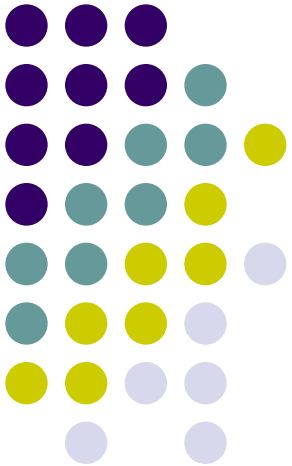
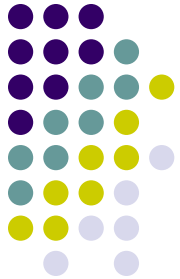
ОПТИМИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТАЦИОННЫХ СРЕД

ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ



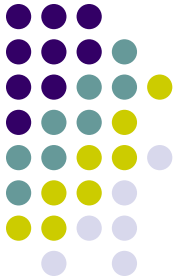
существуют среды, используемые при решении разных задач:



- генетических исследований, при обработке штаммов мутагенами;
- селекции мутантов — полноценные и селективные среды;
- длительного хранения и пересевов штаммов микроорганизмов;
- оптимизации продуктивности штамма в колбах;
- для инокулята и посевного материала (в том числе вегетативного и спорового);
- оптимизации продуктивности в ферментерах производственного масштаба.

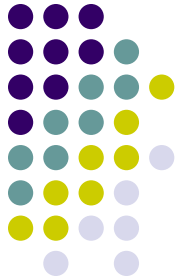
Выбор критерия оптимизации

(применительно к средам в колбах)



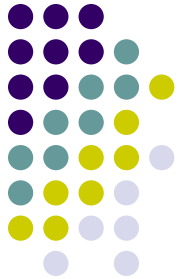
- количество целевого продукта;
- производительность по целевому продукту;
- выход целевого продукта по субстрату;
- минимизация стоимости среды для получения единицы целевого продукта.

Выбор исходных компонентов среды



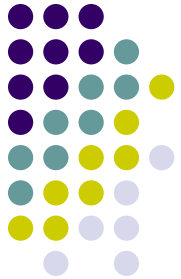
- При подборе сред в первую очередь следует обратить внимание на химический состав биомассы микроорганизмов и на химический состав внеклеточного продукта, если он является целевым.
- Основные компоненты среды — источники углерода (и одновременно энергии), азота, фосфора, серы, микроэлементов, ростовых факторов и витаминов для начала роста биомассы.

Определение соотношения компонентов среды



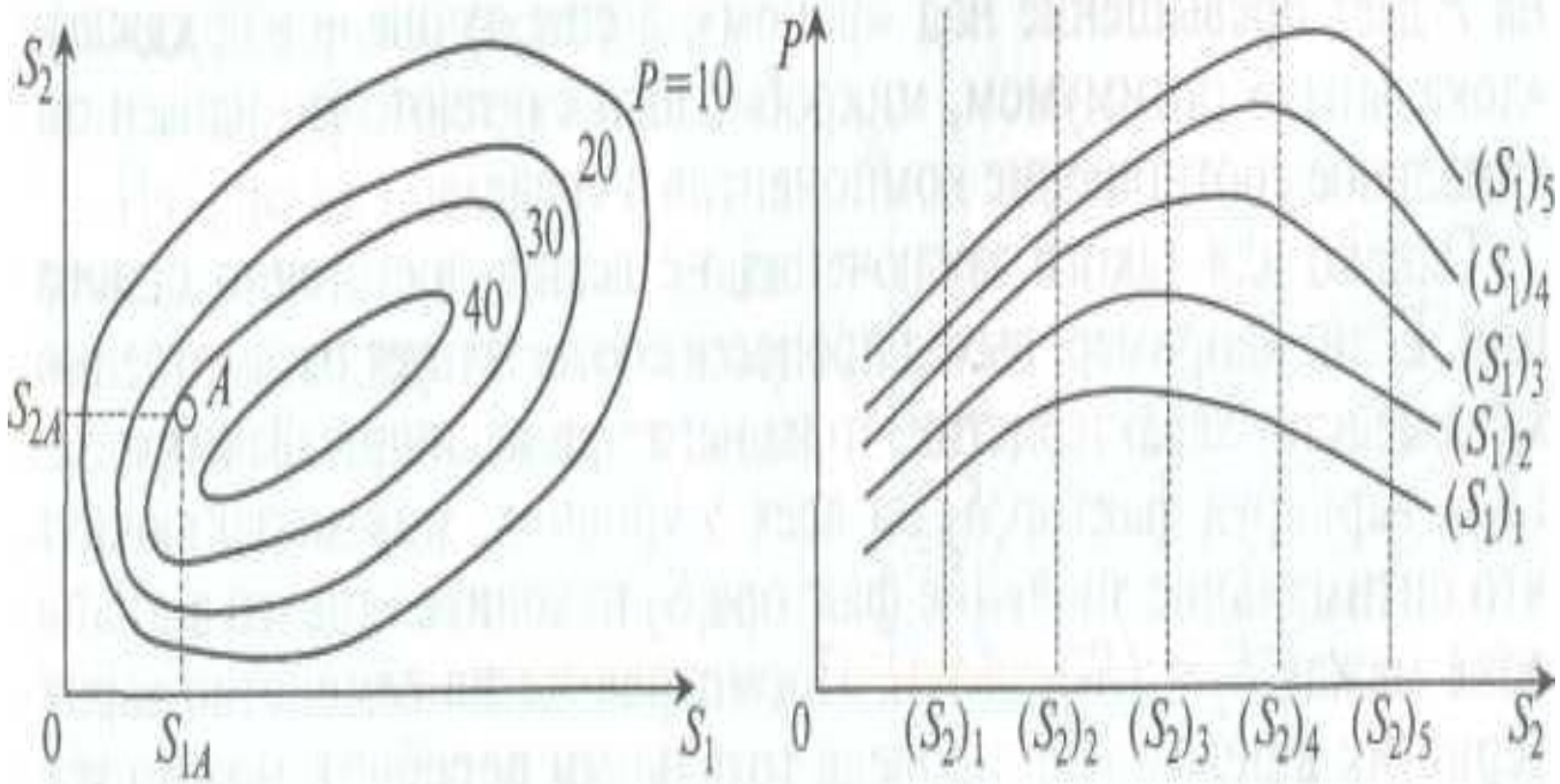
- . Рецептуры сред для промышленных штаммов охраняются как большой секрет, и многие микробиологи занимаются их подбором.
- Когда в составе среды только один компонент не изучен и необходимо определить его оптимальную концентрацию, достаточно провести серию опытов, в которых исследуемый компонент будет находиться в разных концентрациях.
- Проведения опытов с 4—5 разными концентрациями (уровнями) компонента достаточно, чтобы получить представление о характере его влияния.

ТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МНОГОФАКТОРНЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ

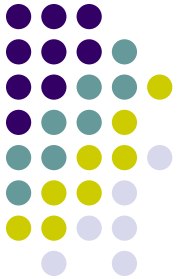


- Необходимо построить *поверхность отклика,* напоминающую топографическую карту. На этой карте на двух осях координат отложена величина факторов *S*1 и S2, а в самом графике проведены контурные *линии равного уровня,* соответствующие одинаковому выходу *P* — параметру оптимизации.

для построения «топографической карты» нужно «изрешетить» всю площадь в изучаемом диапазоне *S1* и *S2* опытами.

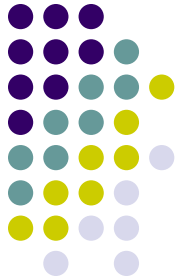


Отдельное изучение каждого фактора.



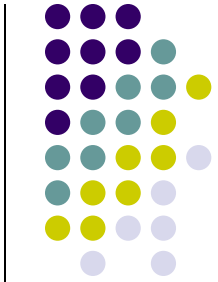
- при подборе сред микробиологи применяют исходный «фон» — определенное соотношение уровней факторов (концентраций компонентов) в среде. На этом «фоне» ставят однофакторные эксперименты по каждому из n факторов и получают столько же кривых, сколько изучают факторов.

Метод Гаусса — Зайделя



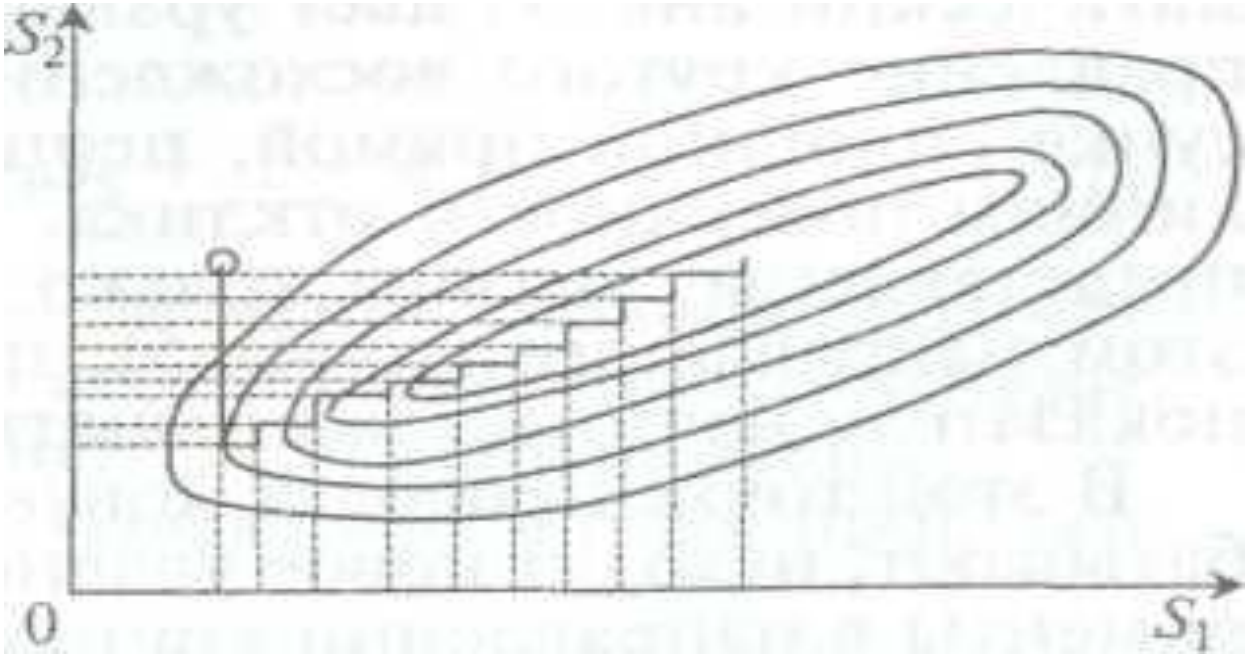
- этот метод называют «последовательным изучением каждого фактора». Здесь частные зависимости *P (S1), P (S2), P (Sn)* находят не сразу на одном и том же «фоне», а по очереди. Сначала определяют *P (Si),* анализируют эту зависимость, находят частный оптимум для фактора *Si,* затем меняют «фон», установив в нем значение *Si,* равное этому частному оптимуму.

Недостатки метода:

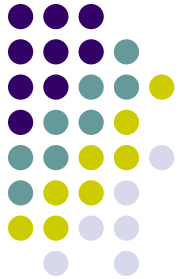


- метод Гаусса — Зайделя следует повторять пока частные оптимумы по отдельным факторам не перестанут изменяться от одной серии опытов к другой.
- метод имеет и еще один недостаток по сравнению с предыдущими: необходимо *поочередное* выполнение серий экспериментов, так как изменение «фона» требует анализа результатов каждой серии.

