



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA

MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CULTIVOS DE ALTA DENSIDAD EN
BIORREACTORES MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE OBSERVADORES Y
CONTROLADORES DE ORDEN ENTERO Y FRACCIONARIO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN INGENIERÍA ELÉCTRICA

LISBEL BÁRZAGA MARTELL

PROFESOR GUÍA:
DR. MANUEL ARMANDO DUARTE MERMOUD

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
DR. RICARDO PÉREZ CORREA
DR. PEDRO ANDRÉS SAA HIGUERA
DR. NESTOR BECERRA YOMA

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la Beca Nacional de Doctorado (ANID)

SANTIAGO DE CHILE
2021

**RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL
GRADO DE:** Doctora en Ingeniería Eléctrica
POR: Lisbel Bárzaga Martell
FECHA: 27/07/2021
PROFESOR GUÍA: Manuel Armando Duarte Mermoud

**MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE CULTIVOS DE ALTA
DENSIDAD EN BIORREACTORES MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE
OBSERVADORES Y CONTROLADORES DE ORDEN ENTERO Y
FRACCIONARIO**

El presente trabajo aborda la implementación de combinaciones de esquemas que involucran observadores y controladores de orden entero y/o fraccionario basados en un modelo fenomenológico de un cultivo fed-batch de alta densidad de *S. cerevisiae* con metabolismo overflow.

La producción de β -caroteno y β -ionona tiene una gran importancia a nivel comercial, dado su amplio uso en la industria cosmética, de alimentos y salud. Para la síntesis de estos compuestos a nivel industrial se utiliza la levadura *S. cerevisiae* modificada genéticamente, cuyo proceso de cultivo presenta un metabolismo overflow.

Para mantener el sistema bajo un perfil óptimo, se propone utilizar por primera vez un controlador adaptable combinado con control por linealización por retroalimentación y cálculo fraccionario. El control adaptable está orientado directamente a sistemas con parámetros parcialmente desconocidos, mientras que el cálculo fraccionario aplicado a observadores y/o controladores está orientado a procesos que presentan ruido en mediciones, perturbaciones y variaciones paramétricas, donde se obtienen resultados más generales y satisfactorios.

El objetivo del desarrollo de los esquemas de control y estimación enteros y/o fraccionarios en cultivos fed-batch de alta densidad de *S. cerevisiae* es aumentar la producción de biomasa y minimizar la formación de etanol, maximizando así la productividad del proceso fermentativo.

La propuesta de tesis es un aporte importante al conocimiento en el área de control y observación, así como también en el área de procesos fermentativos, al incluir estrategias que hasta el momento no han sido exploradas ni desarrolladas.

Abstract

The present work deals with the implementation of combinations of schemes that involve observers and controllers of integer and fractional order based on a phenomenological model of a high-density fed-batch culture of *S. cerevisiae* with overflow metabolism. The production of β -carotene and β -ionone is of great commercial importance, given its wide use in the cosmetic, food, and health industries. For the synthesis of these compounds at an industrial level is used the genetically modified yeast.

The thesis proposed an adaptive controllers combined with feedback linearization control and fractional calculus for the first time to keep the system under an optimal profile. The adaptive control is directly related to systems with partially unknown parameters. At the same time, the fractional calculus applied to observers and controllers is oriented to processes with measurements noise, disturbances, and parametric variations, where more general and satisfactory results are obtained.

The objective of the development of entire and/or fractional estimation and control schemes in high-density fed-batch culture of *S. cerevisiae* with overflow metabolism is to increase biomass production and minimize ethanol formation, by maximizing the productivity of the fermentation process.

The thesis proposal is an essential contribution to the knowledge in the control and observation area of fermentation processes by including strategies that have not been explored or developed so far.

A mis padres, mis abuelos y a mi esposo.

Agradecimientos

Antes que todo, quisiera agradecerles a mis abuelas Amalia y Oriestela, y mi abuelo Carlos que ya no están junto a mí. Ellos han significado mucho en mi vida. También quiero agradecerle a mi madre Maribel y a mi padre Damián, ellos me han ayudado y apoyado mucho desde la distancia de este viaje que inició hace 4 años atrás. Quiero agradecerle al resto de mi familia, a mi hermana, sobrina, tías y primas y a mis amigos de la Universidad de Chile, en especial a Bastián Gamboa, así como las nuevas amistades que he conocido en esta nueva etapa en Chile.

Quiero agradecer a mi tutor el Dr. Manuel Duarte Mermoud por ayudarme desde un principio con mi viaje a Chile, cuya dedicación y experiencia me ha ayudado a lo largo de estos 4 años de doctorado. Es como un segundo padre en Chile. En especial quiero agradecer a Norelys Águila Camacho, compatriota cubana que me acogió con una sonrisa desde el primer día.

Quiero agradecer al profesor Ricardo Pérez Correa, por la ayuda con el tema de investigación y su apoyo a mi formación. Agradecida por el apoyo de los doctores Juan Carlos Travieso y Pedro Saa Higuera en la elaboración de los artículos científicos con los resultados de esta tesis.

Quiero agradecer a ANID, la beca nacional de doctorado, por su financiamiento durante el doctorado (2017-2021).

Finalmente, el máximo agradecimiento y amor a mi esposo Carlos, que siempre ha estado en todo momento junto a mí animándome a seguir adelante, cruzando mares y fronteras para estar juntos.

A todos, muchas gracias por el apoyo.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Motivación	1
1.2. Descripción del problema general	3
1.3. Hipótesis	3
1.4. Objetivos generales y específicos	3
1.5. Contribuciones	4
2. Estado del Arte – Revisión Bibliográfica	7
2.1. Proceso fermentativo	7
2.1.1. Metabolismo overflow	8
2.1.2. Modelo matemático del biorreactor	9
2.2. Estrategias de control en cultivos de alta densidad	14
2.2.1. Control por linealización por retroalimentación	16
2.2.2. Control Adaptable	16
2.3. Observadores en cultivos de alta densidad	20
2.3.1. Sensores para O_2 , CO_2 y sustrato	21
2.3.2. Observadores de biomasa	22
2.3.3. Observadores de producto y velocidad de crecimiento	22
2.4. Cálculo Fraccionario	23
2.4.1. Conceptos generales de cálculo fraccionario	23
2.4.2. Observadores fraccionarios	25
2.5. Conclusiones	26
3. Diseños de estrategias de control para ADC	28
3.1. Estrategia de control para la velocidad de crecimiento	28
3.2. Análisis de estabilidad del error de control	30
3.3. Control de oxígeno disuelto	31
3.4. Optimización de los parámetros de los controladores	33
3.5. Esquemas propuestos de lazos de control	35
3.6. Conclusiones	37
4. Diseño de observadores para ADC	38
4.1. Introducción	38
4.2. Observador Asintótico	39
4.3. Observador Híbrido	40
4.4. Observador de velocidad de crecimiento	45

4.5. Observador fraccionario de velocidad de crecimiento	47
4.6. Análisis de Observabilidad	47
4.7. Análisis de estabilidad del error de estimación	52
4.8. Optimización de los parámetros de los observadores	53
5. Simulaciones y análisis de Resultados	54
5.1. Condiciones de simulación	54
5.1.1. Función del flujo de alimentación en lazo abierto	55
5.1.2. Índices de desempeño	56
5.1.3. Aproximaciones <i>smooth</i>	57
5.2. Desempeño del observador híbrido a lazo abierto	58
5.2.1. Comportamiento del observador híbrido en el régimen respirativo . .	59
5.2.2. Comportamiento del observador híbrido en el régimen respiro-fermentativo	60
5.2.3. Evaluación de robustez del observador híbrido	61
5.3. Desempeño de la estrategia de control de etanol con observador híbrido . . .	70
5.4. Desempeño de la estrategia de control de velocidad de crecimiento con obser- vador fraccionario	73
5.5. Comparación de diferentes estrategias de control de alta densidad	87
Conclusiones	89
Publicaciones	92
Nomenclatura	94
Bibliografía	98

Índice de Tablas

2.1. Estrategias de control fed-batch en cultivos de alta densidad.	15
3.1. Parámetros optimizados por PSO para las estrategias de control.	34
3.2. Estrategias de control de F_{in}	37
5.1. Parámetros estequiométricos, cinéticos y <i>smooth</i>	55
5.2. Parámetros optimizados por PSO para las aproximaciones <i>smooth</i>	57
5.3. Resultados del índice de desempeño del observador híbrido (IAE)	62
5.4. Resultados del índice de desempeño del observador fraccionario asintótico.	73
5.5. Resultados de las estrategias de control de alta densidad.	87
5.6. Resultados de los índice de desempeño para cada controlador.	89

Índice de Ilustraciones

2.1. La capacidad respiratoria limitada de <i>S. cerevisiae</i> da como resultado del metabolismo overflow: A) Consumo subcrítico de glucosa o etanol, cuando no se ha alcanzado el límite de capacidad oxidativa; B) Consumo crítico de glucosa en máxima capacidad oxidativa; C) Consumo de glucosa supercrítico y producción de etanol.	8
2.2. Comportamiento del sistema en el régimen RF.	12
2.3. Comportamiento del sistema en el régimen R.	13
2.4. Clasificaciones de Observadores.	21
3.1. Control de oxígeno disuelto	32
3.2. Agitación (N), flujo de aire (G), fracción de oxígeno (yO_2) y señal de controlador de O_2	33
3.3. Coeficientes de transferencia volumétrica para el oxígeno kla_{O_2} y el dióxido de carbono kla_{CO_2}	34
3.4. Esquema de control propuesto para la estrategia 1 que incluye observador de etanol y el controlador de O_2	35
3.5. Esquema de control propuesto para la estrategia 2 que incluye observador de biomasa y velocidad de crecimiento y el controlador de O_2	36
5.1. Comportamiento de las funciones <i>smooth</i> (Líneas discontinuas azules) en régimen respirativo.	58
5.2. Comportamiento de las funciones <i>smooth</i> (Líneas discontinuas azules) en régimen respiro-fermentativo.	59
5.3. Estimaciones del observador híbrido en el régimen respirativo con $\mu_{crit} > \mu_{set} = 0,1391/h$ y 5% de ruido de medición.	60
5.4. Estimaciones del observador híbrido en el régimen respiro-fermentativo con $\mu_{crit} > \mu_{set} = 0,1471/h$ y 5% de ruido de medición.	61
5.5. Estimaciones de biomasa (A) y etanol (B) del observador híbrido, filtro de Kalman y el observador asintótico en régimen respirativo.	63
5.6. Estimaciones de biomasa (A) y etanol (B) del observador híbrido, filtro de Kalman y el observador asintótico en régimen respiro-fermentativo.	64
5.7. Comportamiento del flujo de alimentación en los regímenes respiro-fermentativo (Línea azul) y respirativo (Línea marrón).	65
5.8. Estimaciones de etanol del observador híbrido, filtro de Kalman y el observador asintótico con 9% de ruido de medición y condiciones iniciales aleatorias en régimen respirativo.	65

