

**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО РОБОТИКА**

България, София 1113, ПК 79, ул. "Акад. Г. Бончев", Бл. 2,
Тел. (+359 2) 8732 614, (+359 2) 8723 571, Факс: (+359 2) 8703361



Почетен член на "Съвета на Европейската научна и културна общност"

асистент Анастасия Йорданова Златкова

**Моделиране и мониторинг
на динамиката на процесите
при култивиране на щам
*Escherichia coli***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за придобиване на образователната и научната степен

«Доктор»

по ПН 5.2 Технически науки - Електротехника, електроника и
автоматика

специалност Автоматизация на производството (по отрасли)

София 2020 г.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от еднократно разширено научно звено на семинар на секция „МБТС“ при Институт по роботика, БАН, проведено на 11.11.2020 година с доклад от ръководител секция с входящ номер 145в/23.11.2020г. с приложение Протокол от 11.11.2020 година.

Материалите във връзка със защитата са публикувани на интернет страницата на ИР-БАН www.ir.bas.bg и са на разположение в канцеларията на ИР-БАН.

АВТОР : ас. Анастасия Йорданова Златкова

ЗАГЛАВИЕ : Моделиране и мониторинг на динамиката на процесите при култивиране на щам *Escherichia coli*

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ : проф. д-н Велислава Любенова

НАУЧНО ЖУРИ:

вътрешни членове:

проф. д-р Сия Лозанова

доц. д-р Пламена Златева

външни членове:

проф. д-н Георги Костов – УХТ– Пловдив

проф. д-р Петя Копринкова – ИИКТ– БАН

доц. д-р Олимпия Роева – ИБФБМИ– БАН

Резервни членове:

вътрешен – доц. д-р Снежанка Костова

външен – доц. д-р Боряна Вачова – ИИКТ-БАН

Въведение

Биотехнологиите предлагат разнообразие от решения за редица проблеми в производството на продукти в хранително-вкусовата и фармацевтичната индустрия, както и намират приложение в пречистването на отпадни води, в производството на биогорива и др. Ключови за това производство са биотехнологичните процеси, чието разбиране спомага за качествен контрол на целевите продукти от тези биотехнологии. Сложните механизми на тези процеси, които са все още непознати или не напълно изучени води до необходимостта те да се изследват и да се формализират получените знания с модели. За целите на адаптивните мониторинг и управление, едни от най-подходящите за тези процеси предвид специфичната им природа, е необходимо предложените модели да отговарят на определени изисквания като качество и структура. Дисертационният труд е посветен на моделирането и мониторинга на динамиката на процесите при култивиране на щам *E. coli*, който е един от най-често използваните моделни микроорганизми в биотехнологията.

Обща характеристика на дисертационния труд

Глава I Литературен обзор

В направеният обзор са разгледани 180 литературни източника. Разгледани са подходи за моделиране на биотехнологичните процеси (неструктурни и структурни, модели на белите, сиви и черни кутии). По-детайлно е разгледан Обобщеният динамичен модел, неговата структура и предимства, както и проблемите при моделиране на скоростите на реакции. Показани са и кинетични модели за *E. coli* – консумация и насищане с глюкоза, консумация на ацетат и специфични скорости на растеж. Посочени са и методи за идентификация на модели на ферментационни процеси. Разгледан е мониторинга на процесите на култивиране с *E. coli* – актуалност и проблеми. Представени са софтуерни сензори на базата на модели и такива, базиращи се на данни, заедно с тяхната класификация с примери и връзката им с управлението, както и предимствата и недостатъците на различните методи за мониторинг. Направени са следните изводи:

1. От предлаганите в литературата модели, описващи динамиката на процеси с щам *E. coli*, е избран неструктурен модел за периодични с подхранване ферментации като база за изследванията в дисертационния труд, тъй като описва с добра точност динамиката на процеса и е с достатъчно проста структура. Той се състои от два под-модела, описващи окислително-ферментативен растеж на биомасата върху глюкоза и окислителен растеж върху глюкоза и ацетат, които се превключват в зависимост от стойността на ключов параметър (критерий за превключване) – окислителния капацитет на ферментора.
2. Предложеният критерий от т.1 за разпознаване на различните метаболитни състояния включва кинетичен израз с постоянни коефициенти, което може да компрометира точността на резултатите имайки предвид природата на биопроцесите. Възможността да се приложи друг критерий - кинетиката на

междинен метаболит, би подобрило тяхното разпознаване. Основание за такъв подход е фактът, че производството и консумация на ацетата се описват поотделно в двата подмодела.

3. За преодоляване на основните проблеми на БТП като обект за мониторинг в литературата са предложени голям брой методи за синтез на СС на базата на модели и на данни. Моделните СС имат предимствата да оценяват кинетични параметри с физически смисъл, не изискват реализацията на голям брой експерименти и е възможно да се постигне робастност по отношение на смущения в модела и/или измерванията.
4. Най-използваният в литературата метод за синтез на СС на кинетиката е оценител на базата на наблюдател (ОБН). Основни негови предимства са линейната структура, с което се преодоляват част от проблемите при нелинейните методи, робастността по отношение на някои моделни неопределености и оценяването на скоростите на реакции като неизвестни нестационарни параметри.
5. Една възможна алтернатива за адаптивен мониторинг на биопроцесите е разработката на каскадни СС (комбинация на ОБН и адаптивни наблюдатели с линейна структура).

Цел на дисертационния труд

Да се предложат нови подходи за моделиране и мониторинг на кинетиката на физиологичните състояния на периодични с подхранване биопроцеси на култивиране на *E. coli*. Те да се базират на извеждане на адаптивен ключов параметър, който да идентифицира смяната на физиологичните състояния на процесите.

Задачи

1. Да се изведе нов неструктурен модел на периодичен с подхранване процес на култивиране на щам *E. coli* използвайки експериментални данни от два процеса, преминаващи през различни физиологични състояния.
2. Да се изведат софтуерни сензори за мониторинг на кинетиката на процеса при окислително-ферментативен растеж на биомасата върху глюкоза. Да се осъществи анализ на устойчивост и настройка на софтуерните сензори. Да се проведат симулационни изследвания при различни видове смущение на базата на изведения в задача 1 модел.
3. Да се изведат софтуерни сензори за мониторинг на кинетиката на процеса при окислителен растеж на биомасата върху глюкоза и ацетат. Да се осъществи анализ на устойчивост и настройка на софтуерните сензори. Да се проведат симулационни изследвания при различни видове смущение на базата на изведения в задача 1 модел.

Глава II Разработка на модели, описващи различни метаболитни състояния при култивиране на щам *Escherichia coli*

Осъществен е анализ на експериментални резултати от две ферментации, проведени в биотехнологичната лабораторията към катедра Биоинженерство на Университета Миньо, град Брага, Португалия. Тези две ферментации са проведени в периодичен с подхранване режим на култивиране. За тях е известно, че преминават през няколко метаболитни състояния, които най-общо могат да се представят със следната схема на реакции:



За Ферментация 1, която преминава само през две метаболитни състояния, е приложен експоненциален профил на подхранване на базата на уравнението:

$$F(t) = \frac{\mu_K}{k_{XS}} \frac{X(t)W(t)}{S_{in}}$$

При Ферментация 2 скоростта на подхранване се променя по такъв начин, който позволява образуването на ацетат да започне много по-рано и да се достигне до състояние на консумация на произведеният ацетат, като биотехнологичният процес преминава и през трите метаболитни състояния.

Създадени са две бази данни – едната е свързана с Ферментация 1, а другата с Ферментация 2. Всяка от тези бази съдържа стойностите на концентрациите на биомаса, глюкоза и ацетат на всеки 1 час, както и стойностите на теглото на културалната среда в самия биореактор, скоростта на подхранването с глюкоза и скоростите на трансфер на кислород и въглероден диоксид са измервани и въведени през 0.1 часа.

Неструктурният математичен модел за описание на различните метаболитни състояния при периодични с подхранване ферментации с щам *E. coli*, предложен в литературата (модел Роша), се състои от два подмодела. Първият описва окислително-ферментативния растеж върху глюкоза, който включва уравнения (2.0a) и (2.0b) от схемата на реакциите. Вторият подмодел описва окислителния растеж върху глюкоза и ацетат и включва и трите уравнения от схемата на реакциите. Двата подмодела са представени със следната система диференциални уравнения:

Окислително- ферментативен растеж

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ O \\ C_r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 \\ 0 & k_3 \\ -k_5 & -k_6 \\ k_8 & k_9 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_2 \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ O \\ C_r \end{bmatrix} + \frac{F_{in,S}}{W} \begin{bmatrix} 0 \\ S_{in} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ OTR \\ -CTR \end{bmatrix} \quad (2.2)$$

Окислителен растеж

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ O \\ C_r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & 0 \\ 0 & -k_4 \\ -k_5 & -k_7 \\ k_8 & k_{10} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_1 \\ \mu_3 \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \\ O \\ C_r \end{bmatrix} + \frac{F_{in,S}}{W} \begin{bmatrix} 0 \\ S_{in} \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ OTR \\ -CTR \end{bmatrix} \quad (2.3)$$

Използваният в модел Роша ключов параметър (маркер) за преминаване на процеса от едно метаболитно състояние в друго и съответно за превключване на подмоделите е окислителния капацитет на ферментора. Той е представен с кинетичен израз включващ постоянни стойности. То тази причина не може да бъде приет като надежден маркер за смяна на състоянията поради липсата на възпроизводимост на експерименталните резултати. Това налага търсенето на други подходи базиращи се на налични измервания в реално време. Такъв подход е използването на информация за кинетиката на концентрацията на ацетат (скоростта на неговото производство или консумация), която може да бъде получена на базата на балансовото уравнение за ацетата (уравнение 2.2) от налични измервания на концентрацията на тази променлива в културалната среда, нейната производна, както и скоростта на подхранване и теглото на течността в биореактора, както следва:

$$R_a = \frac{dA}{dt} + \frac{F_{in,S}}{W} A \quad (2.10)$$

Условията за преминаване на процеса от окислителен към окислително-ферментативен растеж са както следва:

$$R_a = 0, S \neq 0 \quad \text{окислителен растеж върху глюкоза} \quad (2.11a)$$

$$R_a > 0, S \neq 0 \quad \text{окислително-ферментативен растеж върху глюкоза} \quad (2.11b)$$

т.е., положителните стойности на така изчислената скорост са индикатор, че микроорганизмът е в окислително-ферментативно състояние, а нулевите стойности, че е в окислително състояние на растеж върху глюкоза.

Условията за преминаване на процеса от окислително-ферментативен растеж към окислителен са както следва:

$$R_a < 0, S \neq 0 \quad \text{окислителен растеж върху ацетат и глюкоза} \quad (2.11c)$$

$$R_a < 0, S = 0 \quad \text{окислителен растеж върху ацетат} \quad (2.11d)$$

Пълна схема на предложения модел, описващ разглежданите три метаболитни състояния с новия ключов параметър, заедно с предложените кинетични изрази за скоростта на консумация на глюкоза, q_s , нейната критична стойност, q_{scrit} , скоростта на консумация на ацетат, q_{ac} , и трите специфични скорости на растеж на биомаса, (μ_1 , μ_2 , μ_3), е представена на Фигура 2.3.