Процедура оптимизации по методу Гаусса-Зайделя

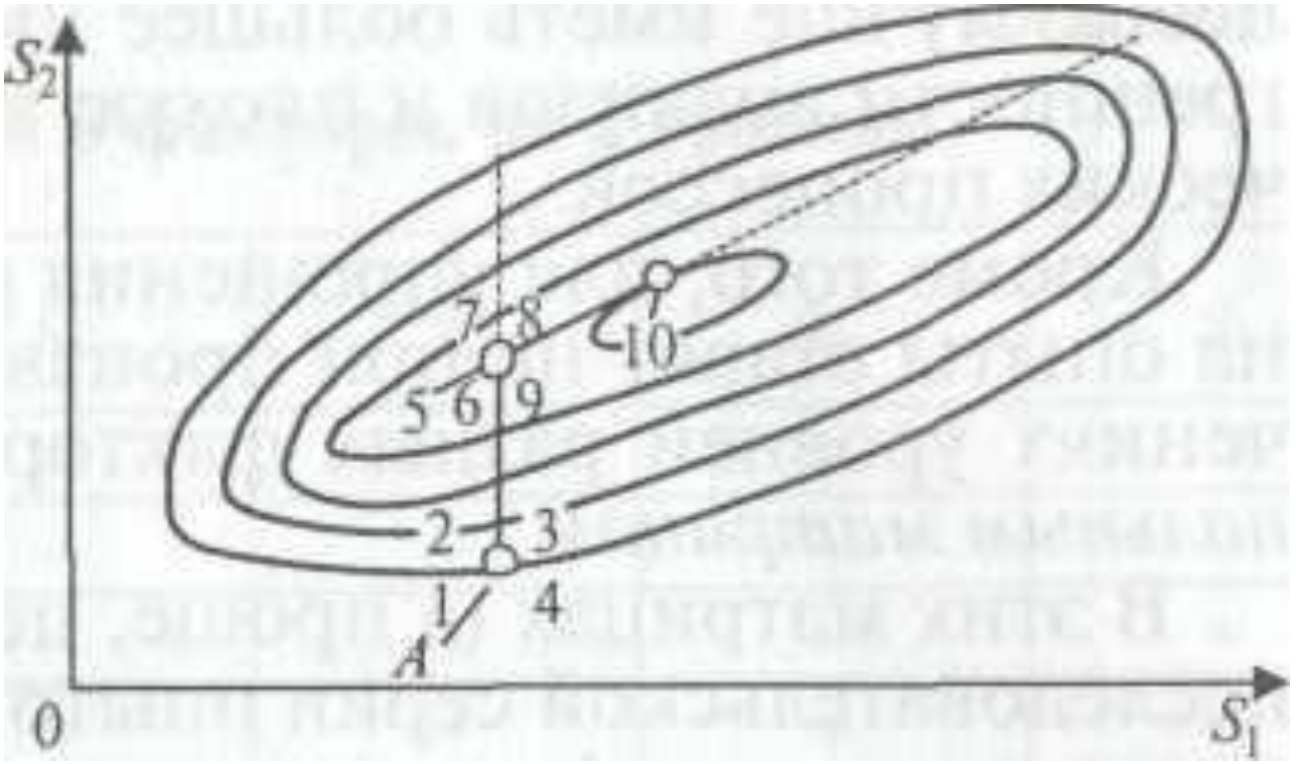


МЕТОД БОКСА — УИЛСОНА

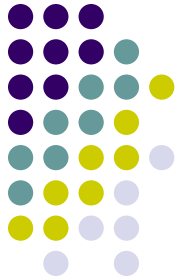


- По этому методу вблизи исходной точки («фона») ставится специальным образом спланированная небольшая серия опытов, в которой одновременно варьируются *все* изучаемые факторы, каждый на 2 уровнях (верхнем и нижнем).
- Результаты этих опытов *математически обрабатывают* для получения приближенного математического описания процесса в этой локальной области. Для двух уровней варьирования факторов находят линейное уравнение (*уравнением регрессии)*, величина факторов входит в первой степени.

Процедура оптимизации по методу Бокса-Уилсона



Исследовательская серия опытов



- сначала ставится небольшая серия опытов на двух уровнях — верхнем и нижнем. Для каждого фактора эти уровни отличаются от *основного уровня* (исходного уровня «фона») на одну и ту же величину.
- Эта величина называется *интервалом варьирования* и обозначается *X.* Для разных факторов величина λ. может быть разной.

Для чего ставится исследовательская серия опытов?
Чтобы получить линейное уравнение, связывающее выходной параметр оптимизации *P* с влияющими факторами:

$$P = b_0 + b_1 S_1 + b_2 S_2 + b_3 S_3 + \ldots + b_n S_n.$$

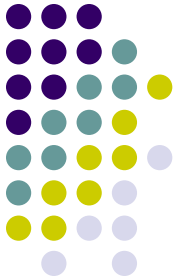
- для упрощения расчетов по методу Бокса—Уилсона опыты ставят не при произвольным образом измененных значениях уровней разных факторов, а по так называемым *ортогональным матрицам*
- В этих матрицах (перечне вариантов, взятых в данной исследовательской серии опытов) из всех возможных 2^n вариантов опытов, когда n факторов варьируется на 2 уровнях, выбирают небольшое количество вариантов со следующими свойствами

Свойства матрицы:

- 1. в каждой серии количество вариантов опытов с верхним уровнем *каждого фактора* равно количеству вариантов с нижним уровнем того же фактора;
- 2. верхний уровень *любого фактора* сочетается одинаковое число раз и с верхними, и с нижними уровнями *всех остальных факторов,* он как бы проверяется на усредненном фоне, в котором влияние уровней остальных факторов нивелируется. Это же положение справедливо и для нижних уровней.

- Планы ортогональных матриц разработаны для различного числа факторов n и могут включать разное число вариантов планирования. Практически в исследовательских сериях стараются уменьшить число вариантов опытов. Для этого целесообразно выбрать ближайшую матрицу с числом вариантов большим, чем (n + 2).

Планы экспериментов имеются в различных справочниках и руководствах.



Матрица планирования для 2 факторов на 2 уровнях

№ варианта	S_1	S_2
1	–	–
2	+	–
3	–	+
4	+	+

Матрица планирования для 6 факторов на 2 уровнях состоящая из 8 экспериментов, может быть использована также для 3 факторов (это — полный факторный эксперимент), для 4 и для 5 факторов (вычеркивая за ненадобностью 1, 2 или 3 столбца

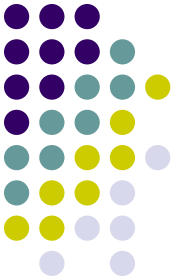
из этой матрицы).