5.9. Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respirativo: Estimaciones de biomasa	66
5.10. Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respirativo: Estimaciones de etanol.	67
5.11. Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respiratorio: Estimaciones de biomasa	67
5.12. Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respiratorio: Estimaciones de etanol.	68
5.13. Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respiratorio: Estimaciones de velocidad de crecimiento.	68
5.14. Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respirativo: Estimaciones de velocidad de crecimiento.	69
5.15. Estimación de concentración de biomasa y flujo de alimentación con un 5 % de ruido.	70
5.16. Estimación de concentración de etanol con un 5 % de ruido y un set-point igual a 0,5 g/L.	71
5.17. Estimación de concentración de etanol con un 5 % de ruido y un set-point igual a 1 g/L.	72
5.18. Comportamiento del sistema para la estrategia de control 1 y el observador híbrido.	72
5.19. Error de estimación para diferentes órdenes de derivación con un 5 % de ruido.	74
5.20. Estimación de biomasa para diferentes órdenes de derivación con un 5 % de ruido.	75
5.21. Estimación de etanol para diferentes órdenes de derivación con un 5 % de ruido.	75
5.22. Perfiles de flujo de alimentación exponencial para diferentes órdenes de derivación con un 5 % de ruido.	76
5.23. Error paramétrico para diferentes órdenes de derivación con un 5 % de ruido.	76
5.24. Simulaciones de Monte Carlo para la estimación de μ por el FAO bajo incertidumbre paramétrica.	77
5.25. Simulaciones de Monte Carlo para la estimación de biomasa por el FAO bajo incertidumbre paramétrica.	78
5.26. Perfiles de flujo de alimentación exponencial bajo incertidumbre paramétrica.	78
5.27. Simulaciones de Monte Carlo para la estimación de etanol por el FAO bajo incertidumbre paramétrica.	79
5.28. Simulaciones de Monte Carlo para la estimación de etanol por el AO bajo incertidumbre paramétrica.	79
5.29. Comportamiento de la biomasa, F_{in} , μ y μ_{set} ante la perturbación de salida $\eta(t)$, sin ruido.	81
5.30. Comportamiento de la biomasa, F_{in} , μ y μ_{set} ante la perturbación de salida $\eta(t)$, con 5 % de ruido.	82
5.31. Comportamiento de la biomasa, F_{in} , μ y μ_{set} ante la perturbación de salida $\eta(t)$, con 10 % de ruido.	82
5.32. Comportamiento del error paramétrico $ \theta_\mu $ acotado bajo la perturbación $\eta(t)$ para 0 %, 5 % y 10 % de ruido.	83
5.33. Comportamiento del error paramétrico para la estrategia de control 2 y el observador fraccionario asintótico.	83

5.34. Estimación de concentración de biomasa y flujo de alimentación con un 5% de ruido.	84
5.35. Estimación de velocidad de crecimiento con un 5% de ruido y un set-point igual a $0,95\mu_{crit}$ 1/h.	85
5.36. Comportamiento del sistema para la estrategia de control 2 y el observador fraccionario asintótico.	86
5.37. Diagrama en bloques de las estrategias de control.	87

Capítulo 1

Introducción

La presente Tesis Doctoral estudia la aplicación de nuevas técnicas de control y observación a un cultivo de alta densidad fed-batch de *S. cerevisiae* con metabolismo overflow.

1.1. Motivación

La Biotecnología hoy en día se considera una industria que hace contribuciones significativas a la humanidad en diferentes campos como la biomedicina, la industria de alimentos y la agricultura industrial, entre otros. La Biotecnología ha abierto una oportunidad para la obtención y desarrollo de una amplia variedad de productos de alto valor industrial, como son los productos biomédicos: vacunas terapéuticas, anticuerpos monoclonales, proteínas recombinantes, cultivos mejorados, aditivos y pigmentos para alimentos, entre otros [1].

Los avances en diferentes campos como la ingeniería metabólica, la biología sintética y la microbiología, han permitido que los procesos biotecnológicos eleven notablemente la especificidad y productividad del proceso. La ingeniería de microorganismos, o modificación genética, permite generar microorganismos con mayores rendimientos y productividad, tolerantes a concentraciones menores de oxígeno y capaces de crecer en medios más concentrados [1]. La producción biotecnológica permite, entre otras ventajas i) trabajar a pequeña y gran escala, ii) utilizar las fuentes de carbono, nitrógeno y energía de una forma más eficiente, iii) operar en condiciones cercanas a las ambientales, iv) generar productos con mayor selectividad, v) aumentar la eficiencia del capital (lo que disminuye el riesgo de inversión) vi) innovación continua y distribuida en base a criterios de calidad (aseguramiento de la calidad), rendimiento y productividad global del proceso [2].

El alto potencial de la Biotecnología, ciertamente, ha revolucionado el mercado. Entre los productos más prometedores con fines industriales, se destaca la producción de carotenoides de la familia de los terpenos e isoprenoides. Los carotenoides son pigmentos orgánicos del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en la estructura de plantas, gran variedad de algas, hongos y bacterias [3, 4]. Dentro de los productos de interés, se encuentran el β -caroteno y la β -ionona. Al β -caroteno se le atribuyen propiedades tales como la reducción de la probabilidad de ocurrencia de ataques cardíacos y el aumento de la eficiencia

del sistema inmunológico, propiedades antioxidantes y precursor de la vitamina A, además, de ser responsable del color naranja de diferentes alimentos [5].

La β -ionona, por su parte, es una molécula de aroma destacable, presente en muchas flores y frutas, como las moras, los melocotones y los albaricoques, entre otros. Suele ser usada por la industria de los alimentos en antisépticos, aditivos y fragancias, pero también la β -ionona, al igual que el β -caroteno, es un intermediario clave en la síntesis de vitaminas A, E y K. En la naturaleza, la β -ionona se obtiene a partir del β -caroteno [6].

En la actualidad, existe una fuerte demanda de β -caroteno y β -ionona [6]. Ambos productos pueden ser extraídos desde sus fuentes naturales, pero dicha extracción es difícil y costosa, por lo que la síntesis bioquímica es una alternativa para la producción sustentable de sabores y fragancias, y es considerado "natural".

Para la producción de estos compuestos industriales de alto valor agregado se utilizan factorías celulares. Entre las factorías más populares, se encuentra la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Algunas ventajas de sus usos son: (i) amplio conocimiento de su genoma, (ii) facilidad de cultivo y manipulación, (iii) bajo costo, (iv) rápido crecimiento en diferentes fuentes de carbono y (v) crecimiento a altas densidades celulares. La levadura *S. cerevisiae* se puede transformar en una levadura productora de β -ionona mediante modificación genética, utilizando técnicas como combinaciones de expresiones carotogénicas, integraciones de genes, entre otros [6]. Con el fin de alcanzar altas densidades, los biorreactores se operan en modalidad fed-batch con una alimentación continua limitada en glucosa, ya que un exceso de glucosa conduce a la formación de productos secundarios como el etanol, consecuencia del desequilibrio entre el exceso de NADH generado en la glicólisis y su consumo por la respiración, también conocido como efecto Crabtree o metabolismo de sobreflujo (overflow).

Debido a las ventajas asociadas del β -caroteno y la β -ionona, y respondiendo a la necesidad de producción de aromas y sabores que normalmente se encuentran en tan bajas concentraciones en la naturaleza que su producción sólo es factible y sustentable a través de plataformas biotecnológicas, numerosos grupos de investigación en el mundo han dedicado sus esfuerzos en la generación de nuevas estrategias de control avanzado para cultivos de alta densidad. Estas estrategias se pueden clasificar en controladores PID [7, 8, 9, 10], control por redes neuronales (ANN) [11, 12, 13, 14, 15], control adaptativo [16, 17, 18, 19], control heurístico [20, 21, 22, 23, 24] y control predictivo [25, 26, 27, 28]. Por lo general, estas estrategias de control manipulan la tasa de alimentación mediante el control de variables críticas como concentración de sustrato [29, 30, 31], coeficiente respirativo (RQ) [7, 9, 10, 32], oxígeno disuelto [33, 21], etanol [17, 16, 7] y la tasa de crecimiento específico [34, 35]. Sin embargo, ninguna de las estrategias anteriores ha incorporado operadores fraccionarios, los cuales han venido teniendo un gran auge en el área de identificación y modelación [36, 37, 38]. Es, en este sentido, que el objetivo de esta tesis de doctorado se enfoca en el desarrollo de una nueva estrategia de control avanzado con base en las mediciones que determinan el comportamiento fisiológico del microorganismo (velocidad de crecimiento) para alcanzar cultivos de alta densidad (concentraciones de biomasa por encima >100 g/L) y en el desarrollo de observadores capaces de estimar las diferentes variables inaccesibles (biomasa, etanol, velocidad de crecimiento) y de interés dentro del proceso fermentativo

1.2. Descripción del problema general

El modelo del proceso de fermentación de la levadura *S. cerevisiae* descrito por [17] es particularmente complejo y difícil de simular, ya que es un modelo altamente no lineal que presenta una estructura variable. La estructura variable se debe al hecho de que este tipo de cultivo celular presenta un metabolismo de sobreflujo, llamado efecto 'Crabtree' o metabolismo Overflow, lo que afecta el comportamiento metabólico del cultivo en condiciones específicas del proceso [39].

Los parámetros cinéticos y estequiométricos del modelo pueden incluir incertidumbre, además de presentar una variación lenta en el tiempo, lo que hace difícil la aplicación de cualquier técnica de control. A lo anterior, se le añade que muy pocas estrategias de control han logrado cultivos de altas densidades, y hasta la fecha no hay aplicaciones de control fraccionarias aplicadas a los procesos con metabolismo overflow. Sumado a estas dificultades, las mediciones disponibles del proceso comúnmente están sujetas a ruido, lo que dificulta la identificación de parámetros en la práctica y, por lo tanto, el diseño de observadores.

Dado que el mecanismo de overflow es casi "universal" en muchos microorganismos (ie. *S. cerevisiae*, *E. coli* y *P. pastoris*), podemos concluir que es un buen candidato para implementar estrategias de control adaptable entero y/o fraccionario y observadores enteros y/o fraccionarios con el objetivo de mejorar la robustez y la productividad del sistema frente a incertidumbres paramétricas, ruido y perturbaciones. El control adaptable permite estimar cualquiera de los parámetros parcialmente desconocidos del proceso y los observadores permiten la estimación de aquellas variables del sistema que no pueden ser medidas, como es la concentración de biomasa, sustrato, producto o velocidades de crecimiento en base a mediciones disponibles del mismo proceso.

Las soluciones propuestas en esta tesis incluyen un análisis teórico junto con simulaciones y resultados de los esquemas propuestos, destacándose las ventajas que tienen los nuevos diseños sobre los propuestos en la literatura.

1.3. Hipótesis

La hipótesis de trabajo de tesis de doctorado es la siguiente:

La implementación de una combinación de esquemas que involucran observadores y controladores de orden entero y/o fraccionario basados en un modelo fenomenológico de un cultivo fed-batch de *S. cerevisiae* con metabolismo overflow y parámetros desconocidos, permitirá obtener resultados más ventajosos y reproducibles en altas densidades celulares con respecto a los esquemas clásicos.

1.4. Objetivos generales y específicos

Objetivo general

Mejorar la producción de cultivos de alta densidad en biorreactores con el objetivo de aumentar la concentración de biomasa y disminuir la concentración de etanol luego de diseñar

y aplicar estrategias de control y estimación de orden entero y/o fraccionario en cultivos fed-batch de alta densidad para *S. cerevisiae*.