$S > 0, R_a \geq 0$	-окислително-ферментативен растеж върху глюкоза
$q_S = q_{S,max} \frac{S}{K_S + S} \Rightarrow q_{OS} = q_S * k_{OS} \left\{ \begin{array}{l} R_a = 0 \Rightarrow \begin{cases} \mu_1 = q_S/k_1 \\ \mu_2 = 0 \end{cases} \\ R_a > 0 \Rightarrow q_{S,crit} = \frac{q_{O,max}}{k_{OS}} \frac{K_{i,O}}{K_{i,O} + A} \begin{cases} \mu_1 = q_{S,crit}/k_1 \\ \mu_2 = (q_S - q_{S,crit})/k_2 \end{cases} \end{array} \right.$ $q_{AC} = 0 \Rightarrow \mu_3 = 0$	
$S > 0, R_a < 0$	- окислителен растеж върху глюкоза и ацетат
$q_S = q_{S,max} \frac{S}{K_S + S} \Rightarrow q_{OS} = q_S * k_{OS} \text{ и } q_{AC} = q_{AC,max} \frac{A}{K_A + A} \frac{K_{i,A}}{K_{i,A} + A} \Rightarrow \begin{cases} \mu_1 = q_S/k_1 \\ \mu_2 = 0 \\ \mu_3 = q_{AC}/k_4 \end{cases}$	
$S = 0, R_a < 0$	- окислителен растеж върху ацетат
$q_S = 0 \Rightarrow \begin{cases} \mu_1 = 0 \\ \mu_2 = 0 \end{cases}$ $q_{AC} = q_{AC,max} \frac{A}{K_A + A} \frac{K_{i,A}}{K_{i,A} + A} \Rightarrow \mu_3 = q_{AC}/k_4$	

Фигура 2.3 Описание на пълния модел на процеса

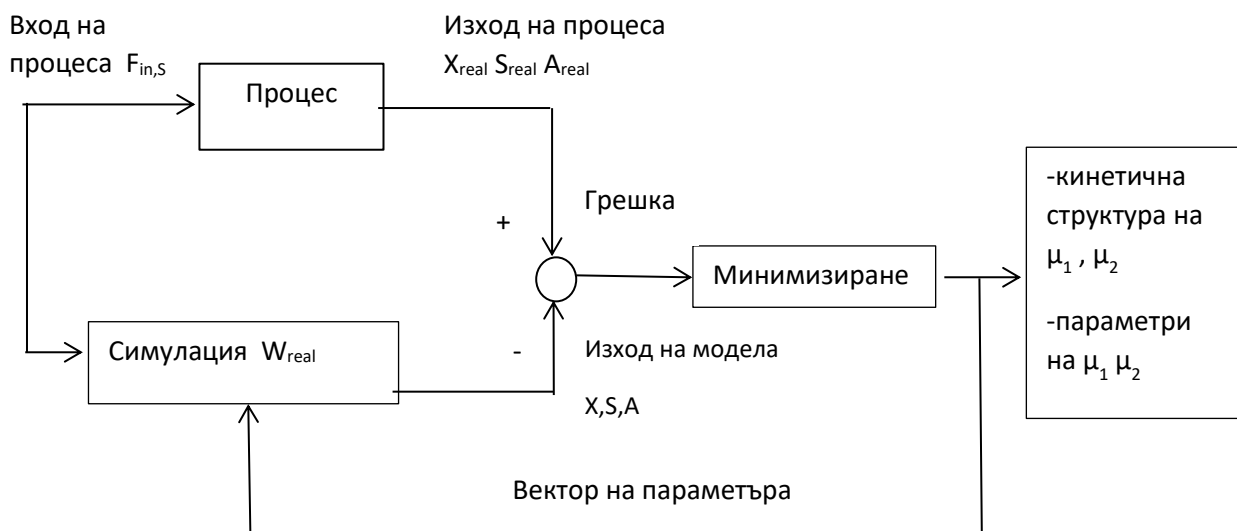
Моделът от Фигура 2.3 е сравнен с този взет от литературата, (*модел Rocha*).

Параметричната идентификация на двата модела е осъществена чрез оптимизация на базата на еволюционни алгоритми. Те са базирани на еволюционната теория на Дарвин и са тип стохастична оптимизация. Тя се предпочита при моделирането на биотехнологичните процеси, тъй като при нея се избягват проблемите, характерни при използването на традиционните методи на оптимизация – не са зависими от началните условия на процеса, избягват попадането в локален екстремум, стойностите на параметрите имат биологичен смисъл и др. Еволюционните алгоритми изследват популация от индивиди, като всеки индивид представлява допустимо решение на поставената задача. Популацията се подлага на операции като селекция, кръстосване и мутация (произволна промяна на стойността).

Осъществени са изследвания на различни структури на модели на консумацията на глюкоза и ацетат с цел избор на най-подходящ модел, както и е осъществено сравнение на резултатите от предложения модел с тези, получени на базата на модела на *Rocha*. Осъществен е анализ на резултатите и на тази база е предложен модел, описващ най-адекватно разглежданите процеси.

Симулационни резултати на окислително-ферментативния растеж (модел 1)

Методологията използвана за оценяването на кинетичната структура и параметри, свързани с окислително-ферментативния растеж, е показана на Фигура 2.4.



Фигура 2.4 Методология за извеждане на най-добрата кинетична структура, кинетични параметри и икономически коефициенти, свързани с окислително-ферментативния растеж. Входът е еднакъв за симулационния и експерименталния процес, както и началните стойности на променливите.

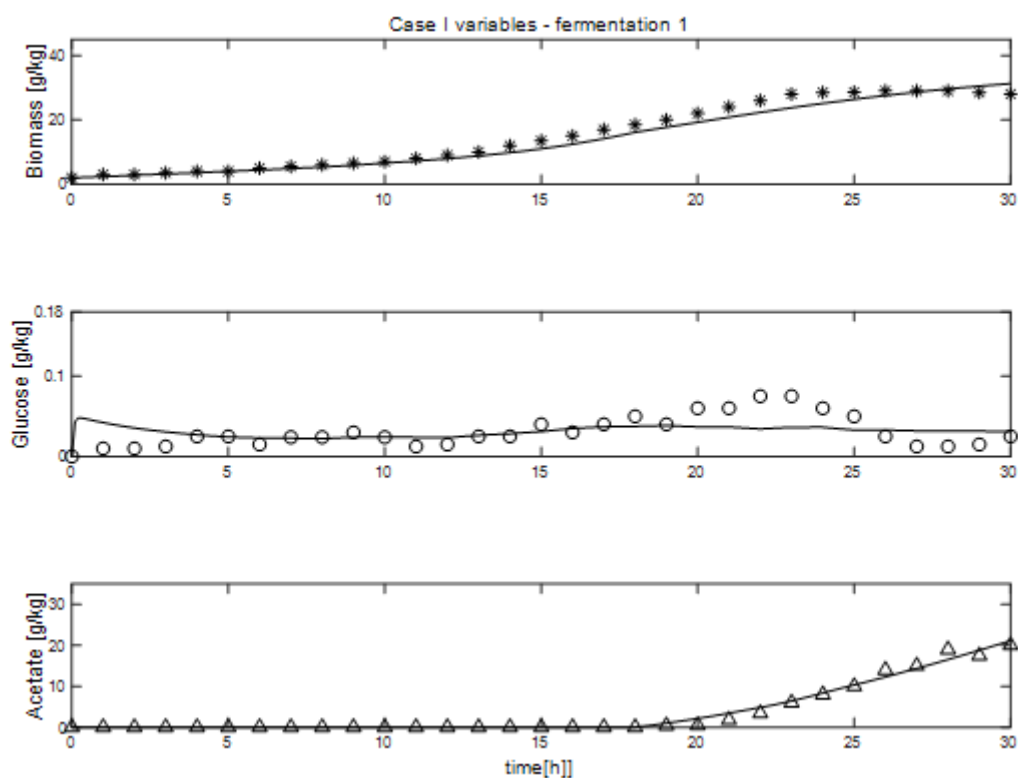
Предложената целева функция, която трябва да бъде минимизирана, представлява сбора на разликите на квадрат между симулационните $\xi_{sim,j}$ и експерименталните данни $\xi_{exp,j}$ за всяка точка (p_j) на съответната променлива на състоянието в симулацията. Разликата за всяка точка се нормализира като се разделя на максималната експериментална стойност ($\xi_{exp,max}$) за тази променлива, с цел уеднаквяване на тежестта на всички променливи на състоянието. Експерименталните данни, използвани при идентификацията са взети от Ферментация 1.

На базата на предложената процедура за параметрична идентификация са тествани при едни и същи условия четири уравнения за консумацията на глюкоза, представени в Таблица 2.1 като случаи 1-4, с цел да се сравнят свойствата на различни модели от литературата използвани за описание на наблюдаваните метаболитни състояния.

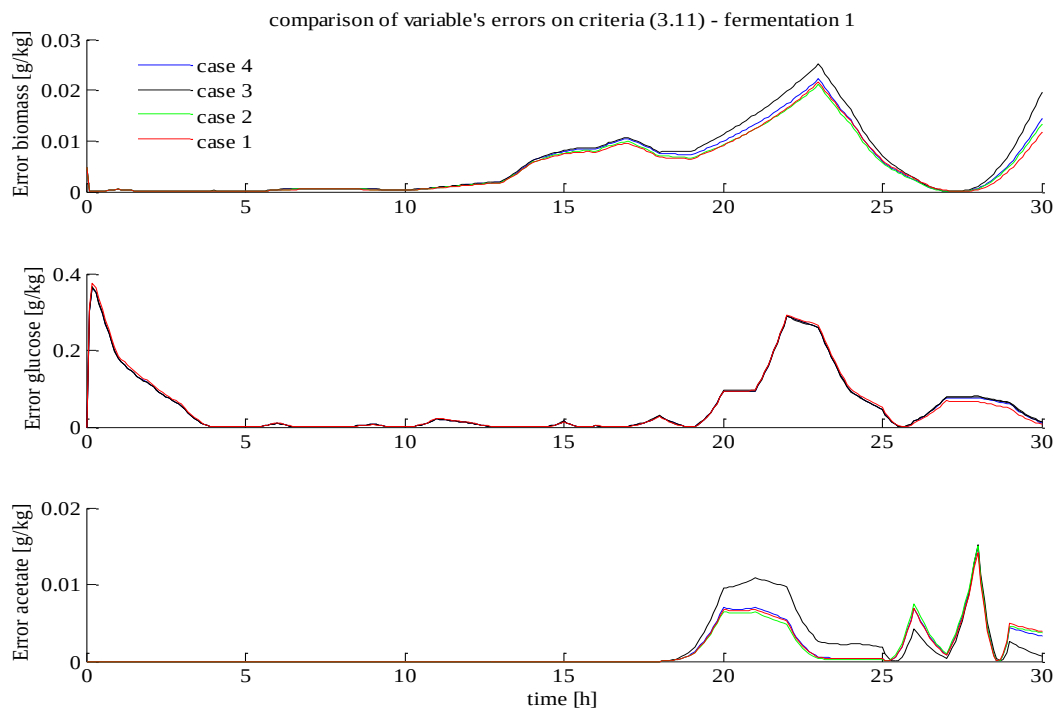
На Фигура 2.5 са представени резултатите за Случай 1 като са показани съответно стойностите на трите променливи – концентрациите на биомаса, глюкоза и ацетат, както и специфичните скорости на растеж и скоростта на консумация на глюкоза. Графичният профил на биомасата от Фигура 2.5 показва стабилизиране на концентрацията ѝ в края на процеса въпреки високата консумация на глюкоза, за което се съди по ниските ѝ нива в средата и края на процеса. Този процес може да се обясни единствено с ацетатното инхибиране на дихателния капацитет на бактерията и по тази причина е отчетен в модела.