Матрица планирования для 6 факторов на 2 уровнях

№ вариантов	S_1	S_2	S_3	S_4	S_5	S_6
1	–	–	–	–	–	–
2	+	–	–	+	+	–
3	–	+	–	+	–	+
4	+	+	–	–	+	+
5	–	–	+	+	+	+
6	+	–	+	–	–	+
7	–	+	+	–	+	–
8	+	+	+	+	–	–

- После выбора матрицы планирования, числа варьируемых факторов и интервалов планирования можно переходить от условных обозначений матриц, выраженных чередованием знаков (-) и (+), к их физическому наполнению реальными значениями концентраций компонентов среды, которые предстоит проверять в опытах при оптимизации состава среды. Все результаты удобно записывать в сводную таблицу.

Пример оптимизации 4-х компонентной среды по методу Бокса-Уилсона



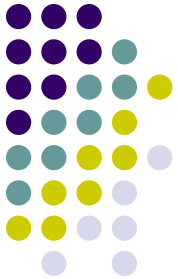
Наименование этапов работы		Наименование факторов (концентраций компонентов среды)				Конечная концентрация антибиотика, ед/мл					
		S_1, крахмал, %	S_2, $(NH_4)_2SO_4$, %	S_3, кукурузный экстракт, %	S_4, соевая мука, %	P_1	P_2	$\bar{P}$	$(P_j - \bar{P})$	$(P_j - \bar{P})^2$	$\hat{P}$
Основной уровень $(S_i)_0$		6,0	0,6	0,75	2,0	—	—	—	—	—	—
Максимальный уровень (S_i) max		10,0	2,0	2,0	5,0	—	—	—	—	—	—
Минимальный уровень (S_i) min		0,0	0,0	0,0	0,0	—	—	—	—	—	—
Интервал варьирования λ_i		0,7	0,1	0,15	0,3	—	—	—	—	—	—
Матрица планирования эксперимента	№ варианта										
	1	(–)5,3	(–)0,5	(–)0,6	(–)1,7	5600	5800	5700	100	10000	5553
	2	(+)6,7	(–)0,5	(–)0,6	(+)2,3	7200	7000	7100	100	10000	7149
	3	(–)5,3	(+)0,7	(–)0,6	(+)2,3	6750	6450	6600	150	22500	6663
	4	(+)6,7	(+)0,7	(–)0,6	(–)1,7	6030	6210	6120	90	8100	6179
	5	(–)5,3	(–)0,5	(+)0,9	(+)2,3	6930	7030	6970	60	3600	7027
	6	(+)6,7	(–)0,5	(+)0,9	(–)1,7	6740	6400	6520	120	14400	6563
	7	(–)5,3	(+)0,7	(+)0,9	(–)1,7	6080	5940	6040	70	4900	6057
	8	(+)6,7	(+)0,7	(+)0,9	(+)2,3	8000	7600	7800	200	40000	7653
$\Sigma(P - \bar{P})^2$	—	—	—	—	—	—	—	—	—	113500	—

Продолжение таблицы

оптимизация 4-х компонентной среды по методу Бокса-Уилсона

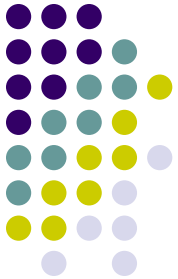
Наименование этапов работы		Наименование факторов (концентраций компонентов среды)				Конечная концентрация антибиотика, ед/мл					
		S_1, крахмал, %	S_2, $(NH_4)_2SO_4$, %	S_3, кукурузный экстракт, %	S_4, соевая мука, %	P_1	P_2	$\bar{P}$	$(P_j - \bar{P})$	$(P_j - \bar{P})^2$	$\hat{P}$
Коэффициенты регрессии b_i		+283	+30	+222	+515	$(b_0 = 6603)$			—	—	—
Произведение $b_i\lambda_i$		+198	+3	+33	+155	$\Sigma\Sigma(P_j - \bar{P})^2 = 2 \cdot 113500 = 227000$					
Запас Δ_i		4,0	1,4	1,25	3,0	$\Sigma(\bar{P} - \hat{P})^2 = 58258$					
Критичность $\lvert\Delta_i/(b_i\lambda_i)\rvert$		0,02	0,47	0,038	0,019						
Шаг ΔS_i		+0,64	–	+0,11	+0,5	Расч. знач. $\hat{P}$	Экспер. знач. P	—	—	—	—
Опыты крутого восхождения	9	6,6	0,6	0,86	2,5	7879	7140	—	—	—	—
	10	7,3	0,6	0,97	3,0	9155	7630	—	—	—	—
	11	7,9	0,6	1,08	3,5	10430	8350	—	—	—	—
	12	8,6	0,6	1,19	4,0	11706	8510	—	—	—	—
	13	9,2	0,6	1,30	4,5	12982	6220	—	—	—	—

оптимизация среды по методу Бокса-Уилсона



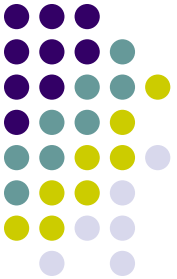
- После выбора матрицы планирования, числа варьируемых факторов и интервалов планирования можно переходить от условных обозначений матриц, выраженных чередованием знаков (-) и (+), к их физическому наполнению реальными значениями концентраций компонентов среды, которые предстоит проверять в опытах при оптимизации состава среды.

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ В МЕТОДЕ БОКСА—УИЛСОНА



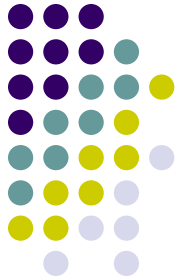
- основной уровень («фон»), интервалы варьирования, минимальный и максимальный уровни фактора, при которых исследователь допускает протекание процесса, определяются интуицией.
- необходимо найти физические значения верхнего и нижнего уровней факторов.
- Для этого к основному уровню нужно прибавить интервал варьирования — для верхнего уровня или вычесть его — для нижнего уровня.