Objetivos específicos

1. Aplicar técnicas de control avanzado de orden entero y/o fraccionario en cultivos de alta densidad de *S. cerevisiae* para la producción de beta-caroteno y beta-ionona.
2. Aplicar técnicas de observación de orden entero y/o fraccionario en cultivos de alta densidad de *S. cerevisiae* para la producción de beta-caroteno y beta-ionona.
3. Analizar desde el punto de vista analítico y de simulaciones la estabilidad, convergencia y desempeño de los observadores y controladores empleando parámetros enteros y/o fraccionarios, considerando órdenes fraccionarios de derivación en un intervalo entre $0 < \alpha < 1$.
4. Realizar un análisis comparativo de los esquemas estudiados en este trabajo, evaluando las ventajas y desventajas con respecto a los esquemas tradicionales y de la literatura. En específico, se estudiarán los efectos para lograr maximizar la biomasa y sus posibles mejorías.
5. Seleccionar los parámetros de los esquemas propuestos a través de técnicas de optimización con el fin de determinar los valores óptimos de órdenes de derivación, ganancias de controladores y observadores, condiciones iniciales, leyes de ajuste, entre otros, que permitan obtener mejores resultados.
6. Seleccionar la mejor estrategia en base a los índices IAE (integral del error absoluto), ISU (integral de la señal de control al cuadrado) e IAVU (integral de la variación absoluta de la señal de control).

1.5. Contribuciones

Para el modelado de los cultivos con metabolismo overflow actualmente se emplea el modelo descrito en Dewasme et al. [17], el cuál incorporó datos experimentales para *S. cerevisiae* y *E. coli*. Sin embargo, el modelo de [17] no considera limitación de oxígeno disuelto, utiliza un parámetro constante para los coeficientes de transferencia volumétrica de oxígeno y dióxido de carbono, el modelo tiene imprecisiones y solo informa una concentración de biomasa total de 80 gDCW/L en 24 h de simulación. Como contribución, en base a los objetivos propuestos, se comenzará re-calibrando el modelo dinámico del cultivo fed-batch de la levadura *S. cerevisiae* genéticamente modificada en el laboratorio de fermentación del Departamento de Ingeniería Química y Bioprocesos de la Pontificia Universidad Católica de Chile [40, 41]. Adicionalmente, esta tesis contribuye agregando el análisis del comportamiento del sistema con limitación de oxígeno disuelto. Finalmente, Dewasme et al. [17] representa las velocidades de crecimiento específicas de las reacciones catabólicas sujetas al metabolismo overflow mediante funciones no lineales *min - max*. Esta representación será mejorada con el uso de funciones 'suaves' (smooth) continuas y diferenciables para todo el espacio n que son más representativas y definidas en [42].

Por otra parte, Dewasme et al. [17] propuso una estrategia adaptativa robusta con un único lazo de control de etanol en una fermentación fed-batch de *S. cerevisiae* y *E. coli*. En dicho trabajo, la ley de control se obtuvo mediante la linealización de las ecuaciones de balance

de masa del proceso y un modelo de referencia lineal de primer orden. La ley de control se transformó en una ley adaptable, a partir de englobar los coeficientes estequiométricos de sustrato-producto y las velocidades específicas de crecimiento en un parámetro desconocido, cuyo valor fue estimado mediante una ley de ajuste adaptable robusta. Los resultados obtenidos muestran una concentración de biomasa cercana a los 80 gDCW/L para los cultivos de levadura con y 20 gDCW/L para los cultivos de bacterias. Como contribución, este trabajo plantea mejorar el control del proceso descrito en [17] mediante: el cálculo de los parámetros de ajuste mediante la técnica de optimización PSO, emplear un controlador de oxígeno disuelto (DO) para evitar la limitación de oxígeno disuelto durante el cultivo, disminuir el valor del set-point del etanol (la disminución del valor de referencia, permite que el exceso de etanol se consuma conjuntamente con la glucosa) y emplear un observador para la concentración de etanol y biomasa, dado que dichas variables no se miden en línea.

Otra contribución de este trabajo de tesis es el desarrollo de una nueva estrategia de control adaptable para la velocidad de crecimiento específica. La velocidad de crecimiento específica es considerada un indicador importante que define el estado fisiológico de las células: régimen respirativo y/o respiro-fermentativo. Al controlar esta variable, el microorganismo se ve obligado a permanecer en un estado fisiológico determinado, lo que permite maximizar la productividad y el rendimiento en el proceso [21, 43]. La estrategia combina control por linealización de retroalimentación y control adaptable. Para este tipo de estrategias de control, los trabajos estudiados en la literatura reportan un valor de set-point constante, el cual varía según el tipo de microorganismo [15, 23, 44, 45, 46, 43, 34, 47, 48, 49]. Pero la suposición de usar un valor constante de set-point no siempre es aceptable en situaciones prácticas en cultivos industriales fed-batch debido a la estructura variable que presenta el proceso fermentativo de *S. cerevisiae*, lo cual nos llevó a usar un valor variable en el tiempo para el set-point.

Para la estimación de las variables no accesibles como la concentración de biomasa, etanol y velocidad de crecimiento, se diseñaron dos observadores. Un primer observador está basado en el diseño de Bogaerts et al. [50], el cual es un observador híbrido que combina el observador asintótico de Bastin y Dochain [51] y un filtro de Kalman extendido. El observador híbrido estima en línea las variables clave del proceso (concentraciones de biomasa y etanol) a partir de las mediciones disponibles de O_2 , CO_2 y la concentración de sustrato. En este diseño del observador, se utilizan las funciones *smooth*, lo que permite un desempeño más eficiente del observador. El segundo observador es un nuevo diseño basado en un observador asintótico propuesto en [52], pero con parámetros fraccionarios. Este observador estima las velocidades de crecimiento de cada reacción específica a partir de las mediciones de biomasa. A modo de comparación con trabajos previos sobre observadores de cultivos fed-batch [16, 53, 54, 55, 50] se contrastó y se analizó el desempeño del observador híbrido y el observador asintótico fraccionario en todos los regímenes metabólicos relevantes (manipulando la tasa de crecimiento específica en lugar de hacer cero las reacciones específicas), lo que permite afirmar su robustez en una amplia gama de condiciones de operación

Las contribuciones anteriormente mencionadas, junto con los resultados obtenidos en este trabajo de t, pueden encontrarse en el presente documento de tesis, siguiendo la siguiente organización. El Capítulo 2 contiene el análisis del estado del arte de las estrategias de control y observación aplicadas a cultivos de alta densidad, junto con la descripción del modelo

dinámico del proceso de fermentación fed-batch de *S. cerevisiae* con metabolismo overflow, al cual se le aplican las estrategias de control y observación propuestas. El Capítulo 3 presenta el diseño, análisis y simulación de la estrategia de control de la velocidad de crecimiento, junto con la simulación de la modificación de la estrategia de control propuesta por Dewasme et al. [17], así como resultados comparativos con otras estrategias de control. El capítulo 4 presenta el diseño, análisis y simulación de los observadores propuestos en este trabajo de tesis para sistemas con metabolismo overflow. En el capítulo 6 se incluye, además, los estudios por simulación y la presentación de los análisis teóricos de estabilidad y convergencia para cada diseño. Finalmente, se presentan las conclusiones generales del proceso de investigación y las propuestas para el trabajo futuro.

Capítulo 2

Estado del Arte – Revisión Bibliográfica

A continuación, se realizará una introducción al proceso fermentativo, junto con la descripción del modelo, así como una revisión del estado del arte de las diferentes estrategias de control y observación aplicadas a cultivos fed-batch en alta densidad (concentraciones de biomasa superiores a los 100 gDCW/L).

2.1. Proceso fermentativo

En la producción industrial de β -caroteno y β -ionona, los procesos fermentativos tienen un papel muy importante. En esta etapa clave se cultivan los microorganismos (*S. cerevisiae*, *E. coli*, entre otros) en un medio líquido, en el cual proliferan, transformándose los sustratos iniciales en biomasa y productos secundarios.

El proceso fermentativo puede dividirse en tres grandes categorías altamente interconectadas: cultivo (inoculación), crecimiento y producción del producto (fermentación), y finalmente una etapa de purificación (cromatografía). En general, durante la fermentación se busca maximizar un producto de interés, que luego debe ser extraído del caldo de cultivo, purificado y formulado, para generar el producto comercial [51]. Existen tres modos de cultivo en fermentadores:

- Cultivo continuo
- Cultivo batch
- Cultivo semi continuo o fed-batch

Siendo el cultivo fed-batch el más utilizado en la industria [3] y con el que se logra cultivos de alta densidad celular (ADC), es decir, concentraciones de biomasa superiores a 100 gDCW/L con una alimentación continua limitada en la fuente de carbono [56].

En el cultivo fed-batch, los sustratos, vitaminas, minerales, aminoácidos y ácidos grasos se añaden escalonadamente a medida que progresa la fermentación. Ninguna sustancia en forma líquida es sacada del fermentador durante el cultivo, lo cual ayuda al proceso a trabajar en buenas condiciones de esterilización.

Además, una fermentación fed-batch bajo una alimentación controlada evita la activación del metabolismo overflow, o sea, evita la formación de productos secundarios (etanol en levaduras, acetato en bacterias, lactato en células animales, entre otros) y disminuye el efecto generado por el exceso de la fuente de carbono o por la sobrealimentación de sustrato.

2.1.1. Metabolismo overflow

El metabolismo overflow es un fenómeno de catabolismo incompleto, que ocurre cuando existe una concentración excesiva de glucosa, o falta de oxígeno bajo condiciones aeróbicas, lo cual lleva a la producción, por ejemplo, de etanol en levaduras, acetato en bacterias o lactosa en células de animales, lo cual inhibe el crecimiento celular (producción de biomasa) [17, 55].

La figura 2.1 muestra la capacidad respiratoria limitada de *S. cerevisiae* como resultado del cuello de botella o metabolismo *overflow*. La figura es una adaptación de las figuras propuestas en [17, 55].

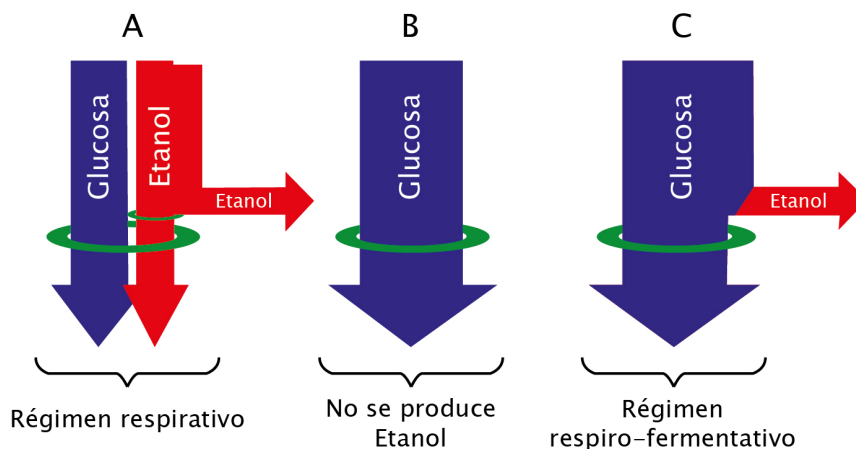


Figura 2.1: La capacidad respiratoria limitada de *S. cerevisiae* da como resultado del metabolismo overflow: A) Consumo subcrítico de glucosa o etanol, cuando no se ha alcanzado el límite de capacidad oxidativa; B) Consumo crítico de glucosa en máxima capacidad oxidativa; C) Consumo de glucosa supercrítico y producción de etanol.

