یابد در نتیجه غلظت گلوتامین در طول فعالیت

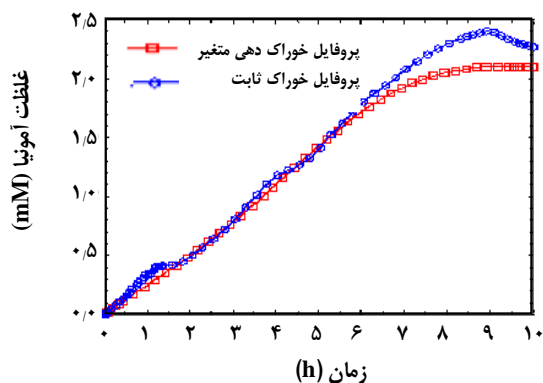
نمودارهای ۷ و ۸ به ترتیب تغییرهای غلظت گلوکز و گلوتامین در محیط کشت بر حسب زمان را نشان می دهند. مطابق شکل روند کاهش در غلظت این دو ماده در طول دوره کشت دیده می شود که با مصرف آنها تعداد سلول های زنده در محیط کشت افزایش می یابد. مطابق دو معادله زیر (پیش تر گفته شده است) غلظت این دو ماده به دلیل افزایش،  $X_v$  تعداد سلول های زنده در واحد حجم به مرور زمان کاهش می یابد.

$$\frac{dG_{lc}}{dt} = \frac{F_1}{V} G_{lc_{in}} - \frac{(F_1 + F_2)}{V} G_{lc} - q_{G_{lc}} X_v$$

$$\frac{dG_{ln}}{dt} = \frac{F_2}{V} G_{ln_{in}} - \frac{(F_1 + F_2)}{V} G_{ln} - q_{G_{ln}} X_v$$

همان گونه که نمودار ۷ نشان می دهد غلظت گلوکز در آغاز رشد سلول هیبریدوما بیش ترین مقدار خود را یعنی غلظت اولیه را





نمودار ۱۰ - پروفیل غلظت آمونیا بر حسب زمان در طول دوره کشت برای حالت (۱) و (۲).

ثابت و متغیر از نرخ خوراک به ترتیب ۱۲۰ و ۱۶۰ میلی مولار می‌باشد. علت آن افزایش سریع  $X_v$  در محیط کشت در روزهای شش تا نهم می‌باشد. در واقع افزایش تند تعداد سلول‌های زنده کمک شایانی به افزایش تولید فراورده (مونوکلونال آنتی‌بادی) می‌کند.

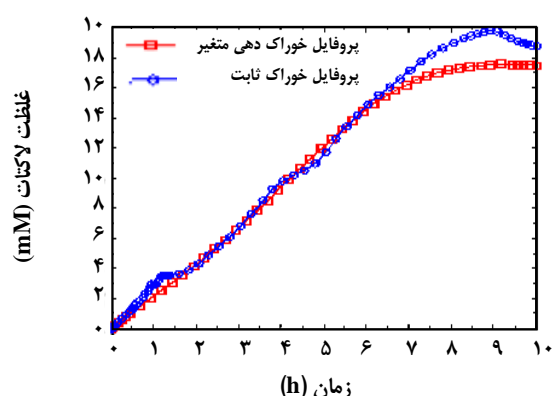
$$\frac{dM_{Ab}}{dt} = q_{M_{Ab}} X_v - \frac{(F_1 + F_2)}{V} M_{Ab}$$

بررسی داده‌های به دست آمده از نمودارهای فوق می‌توان نتیجه گرفت که تزریق نسبتاً زیاد خوراک (گلوتامین) در روز پنجم و سپس کاهش سریع خوراک ورودی در روزهای ششم، هفتم و هشتم سبب افزایش تولید تعداد سلول‌های زنده در بازه زمانی روز ششم تا نهم می‌شود. که این خود سبب یک خیزش نسبتاً بزرگ در تولید مونوکلونال آنتی‌بادی از روز ششم به بعد می‌شود.