Таблица 2.1. Изрази за скорост на консумация на глюкоза, използвани за проверка на най-добрата кинетична структура за окислително-ферментативния растеж с ключов параметър и условие $R_a \geq 0$

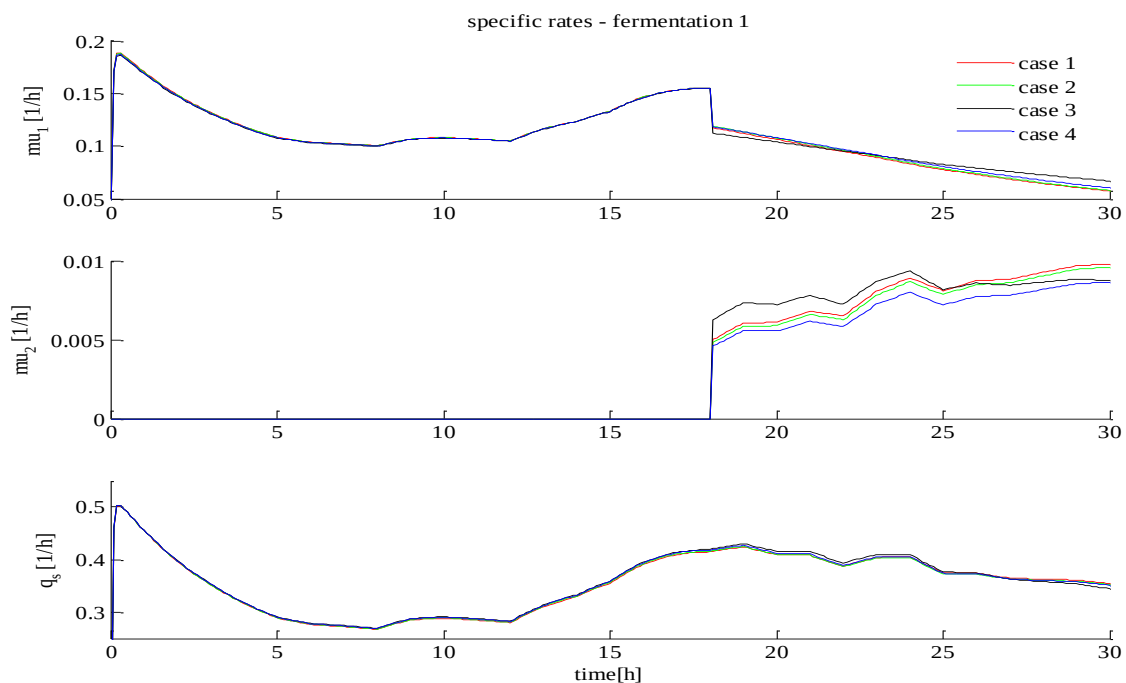
Случай	Скорост на консумация на глюкоза	Грешка Нов модел	Грешка модел Rocha
1	$q_S = q_{S,max} \frac{S}{S + K_S}$	17.6523	18.3729
2	$q_S = q_{S,max} \frac{S}{S + K_S} \frac{K_{i,S}}{K_{i,S} + A}$	17.7218	18.3103
3	$q_S = q_{S,max} \frac{S}{S + K_S + \frac{K_S}{K_{i,S}} A^2}$	18.0407	22.2582
4	$q_S = q_{S,max} \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \left(1 - \frac{A}{K_{i,S}} \right)$	17.7004	18.6441



Фигура 2.5 Сравнение на моделните (с непрекъсната линия) и експериментални стойности на биомаса (*), глюкоза (o) и ацетат (Δ) за Случай 1 от Табл. 2.1



Фигура 2.6а. Сравнение на грешките от критерий (2.12) на X , S и A за Случаи 1-4 от Табл. 2.1

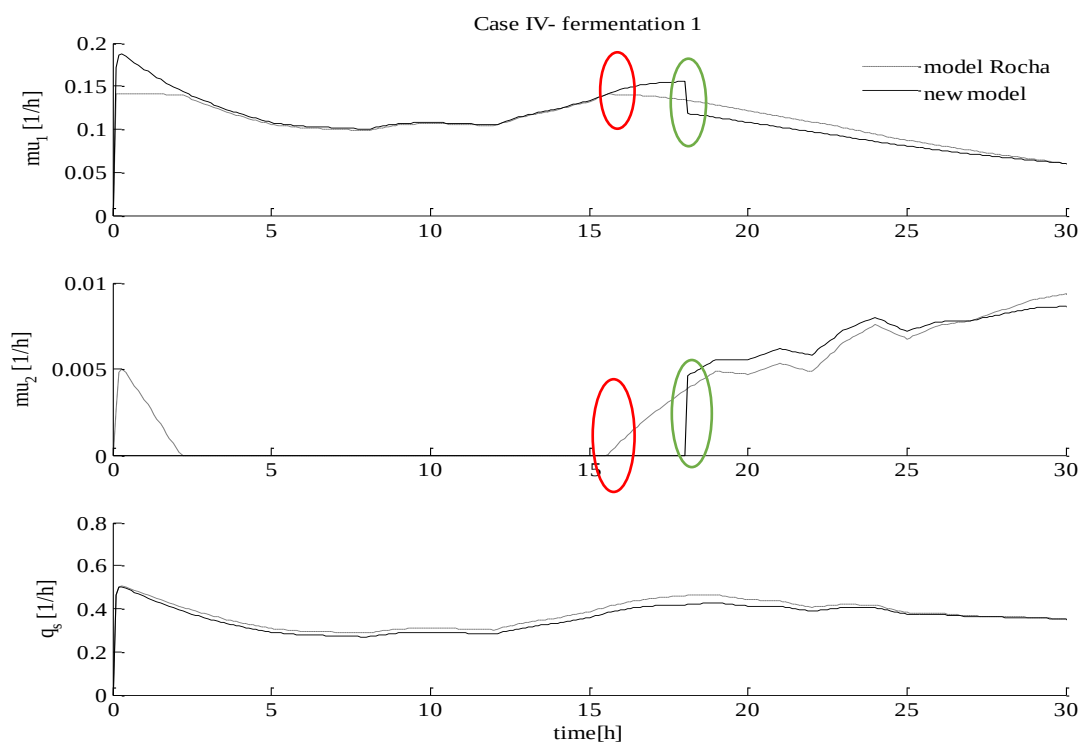


Фигура 2.6б. Сравнение на специфичните скорости за Случаи 1-4 от Табл. 2.1

На Фигура 2.6a са сравнени средните квадратични грешки на същите променливи за четирите случая. Те са приблизително еднакви като по-голямата грешка при глюкозата се дължи на неточност на самия сензор при измерването на ниски стойности.

На Фигура 2.6b са представени промените във времето на специфичната скорост на консумация на глюкоза и специфичните скорости на растеж съответстващи на окислението (μ_1) и на ферментацията (μ_2) на глюкоза за четирите случая. Като следствие на приблизително еднаквите резултати от моделиране на променливите, профилите и на трите скорости (μ_1 , μ_2 и q_s) са много близки при изследваните модели за консумация на глюкоза.

На Фигура 2.8 са сравнени получените стойности за двете специфични скорости на растеж и на консумация на глюкоза при два от случаите, като с червено е отбелязан моментът, в който модел *Rocha* засича началото на продуциране на ацетат и превключването от окислителен към окислително-ферментативен растеж. Може да се отбележи, че това засичане е по-неточно, докато новият модел идентифицира смяната в точния момент, което е 3 часа по-късно (отбелязано със зелено).



Фигура 2.8 Сравнение на специфичните скорости на растеж и консумация на глюкоза за двата модела (нов модел - Фиг. 2.3 и модела за Случаи 3 и 4 от Таблица 2.1).

Симулационни резултати на окислителен растеж върху ацетат и глюкоза (модел 2)

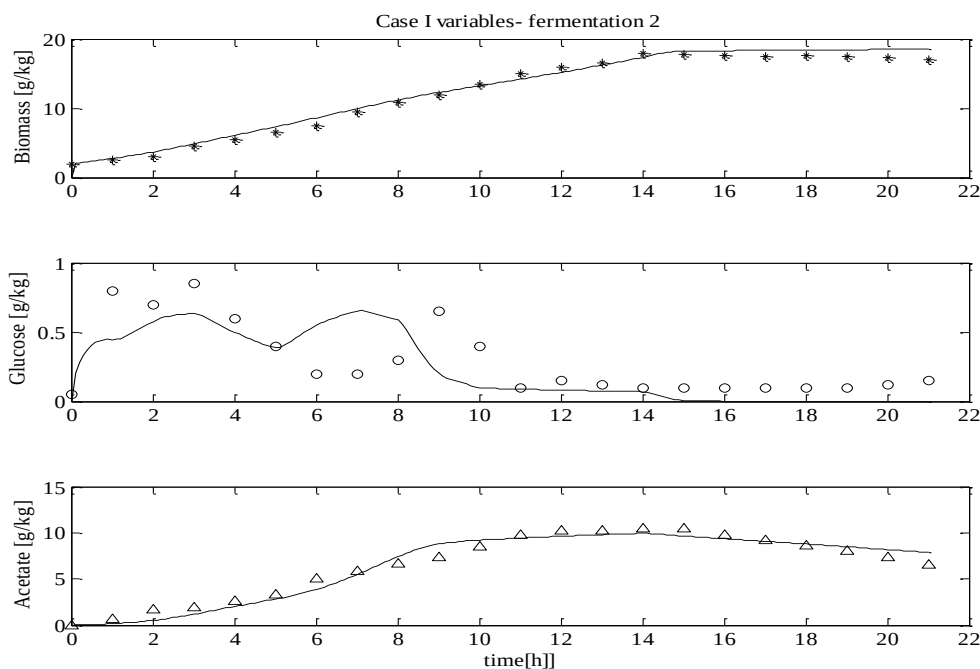
Предложената методология за оценяване на кинетичната структура и параметри за разглеждания случай е дадена на Фигура 2.9 от дисертационния труд и е подобна на тази от Фигура 2.4, свързана само с окислително-ферментативния растеж.