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕДУРЫ В МЕТОДЕ БОКСА—УИЛСОНА



- кроме варьируемых факторов в составе среды могут быть факторы, значение которых одинаково для всех вариантов среды.
- надо не забывать при приготовлении сред добавлять и эти постоянные для всех сред компоненты, хотя в матрице планирования они и не указаны.

Постановка эксперимента



- В микробиологических исследованиях принято для надежности повторять опыты и не по одному разу. Это касается и опытов с планированием эксперимента при подборе сред.
- в данных опытах есть одна особенность:
- - не интересны конкретные цифры для каждой отдельной среды:
- - *вся серия в целом* служит одной задаче: найти более точно описание всей области эксперимента уравнением, а с ним — и более точное направление движения к оптимуму;
- - каждая точка матрицы помогает другой и они дают *совокупный результат.*

Это позволяет снизить требования к повторению опытов.

Расчет коэффициентов уравнения регрессии

- Свободный член уравнения b_o находится как среднее из значений P для всех N вариантов матрицы:

$$b_0 = \frac{\sum_{u=1}^{N} \bar{P}_u}{N},$$

где $\bar{P}_u$ — среднее значение величины P для всех повторений для u-го варианта матрицы.

$$b_1 = \frac{\sum_{u=1}^{N}\left(\bar{\bar{P}}_u S_{iu+}\right) - \sum_{u=1}^{N}\left(\bar{\bar{P}}_u S_{iu-}\right)}{N}.$$

- Коэффициент регрессии i-го фактора определяется как разность сумм выходов $\overline{\overline{P_u}}$, в которых фактор S_i, находился со знаком (+), и выходов $\overline{P_u}$, где фактор S_i, находился со знаком (-), деленная на число вариантов в матрице планирования *N:*

- Если принять кодированные значения факторов X_i т.е. S_{iu}, как (+1) для верхнего уровня и (—1) для нижнего, то получаем:

$$b_i = \frac{\sum_{u=1}^{N} (\bar{P}_u S_{iu})}{N}.$$

- Например, для фактора S_2 в таблице коэффициент регрессии вычисляют следующим образом:

$$b_2 = \frac{(-1)\cdot 5700 + (-1)\cdot 7100 + 1\cdot 6600 + 1\cdot 6120 + (-1)\cdot 6970}{8} +$$
$$+ \frac{(-1)\cdot 6520 + 1\cdot 6040 + 1\cdot 7800}{8} = +30.$$

- Рассчитанные таким образом коэффициенты имеют разные знаки. Знак (+) означает, что при увеличении данного фактора происходит возрастание параметра оптимизации *P,* знак (-) - наоборот, уменьшение *P.*
- Чем больше коэффициент регрессии, тем больше он влияет на результат процесса.

На основе коэффициентов регрессии можно записать уравнение

$$\bar{P} = 6603 + 283 S_1 + 30 S_2 + 222 S_3 + 515 S_4$$

Чтобы перейти к натуральным переменным, нужно подставить выражение для кодированных факторов:

$$S_i = \frac{\bar{S}_i - \bar{S}_{0i}}{\lambda_i},$$

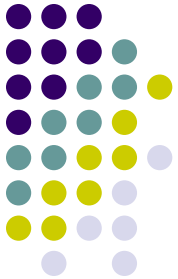
где S_i и S_{oi} — натуральные значения уровня i-го фактора в данном опыте и основного уровня этого фактора; λ_i — интервал варьирования i-го фактора в натуральных величинах

Определение запаса для движения в направлении крутого восхождения

- При определении программы крутого восхождения от основного уровня необходимо знать для каждого фактора запас Δ_i,- в сторону движения [для коэффициентов регрессии со знаком (+) - в сторону увеличения, со знаком (-) - в сторону уменьшения]:

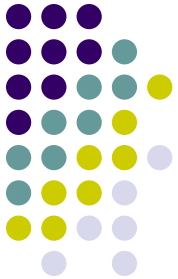
$$\Delta_i = S_{i\,\max} - S_{0i}, \text{ если } b_i > 0 \text{ или } S_{0i} - S_{i\,\min}, \text{ если } b_i < 0. \quad (7.6)$$

Определение вспомогательного показателя «критичность».



- Этот показатель представляет собой модуль отношения запаса Δ_i, и произведения $b_i\lambda_i$,- и физически выражает в сравнительном аспекте, сколько сможет уместиться в «запасе» шагов в направлении крутого восхождения для разных факторов с учетом их степени влияния на результат процесса.
- Чем ниже значение показателя критичности для фактора, тем меньшее (по сравнению с другими) число шагов уместится в «запасе» для этого фактора.

Выбор шага крутого восхождения



- Обычно крутое восхождение проводится путем равномерного пошагового приращения в каждом последующем опыте величины уровня фактора.
- При этом для одного из факторов — наиболее критичного — величина приращения (шага) выбирается, а для всех остальных — рассчитывается так, чтобы их значения были пропорциональны произведениям $b_i\lambda_i$.

Выбор шага крутого восхождения

- Обычно выбирают относительно немного шагов в направлении крутого восхождения: 5—8, не более.
- По наиболее критичному фактору выбранное количество шагов ***m*** позволяет определить величину шага ΔSi

$$\Delta S_6 = \frac{\Delta_i}{m}.$$

Выбор шага крутого восхождения

- Если величина базового шага равна 0,5,то пропорционально произведениям biλi,- найдем величину шага ΔSi, для факторов *Si:*

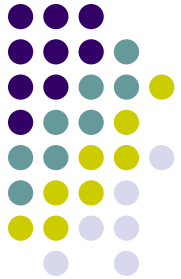
$$\Delta S_i = \frac{\Delta S_б}{(b\lambda)_б}(b\lambda)_i;$$

$$\Delta S_1 = \Delta S_4 \frac{b_i\lambda_i}{b_4\lambda_4} = 0{,}5\frac{198}{155} = 0{,}64;$$

$$\Delta S_3 = \Delta S_4 \frac{b_3\lambda_3}{b_4\lambda_4} = 0{,}5\frac{33}{155} = 0{,}11.$$

- Для фактора проставлен прочерк.
- Значит по результатам анализа установлено, что данный фактор не оказывает существенного влияния на результат процесса, а потому его значение нет смысла менять.
- Как определить, что тот или иной фактор является значимым или незначимым?
- Для этого в планировании эксперимента предусмотрена специальная процедура.