### اعتبار سنجی نتیجه‌ها

به منظور اعتبار سنجی، نتیجه‌های شبیه سازی با نتیجه‌های به دست آمده از کار بهینه سازی ترمیلی و همکاران [۳۵] میگوئل و همکاران [۳۶] مقایسه شد. ترمیلی و همکاران به کمک برنامه نویسی دینامیک<sup>(۱)</sup> میزان مونوکلونال آنتی‌بادی تولیدی بهینه را ۳۱۸/۸ میلی‌گرم به دست آوردند و در کار حاضر مقدار بهینه به دست آمده برای مونوکلونال آنتی‌بادی در حدود ۳۱۴/۳ میلی‌گرم است که تطابق خوبی با نتیجه‌های کار ترمیلی و همکاران داشته و مطابق جدول ۴، ۱/۴ درصد می‌باشد. همچنین نتیجه‌ها نشان داد میزان اختلاف با پژوهش میگوئل و همکاران به کمک الگوریتم ازدحام

(۱) Dynamic programming (DP)



نمودار ۹ - پروفیل غلظت لاکتات بر حسب زمان در طول دوره کشت برای حالت ثابت و متغیر از نرخ خوراک.

ده روزه کاهش یافته و در پایان روز دهم کمینه می‌شود. افزون بر این نمودار نشان می‌دهد که در حالت نرخ متغیر غلظت باقی‌مانده گلوتامین در انتهای روز دهم کم‌تر از حالت نرخ ثابت می‌باشد. در نمودارهای ۹ و ۱۰ به ترتیب تغییرهای غلظت دو بازدارنده محیط کشت یعنی لاکتات و آمونیاک در طول دوره کشت برحسب زمان برای هر دو حالت نرخ ثابت و متغیر از خوراک ترسیم شده است داده‌های به دست آمده از نمودار نشان می‌دهد که غلظت باز دارنده‌ها در محیط کشت به مرور زمان افزایش می‌یابد. مطابق معادله‌های زیر می‌توان علت را به افزایش تعداد سلول‌های زنده در محیط کشت نسبت داد که سبب افزایش تولید این دو بازدارنده می‌شود. میزان غلظت لاکتات و آمونیاک در پایان دوره کشت (روز دهم) برای حالت نرخ متغیر از خوراک اندکی بیشتر از حالت نرخ ثابت از خوراک می‌باشد که این عامل می‌تواند به افزایش سریع  $X_v$  در روزهای ششم هفتم و نهم نسبت داد.

$$\frac{dLac}{dt} = q_{Lac} X_v - \frac{(F_1 + F_2)}{V} Lac$$

$$\frac{dAmm}{dt} = q_{Amm} X_v - \frac{(F_1 + F_2)}{V} Amm$$

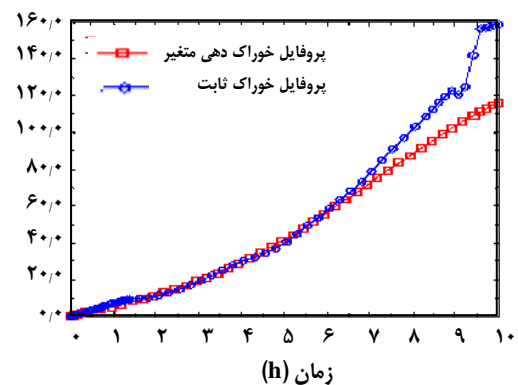
غلظت مونوکلونال آنتی‌بادی (فراورده‌ی نهایی) در محیط کشت برحسب زمان در نمودار (۱۱) نمایش داده شده است. همان‌گونه که دیده می‌شود از روز ششم به بعد میزان تولید فراورده، برای خوراک با حالت تغییر نسبت به حالت ثابت افزایش یافته است و این افزایش غلظت فراورده در روز آخر به حداکثر خود می‌رسد. به عبارت دیگر غلظت مونوکلونال آنتی‌بادی در روز دهم برای هر دو حالت



جدول ۴. جدول اعتبار سنجی بهینه سازی انجام شده (مقایسه با بهینه سازی ترمبلی و همکاران)

مقدار	واحد	بیشترین میزان مونو کونال آنتی بادی تولیدی
۳۱۸/۸	میلی گرم	ترومبلی و همکاران محاسبه شده به کمک DP
۳۱۴/۴	میلی گرم	کار حاضر محاسبه شده به کمک الگوریتم ژنتیک
۱/۴	%	میزان اختلاف بر حسب درصد
۳۶۲/۴۵	میلی گرم	میگوئل و همکاران محاسبه شده به روش FIPS
۳۱۴/۴	میلی گرم	کار حاضر محاسبه شده به کمک الگوریتم ژنتیک
۱۳/۲	%	میزان اختلاف بر حسب درصد