Таблица 2.4. Комбинации от структури за скоростите на консумация на глюкоза и ацетат при моделиране на за окислителен растеж с ключов параметър и условие $R_a < 0$

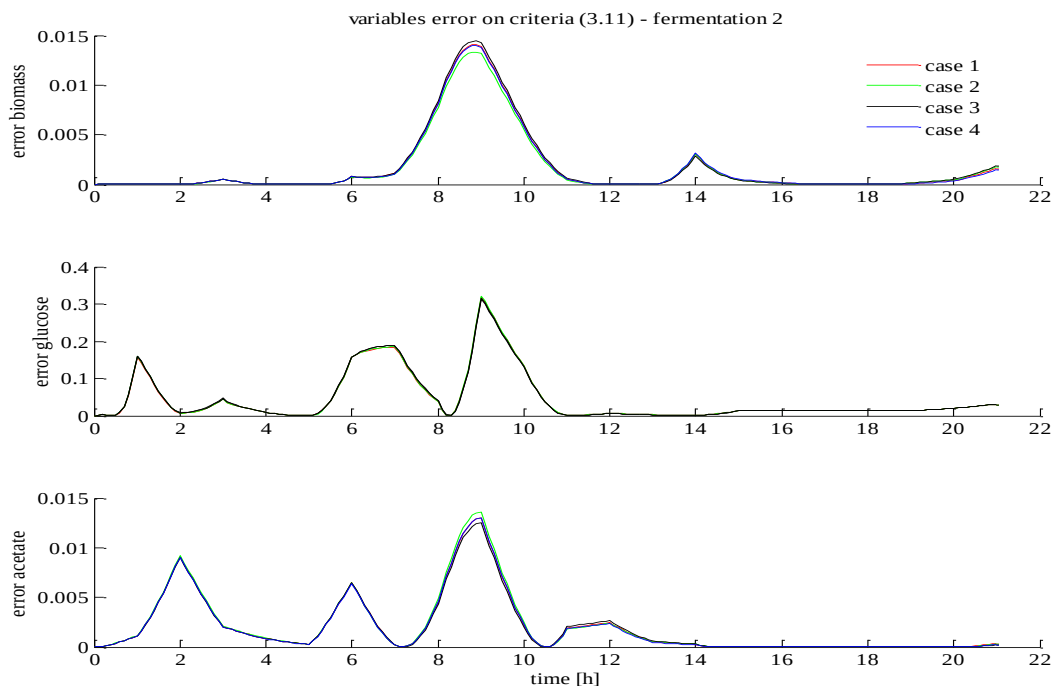
Случай	Скорост на консумация на глюкоза	Скорост на консумация на ацетат	Грешка Нов модел	Грешка Модел Rocha
1	$q_S = q_{Smax} \frac{S}{K_S + S}$	$q_{ac} = q_{acmax} \left(\frac{A}{K_a + A} \right) \left(\frac{K_{ia}}{K_{ia} + A} \right)$	10.25	10.29
2	$q_S = q_{Smax} \frac{S}{K_S + S}$	$q_{ac} = q_{acmax} \left(\frac{A}{K_a + A} \right)$	10.3	10.29
3	$q_S = q_{Smax} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(1 - \frac{A}{K_{i,S}} \right)$	$q_{ac} = q_{acmax} \left(\frac{A}{K_a + A} \right) \left(\frac{K_{ia}}{K_{ia} + A} \right)$	10.324	10.4
4	$q_S = q_{Smax} \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \left(1 - \frac{A}{K_{i,S}} \right)$	$q_{ac} = q_{acmax} \left(\frac{A}{K_a + A} \right)$	10.312	10.3

В таблица 2.4 са показани четирите комбинации от структури на скоростите на консумация на глюкоза и ацетат за тестване на най-добрата комбинация описваща окислителния растеж, както и общата грешка от критерий (2.12) за четирите случая.

На Фигура 2.10 са показани сравнените стойности на моделните и експерименталните данни, аналогично на направеното за модел 1 по-горе. Тук се наблюдава по-засилен ферментативен растеж на биомасата свързан с производството на ацетат. От 15-тия час започва консумиране на междинния метаболит и метаболитното състояние преминава към окислителен растеж върху ацетат, който се характеризира с ниска активност.



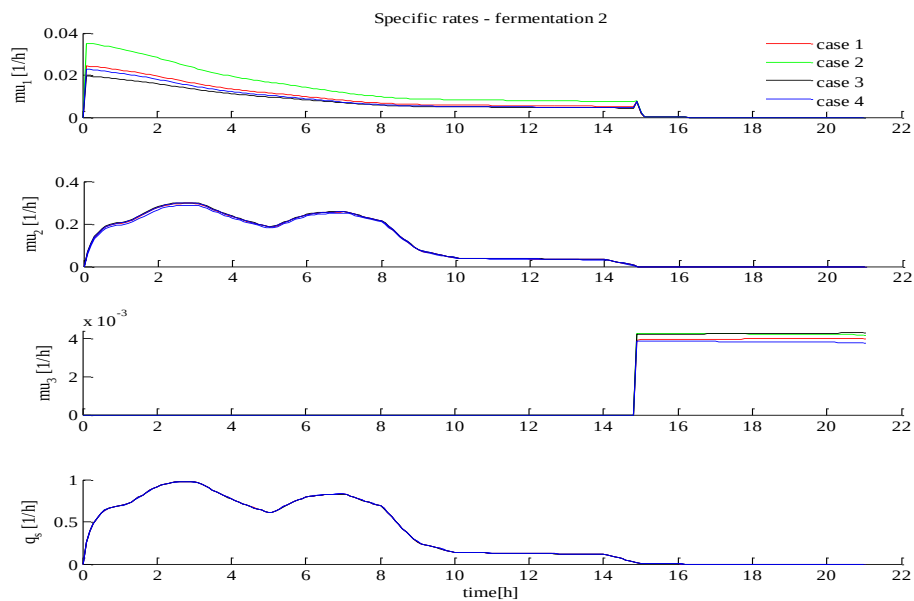
Фигура 2.10 Сравнение на моделните (с непрекъсната линия) и експериментални стойности на биомаса (*), глюкоза (o) и ацетат (Δ) за Случай 1 от Табл. 2.3



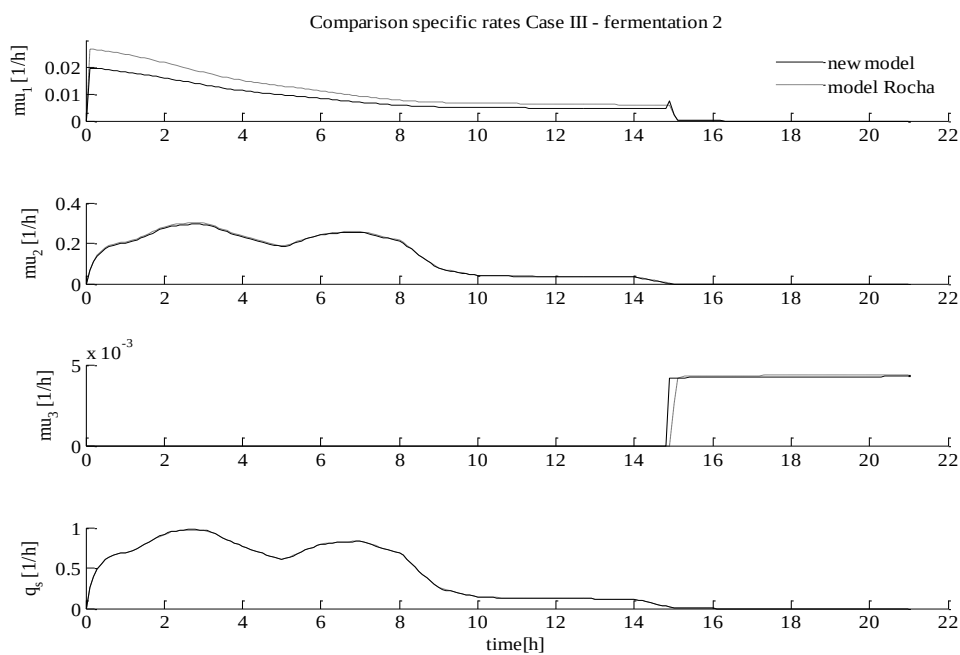
Фигура 2.11а. Сравнение на грешките от критерий (2.12) на биомаса, глюкоза и ацетат за случаи 1-4 от Табл. 2.3

На Фигура 2.11а са сравнени резултатите от моделирането на четирите случая от таблицата. Общите грешки са много близки по стойност и това показва, че инхибирането по ацетат не влияе на скоростта на неговата консумация при окислителен растеж, както и на скоростта на консумация на глюкоза. При глюкозата по-голямата грешка може да обясни с неточното измерване на ниските стойности на глюкозата, разтворена в културалната среда. Максималните стойности на тези относителни средно-квадратични грешки при биомасата и ацетата не надвишават 15%, докато при глюкозата – 30%, което може да се приеме за добра точност при моделирането на този процес. На Фигура 2.11b са показани съответните специфични скорости.

На Фигура 2.13 са сравнени резултатите от новия модел и за модел *Rocha* за Случай 3 от Таблица 2.4. Почти еднакви стойности на грешките при всички варианти на двата модела, дадени в същата таблица, показват адекватността им при описание на разглежданите метаболитни състояния. Малките отклонения в стойностите на променливите се отразява в незначителни такива при специфичните скорости μ_1 и μ_3 , което може да се види от фигурата, докато стойностите за μ_2 и q_s почти напълно съвпадат.



Фигура 2.11b. Сравнение на специфичните скорости за Случаи 1-4 от Таблица 2.3



Фигура 2.13 Сравнение на специфичните скорости на растеж и консумация за двата модела

Глава III Мониторинг на две физиологични състояния при периодична с подхранване ферментация на *Escherichia coli*

Операционният модел на процеса се извежда от първите две реакции на схемата - 2.0a и 2.0b. Състои от два под-модела (3.1) и (3.2), описващи окислителното и окислително-ферментативното физиологично състояние, съответно както следва:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 \\ -k_1 \\ 0 \end{bmatrix} \mu_1(t) X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} + \frac{F_{in,s}}{W} \begin{bmatrix} 0 \\ S_{in} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (3.1)$$

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 \\ 0 & k_3 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_1(t) \\ \mu_2(t) \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} + \frac{F_{in,s}}{W} \begin{bmatrix} 0 \\ S_{in} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (3.2)$$

където скоростите на растеж R_{X1} и R_{X2} се разглеждат като неизвестни нестационарни параметри, които са свързани с концентрацията на биомаса и специфичните скорости μ_1 и μ_2 посредством изразите:

$$R_{X1} = \mu_1 X$$

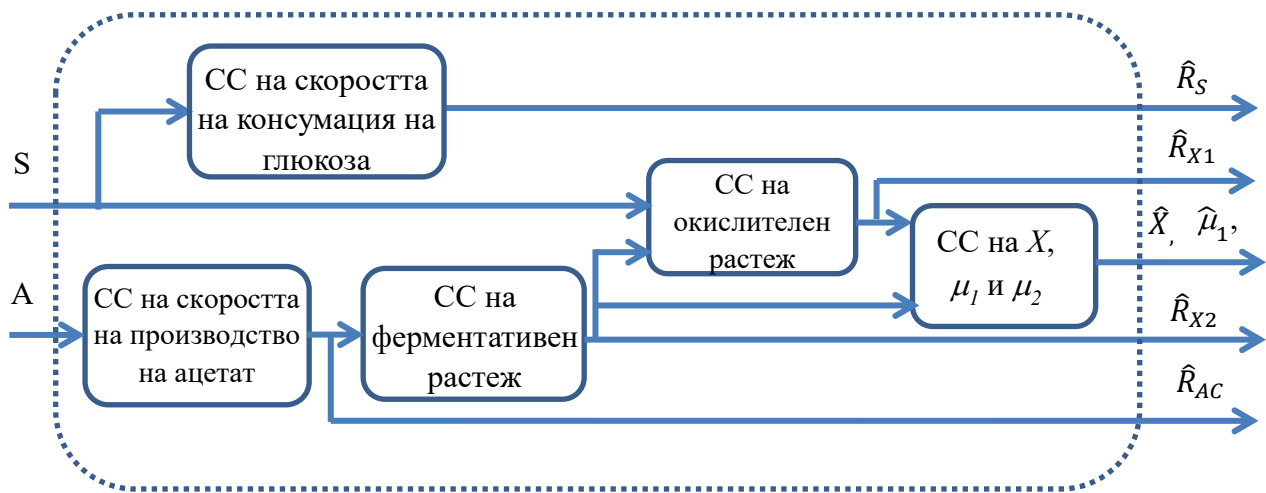
$$R_{X2} = \mu_2 X$$

За реализацията на новия метод за мониторинг е разработена каскадна схема от софтуерни сензори. Входната информация включва измервания в реално време на концентрациите на ацетата (A) и глюкозата (S). Изходите на схемата за мониторинг са оценените:

- ✓ Скорост на производство на ацетат, R_{ap} – първа стъпка от каскадната структура;
- ✓ Скорост на ферментативен растеж на биомасата, R_{X2} – втора стъпка;
- ✓ Скорост на окислителен растеж на биомасата, съответно R_{X1} – трета стъпка;
- ✓ Концентрация на биомасата, X , и специфичните скорости на растеж, μ_1 и μ_2 , отнасящи се съответно за окислителния и ферментативен растеж на биомасата – четвърта стъпка;
- ✓ Скорост на консумация на глюкоза, R_S - оценките на този параметър не се включват в каскадната структура, но дават ценна информация за процеса, както и могат да се използват при верификация на получените оценки за скоростите.