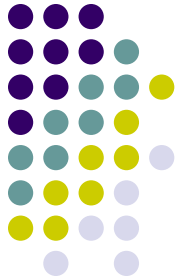
СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ



- В биологических процессах результат процесса обычно неоднозначен.
- Существует какой-то уровень колебаний, возможных по случайным причинам.
- Природа этих колебаний (источников неоднородности) может быть различной. Это ошибки в определении результата, и различия в значении факторов при проведении эксперимента, и неточности приготовления сред, и вообще присущая биологическим объектам неоднородность.

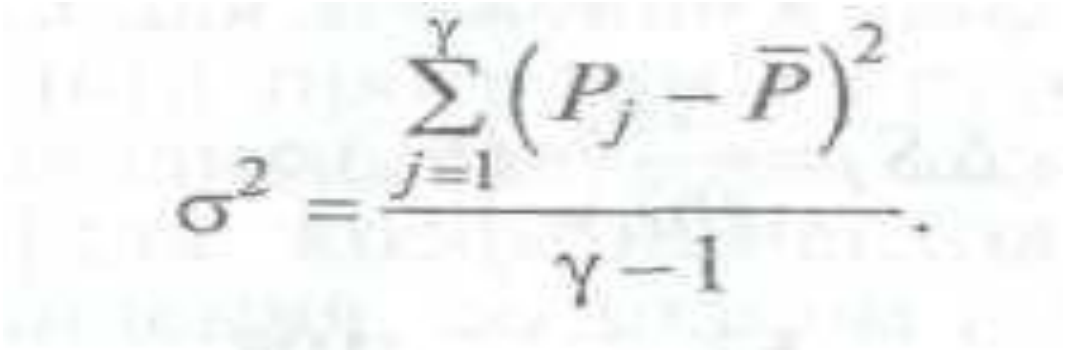
- коэффициенты регрессии определяют по значениям выходного показателя, для них есть уровень случайных изменений, который находят с помощью статистической обработки.
- Уровень воспроизводимости процесса характеризуется *дисперсией.*
- Для определения дисперсии воспроизводимости существуют два способа.

Первый способ— многократное повторение опытов для одного и того же варианта (среды).



- В этом случае имеем ряд значений *P*, их количество обозначим γ, оно не должно быть меньше 8—10.
- Нужно найти среднюю величину $\overline{P}$ для всех γ опытов, все отклонения от среднего $(P-\overline{P})$, квадраты этих отклонений и сумму квадратов $\sum(Pj—\overline{P})^2$ для всех γ повторений.

Дисперсию воспроизводимости определяют по формуле:



$$\sigma^2 = \frac{\sum_{j=1}^{\gamma} (P_j - \bar{P})^2}{\gamma - 1},$$

Это не среднеквадратичное отклонение, а дисперсия воспроизводимости каждого отдельного измерения.

- Если выполнить несколько серий опытов на одной и той же среде (в каждой серии число опытов γ), затем для каждой серии рассчитать свою среднюю величину *P* , и посмотреть, какова будет дисперсия воспроизводимости для этих *средних значений,* то получим:

$$\sigma^2_{\bar{P}} = \sigma^2 / \gamma.$$

Второй способ— расчет дисперсии процесса по данным повторных экспериментов матрицы планирования.

- Он более удобен при планировании эксперимента, так как повторения в каждом варианте матрицы предусмотрены. Если γ — число повторений в каждом варианте среды, а *N* — общее число вариантов сред в матрице, то дисперсию воспроизводимости *единичного значения* находят по формуле

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{u=1}^{N} \sum_{j=1}^{\gamma} \left(P_j - \bar{P}\right)^2}{(\gamma - 1)\, N}.$$

- Надежность вычисления дисперсии воспроизводимости определяется количеством «лишних» опытов, необходимых для нахождения дисперсии.
- Количество «лишних» опытов называют *числом степеней свободы f.* Для первого способа оно равно *(γ* - 1), для второго — *N(γ* - 1). Эта величина является важным статистическим показателем.

- для надежного определения дисперсии воспроизводимости процесса число степеней свободы f должно быть не менее 5—8.
- Чем больше дисперсия, тем хуже воспроизводимость процесса.
- Корень квадратный из дисперсии воспроизводимости процесса называют *стандартным отклонением,* или *стандартной ошибкой.*

Определение значимости коэффициентов регрессии.

- Уровень возможных случайных колебаний коэффициентов регрессии называется *доверительным интервалом,* обозначается буквой ε и его вычисляют по формуле:

$$\varepsilon = t\sqrt{\frac{\sigma^2}{N\gamma}} = t\sqrt{\frac{\sum\sum\left(P_u - \bar{P}\right)^2}{(\gamma - 1)\,N^2\gamma}}.$$

- В этой формуле появляется новый коэффициент *t* — критерий Стьюдента, определяемый по таблицам.
- Для надежности оценки до 95% критерий Стьюдента зависит только от числа степеней свободы *f* при которых находим дисперсию воспроизводимости.

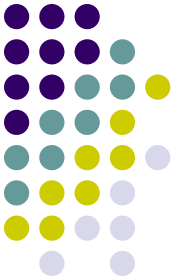
значения критерия Стьюдента для наиболее часто встречающихся значений f при $P = 0,95$:

f	t	f	t
1	12,71	10	2,23
2	4,30	12	2,18
3	3,18	16	2,12
4	2,78	20	2,09
5	2,57	30	2,04
6	2,45	60	2,00
7	2,37	100	1,98
8	2,31		

вначале критерий t резко уменьшается с возрастанием f, а затем его значение стабилизируется.