یک مدل ریاضی با ضریب بازدهی متغیر پیش‌بینی و سپس معادله‌های دیفرانسیل به کمک روش عددی رانگ گوتا مرتبه ۴ اصلاح یافته (Ode4) حل شد و با استفاده از الگوریتم ژنتیک، نرخ بهینه‌ی سوبسترات تعیین شد که نتیجه‌های بهینه‌سازی افزایش ۳۴ درصدی نسبت به حالت نرخ خوراک ثابت روزانه را نشان می‌دهد (میزان مونوکلونال آنتی بادی تولیدی با نرخ ثابت سوبسترات در طی ده روز ۲۳۳ میلی گرم و نرخ سوبسترات متغیر ۳۱۴ میلی گرم به دست آمد). افزون بر این نتیجه‌ها نشان داد برای دست یابی به بیشترین تولید فراورده می بایست راکتور در روز اول در حالت ناپیوسته نگه داشته شود یعنی نرخ خوراک گلوتامین در روز اول صفر و در روز دوم خوراک دهی گلوتامین با بیشترین نرخ خود (حدود ۰/۵ لیتر در روز) انجام گیرد سپس در روزهای دوم و سوم به ترتیب با نرخ ۰/۲ و ۰/۱۱ لیتر در روز تغذیه شود. شدت جریان بهینه خوراک گلوکز در روز اول تا چهارم ناچیز (به تقریب صفر) و در روز پنجم با نرخ ۰/۲ لیتر در روز خوراک دهی شود. از تحلیل نتیجه‌های به دست آمده از نمودارهای به دست آمده می توان نتیجه گرفت که تزریق به نسبت زیاد خوراک گلوتامین در روز پنجم و سپس کاهش سریع خوراک ورودی در روزهای ششم، هفتم و هشتم سبب افزایش تولید تعداد سلول‌های زنده در بازه زمانی روز ششم تا نهم می‌شود که این عامل یک خیزش به نسبت بزرگ در تولید مونوکلونال آنتی بادی از روز ششم به بعد می‌شود. نتیجه‌های به دست آمده از بهینه سازی فرایند نشان می‌دهد که میزان مونوکلونال آنتی بادی تولیدی بهینه به عنوان فراورده‌ی نهایی ۳۱۸/۸ میلی‌گرم به دست می‌آید و مقایسه آن با نتیجه‌های کار ترمبلی و همکاران اختلاف ۱/۴٪ را نشان می‌دهد.



نمودار ۱۱- پروفیل فراورده‌ی تولیدی مونوکلونال آنتی بادی در طول ۱۰ روز کشت برحسب میلی مولار.

ذره‌ها به‌طور کامل آگاه<sup>(۱)</sup>، شاخص کارایی (PI) مورد بهینه سازی قرار گرفت در حدود ۱۳/۲٪ می باشد.

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش، بهینه‌سازی فرایند کشت نیمه پیوسته سلول‌های هیبریدوما برای تولید بیشترین مونوکلونال آنتی‌بادی به کمک الگوریتم ژنتیک انجام گرفت. نرخ خوراک سوبسترا، به عنوان متغیر کلیدی در فرایند بهینه‌سازی به صورت روزانه از مهم‌ترین پارامترهای اثر گذار در تولید این ماده‌ی ارزشمند (مونوکلونال آنتی بادی) می‌باشد. در این پژوهش از مدل سینتیکی هفت مرحله‌ای به منظور مدل سازی فرایند کشت نیمه پیوسته هیبریدوما استفاده شد. در این مدل غلظت‌های گلوکز و گلوتامین برای توصیف عبارت نرخ رشد ویژه و نرخ مرگ سلول‌ها تابع غلظت لاکتات، آمونیاک و گلوتامین است. نرخ تولید ویژه مونوکلونال آنتی‌بادی توسط

(۱) Fully Informed Particle Swarm (FIPS)

				نمادها
$Y_{xv/glc}$	$1.09 \times 10^8$	cells/mmol		
$m_{glc}$	$0.17 \times 10^{-8}$	mmol.cells./day		
$K_{glc}$		1.0 mM	$\beta$	$0.35 \times 10^{-8}$ mg.cells/day
$\alpha_0$	$2.57 \times 10^{-8}$	mg.cells/day	$k_{d \text{ amm}}$	0.06 1/day.mM
$k_{m \text{ glc}}$		19.0 mM	$Y_{lac/glc}$	1.8 mmol/mmol
$K_{gln}$		0.3 mM	$k_{d \text{ max}}$	0.69 1/day
$K_{\mu}$		0.02 1/day	$Y_{xv/gln}$	$3.8 \times 10^8$ cells/mmol
			$k_{d \text{ lac}}$	0.01 1/day. Mm
			$k_{d \text{ gln}}$	0.02 mM
			$Y_{amm/gln}$	0.85 mmol/mmol
			$\mu_{max}$	1.09 1/day