Разработените по-долу софтуерни сензори са изведени според следните допускания:

- ✓ Параметрите на модели (3.1), (3.2), свързани с транспортната динамика – скорост на разреждане, скорост на подхранване, концентрация на глюкозата в разтвора за подхранване и теглото на културалната среда в биореактора са известни;
- ✓ Параметрите k_1 – k_3 , които са обратно пропорционални на коефициентите на добив са известни константи.



Фигура 3.1 Схема на каскадният софтуерен сензор

В зависимост от стойностите има два случая: когато кинетиката на междинния метаболит ацетат, R_a , е равна на 0 – системата е в състояние на окислителен растеж и схемата се редуцира само до трета стъпка от каскадата. При стойности на R_a по-големи от 0 има производство на ацетат, метаболитното състояние е окислително-ферментативно и се активира цялата схема.

Софтуерният сензор на скоростта на производство на ацетат има следния вид:

$$\frac{d\hat{A}}{dt} = \hat{R}_{ap} - DA_m + w_1(A_m - \hat{A}) \quad (3.5a)$$

$$\frac{d\hat{R}_{ap}}{dt} = w_2(A_m - \hat{A}) \quad (3.5b)$$

където $\hat{R}_{ap}$ и $\hat{A}$ са оценките за скоростта на производство на ацетат (R_{ap}) и концентрацията на ацетат (A), A_m – измерените стойности на A , включващи бял шум (ε_1), $A_m = A + \varepsilon_1$; w_1 и w_2 – параметри за настройка на оценителя, чиито стойности трябва да изпълняват условията за устойчивост. Уравнение (3.5b) е изведено при допускане, че динамиката на оценките на R_{ap} се управлява от разликата между измерената и оценена стойност на ацетата, умножена с параметъра за настройка w_2 .

Направен е анализ на устойчивостта с дефиниране на грешките $\tilde{A} = A_m - \hat{A}$ и $\tilde{R}_{ap} = R_{ap} - \hat{R}_{ap}$, като $\hat{A}$ и $\hat{R}_{ap}$ са получени от уравнения (3.5a), (3.5b). Изведена е следната система на грешките от оценяване:

$$\frac{dx}{dt} = Ax + v \quad (3.4)$$

където

$$x = \begin{bmatrix} \tilde{A} \\ \tilde{R}_{ap} \end{bmatrix} \quad A = \begin{bmatrix} -w_1 & 1 \\ -w_2 & 0 \end{bmatrix} \quad v = \begin{bmatrix} -\varepsilon_1(D + w_1) \\ -\varepsilon_1 w_2 + \frac{dR_{ap}}{dt} \end{bmatrix}$$

Приема се, че h_1 и h_2 са реални собствени стойности на матрицата $\mathbf{A}$, свързани по дефиниция с коефициентите w_1 и w_2 . Изборът те да бъдат еднакви по стойност има следните предимства: редуцират се степените на свобода на алгоритъма за оценяване; позволява се една лесна интерпретация от гледна точка на сходимостта; изчисленията на параметрите за настройка са директни и ясни.

Следваща стъпка от схемата от Фигура 3.1 включва софтуерен сензор на скоростта на окислителен растеж, R_{X1} . Той е изведен от динамичното уравнение за концентрацията на глюкоза, S , и входове: измерванията за S , както и оценките на R_{X2} получени (3.5) и (3.8).

Софтуерният сензор има следния вид:

$$\frac{d\hat{S}}{dt} = -k_1\hat{R}_{X1} - k_2\hat{R}_{X2} - DS_m + \frac{F_{in,S}}{W}S_{in} + w_3(S_m - \hat{S}) \quad (3.9a)$$

$$\frac{d\hat{R}_{X1}}{dt} = w_4(S_m - \hat{S}) \quad (3.9b)$$

където $\hat{R}_{X1}$ - оценките от R_{X1} , w_3 и w_4 - параметри на оценителя (3.9), чиито стойности за избрани според процедурата, описана от уравнение (3.7b).

Оценяването в реално време на концентрацията на биомаса и специфичните скорости се осъществява на базата на балансово уравнение на концентрацията на биомасата:

$$\frac{d\hat{X}}{dt} = \hat{R}_{X1} + \hat{R}_{X2} - D\hat{X} \quad (3.11)$$

където $\hat{R}_{X1}$ и $\hat{R}_{X2}$ са съответно оценките за скоростите на окислителен, R_{X1} , и ферментативен, R_{X2} , растеж, а $\hat{X}$ - оценките за концентрация на биомасата X . Последните позволяват изчисляването на специфичните скорости μ_1 и μ_2 , отговарящи на скоростите на окислителен R_{X1} , и ферментативен R_{X2} растеж, както следва:

$$\hat{\mu}_1 = \hat{R}_{X1}/\hat{X} \quad (3.12a)$$

$$\hat{\mu}_2 = \hat{R}_{X2}/\hat{X} \quad (3.12b)$$

Оценяването на скоростта на консумация на глюкоза от измервания на този субстрат, подобно на софтуерния сензор (СС) (3.5), може да бъде осъществено чрез оценител на базата на наблюдател (ОБН) представен със следната система:

$$\frac{d\hat{S}}{dt} = \hat{R}_S - DS + \frac{F_{in,S}}{W}S_{in} + w_5(S_m - \hat{S}) \quad (3.13a)$$

$$\frac{d\hat{R}_S}{dt} = w_6(S_m - \hat{S}) \quad (3.13b)$$

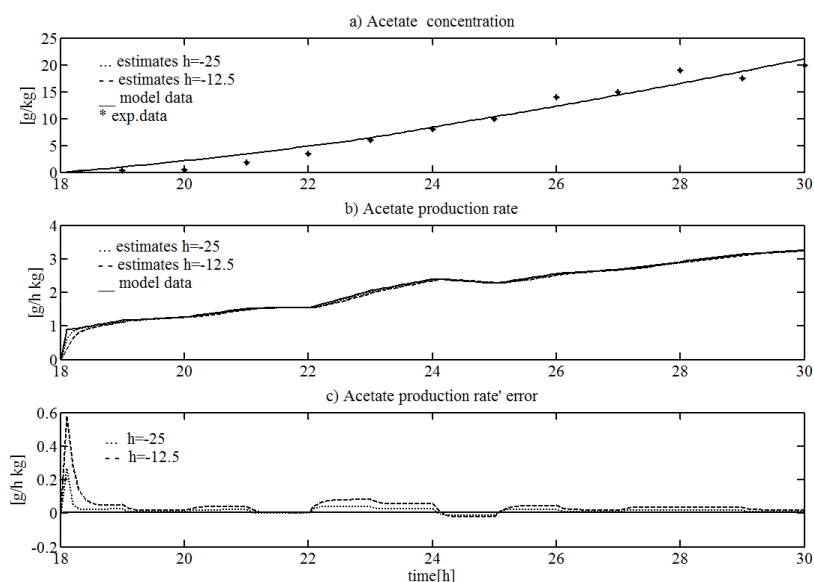
където S_m са измерените стойности на концентрацията на глюкоза включващи бял шум (ε_2), $A_m = A + \varepsilon_2$, $\hat{R}_S$ - оценки на скоростта на консумация на глюкоза, които са с отрицателни стойности поради консумацията на субстрата; $\hat{S}$ - оценки на концентрацията на глюкоза; w_5 and w_6 - параметри за настройка на СС, като отново се избират двойни собствени стойности.

Направен е анализ на симулационните изследвания на мониторинга на две физиологични състояния при предложени СС на базата на неструктурния модел от Глава II, като параметрите на модела са както следва:

Таблица 3.1. Стойности на параметрите на модела

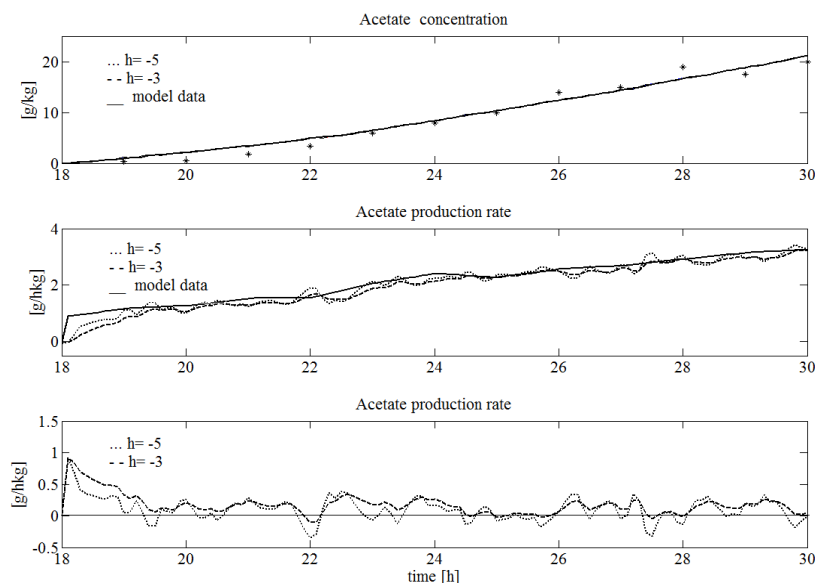
Параметри	$q_{s,max}$	K_s	k_1	k_2	k_3	k_{os}	q_{omax}	K_{io}
Стойности	2.044	0.148	2.67	20.59	10.77	2.184	0.685	20.198

На Фигура 3.2a са сравнени моделните, оценените и експериментални стойности на концентрацията на ацетат. До 18-ти час в културалната среда не е натрупан никакъв ацетат и микроорганизмите се намират единствено в състояние на окислителен растеж върху глюкоза. След този период започва производство на ацетат и микроорганизмите растат в условия на окислително-ферментативно физиологично състояние. На Фигура 3.2b са сравнени моделните и оценени стойности на скоростта на производство на ацетат. Тествани са собствени стойности: $h = -25$ и $h = -12.5$ за изследване на сходимостта на оценките и тяхната чувствителност по отношение на производната dR_{ap}/dt . Резултатите са с пренебрежимо малки разлики за оценките при двата случая. Грешките от оценяването, представени на Фигура 3.2c демонстрират по-добрата сходимост и точност при по-високата собствена стойност, особено в началото на ферментативната фаза, където максималната относителна грешка достига 60% за $h = -12.5$ и 25% за $h = -25$.