La figura 2.1 explica como la levadura *S. cerevisiae* durante un cultivo es capaz de cambiar su metabolismo debido a su capacidad respiratoria limitada. Cuando el sustrato no supera su valor crítico ($S < S_{crit}$, que por lo general son 40mg/L) y la velocidad de crecimiento no supera su valor crítico $\mu < \mu_{crit}$, la levadura se encuentra en el régimen respirativo, donde no se produce etanol. Analíticamente, el régimen R está representando por las las ecuaciones 2.1 y 2.3.

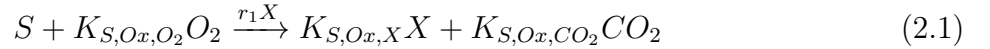
Por otro lado, cuando hay una concentración excesiva de glucosa, o sea, $S > S_{crit}$, y la velocidad de crecimiento supera su valor crítico $\mu > \mu_{crit}$, existe un *overfeeding*, hay limitaciones de oxígeno y la levadura se encuentra en el régimen respiro-fermentativo (RF). Este régimen se caracteriza porque se produce etanol, el cual inhibe el crecimiento celular (producción de biomasa). Este régimen esta representado por las ecuaciones 2.1 y 2.2.

2.1.2. Modelo matemático del biorreactor

El modelo fenomenológico presentado en [17] describe el proceso metabólico de la levadura *S. cerevisiae*, el cual ha sido estudiado por varios autores [17, 57, 16, 55, 53, 54]. El modelo se basa en la hipótesis de cuello de botella (*bottleneck*) descrita por Sonnleitnert y Kappeli [58]. Al ser un modelo general, permite modelar cualquier cultivo celular (i.e. bacterias, levaduras y células animales) que presente un metabolismo overflow llamado *overflow* o ‘Efecto Crabtree’ [59], siempre que se conozca el proceso y los parámetros de fermentación.

El metabolismo *Overflow* de *S. cerevisiae* esta representando por las siguientes ecuaciones estequiométricas:

Oxidación de la Glucosa



Fermentación de la Glucosa



Oxidación del Producto



donde X, S, E, O_2 y CO_2 representan la biomasa, el sustrato (Glucosa), el etanol (producto secundario), el oxígeno disuelto y el dióxido de carbono, respectivamente, $K_{i,j,l}$ ($i = X, E, j = oxidativo(Ox), fermentativo(Fer), l = X, E, O_2, CO_2$) son los coeficientes estequiométricos específicos para cada reacción y r_i ($i = 1, 2, 3$) son las velocidades de crecimiento específicas de la reacción i. Las reacciones 2.1 - 2.3 representan las tres vías metabólicas de consumo de la glucosa.

Las ecuaciones de velocidad de crecimiento específicas están definidas por las expresiones:

$$r_1(t) = \frac{\min(r_s, r_{s_{crit}})}{K_{S,Ox,X}} \quad (2.4)$$

$$r_2(t) = \max(0, r_s - r_{s_{crit}}) \quad (2.5)$$

$$r_3(t) = \max\left(0, \frac{K_{S,Ox,O_2}(r_s - r_{s_{crit}})}{K_{E,Ox,O_2}} \frac{E}{E + K_e}\right) \quad (2.6)$$

donde r_s , $r_{s_{crit}}$ son las velocidades de crecimiento específica y crítica en glucosa y K_e es la constante de saturación del etanol.

El consumo de glucosa r_s se calcula según la cinética de Monod:

$$r_s(t) = \mu_{s,max} \frac{S}{S + K_S} \quad (2.7)$$

mientras que el consumo crítico de glucosa r_{scrit} está dada por la siguiente expresión:

$$r_{scrit}(t) = \frac{\mu_{O,max}}{K_{S,O_2}} \frac{O_2}{O_2 + K_{O_2}} \frac{K_{ie}}{K_{ie} + E} \quad (2.8)$$

donde $\mu_{s,max}$ y $\mu_{O,max}$ son los valores máximos de las velocidades específicas de crecimiento en glucosa y de oxígeno, K_S y K_{O_2} son las constantes de saturación de sustrato y oxígeno, y K_{ie} es la constante de inhibición del etanol, respectivamente.

Las ecuaciones de balance de masa que representan el proceso anterior se describen a través de las siguientes ecuaciones diferenciales para un fermentador operado en modo fed-batch.

$$\frac{dX}{dt} = (K_{S,Ox,X}r_1 + K_{S,Fer,X}r_2 + K_{E,Ox,X}r_3)X - DX, \quad (2.9)$$

$$\frac{dS}{dt} = -(r_1 + r_2)X - DS + DS_{in}, \quad (2.10)$$

$$\frac{dE}{dt} = (K_{S,Fer,E}r_2 - r_3)X - DE, \quad (2.11)$$

$$\frac{dO_2}{dt} = (K_{S,Ox,O_2}r_1 + K_{E,Ox,O_2}r_3)X - DO_2 + OTR, \quad (2.12)$$

$$\frac{dCO_2}{dt} = (K_{S,Ox,CO_2}r_1 + K_{S,Fer,CO_2}r_2 + K_{E,Ox,CO_2}r_3)X - DCO_2 - CTR, \quad (2.13)$$

$$\frac{dV}{dt} = F_{in}, \quad (2.14)$$

donde F_{in} es el flujo de entrada, V es el volumen del cultivo, S_{in} es la concentración de sustrato en la corriente de entrada y D es la tasa de dilución ($D = F_{in}/V$). El término OTR representa la tasa de transferencia del oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida, y el término CTR representa la tasa de transferencia de CO_2 , desde la fase líquida a la fase gaseosa.

Las ecuaciones 2.9, 2.10, 2.11, 2.12 y 2.13 representan los balances de la biomasa, el sustrato (glucosa), el producto (etanol), el oxígeno y el dióxido de carbono, respectivamente. El primero término de cada ecuación representa el consumo por generación de la variable correspondiente para las tres reacciones y el segundo término corresponde a la dilución. El término DS_{in} representa el sustrato que ingresa al reactor por la alimentación, mientras que el OTR y el CTR representan la velocidad de transferencia del oxígeno disuelto y dióxido de carbono, respectivamente. Finalmente, la ecuación 2.14 representa el balance de masa total.

Tal y como muestran las Eqs. 2.9 - 2.14, todas las concentraciones se ven afectadas, por los cambios en el volumen. A su vez, los cambios en la concentración de sustrato afecta a las velocidades de crecimiento, la velocidad de formación de producto, y la velocidad de consumo de oxígeno CTR . La dinámica del oxígeno se ve afectada por la velocidad de transferencia de masa del oxígeno OTR , desde la fase gaseosa a la fase líquida, la velocidad a la que el oxígeno es transportado hacia la célula, y la velocidad de consumo de oxígeno CTR por el microorganismo para su crecimiento, mantenimiento y producción de metabolitos. El flujo de alimentación F_{in} controla a su vez la composición del medio fermentativo, proporcionando los nutrientes necesarios durante las fases de crecimiento y producción.

Otra variable como la temperatura afecta al proceso fermentativo de dos maneras: un aumento o disminución de la temperatura puede causar daños a nivel celular irreversibles, inhibiéndose el crecimiento celular. El pH también afecta el crecimiento óptimo de los microorganismos y, dependiendo del tipo de microorganismo, este puede crecer mejor en condiciones de acidez o de alcalinidad. La velocidad de agitación del fermentador, por su parte, puede influir en la transferencia de masa del oxígeno, induciendo más o menos oxígeno al caldo de cultivo.

Las tasas de transferencia OTR y CTR se calculan de acuerdo a [17] de la siguiente manera:

$$OTR = kla_{O_2} (O_{2,sat} - O_2), \quad (2.15)$$

$$CTR = kla_{CO_2} (CO_2 - CO_{2,sat}), \quad (2.16)$$

donde los términos kla_{O_2} y kla_{CO_2} son los coeficientes de transferencia volumétrica para el oxígeno y el dióxido de carbono, respectivamente, $O_{2,sat}$ y $CO_{2,sat}$ son los valores de las concentraciones en el punto de saturación del oxígeno y del dióxido de carbono respectivamente. Los coeficientes de transferencia volumétrica se calculan de la siguiente forma:

$$kla_{O_2} = 5\alpha N^\beta G^\gamma \quad (2.17)$$

$$kla_{CO_2} = \Delta kla_{O_2} \quad (2.18)$$

donde N representa la velocidad de agitación del fermentador y G el flujo de gases. La agitación N , además de aumentar el coeficiente volumétrico de transferencia de masa, permite mantener el cultivo en condiciones homogéneas, aunque el máximo valor de agitación depende de las restricciones físicas del fermentador. Por otro lado, el flujo de gases G , o aireación, además de suministrar oxígeno, permite arrastrar el dióxido de carbono producido por las células [44]. Las constantes positivas α , β y γ fueron ajustadas en condiciones experimentales abióticas, mientras que el parámetro Δ se calcula según [60] como la diferencia entre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno y el coeficiente volumétrico de transferencia para el dióxido de carbono:

$$\Delta = \frac{kla_{O_2}}{kla_{CO_2}} \quad (2.19)$$

En las figuras 2.2 y 2.3 podemos ver representando gráficamente los regímenes que caracterizan al metabolismo Overflow.