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۳

## مراجع

- [1] Rodrigues M.E., Costa A.R., Henriques M., Azeredo J., Oliveira R., [Technological Progresses in Monoclonal Antibody Production Systems](#), *Biotechnology Progress*, **26(2)**: 332-351 (2010).
- [2] Li F., Zhou J.X., Yang X., Tressel T., Lee B., [Current Therapeutic Antibody Production and Process Optimization](#), *Bioprocess J.*, **4**: 1-8 (2005).
- [3] Yoon S.K., Hong J.K., Choo S.H., Song J.Y., Park H.W., Lee G.M., [Adaptation of Chinese Hamster Ovary Cells to Low Culture Temperature: Cell Growth and Recombinant Protein Production](#), *J. Biotechnology*, **122**: 463-472 (2006).
- [4] Chen L., Nguang S.K., Chen X.D., Li X.M., [Modelling and Optimization of Fed-Batch Fermentation Processes Using Dynamic Neural Networks and Genetic Algorithms](#), *Biochemical Engineering Journal*, **22(1)**: 51-61 (2004).
- [5] Levišauskas, D., Tekorius T., [Model-Based Optimization of Fed-Batch Fermentation Processes Using Predetermined Type Feed-Rate Time Profiles. A Comparative Study](#), *Information Technology and Control*, **34(3)**: 231-236 (2005).
- [6] Liu C., Gong Z., Shen B., Feng E., [Modelling and Optimal Control for a Fed-Batch Fermentation Process](#), *Applied Mathematical Modelling*, **37 (3)**: 695-706 (2013).
- [7] Peng W., Zhong J., Yang J., Ren Y., Xu T., Xiao S., Tan H., [The Artificial Neural Network Approach Based on Uniform Design to Optimize the Fed-Batch Fermentation Condition: Application to the Production of Iturin A](#). *Microbial Cell Factories*, **13(1)**: 54 (2014).
- [8] Roubos J.A., van Straten G., van Boxtel A.J.B., [An Evolutionary Strategy for Fed-Batch Bioreactor Optimization; Concepts and Performance](#), *Journal of Biotechnology*, **67 (2-3)**: 173-187 (1999).
- [9] Kookos I. K., [Optimization of Batch and Fed-Batch Bioreactors Using Simulated Annealing](#), *Biotechnology Progress*, **20(4)**: 1285-1288 (2004).
- [10] Jayaraman V.K., Kulkarni B.D., Gupta K., Rajesh J., Kusumaker H.S., [Dynamic Optimization of Fed-Batch Bioreactors Using the Ant Algorithm](#), *Biotechnology Progress*, **17(1)**: 81-88 (2001).
- [11] Chiou J.-P., Wang F.-S., [Hybrid Method of Evolutionary Algorithms for Static and Dynamic Optimization Problems with Application to a Fed-Batch Fermentation Process](#), *Computers & Chemical Engineering*, **23(9)**: 1277-1291 (1999).