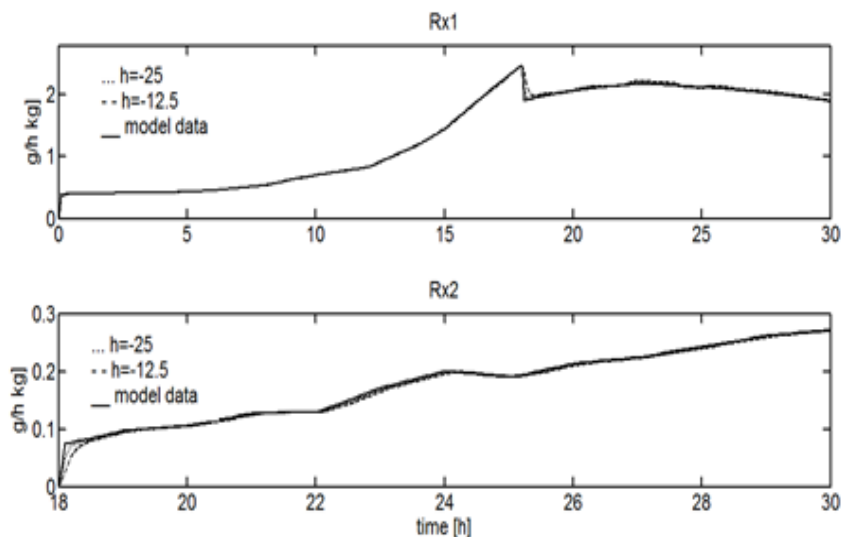
Фигура 3.2. Оценяване на скоростта на продуциране на ацетат без добавен шум в измерванията на концентрацията на междинния метаболит

На Фигура 3.3, е осъществено изследване със същия СС при добавен бял шум ε към ацетатните измервания, чието средно отклонение представлява 1% от средната стойност на ацетатната концентрация. Симулациите са осъществени с използването на по-ниски собствени стойности в сравнение с предишното изследване, тъй като чувствителността по отношение на шума е много висока при h надвишаваща 5. Предложените собствени стойности при настройката са добър компромис между скорост на сходимост и чувствителност на оценките за разглежданите смущения. По-високата собствена стойност е по-добър избор за настройка на оценителя, тъй като дава по-малки грешки и по-добра сходимост в началото на ферментативното метаболитно състояние.



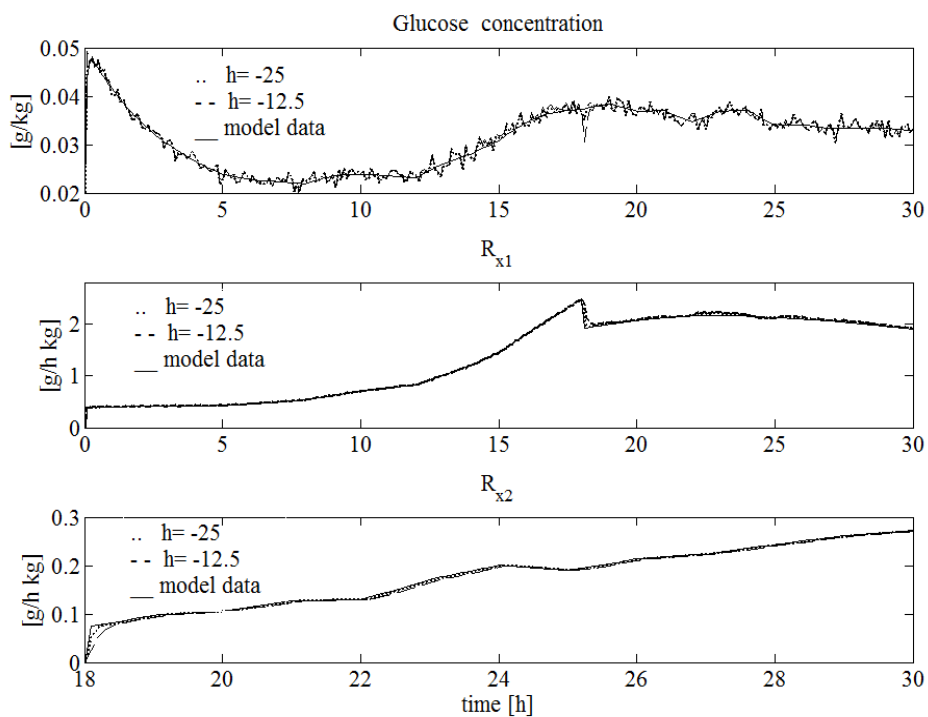
Фигура 3.3. Оценяване на скоростта на продукция на ацетат при 1% адитивен шум в измерванията на концентрацията на междинния метаболит

На Фигура 3.4 са оценени скоростите на окислителен и ферментативен растеж без внесени смущения. По-големите относителни грешки се дължат на по-ниските стойности на параметрите по време на скока в началото на ферментативния растеж.

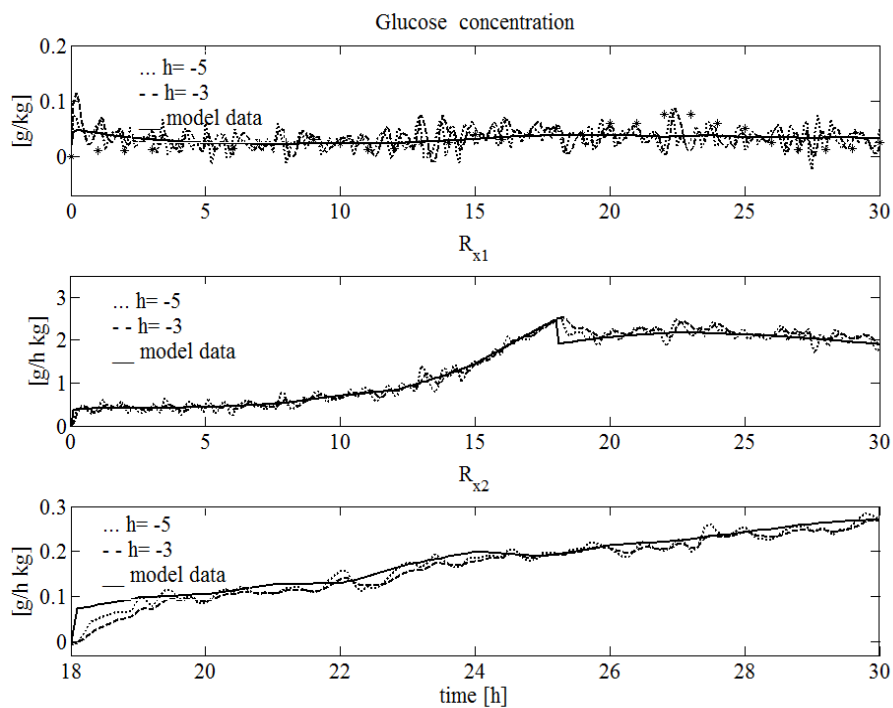


Фигура 3.4. Оценяване на скоростите на окислителен и ферментативен растеж без смущения в измерванията

На следващите две фигури са представени оценките на същите скорости, но при добавени 3% адитивен шум в измерванията на глюкозата и 1% бял шум в измерванията на ацетата. Грешките при оценяване намаляват в приемливи граници, когато се избират по-високи собствени стойности. Влошеното качество при Фигура 3.8 се обяснява с ниските стойности на концентрацията на глюкозата и по-силното влияние на шума от ацетата.



Фигура 3.6. Оценяване на скоростите на окислителен и ферментативен растеж при 3% смущения в измерванията на глюкоза



Фигура 3.8. Оценяване на скоростите на окислителен и ферментативен растеж при 1% смущения в измерванията на ацетат

От осъществените изследвания са направени следните по-важни изводи:

- ✓ Предложената схема за мониторинг дава възможност да бъдат оценени с добра точност скоростите на растеж в окислително-ферментационно метаболитно състояние
- ✓ По-силно влияние върху качеството на оценките оказва шума при измерване на ацетата в сравнение с този при измерване на глюкозата, което се дължи на различните нива на концентрациите на тези променливи по време на ферментационния процес
- ✓ Настройката на предложените софтуерни сензори е сведена до избор на една собствена стойност, която се определя като компромис между скоростта на сходимост на оценките и тяхната чувствителност по отношение на смущенията
- ✓ Скоростта на окислителен растеж се оценява с по-добра точност от тази на ферментационния, което се дължи на стойностите на тези променливи и различното влияние на смущенията по време на ферментацията.
- ✓ Мониторингът на концентрацията на биомаса се осъществява с най-висока точност.

Влиянието на шумове в измерванията на ацетата и глюкозата върху специфичната скорост на окислителен растеж е по-силно в началото на процеса, когато концентрацията на биомаса е с ниски стойности.

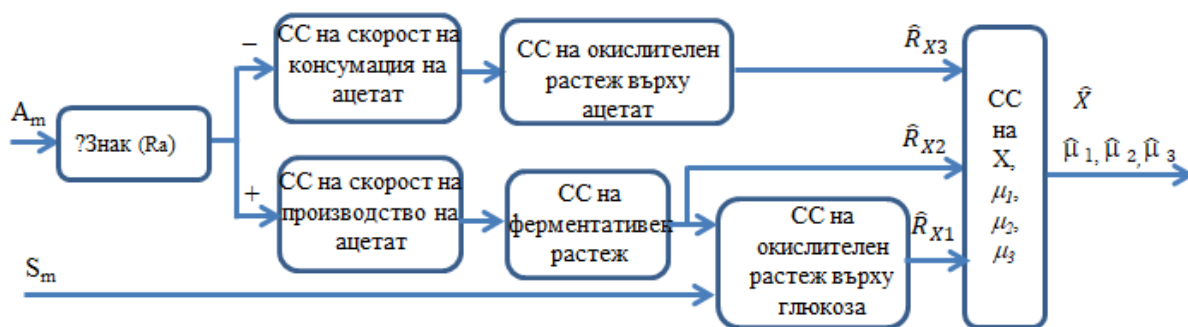
Глава IV Мониторинг на три физиологични състояния при периодична с подхранване ферментация на *Escherichia coli*

Подобно на изведения операционен модел в Глава III, операционният модел на процес, преминаващ през трите състояния, се състои от модели (4.1) и (4.2), описващи динамиката както на окислително-ферментативен растеж върху глюкоза така и на окислителен растеж върху ацетат:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & -k_2 \\ 0 & k_3 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_1(t) \\ \mu_2(t) \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} + \frac{F_{ins}}{W} \begin{bmatrix} 0 \\ S_{in} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (4.1)$$

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & 1 \\ -k_1 & 0 \\ 0 & -k_4 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \mu_1(t) \\ \mu_3(t) \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ S \\ A \end{bmatrix} + \frac{F_{ins}}{W} \begin{bmatrix} 0 \\ S_{in} \\ 0 \end{bmatrix} \quad (4.2)$$

Изведеният софтуерен сензор има вида :



Фигура 4.1. Каскадна схема от софтуерни сензори

Входната информация при този СС е същата като предишния, а изходите са трите скорости на растеж на биомасата, нейната концентрация и съответните специфични скорости. Ако кинетиката на ацетата е по-голяма от 0 това показва окислително-ферментативен растеж върху глюкоза. При стойност по-малка от нула е случаят на окислителен растеж върху ацетат. Ако е равна на нула – се наблюдава пълно консумиране на натрупания в културалната среда ацетат или липсата на такъв изцяло.