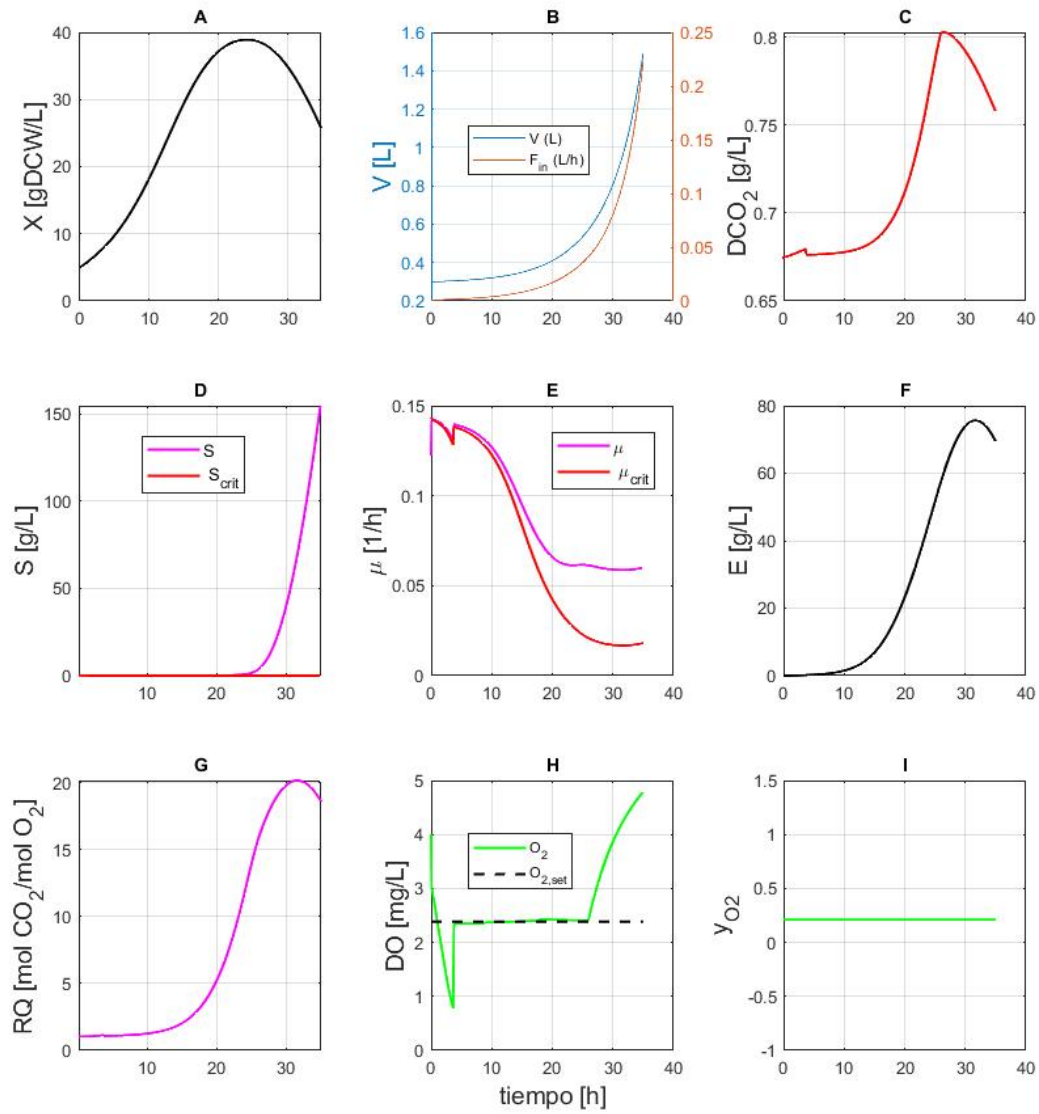


Figura 2.2: Comportamiento del sistema en el régimen RF.

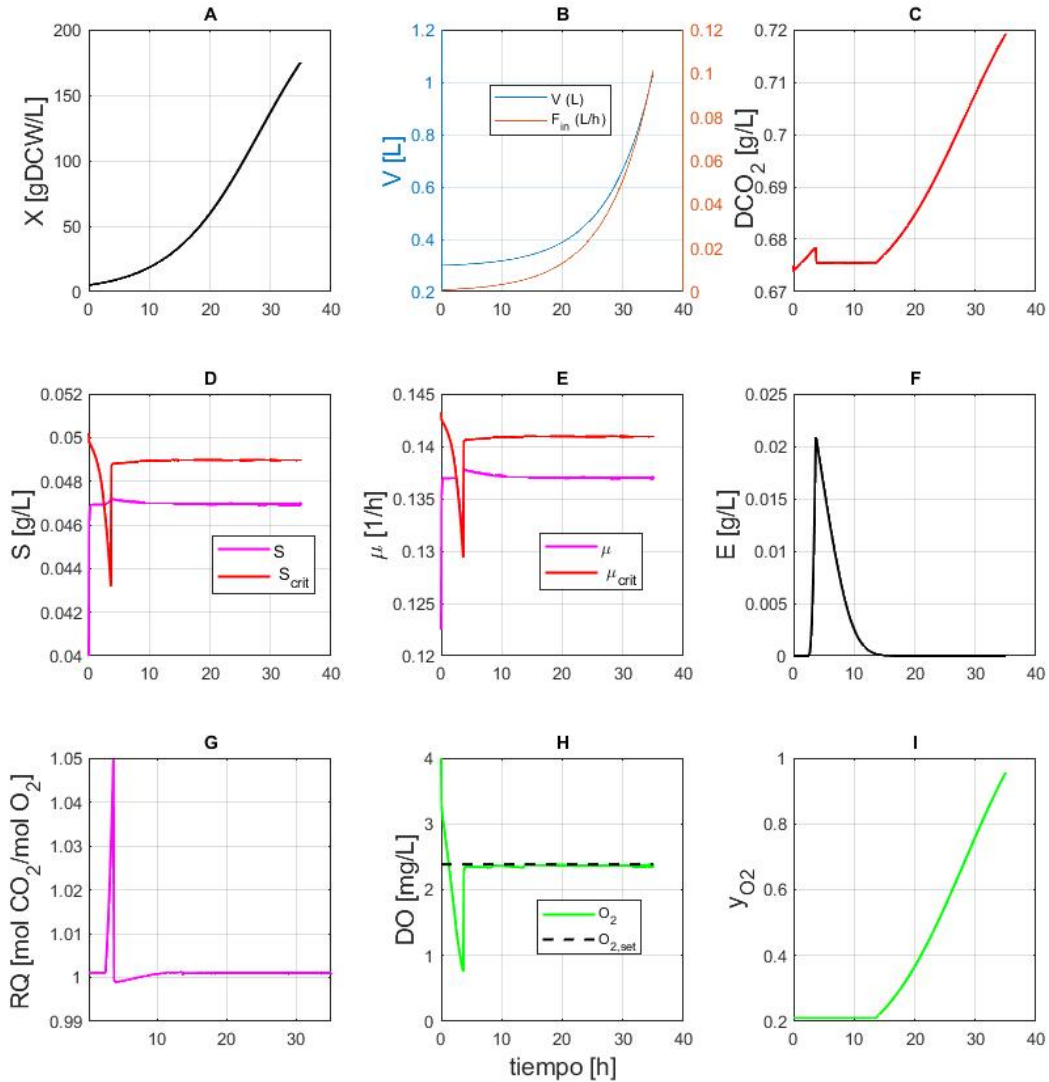


Figura 2.3: Comportamiento del sistema en el régimen R.

En la figura 2.2 se muestra el régimen respiro-fermentativo (RF). Aquí se puede apreciar los efectos del metabolismo Overflow. La biomasa (Fig. 2.2 A) comienza a decrecer en el tiempo, lo cual indica una inhibición del crecimiento celular. Hay sobrealimentación de sustrato (Fig. 2.2 D - Línea magenta), superando su valor crítico S_{crit} (Fig. 2.2 D - Línea roja) y el O_2 deja de estar saturado a las 25 horas (Fig. 2.2 H - Línea verde). Este comportamiento repercute en que la velocidad de crecimiento μ (Fig. 2.2 E - Línea magenta) supera su valor crítico μ_{crit} (Fig. 2.2 E - Línea roja), produciéndose etanol (Fig. 2.2 F - Línea negra) y descompensándose el balance entre el CO_2 y el O_2 , lo cuál se refleja en un valor muy grande del coeficiente respirativo RQ (Fig. 2.2 G - Línea magenta).

Por otro lado, la figura 2.3 muestra el comportamiento 'ideal y deseado' del proceso. La biomasa crece de forma exponencial (Fig. 2.3 A), no hay sobrealimentación de sustrato (Fig. 2.3 D) y el O_2 se mantiene saturado (Fig. 2.3 H). Este comportamiento influye en que la

velocidad de crecimiento μ no supere su valor crítico μ_{crit} (Fig. 2.3 E), no haya producción de etanol (Fig. 2.3 F) y haya un balance perfecto entre el consumo de O_2 y la producción de CO_2 , reflejándose en el coeficiente RQ, el cual es aproximadamente igual a 1 (Fig. 2.3 G).

2.2. Estrategias de control en cultivos de alta densidad

El control de cultivos de alta densidad es un desafío actual dada la versatilidad del cultivo y los diferentes estados fisiológicos de las células, como por ejemplo la ocurrencia del fenómeno de catabolismo incompleto, o metabolismo Overflow [39]. Otros factores que dificultan el control de este tipo de cultivos son: i) la baja solubilidad de los sustratos sólidos y gaseosos en el caldo de cultivo, ii) la inhibición del crecimiento de la biomasa por sustratos y bio-productos, iii) la inestabilidad y volatilidad de sustratos y productos, iv) altas tasas de producción de CO_2 y calor, y v) alta demanda de oxígeno disuelto en cultivos aeróbicos [57].

Existen diferentes estrategias de control propuestas en la literatura que abordan las limitaciones mencionadas con anterioridad. Estas estrategias pueden clasificarse en controladores retroalimentados, tales como el controlador clásico PID [7, 9, 10, 61], controladores basados en redes neuronales [12, 13, 14, 15], controladores adaptables [16, 17, 19, 62], controladores heurísticos [20, 21, 22, 23, 24] y controladores predictivos (MPC) [25, 26, 27, 28]. Por lo general, estas estrategias de control utilizan como variable manipulada el flujo de alimentación mientras que las variables controladas más comunes son: la concentración de sustrato [29, 30, 31], el coeficiente respirativo RQ [7, 9, 10, 32], el oxígeno disuelto [21, 33], el etanol [7, 16, 17] y la tasa de crecimiento específica [34, 35]. Sin embargo, algunas de las referencias citadas no consideran el impacto del control de oxígeno disuelto cuando ocurre el metabolismo Overflow durante el cultivo.

La Tabla 2.1 muestra un resumen de las estrategias de cultivo de alta densidad probadas experimentalmente.

Además de las estrategias de control mencionadas, los esquemas de control a lazo abierto también se han utilizado en cultivos de alta densidad. A diferencia de un esquema de control a lazo cerrado, el lazo abierto se caracteriza porque la respuesta de las variables de salida del sistema no son utilizadas para compararse con valores nominales de referencia definidos. En estas estrategias se establece un valor inicial que permanece constante durante el transcurso de la operación, y que puede ser manipulado manualmente conforme se desarrolla el proceso.