- [12] Wang F.-S., Cheng W.-M., [Simultaneous Optimization of Feeding Rate and Operation Parameters for Fed-Batch Fermentation Processes](#), *Biotechnology Progress*, **15** (5): 949–952 (1999).
- [13] Sarkar D., Modak J.M., [Optimization of Fed-Batch Bioreactors Using Genetic Algorithm: Multiple Control Variables](#), *Computers & Chemical Engineering*, **28**(5): 789–798 (2004).
- [14] Banga J. R., Moles C.G., Alonso A.A., [Global Optimization of Bioprocesses Using Stochastic and Hybrid Methods](#). In Floudas C. A., Pardalos P. (Eds.), "Frontiers in Global Optimization" (pp. 45–70). Boston, MA: Springer US (2004).
- [15] Da Ros S., Colusso G., Weschenfelder T.A., de Marsillac Terra L., de Castilhos F., Corazza M.L., [A comparison Among Stochastic Optimization Algorithms for Parameter Estimation of Biochemical Kinetic Models](#), *Applied Soft Computing*, **13**(5): 2205–2214 (2013).
- [16] Rocha M., Mendes R., Rocha O., Rocha I., Ferreira E.C., [Optimization of Fed-Batch Fermentation Processes with Bio-Inspired Algorithms](#), *Expert Systems with Applications*, **41**(5): 2186–2195 (2014).
- [17] Kennedy J., Eberhart R., "Particle Swarm Optimization". In *IEEE International Conference on Neural Networks*, pp. 1942–1948 (1995).
- [18] Basturk B., Karaboga D, An Artificial Bee Colony (ABC) Algorithm for Numeric Function Optimization, In *Proceedings of the IEEE Swarm Intelligence Sym-Posium*, pp. 687–697. IEEE (2006).
- [19] Yang, X. S., Suash, D. "Cuckoo Search via Levy Flights. In World Congress on Nature & Biologically Inspired Computing", In *NaBIC 2009* , pp. 210–214, (2009).
- [20] Yang X. S. "Nature-Inspired Metaheuristic Algorithms". Luniver Press, Beckington, UK: (2010).
- [21] Uymaz S. A., Tezel G., Yel E. [Artificial Algae Algorithm \(AAA\) for Nonlinear Global Optimization](#). *Applied Soft Computing*, **31**, 153–171 (2015).
- [22] Sörensen, K., [Metaheuristics-the Metaphor Exposed](#). *International Transactions in Operational Research*, **22** (1), 3–18 (2015).
- [23] Burke E. K., Kendall G. "Search Methodologies - Introductory Tutorials in Optimization and Decision Support Techniques" (2nd ed.). Springer, New York, US. (2014).
- [24] Civicioglu P. [Backtracking Search Optimization Algorithm for Numerical Optimization Problems](#). *Applied Mathematics and Computation*, **219** (15): 8121–8144(2013).
- [25] Guney K., Durmus A., Basbug S. [Backtracking Search Optimization Algorithm for Synthesis of Concentric Circular Antenna Arrays](#). *International Journal of Antennas and Propagation*, Article ID 250841, 11 Pages (2014).
- [26] El-Fergany A. [Optimal Allocation of Multi-Type Distributed Generators Using Backtracking search optimization Algorithm](#). *International Journal of Electrical Power & Energy Systems*, **64**: 1197–1205 (2015).

- [27] Das S., Mandal D., Kar R., Ghoshal S. P., "Interference Suppression of Linear Antenna Arrays with Combined Backtracking Search Algorithm and Differential Evolution". In *International Conference on Communications and Signal Processing (ICCSP)* (pp. 162–166) (2014).
- [28] Askarzadeh A., Coelho L.D.S., A Backtracking Search Algorithm Combined with Burger's Chaotic Map for Parameter Estimation of PEMFC Electrochemical Model. *International Journal of Hydrogen Energy*, **39** (21): 11165–11174 (2014).
- [29] Song X., Zhang X., Zhao S., Li L. Backtracking Search Algorithm for Effective and Efficient Surface Wave Analysis. *Journal of Applied Geophysics*, **114**: 19–31(2015).
- [۳۰] رضا کاظمی، ماشاالله؛ راجی، مصطفی، کاربرد الگوریتم ژنتیک در بهینه سازی فرایندهای مرتبط با مهندسی شیمی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲) ۳۸ : ۲۲۸ تا ۲۴۴ (۱۳۹۸).
- [۳۱] پوربشیر، اسلام؛ مهاجری اول، ژایلا؛ نکوئی، مهدی؛ حمیدوند، سمیه ، مطالعه ارتباط کمی ساختار - فعالیت برای پیش بینی فعالیت PIM مشتق‌های تری آزولوپیریدین با اسفاده از الگوریتم ژنتیک - برآزش خطی چندگانه، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲) ۳۷ : ۱۳۷ تا ۱۴۸ (۱۳۹۷).
- [32] Patel N., Padhiyar N. Multi-Objective Dynamic Optimization Study of Fed-Batch Bio-Reactor. *Chemical Engineering Research and Design*, 119, 160-170 (2017).
- [33] Bin Mohd Zain, M. Z., Kanesan, J., Kendall, G., Chuah, J. H. Optimization of Fed-Batch Fermentation Processes Using the Backtracking Search Algorithm. *Expert Systems with Applications*, **91**: 286-297(2018).
- [34] Miriyala S. S., Mitra K., "Multi-Objective Optimal Control of Biochemical Processes Using Genetic Algorithms Through ANN Assisted Reformulation". *Control Conference (ICC)*. (pp. 143-148). IEEE (2018). [Indian]
- [35] De Tremblay M., Perrier M., Chavarie C., Archambault J., Optimization of Fed-Batch Culture of Hybridoma Cells Using Dynamic Programming: Single and Multi-Feed Cases, *Bioprocess Engineering*, **7**(5): 229-234 (1992).
- [36] Rocha M., Mendes R., Rocha O., Rocha I., Ferreira E.C. "Optimization of Fed-Batch Fermentation Processes with Bio-Inspired Algorithms", *Expert Systems with Applications* **41**(5): 2186-2195 (2014).