Оценяването в реално време на скоростта на консумация на е подобна на тази на (3.5):

$$\frac{d\hat{A}}{dt} = \hat{R}_{ac} - DA + w_5(A - \hat{A}) \quad (4.3a)$$

$$\frac{d\hat{R}_{ac}}{dt} = w_6(A - \hat{A}) \quad (4.3b)$$

където $\hat{R}_{ac}$ и $\hat{A}$ са съответно оценките на скоростта на консумация на ацетат, R_{ac} , и концентрацията на ацетат, A , w_5 и w_6 - параметри за настройка. Тъй като стойностите на $\hat{R}_{ac}$ са отрицателни, параметрите за настройка са изчислени на базата на следните изрази:

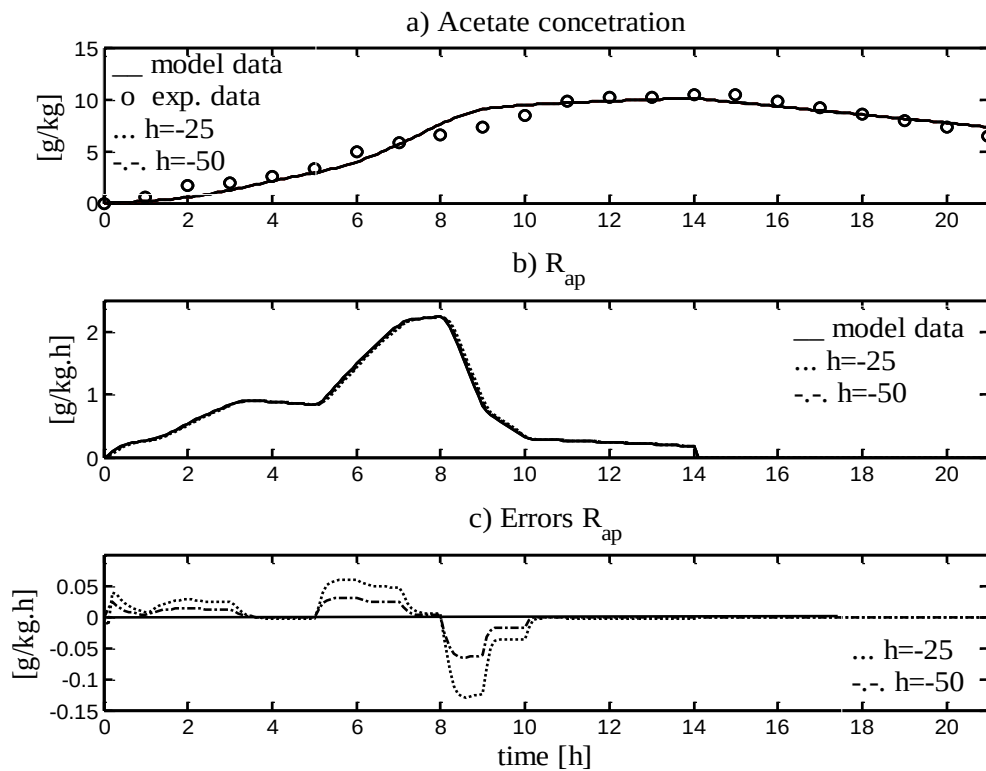
$$w_5 = -2h \quad w_6 = -w_5^2/4 \quad (4.4)$$

Отново е направен анализ на симулационните изследвания при мониторинга на три физиологични състояния при предложения СС на базата на неструктурния модел от Глава II, с параметри:

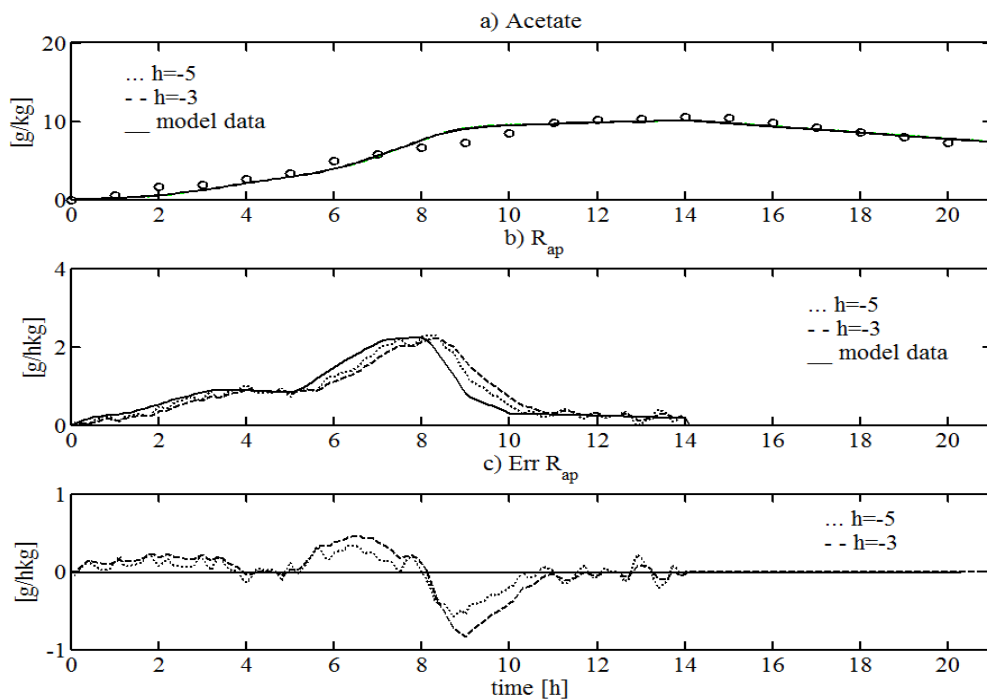
Таблица 4.1. Стойности на кинетичните параметри на биохимичния модел

Параметър	$q_{s,max}$	K_s	k_1	k_2	k_3	k_4	k_{os}	$q_{o,max}$	$K_{i,o}$	$q_{ac,max}$	K_a	K_{ia}
Стойност	11.34	7.17	2.06	3.17	0.72	8.9	5.47	0.28	2.8	0.04	0.37	84.8

На Фигура 4.2 са представени резултатите от работата на СС. Изследвани са две настройки – със собствени стойности $h = -25$ и $h = -50$. Резултатите, представени на Фигури 4.2a и 4.2b показват много малки разлики в оценките на ацетата и скоростта на производството му за двата разглеждани случая. Грешките от оценяване, показани на Фигура 4.2c са по-малки и с по-добра сходимост при по-високата собствена стойност. Максималните относителни грешки са 13% при $h = -25$ и 5% при $h = -50$.



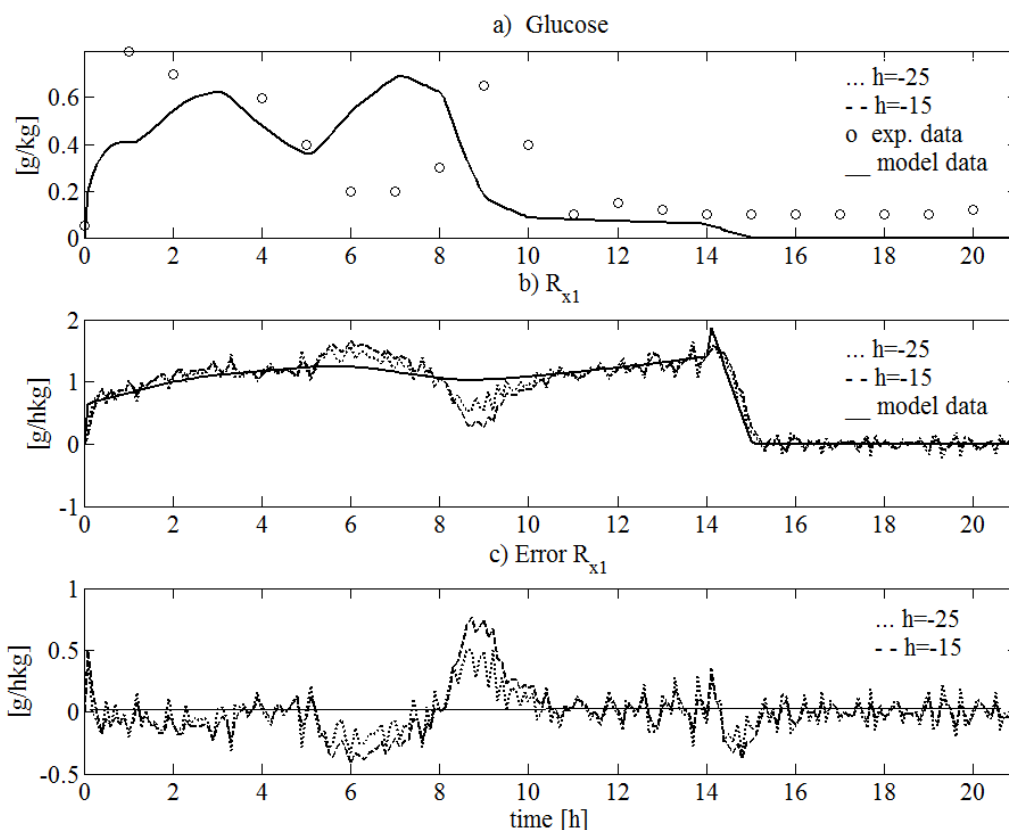
Фигура 4.2 Оценяване на скоростта на производство на ацетат без шум в измерването на концентрацията на междинния метаболит



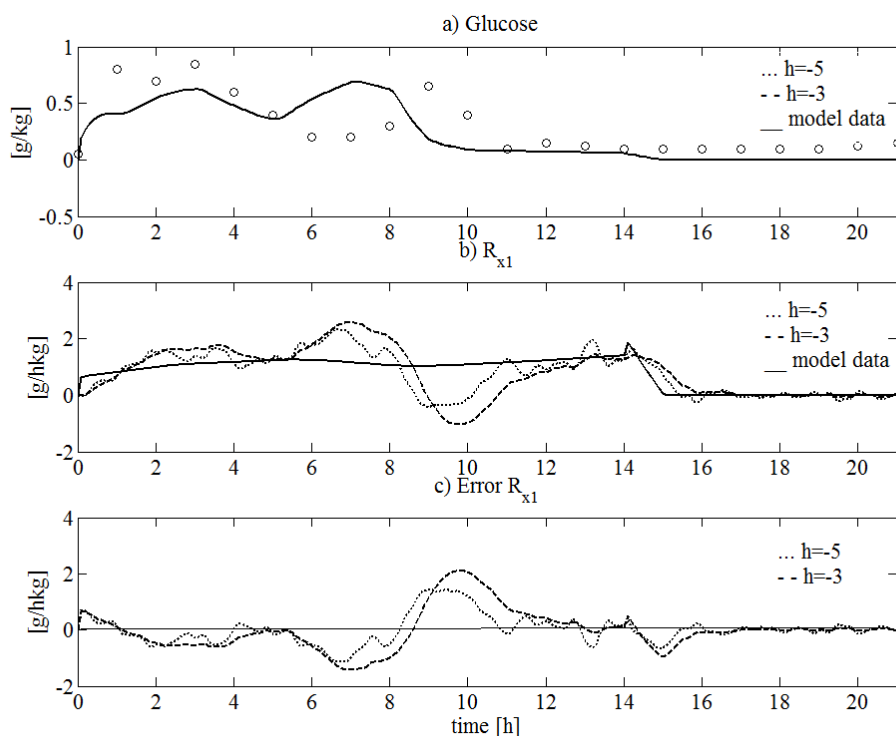
Фигура 4.3 Оценяване на скоростта на производство на ацетат с 1% шум в измерването

На Фигура 4.3 са представени резултатите със същия СС, но при добавяне на шум към измерванията на ацетата, който представлява адитивен бял шум с 1% отклонение от средната стойност на ацетатната концентрация. Симулационните изследвания са осъществени при две по-ниски собствени стойности при настройката в сравнение с изследванията без шум – $h = -3$ и $h = -5$, тъй като при по-високи стойности чувствителността на оценките по отношение на шума, както и съответните грешки са много високи. От друга страна по-ниските собствени стойности намаляват сходимостта на оценките към „истинските“ (моделни) стойности на R_{ap} . Максималните относителни грешки са около 50% за $h = -3$ и 27% за $h = -5$. Те се появяват около 9-ти час, когато скоростта на производство намалява най-бързо.