Ejemplos de lazo abierto lo podemos encontrar en el trabajo de Chang et al., [63], donde los autores estudian los efectos de diferentes niveles de agitación (300, 450 y 600 rpm) en el suministro del oxígeno disuelto. El bioproceso alcanzó una concentración final de biomasa de 129.32 gDCW/L a las 120 h de operación, siendo la estrategia a 450 rpm, lo que permitió obtener la mayor concentración de biomasa, disminuyendo los esfuerzos de corte que sufre la factoría celular durante el proceso. Westfall et al., [46] estudiaron la producción de amorfadieno en diferentes cepas de *S. cerevisiae*. Los resultados indicaron una concentración final de biomasa de 361 OD (144 gDCW/L) en 115 h de proceso, para un perfil constante de alimentación con un valor de μ_{set} igual a $0.087 h^{-1}$. Ma et al., [64] y Shi et al., [48] estudiaron una estrategia enfocada en *S. cerevisiae CEN.PK2-1D*. Los resultados de Ma et al., [64] indicaron una concentración final de biomasa y licopeno de 185.6 OD ($\sim 74,2gDCW/L$)

Variable controlada	Método de control	X_F (gDCW/L)	q_x (gDCW/L/g)	Microorganismo	Ref.
RQ	Feedback con pH-sat	148.4	4.6	<i>S. cerevisiae</i> T65	[9]
RQ	Feedback con pH-sat	99.5	3.3	<i>S. cerevisiae</i> Sa-07346	[10]
RQ	Control Feedback	126.0	3.3	<i>S. cerevisiae</i> T65	[32]
RQ, etanol	Control Feedback	130.0	2.4	<i>S. cerevisiae</i> YE1	[7]
Sustrato	Feedback con pH-sat y O_2 -sat	286.0	3.1	<i>S. acuminatus</i> GT-2	[29]
Sustrato	Control Feedback	124.5	1	<i>Schizochytrium</i> sp. HX-308	[30]
Sustrato	Feedback con pH-sat y O_2 -sat	140.0	2.8	<i>S. cerevisiae</i> G-14	[31]
Sustrato	DAC-DIOLC	160.0	2.22	<i>P. pastoris</i> Mut+	[19]
Etanol	MRAC	80.0	1.2	<i>S. cerevisiae</i>	[16]
Etanol	Control adaptable por linealización	90.0	3.6	<i>S. cerevisiae</i>	[17]
Acetato	Control adaptable por linealización	20.0	0.5	<i>E.coli</i>	[17]
pO_2	Control Heurístico	85.0	2.7	<i>S. cerevisiae</i> H1022	[21]
		93.0	2.5	<i>E.coli</i> 10F-pGLO	
		118.0	1.8	<i>P. pastoris</i> Mut+	
μ	PID con pH-sat	122.0	3.8	<i>S. cerevisiae</i> T65	[34]
μ	PI con pH-sat y DO-sat	110.0	4.4	<i>S. cerevisiae</i> T65	[35]
μ	Control Feedback	120.0	2.0	<i>P. pastoris</i> Mut+	[23]
μ	MPC	150.0	7.5	<i>E. coli</i>	[26]

Tabla 2.1: Estrategias de control fed-batch en cultivos de alta densidad.

y 2.37 g/L en 128 h de proceso para un perfil de alimentación con un valor de μ_{set} igual a $0.11 h^{-1}$, que luego se incrementó a $0.13 h^{-1}$. De manera óptima, Shi et al., [48] obtuvo unas concentraciones de biomasa y licopeno de 250 OD ($\sim 100g/L$) y 3.28 g/L en 158h de operación.

2.2.1. Control por linealización por retroalimentación

El control de linealización por retroalimentación [51] es un enfoque que se ha aplicado con éxito en varios estudios [17, 16, 44]. El diseño del control de linealización por retroalimentación se basa en el conocimiento del modelo fermentativo. La idea básica es derivar un controlador no lineal, que permita una linealización por retroalimentación del comportamiento del proceso. Debido a que los modelos de bioprocesos, por lo general, son inciertos, no solo basta con obtener un controlador no lineal, sino que se necesitan aplicar técnicas de control adaptable para estimar los parámetros inciertos del modelo del biorreactor.

2.2.2. Control Adaptable

El control adaptativo se refiere, a su vez, al diseño de controladores con parámetros parcialmente conocidos que se ajustan en el tiempo, basados en la información de entrada-salida. Existen varias estrategias adaptativas que cubren una amplia gama de métodos, como gain scheduling y control adaptativo por modelo de referencia (MRAC). Narendra y Annaswamy [65] describen 4 esquemas de control. Un primer esquema, denominado control directo, es aquel en el cual se estiman directamente los parámetros del controlador, sin estimar los parámetros de la planta. El segundo esquema, control indirecto algebraico, se calcula la ley de control utilizando los parámetros estimados por un esquema de identificación. Un tercer esquema, denominado control indirecto dinámico, calcula la ley de control utilizando los parámetros estimados por un esquema de identificación y, además, estimando los parámetros de la ley de control en función de errores auxiliares. El cuarto esquema es el control combinado, el cual es una combinación del enfoque directo y el indirecto, pues se realiza estimación de los parámetros de la planta y también de los parámetros del controlador. En los cultivos de altas densidades se han aplicado diferentes estrategias de control adaptable para diferentes factorías celulares.

Chen et al., [16] implementaron un controlador adaptable directo para el proceso descrito en el Capítulo 2. Se utilizó la concentración de etanol como variable de control y el flujo de alimentación como variable manipulada en un proceso de producción de levadura. El etanol fue medido fuera de línea, y la biomasa fue estimada por un observador asintótico [51], usando las mediciones de O_2 , CO_2 y la concentración de etanol. Para derivar la ley de control se utilizó un control por linealización adaptable, el cual se derivó de un balance de masa, suponiendo un estado cuasi-estable del sustrato, lo cual se traduce a que no hay acumulación de glucosa en condiciones de operación óptima del biorreactor. La ecuación (2.11) se redefinió como una ecuación de primer orden de la siguiente forma:

$$\frac{dE}{dt} = D \left(\frac{k_8}{k_2} S_{in} - E \right) - \theta X - Q_E; \quad (2.20)$$

donde θ , Q_E , k_i , S_{in} y X corresponden al parámetro desconocido, la tasa de salida de gases

del etanol, parámetros estequiométricos de la reacción química (2.1)-(2.3), la concentración de sustrato en la corriente de entrada y la concentración de biomasa.

Para calcular la dinámica del error, se resta el sistema en (2.20) con un modelo de referencia lineal estable, de tal forma que el error sea decreciente con el tiempo. La dinámica del error del etanol se define como sigue:

$$\frac{d}{dt}(E^* - E) = -(\lambda_1 + \lambda_2 X)(E^* - E), \text{ con } \lambda_1, \lambda_2 > 0 \quad (2.21)$$

donde E corresponde a la concentración de etanol (producto) y E^* corresponde al valor del set-point y las ganancias λ_1 y λ_2 son constantes positivas. Finalmente, la ley de ajuste de [16] tiene la siguiente forma:

$$F_{in}(t) = \frac{(\lambda_1 + \lambda_2 \hat{X})(E^* - E) + \hat{\theta} \hat{X} + Q_E}{\frac{k_8}{k_2} S_{in} - E} V; \quad (2.22)$$

donde \hat{X} es la estimación de la biomasa (Observador Asintótico) y la estimación del parámetro desconocido se calcula por una ley de ajuste adaptable obtenida de un análisis de estabilidad de Lyapunov, tal que:

$$\dot{\hat{\theta}}(t) = \gamma(E^* - E); \quad (2.23)$$

siendo γ la ganancia adaptativa, que en este caso es un valor constante y estrictamente positivo. La idea es que el parámetro desconocido θ tienda a un valor ideal θ^* , el cual se define como:

$$\theta^* \triangleq \left(\frac{k_1 k_8}{k_2} \right) \mu_1(t) + k_9 \mu_3(t); \quad (2.24)$$

La ley de control (2.22) tiene la ventaja de lidiar con incertezas paramétricas **pequeñas** que se representan en el parámetro desconocido θ . Además, los términos λ_1 y λ_2 pueden ser interpretados como términos proporcionales e integrales de un controlador PI, pero con ganancias variables en el tiempo. Las simulaciones muestran que la concentración de etanol se pudo mantener en dos valores durante el cultivo: 1,5 g/L (0-20 h) y 0,5 g/L (20 - 50 h) y se obtuvo una concentración de biomasa de 80 gDCW/L para 65 h de experimento. Durante el cultivo, se aprecia que el controlador es más lento al inicio y demora en llegar al primer valor de referencia (1,5 g/L). Luego, con el segundo cambio de referencia, este se estabiliza más rápido evidenciando que, a mayor concentración de biomasa, aumenta el tiempo de respuesta del controlador.

Dewasme et al., [17] también implementaron un controlador adaptable directo para el proceso con metabolismo overflow, utilizando la concentración de etanol como variable de control y el flujo de alimentación como variable manipulada para el proceso de producción

de *S. cerevisiae* y *E. coli*. La ley de ajuste de Dewasme et al., [17] incluye un análisis más robusto que el planteado en Chen et al., [16]. En [17], se engloba en un mismo término, el parámetro desconocido y las incertidumbres paramétricas del modelo. Este nuevo parámetro se calcula a partir de la solución de un problema de optimización usando una matriz lineal de desigualdades (LMIs). La ley de control de Dewasme et al., [17] tiene la siguiente forma:

$$F_{in}(t) = \frac{(\lambda_1 + \lambda_2 \hat{X})(E^* - E) + \hat{\theta} \hat{X}}{\frac{k_{E2}}{k_{S2}} S_{in} - E} V; \quad (2.25)$$

donde la ley de ajuste del parámetro desconocido es igual a:

$$\frac{d\hat{\theta}}{dt} = \gamma X (E^* - E); \quad (2.26)$$

siendo γ la ganancia adaptiva estrictamente positiva y X la concentración de biomasa. A diferencia del análisis de Lyapunov de [16], Dewasme et al., [17] incluye la concentración de biomasa en la ley de ajuste. El valor ideal θ^* , se define igual a [16].

Las simulaciones muestran que la estrategia permite lidiar con incertezas paramétricas **grandes**, así como ruido en las variables medidas, obteniendo en el cultivo de *S. cerevisiae* una concentración de biomasa 90 gDCW/L y para *E. coli* de 20 gDCW/L. En ambos cultivos, la concentración de etanol y acetato se mantuvieron en un valor cercano a 1 g/L durante 25 h.

Hocalar et al., [18] también derivaron una ley de control para etanol del balance de masa, pero sin considerar un estado cuasi-estable del sustrato para maximizar el crecimiento de *S. cerevisiae*. La ley de control se obtiene del despeje de una partición hecha al modelo original, donde $[X, P]$ representan la partición de las variables de dinámica lenta: biomasa y etanol, y tiene la siguiente forma:

$$F_{in}(t) = \frac{1}{\nu_3} \left(\frac{dE^*}{dt} + (\lambda_1 + \lambda_2 \hat{X})(E^* - E) + DE + \nu_1 OTR - \nu_2 CTR \right); \quad (2.27)$$

donde ν_1, ν_2 y ν_3 son matrices inversas que contienen los coeficientes estequiométricos y $\frac{dE^*}{dt}$ es la derivada del valor de set-point del etanol.

La ley de control obtenida en (2.28) se realimenta a un controlador PID. La velocidad específica de crecimiento y concentración de biomasa fueron estimadas a partir de las mediciones de flujo de gases, O_2, CO_2 . Los resultados muestran que se obtiene una concentración de biomasa de 75 gDCW/L y se mantiene la concentración de etanol alrededor de 0.07 g/L para 16 h, mientras que el valor de la velocidad específica de crecimiento a la cual crece la biomasa, se mantuvo alrededor de $0.12 h^{-1}$. Se encontró que el controlador de etanol presenta dificultades durante la fase de crecimiento exponencial (0-4 h), debido a la ausencia de etanol. Los autores propusieron iniciar el control, una vez se haya detectado la formación de etanol. Además, se visualizó que el controlador de etanol detectó dos cambios de referencia: 0.1 g/L

y 0.15 g/L durante el cultivo, y aunque el tiempo de respuesta fue rápido, el controlador presentó sobreimpulso.