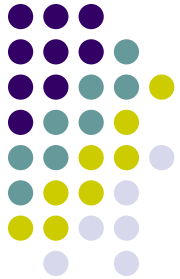
- Доверительный интервал ε имеет одно и то же значение для всех коэффициентов *bi* (в кодированном виде).
- Сравнение коэффициента регрессии с доверительным интервалом и позволяет сделать вывод о его значимости.
- Все коэффициенты *bi* , значения которых ниже доверительного интервала, незначимы. Их можно считать нулевыми.
- Если величина коэффициента больше ε, он значим. Отрицательные коэффициенты регрессии тоже значимы, если они по модулю превосходят ε.

Незначимость коэффициентов может быть вызвана различными причинами:



- 1. взяты слишком малые интервалы варьирования фактора;
- 2. плохая воспроизводимость процесса — все различия в выходе нивелируются ошибкой опыта;
- 3. данный фактор находится на уровне, близком к оптимальному;
- 4. данный фактор не влияет на процесс вообще, по крайней мере в изученной области.

Адекватность математического описания процесса



- Кроме оценки значимости коэффициентов в процедуре статистического анализа предусмотрена оценка адекватности полученного математического описания в целом.
- Для этого сначала находят *дисперсию адекватности,* которая характеризует отклонение рассчитанных по уравнению значений выходного показателя P от найденного в эксперименте $\overline{P}$.

для варианта 6 величину *P* можно определить так

$$\hat{P} = b_0 + b_1 - b_2 + b_3 - b_4 =$$

$$= 6603 + 283 - 30 + 222 - 515 = 6563.$$

Дисперсия адекватности определяется по формуле

$$\sigma_a^2 = \frac{\sum\left(\bar{P}_u - \hat{P}_u\right)^2}{N - n - 1},$$

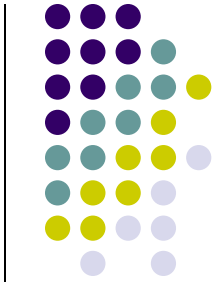
где n — число факторов в уравнении; *N* — число вариантов опытов (условий), по которым определяется дисперсия адекватности; *u* — номер варианта среды, к которому относятся $\bar{P}$ и *P*.

- Знаменатель этой дроби представляет собой *число степеней свободы* f_a дисперсии адекватности:
- $f_a = N - n - 1$;
- т.е. количество «лишних» опытов, имеющихся в плане сверх минимально необходимых $(n + 1)$ — по числу коэффициентов в уравнении.
- Степень адекватности математического описания оценивают по критерию Фишера F, который вычисляют по формуле:

$$F = \sigma_a^2 \gamma / \sigma_P^2 .$$

- Чтобы найти адекватность уравнения, необходимо критерий Фишера сравнить с табличным F_T, имеющимся в справочниках по статистике, также для надежности оценки 95%.
- Уравнение считается адекватным, если $F < F_T$, и наоборот.
- F_T в таблице определяют исходя из двух видов степеней свободы: *fp* — для воспроизводимости самого процесса и *fa* — для дисперсии адекватности.

Расчет программы крутого восхождения



- Для данного примера рассчитывают условия для 6 шагов крутого восхождения, т. е. 6 новых сред.
- На каждом шаге к предыдущему уровню фактора прибавляется или от него отнимается рассчитанное значение шага.
- По наиболее критичному фактору последний шаг будет совпадать с максимальным или минимальным его уровнем, по другим факторам — несколько не доходить до них.
- Составляют 6 сред крутого восхождения и воспроизводят процесс с этими рассчитанными средами. Для факторов с отрицательным значением коэффициента регрессии при каждом шаге *отнимается,* а не прибавляется величина рассчитанного ΔS;.

Анализ результатов крутого восхождения

- сначала нужно все значения уровней факторов пересчитать в кодированные.
- затем рассчитать величину *P* аналогично тому, как это делалось для опытов в исследовательской матрице, подставив вместо кодированных значений *Si* (-1) и (+1) значения, вычисленные по формуле:
-

$$S_i = \frac{\tilde{S}_i - \tilde{S}_{i0}}{\lambda_i},$$

- В колонке рядом с расчетными данными указать экспериментальные.
- Часто столь высоких значений выхода, как ожидали, не получают.
- Рост выходного показателя может идти не все время — после 4-го шага (12-го опыта) начинается даже падение выхода.
- Значит линейное приближение недостаточно. Но направление движения к оптимуму найдено.
- Далее нужно поставить новую матрицу планирования с центром в новой точке и наметить программу крутого восхождения.

- расчет по этому методу необходимо повторять до тех пор, пока линейное уравнение не станет неадекватным. В этом случае надо использовать другие методы, описывающие процесс уже *уравнением второго порядка:*

$$P = b_0 + \sum_{i=1}^{n}(b_i S_i) + \sum_{i,j=1}^{n}(b_{ij} S_i S_j) + \sum_{i=1}^{n}(b_{ii} S_i^2).$$

МНОГОУРОВНЕВЫЕ ПЛАНЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

- методом является *аддитивно-решетчатое описание* процесса.
- В этом случае объект описывается *аддитивно-нелинейным решетчатым уравнением:*
-