На следващите две фигури са показани резултатите от оценяването на скоростта на окислителен растеж върху глюкоза при добавен 3% адитивен шум в измерването на глюкоза и при добавяне на 1% шум в ацетата, подобно на изследванията в предишната глава. Отново по-силно влияние оказва шума от ацетата, а значителните отклонения в оценките показват необходимостта от предварително филтриране на данните.



Фигура 4.7 Оценяване на скоростта на окислителен растеж върху глюкоза при 3% шум в измерване на глюкозата



Фигура 4.8 Оценяване на скоростта на окислителен растеж върху глюкоза при 1% шум в измерване на ацетата

От осъществените изследвания и сравнението на резултатите при Ферментации 1 и 2 могат да бъдат направени следните по-важни изводи:

- ✓ При Ферментация 2, предложената схема за мониторинг, в състояние на липса на шумове в измерванията, дава възможност да бъде оценена с много добра точност само скоростта на ферментативен растеж. С по-ниска точност се оценяват скоростта на окислителен растеж върху ацетат, както и концентрацията на биомаса. С най-висока грешка е оценена скоростта на окислителен растеж върху глюкоза.
- ✓ По-силно влияние върху качеството на оценките оказва шума при измерване на ацетата в сравнение с този на глюкозата, което се дължи на различните нива на концентрациите на тези променливи по време на ферментацията.
- ✓ Настройката на предложените софтуерни сензори е сведен до избор на една собствена стойност, който се определя като компромис между скоростта на сходимост на оценките и тяхната чувствителност по отношение на смущенията
- ✓ Влиянието на смущенията при оценяване на скоростите на производство и консумация на ацетат е по-силно при скоростта на консумация. Когато смущението е шум от измерване, това се дължи на по-ниските стойности на скоростта на консумация, а когато смущението е съответната производна, това се дължи на стъпаловидния профил на скоростта на консумация.
- ✓ Грешките от оценяване на скоростта на ферментативен растеж не оказват значително влияние, когато се използват като вход за оценяване на окислителния растеж върху глюкоза при Ферментация 1, докато при Ферментация 2 това

влияние е значително дори без наличие на шумове в измерванията. Това може да се обясни с различната динамика на тези скорости при двете ферментации, произтичаща от различната динамика и стойности на концентрациите на ацетат и глюкоза. По тази причина влиянието на приблизително еднаквите за двете ферментации шумове от измерванията на глюкозата и ацетата е по-силно при Ферментация 2. Тъй като този извод важи и за съответните специфични скорости, грешките от оценяване на концентрацията на биомаса са по-високи при Ферментация 2.

- ✓ При състояние на окислителен растеж върху ацетат, присъстващ само при Ферментация 2, грешките за биомасата са ниски и се дължат на бързо затихващата грешка на единствената скорост на растеж при това метаболитно състояние.

Глава V Заключение

На базата на резултатите от дисертацията са изведени следните **по-важни изводи**:

1. От предложените в литературата модели, описващи динамиката на процеси с щам *E. coli*, неструктурният (модел *Rocha*) е приет като база за изследванията в дисертационния труд тъй като описва с добра точност динамиката на процеса и е с достатъчно проста структура. Той се състои от два под-модела, описващи окислително-ферментативен растеж на биомасата върху глюкоза и окислителен растеж върху глюкоза и ацетат, които се превключват в зависимост от стойността на ключов параметър (маркер) – окислителния капацитет на ферментатора.
2. Предложеният маркер от т.1 за разпознаване на различните метаболитни състояния включва кинетичен израз с постоянни коефициенти, което може да компрометира точността на резултатите имайки предвид природата на биопроцесите. Предложеният в дисертацията модел с друг маркер - кинетиката на междинния метаболит дава по-точни резултати за всички изследвани промени на физиологичните състояния. По-добрите резултати могат да се обяснят с факта, че този ключов параметър е:
 - ✓ най-информативен от използваните в литературата маркери по отношение на това в какво метаболитно състояние се намира процеса;
 - ✓ адаптивен, тъй като зависи само от измервания в реално време.
3. Разработените каскадни схеми от СС за мониторинг на две (Глава III) и три (Глава IV) физиологични състояния оценяват с добра точност кинетиката на изследваните процеси, както и неизмеримата концентрация на биомаса. Каскадните схеми комбинират оценители на базата на наблюдатели и адаптивни линейни наблюдатели поради предимствата на този вид СС.
4. Настройката на предложените софтуерни сензори от т. 3 е сведена до избор на една собствена стойност, която се определя като компромис между скоростта на сходимост на оценките и тяхната чувствителност по отношение на смущенията. Изследвано е влиянието на шум в измервания на глюкозата и ацетата, като по-силно влияние върху оценките има шума при измерване на ацетат.

Научно-приложни приноси от дисертационната работа

1. Предложен е нов подход за моделиране на динамиката на биотехнологични процеси, характеризиращи се с производство и консумация на междинен метаболит, който се измерва в реално време. Той се базира на въвеждане на адаптивен ключов параметър (маркер) за разпознаване на текущото физиологично състояние, чрез който се постига по-точно описание на процесите.
2. Доказана е работоспособността на предложения подход чрез симулационни изследвания на базата на данни от две ферментации с *E. coli*.
3. На базата на новия подход е разработена обща каскадна схема от софтуерни сензори за мониторинг на кинетиката на биотехнологичните процеси от т.1.
4. Предложен е алгоритъм за настройка на параметрите на софтуерните сензори чрез анализ на устойчивост. Изследвано е влиянието на различни вътрешни и външни смущения.
5. Доказана е работоспособността на предложената каскадна схема за мониторинг чрез симулационни изследвания на модификациите на структурата ѝ в зависимост от стойността на адаптивния маркер и броя на метаболитните състояния на процеса.

Публикации, свързани с дисертацията

Статии реферирани в SCOPUS

1. Zlatkova A., V. Lyubenova, S. Dudin, M. Ignatova (2017) Marker For Switching Of Multiple Models Describing *E. coli* Cultivation, *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, Vol. 70, No 2, 263-272.
2. Petelkov I., V. Lyubenova, A. Zlatkova, V. Shopska, R. Denkova, M. Kaneva, G. Kostov (2016) Encapsulation Of Brewing Yeast In Alginate/Chitosan Matrix: Kinetic Characteristics Of The Fermentation Process At A Constant Fermentation Temperature *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences* Vol. 69, No 10. Pages 1355-1364.
3. Zlatkova A., V. Lyubenova (2017). Dynamics Monitoring of Fed-batch *E. coli* Fermentation. *International Journal Bioautomation*, 21(1), 121-132.

Доклади на конференции

4. Zlatkova A., V. Lyubenova, M. Ignatova (2017) Monitoring Of Oxidative-Fermentativephysiological States In Fed-Batch *E. Coli* Fermentation. *Proceed. International Conference "AGRICULTURE AND FOOD FOR THE XXI CENTURY"* May 11-13, 2017, Sibiu, Romania, 25-36. Докладът е изнесен от младия учен Анастасия Златкова.
5. Zlatkova A., V. Lyubenova (2017) Monitoring The Dynamics Of Bioprocesses Using Intermediate Metabolite *International Conference "Automatics&Informatics"* 4-6 October 2017, p. 231-234.
6. Златкова А., В. Любенова, М. Игнатова (2016) Разпознаване на физиологични състояния при периодично с подхранване култивиране на *E. Coli* Първа Национална конференция за докторанти 2016, Пловдивски университет "Паисий Хилендарски", Биологически факултет, 01.11.2016, постер, резюме.
7. А. Златкова, В.Любенова (август, 2019) Иновационни подходи за мониторинг на сложни био-процеси, Втори Интердисциплинарен докторантски форум, хотел „Самоков“, Боровец, доклад, награден.

The complex mechanisms of biotechnological processes, which are still unknown or not fully studied, lead to the need to study them and formalize the acquired knowledge with models. For the purposes of adaptive monitoring and management, one of the most suitable for these processes due to their specific nature, it is necessary that the proposed models meet certain requirements such as quality and structure. The dissertation is dedicated to the modeling and monitoring of the dynamics of the processes in the cultivation of *E. coli* strain, one of the most frequently used model microorganisms in biotechnology.

The first chapter summarizes the literature review, which includes two parts. The first part discusses the approaches proposed in the literature for modeling of biotechnological processes. The General Dynamic Model, its structure and advantages, as well as the problems in modeling the reaction rates are discussed in more detail. Kinetic models for *E. coli* are also shown - consumption and saturation with glucose, consumption of acetate and specific growth rates. Methods for models' identification of fermentation processes are considered. The second part of Chapter I deals with the monitoring of the processes of cultivating with *E. coli* - relevance and problems. Software sensors based on models and those based on data are considered. Their classification is presented with examples and connection with the management of the processes, including the advantages and disadvantages of the different monitoring methods. Based on the conclusions from the literature review, the purpose and tasks of the Ph. D. thesis are derived.

The second chapter focuses on the development of models describing the different metabolic states in the cultivation of *E. coli*. Experimental data from two fed-batch fermentations of *E. coli* strain for the production of recombinant proteins are presented. The data from the conducted experiments is analyzed and processed. The model taken from the literature (referred to in the thesis as Rocha model) and used as basis for the new model proposed in the dissertation is described in detail. Rocha model includes two submodels that describe three physiological states of the process, which are activated depending on the kinetic model of the oxidative capacity of the fermentor. A new key parameter for switching the two submodels - the kinetics of the intermediate metabolite acetate - has been introduced and described. The identification of the parameters of the two models was performed with different kinetic structures and the obtained results were compared and analyzed.

Chapters three and four are very similar in structure. Chapter III discusses the monitoring of two physiological states in fed-batch fermentation of *E. coli* and Chapter IV - monitoring three physiological states in fed-batch fermentation with the same strain. Both chapters follow the same structure - the development of a cascade scheme of software sensors for real-time monitoring of the kinetics of the process and the unmeasurable concentration of the biomass, the relevant operational models of the process, the derivation of the cascade structure of software sensors, analysis of their stability and adjustment of their parameters. An analysis of the results of the simulations of both fermentations with and without noise in the measurements, was performed.

Chapter V summarizes the content of all chapters as well as the conclusions of the dissertation.