Por otro lado, Hocalar et al., [43] propusieron un controlador linealizado para maximizar el crecimiento de *S. cerevisiae* en un biorreactor de 25 m³ utilizando como variable controlada la velocidad de crecimiento. El algoritmo de control se dividió en 5 fases: medición de las variables primarias, estimación de la biomasa y la velocidad específica de crecimiento mediante un observador de estado, determinación de un modelo de entrada y salidas, determinación de un modelo lineal de referencia y derivación de una ley de control linealizada donde se controla la velocidad específica de crecimiento.

$$F_{in}(t) = \frac{\frac{\mu_x}{Y_{X,O_x,S}} - \lambda_p \left((\mu_s - \mu') - \frac{1}{\lambda_i} \sum (\mu_s - \mu') \right)}{S_{in}} V; \quad (2.28)$$

donde λ_p y λ_i pueden ser interpretados, al igual que en [16], como términos proporcionales e integrales de un controlador PI que compensan los errores de estado estacionario. El término $\frac{\mu_x}{Y_{X,O_x,S}}$ se refiere al valor máximo de las velocidades específicas de crecimiento de la biomasa dividido por el rendimiento de biomasa oxidativa a glucosa. La variable μ_s representa el valor de set-point que debe seguir la variable controlada μ' . La ley de control se retroalimenta a un controlador lineal PID. El control de la velocidad específica de crecimiento se probó para tres valores de consigna fijos: 0.12, 0.13 y 0.08 h⁻¹. Los resultados muestran que se obtuvo una concentración de biomasa 75 gDCW/L, observándose baja formación de etanol (0.04%).

Además de las estrategias de control por linearización, algunos autores han aplicado control adaptable, tal y como describe Galvanauskas et al. [66]. Los autores propusieron una estrategia en cascada para el control de la presión parcial del oxígeno disuelto para maximizar el crecimiento de *S. cerevisiae* y *E. coli*. El algoritmo en cascada manipula la agitación del biorreactor, el enriquecimiento de oxígeno y el perfil del flujo de alimentación de sustrato pre-optimizado. El proceso fue dividido en dos fases: una primera etapa *batch*, donde solo se alimentó glucosa, al final de esta etapa el O₂ alcanzó un 40% de saturación (valor de referencia). En una segunda etapa, se activó el control en cascada para mantener el nivel de referencia de O₂ (40%). Para el control en cascada, primero se activa el control de agitación, y cuando se alcanza su valor máximo de saturación, se activa un segundo control, donde se produce el enriquecimiento de oxígeno hasta llegar a 10 - 20% de enriquecimiento. El último lazo de control de O₂ en activarse es el de manipulación del flujo de alimentación de sustrato. Los resultados muestran que se obtiene una concentración de biomasa de 60 gDCW/L con *S. cerevisiae* y 50 gDCW/L con *E. coli*.

Priyanka et al., [19], por su parte, proponen un controlador desacoplado que utiliza el sustrato y el O₂ como variables controladas para la producción de rHSA con *P. pastoris X-33 Mut+*. Para efectos comparativos se diseñaron 3 controladores: un controlador clásico PID, un controlador adaptivo desacoplado (*Decoupled Adaptive Control* (DAC)) y un controlador linealizado de entrada y salida desacoplado (*Decoupled Input Output Linearizing Control* (DIOLC)). Los resultados por simulación mostraron que el controlador DAC es muy sensible a los cambios en el O₂, mientras que el controlador DIOLC exhibe fuertes oscilaciones durante el control del sustrato. Por lo anterior, los autores proponen un esquema de control aumentado

(DAC-DIOLC) que combina ambos controladores a través de una matriz de desacoplamiento. En el esquema DAC-DIOLC, la concentración de sustrato queda controlada por el DAC y la concentración de O_2 queda controlada por el DIOLC. Los resultados muestran que con el controlador DAC-DIOLC se obtiene el mejor desempeño del sistema, obteniendo una concentración de biomasa de 160 gDCW/L y una concentración de rHSA de 1,5 g/L. El esquema DAC-DIOLC presenta una gran ventaja frente a los diseños individuales, dado que logra desacoplar la interacción entre el sustrato y el O_2 simultáneamente, permitiendo un control más eficiente.

2.3. Observadores en cultivos de alta densidad

Para medir las variables críticas en un biorreactor, como es el caso de las concentraciones de biomasa, sustratos y productos, se utilizan diferentes sensores basados en densidad óptica, capacitancia, espectroscopía ultrasónica, infrarroja cercana y análisis de inyección de flujo, entre otros [62]. El principal inconveniente de estos sensores es que requieren una calibración frecuente y muchas veces proporcionan mediciones poco fiables. Además, suelen fallar cuando se opera a altas concentraciones de biomasa o bajas concentraciones de sustrato y producto [59, 67].

Una solución alternativa es el uso de sensores virtuales, los cuales se conocen como observadores/estimadores. El diseño de un observador se basa en un algoritmo matemático que estima variables no medibles basadas en variables medidas en tiempo real. Dada la importancia de la medición de variables claves no accesibles dentro del biorreactor, los sensores virtuales brindan el beneficio de ser catalogados como sensores no invasivos de bajo costo y como soluciones prácticas de ingeniería. El origen del observador se remonta a los trabajos de Luenberger [68, 69, 70] aplicados a sistemas dinámicos lineales.

En este sentido, en la literatura de cultivos de alta densidad existen diversos enfoques de diseños de observadores. Los observadores, en general, pueden ser clasificados en seis grupos: observadores tipo Luenberger, observadores para sistemas dimensionales finitos, estimadores Bayesianos, observadores de detección de fallas, observadores basados en inteligencia artificial y observadores híbridos [71] (Ver Figura 2.4).

Ejemplos de aplicaciones en biorreactores, podemos mencionar al Observador Luenberger extendido [55, 72, 73, 74, 75] y el observador de modos deslizantes (*sliding mode*) [76, 77, 78, 79, 80], para casos donde se requiere un conocimiento perfecto del modelo de biorreactor. Para casos con modelos parcialmente conocidos, se aplican los observadores adaptativos [81, 82, 83, 84] y los observadores asintóticos [16, 53, 85]. Los estimadores Bayesianos, como el filtro Kalman extendido [82, 86, 87, 88] y el filtro Kalman *Unscented* [89, 90], son los observadores más populares. Este tipo de estimador es rápido y versátil, aunque con un costo computacional muy alto, lo que los hace difíciles de implementar en sistemas de dimensiones grandes. Observadores con elementos de inteligencia artificial (observador neuronal adaptativo y observadores neuronales de Kalman) y para diagnósticos de fallas y perturbaciones (Observador de perturbaciones de orden fraccionario) se han reportado, respectivamente, en [91] y [71].

Una práctica cada vez más común es combinar dos o más observadores, llamados observa-

dores híbridos (observador asintótico-observador de Luenberger [92, 93, 50, 94], observador asintótico-Kalman [50]). Estos observadores híbridos están destinados, sobre todo, a sistemas con un alto grado de no linealidad y con modelos parcialmente desconocidos.

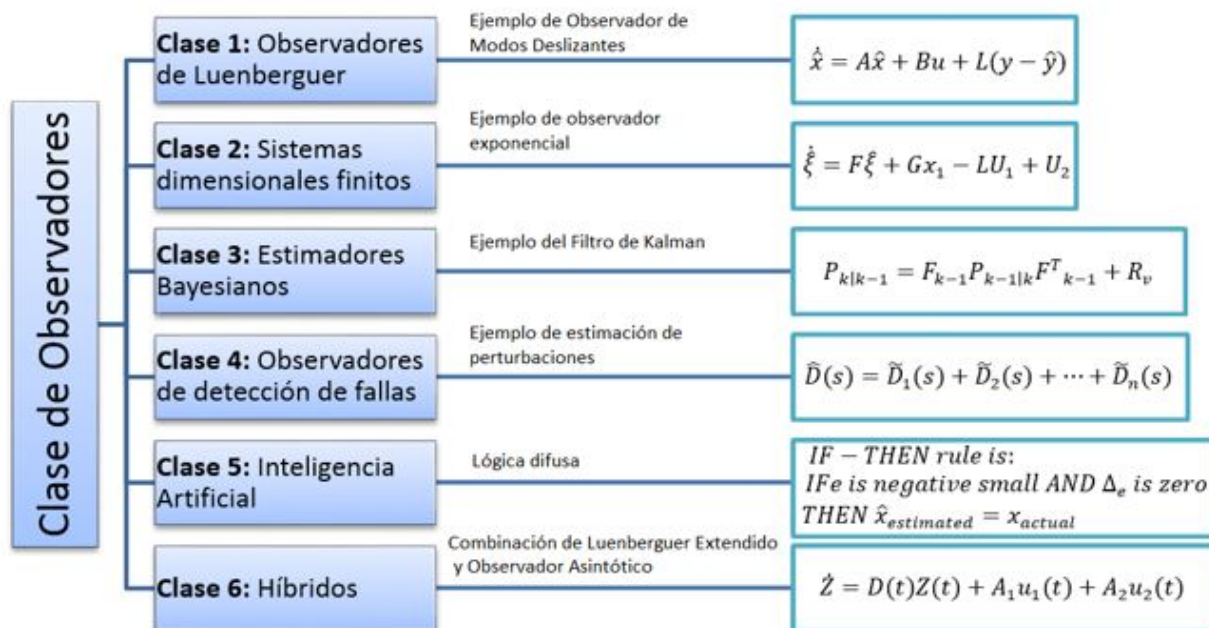


Figura 2.4: Clasificaciones de Observadores.

2.3.1. Sensores para O_2 , CO_2 y sustrato

Las variables que se suelen medir a través de sensores físicos (Siemens, Mettler Toledo, Endress-Hausser, entre otros) y analizadores de gases de salida y caudales en biorreactores industriales son: i) temperatura, ii) pH, iii) oxígeno disuelto (OD), iv) presión, v) composición del gas a la salida de biorreactor, vi) flujo de masa de alimentación y vii) nivel de espuma [56, 95, 96].

La forma más común de medir las concentraciones de O_2 y CO_2 , es utilizar un analizador de gases [28, 25]. Por otro lado, la concentración de sustrato se puede cuantificar y medir en línea usando diferentes técnicas, como la espectroscopía [28], glucómetros (basados en el principio de deshidrogenasa y detección fotométrica) [21], analizadores bioquímicos [97], espectrómetro de infrarrojo medio basado en la transformada de Fourier (FTIR) [98] o utilizando biosensores de concentración de glucosa, tal y como se reporta en el trabajo de Duan et al. [12]. Los métodos fuera de línea (*off-line*) pueden incluir un analizador enzimático [28, 35, 99, 100], cromatografía líquida de alta resolución en línea (HPLC) [101], kits de control de glucosa en sangre y de triglicéridos [29, 102, 103] y el método del ácido dinitrosalicílico (DNS) [104].

Por otro lado, una forma de determinar la biomasa utilizando técnicas *off-line* es mediante centrifugación gravimétrica [25, 28, 39, 97, 105, 106, 107]. Otros métodos incluyen multiplicar la medición de oxígeno disuelto por un coeficiente de correlación [27, 104], exclusión del colorante azul tripano [108], medición de la densidad óptica del cultivo [71, 99, 100, 102, 109], llenado de tubos Eppendorf [35], recuento celular utilizando un hemocitómetro [29], medición

del peso celular seco (DCW) [12, 101, 103, 110], espectroscopía dieléctrica (capacitancia) [34, 111, 112] o espectroscopía infrarroja [113, 114].