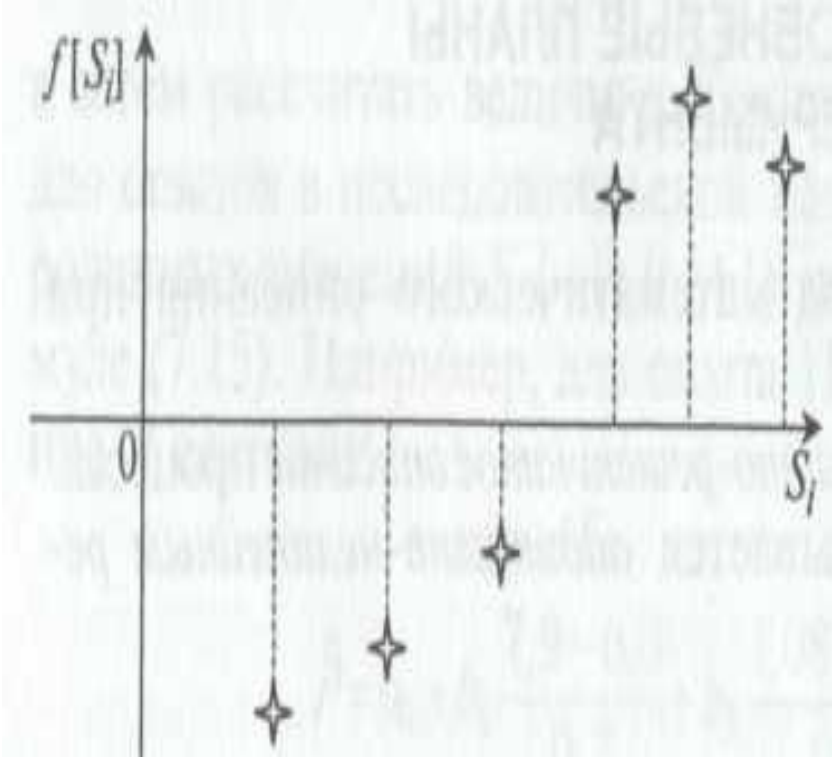
$$P = b_0 + f_1[S_1] + f_2[S_2] + \ldots + f_n[S_n].$$

***Аддитивное* — значит состоящее из суммы членов, каждый из которых зависит только от одного из факторов.**

- Принятое в методе Бокса—Уилсона линейное уравнение регрессии было аддитивным, только значения каждой функции были линейными:
- Здесь функции могут быть и нелинейными

$$f_i(S_i) = b_i S_i + b_{ii} S_i^2 + b_{iii} S_i^3 + \ldots$$

Пример решетчатой функции одного фактора

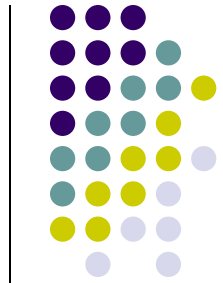


$$f_i[S_i] = \begin{cases} b_{i1} & \text{при} \quad S_i = S_{i1}; \\ b_{i2} & \text{при} \quad S_i = S_{i2}; \\ \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots \\ b_{ik} & \text{при} \quad S_i = S_{ik}. \end{cases}$$

- Чтобы получить зависимости с наименьшим числом опытов и упростить вычисления, целесообразно использовать *ортогональные* матрицы планирования уже на 3, 4, 5 уровнях в соответствии с выбранной разбивкой рабочего диапазона для всех факторов.
- Ортогональность матриц предполагает, что каждый уровень любого фактора сочетается одинаковое число раз со всеми уровнями остальных факторов.

На практике такие схемы планирования эксперимента называют схемами *ортогональных латинских прямоугольников* (или квадратов, если число факторов равно числу уровней каждого фактора).

Есть удобные для практики схемы планирования — 3х3, 4х4, 5 х 5, 8 х 4, 9 х 3. Первая цифра обозначает число факторов, а вторая — число уровней каждого фактора.



Планирование эксперимента для 4 факторов на 4 уровнях

№ п/п	S_1	S_2	S_3	S_4
1	1	1	1	1
2	3	1	3	2
3	4	1	4	4
4	2	1	2	3
5	1	3	3	4
6	3	3	1	3
7	4	3	2	1
8	2	3	4	2
9	1	4	4	3
10	3	4	2	4
11	4	4	1	2
12	2	4	3	1
13	1	2	2	2
14	3	2	4	1
15	4	2	3	3
16	2	2	1	4

Величина эффектов решетчатого описания (b_{ik}) и значение b_o рассчитываются почти так же просто, как в методе Бокса— Уилсона:

$$b_0 = \frac{\sum_{u=1}^{N} P_u}{N};$$

$$b_0 = \frac{\sum_{u=1}^{N} P_u}{N};$$

P^k_{iu} — выход в *u-м* варианте плана, где i-й фактор находился на k-*м* уровне; *m* — число уровней каждого фактора

- нужно найти средний выход *P* в тех опытах, где вычисляемый фактор находится на определяемом уровне,
- вычесть из него средний выход по всей матрице планирования. При этом часть коэффициентов b_{ik} будет со знаком «+», а часть — со знаком «-».
- Для проверки можно использовать соотношение: для каждого фактора алгебраическая сумма b_{ik}. равна 0.
- Доверительный интервал для оценки значимости коэффициентов определяется по соотношению

$$\varepsilon = t\sqrt{\frac{\sigma^2}{\gamma N/m}}.$$

Итоги расчетов величины эффектов аддитивно-решетчатого описания

№ п/п	Наименование фактора		Натуральные и кодированные (в скобках) значения уровней факторов			
1	S_1, соевая мука	Концентрация, %	1,5 (1)	2,0 (2)	3,0 (3)	4,5 (4)
		Эффект	+168	–51	–52	–67
2	S_2, кукурузная мука	Концентрация, %	2,0 (1)	3,0 (2)	4,0 (3)	6,0 (4)
		Эффект	–155	+267	+92	–195
3	S_3, кукуруз-ный экстракт	Концентрация, %	0 (1)	0,5 (2)	1,0 (3)	2,0 (4)
		Эффект	+62	+246	+181	–490
4	S_4, мел	Концентрация, %	0,4 (1)	0,6 (2)	0,9 (3)	1,2 (4)
		Эффект	–452	+11	+108	+331

- Адекватность аддитивно-решетчатого описания проверяют аналогично методу Бокса—Уилсона. При нахождении дисперсии адекватности число степеней свободы f_a принимают $f_a = N - n(m - 1) - 1$.

- «Все должно быть сделано настолько просто, насколько это возможно, но не проще!»

Альберт Эйнштейн

1 вариант

- 1. Дайте определение понятия «биотехнология».
- 2. Какие продукты биотехнологии применяют в медицине?
- 3. Каковы сходство и различия в стадиях ферментации, биотрансформации, биокатализа?
- 4. В чем заключается классификация биотехнологических производств по типам технологических схем?
- 5. Опишите блок-схему производства лизина.
- 6. Виды продуктов по их месту в технологической схеме.