La concentración de producto es probablemente la variable más compleja de estimar. Algunos métodos *off-line* incluyen la cuantificación de unidades de fluorescencia relativa (rFU) [105], cromatografía de gases [21, 102], analizadores bioquímicos [97], HPLC [99, 109] o sondas de etanol para determinar la concentración de etanol en tiempo real, como la utilizada por Xiong et al. [103].

2.3.2. Observadores de biomasa

La estimación de la concentración de la biomasa no es tarea fácil. Lo recomendado es utilizar señales de mediciones que tengan una estrecha relación con la biomasa. Tal es el caso de Urniezius et al. [115], donde se utilizó la tasa de consumo de oxígeno (OUR) para estimar la concentración de biomasa junto con los parámetros estequiométricos: rendimiento de consumo específico de oxígeno de la célula y el consumo de oxígeno para mantenimiento basado en redes neuronales. El estimador se evaluó experimentalmente en cultivos fed-batch con diferentes microorganismos (*E. coli* y *S. cerevisiae*) y con diferentes volúmenes de biorreactor. Wechselberger et al. [116] también estimó la concentración de biomasa y la velocidad de crecimiento específica (μ) utilizando la tasa de evolución de carbono (CER), la tasa de consumo de oxígeno (OUR), el flujo de alimentación del sustrato (F_{in}), la masa del cultivo del reactor (determinada por el principio gravimétrico) y ecuaciones elementales de balance. El observador se implementó en cultivos fed-batch de *P. Pastoris* y *E. coli*, considerando los parámetros estequiométricos variables en el tiempo. La principal desventaja de los observadores propuestos en [115, 116] es la complejidad y el número de ecuaciones de los observadores, a diferencia de observadores menos complejos como el filtro de Kalman o el observador asintótico, en donde se puede estimar la biomasa sin necesidad de conocer por ejemplo las velocidades de crecimiento de las reacciones.

Los observadores adaptivos por su parte, también se han aplicado en cultivos de alta densidad. Tal es el caso de Farza et al. [117] y Zhang et al.[81]. Ambos aplicaron un observador adaptativo para estimar los coeficientes cinéticos y la concentración de biomasa usando la señal de concentración de sustrato. La convergencia exponencial del observador adaptativo en Farza et al. [117] fue garantizada utilizando condiciones de excitación persistente. Mientras tanto, en Zhang et al.[81] se empleó el método de estabilidad de Lyapunov para encontrar una ley de estimación adaptativa para los estados no medidos y para probar la observabilidad. Por su parte, Chen et al. [16] y Veloso et al.[53] implementaron observadores asintóticos basados en la propuesta original de Bastin y Dochain [51, 82]. La diferencia de ambos trabajos radica en la selección de las variables medibles. Chen et al. [16] estimó la biomasa usando señales de etanol, O_2 y CO_2 y Veloso et al.[53] estimó, además de la biomasa, la concentración de etanol y sustrato usando las señales de O_2 y CO_2 . En ambos casos, se consideró un proceso con velocidades de crecimiento desconocidas y parámetros estequiométricos conocidos.

2.3.3. Observadores de producto y velocidad de crecimiento

De acuerdo al estudio de la literatura, se han propuesto pocos observadores para cultivos de alta densidad. Dewasme et al. [88] utilizó un filtro de Kalman extendido (EKF) para

estimar el etanol y el sustrato, considerando a la biomasa y el O_2 como variables medibles en un proceso con metabolismo Overflow. El modelo del proceso fue simplificado y solo se consideró que el sistema operaba en régimen respiro-fermentativo. Por otro lado, Pimentel et al. [55] también propuso un observador tipo Luenberger Extendido (ELO) para el proceso con metabolismo Overflow. Se estimó el etanol usando las concentraciones de biomasa y sustrato como variables medidas, y la matriz de ganancias del ELO se diseñó para cambiar de acuerdo al régimen del cultivo que estuviera activo: régimen respirativo o respiro-fermentativo.

La estimación de la velocidad de crecimiento μ , al igual que la concentración de biomasa, se basa en mediciones de variables correlacionadas. El enfoque más usado es obtener la velocidad de crecimiento a partir de la concentración de biomasa [34, 43, 52]. En Pomerleau et al. [52] y Pomerleau et al. [118] se propusieron observadores asintóticos para la estimación de múltiples velocidades de crecimiento aplicadas a un proceso fed-batch de *S. cerevisiae*, también basados en la concentración de biomasa.

En otro enfoque, Oliveira et al. [119] aplicó un observador asintótico de orden reducido (versión continua y discreta) para la estimación de dos velocidades de crecimiento específicas en un proceso fed-batch con metabolismo Overflow. El observador incluyó dos diseños: uno para el régimen respiro-fermentativo y otro para el régimen respirativo. Las mediciones usadas fueron las tasas de transferencia del oxígeno *OTR* y del carbono *CTR*. Por su parte, en Lubenova et al. [120] y Lubenova et al. [121], los autores propusieron enfoque adaptativos para la estimación en línea de la tasa de crecimiento específica en procesos aeróbicos fed-batch utilizando la tasa de consumo de oxígeno en línea como variable medida.

2.4. Cálculo Fraccionario

La inclusión del cálculo fraccionario (FC) en los sistemas de control y de observación ha crecido en interés en la última década. Numerosas ventajas respecto al uso del cálculo fraccionario (FC), se describen en diferentes trabajos [37, 122, 123, 124, 36, 125], desde la aparición de la fraccionalización del controlador PID clásico. Las ventajas mencionadas en estos trabajos concluyen sobre un rendimiento mejorado de los sistemas de control fraccionarios sobre los controladores clásicos, mejores resultados en sistemas de orden superior, sistemas con retrasos prolongados, altas no linealidades y sistemas de fase mínima. Ejemplos de controladores fraccionarios se pueden encontrar en los trabajos [36] y [37] con el diseño de un controlador fraccionario integral proporcional (FOPI) y un controlador adaptativo de modelo de referencia fraccionario (FOMRAC) y un controlador de alta ganancia fraccionario [126]. En los procesos bioquímicos también se han informado controladores PID fraccionarios (FOPID) en [127, 128] y el estudio de control sobre modelos de bioprocesos con ecuaciones de orden fraccionario en [129, 130].

2.4.1. Conceptos generales de cálculo fraccionario

El cálculo fraccionario es una disciplina matemática que estudia las derivadas e integrales de orden reales o complejos. En el cálculo diferencial se plantea que el valor de n en la derivada $\frac{d^n y}{dt^n}$ es de orden fraccionario. En el dominio del tiempo, dichos operadores se definen por la operación de convolución, lo que los hace útiles para describir fenómenos con memoria y en el caso del dominio de Laplace, las operaciones corresponden al operador s^α , $\alpha \in R$. En la

actualidad el cálculo fraccionario se aplica en áreas tales como las redes eléctricas, la teoría del caos y los fractales, la electrónica, control automático, entre otras [124, 36].

Existen varios operadores de derivadas e integrales fraccionarias. Entre las que podemos mencionar se encuentra la integral fraccionaria, según Riemann-Liouville, y las derivadas fraccionarias según Riemann- Liouville y Caputo. De acuerdo a [124] y [38], las integrales y derivadas de Riemann-Lioiville, así como la derivada de Caputo, se definen de la siguiente manera:

Integral fraccionaria según Riemann-Liouville

$$I_a^\alpha f(t) = \frac{1}{\Gamma(\alpha)} \int_a^t \frac{f(\tau)}{(t-\tau)^{1-\alpha}} d\tau, t > a, \quad (2.29)$$

donde $\Gamma(\alpha)$ corresponde a la función gamma definida como:

$$\Gamma(\alpha) = \int_0^\infty t^{\alpha-1} e^{-t} dt \quad (2.30)$$

Derivada fraccionaria según Riemann-Lioiville

$${}^R D_a^\alpha f(t) = \frac{1}{\Gamma(n-\alpha)} \left(\frac{d}{dt} \right)^n = \frac{1}{\Gamma(n-\alpha)} \int_a^t \frac{f(\tau)}{(t-\tau)^{\alpha-n+1}} d\tau, t > a, \quad (2.31)$$

Derivada fraccionaria según Caputo

$${}^C D_a^\alpha f(t) = I_a^{n-\alpha} [D^n f(t)] = \frac{1}{\Gamma(n-\alpha)} \int_a^t \frac{f^n(\tau)}{(t-\tau)^{\alpha-n+1}} d\tau, t > a, \quad (2.32)$$

donde $n = \min \{k \in \mathbb{N}/k > \alpha\}$. La principal ventaja de la representación de Caputo es que incorpora la condiciones iniciales para $f(\cdot)$ y sus derivadas de orden entero ($\alpha = 1$), las cuales son físicamente interpretables de la manera tradicional.

La transformada de la derivada fraccionaria según Caputo se escribe de la siguiente forma:

$$\mathcal{L} \{ {}^C D_{t_0}^\alpha f(t) \} = s^\alpha F(s) - \sum_{k=0}^{n-1} s^{n-k-1} (f^k(0)) \quad (2.33)$$

La estabilidad de las ecuaciones (2.29) - (2.33) ha sido probadas rigurosamente por varios autores [37, 122, 123, 124, 36, 125].

La forma común de implementar las integrales fraccionarias y las derivadas en las simulaciones es mediante la aproximación numérica de una integral, o una derivada. La siguiente función de transferencia es una aproximación del operador de Laplace de orden fraccionario:

$$C(s) = ks^\alpha \quad (2.34)$$

La aproximación (2.34) se puede implementar con diferentes métodos basados en el dominio de la frecuencia, como es el caso del Método *Oustaloup* [131], el cual utiliza una distribución recursiva de N polos y N ceros tal que:

$$C(s) = k' \prod_{n=1}^N \frac{1 + s/\omega_{zn}}{1 + s/\omega_{pn}}, \quad (2.35)$$

donde ω_{zn} y ω_{pn} son los ceros y los polos de la aproximación para un intervalo de frecuencia en donde la aproximación es válida $[\omega_l, \omega_h]$. La ganancia k' se ajusta para satisfacer que $|C(s) = 0|$ cuando $k = 1,1$ rad/s. El método *Oustaloup* se incorpora como la aproximación *Crone* en el bloque NID del Toolbox para Matlab de derivadas e integrales fraccionarias *Ninteger* [131].

2.4.2. Observadores fraccionarios

En la literatura se han propuesto algunas extensiones fraccionarias de los observadores clásicos, como el observador de alta ganancia, el observador de modos deslizantes y el observador de Luenberger.

Ejemplo de un observador de Luenberger fraccionario (FLO) para sistemas lineales e invariantes en el tiempo con parámetros conocidos fue propuesto en Pacheco et al. [132]. El observador clásico de Luenberger [70] tiene la siguiente forma para un sistema SISO lineal:

$$\begin{aligned} \dot{\hat{x}}(t) &= A\hat{x} + Bu(t) + f[y(t) - \hat{y}(t)] \\ \hat{y}(t) &= C^T \hat{x}, \end{aligned} \quad (2.36)$$

siendo el error de identificación igual a:

$$\dot{e}(t) = (A - fC^T)e(t), \quad (2.37)$$

donde $x(t) \in R^n$ es el vector de estado, $u(t) \in R$ es la señal de entrada, $y(t) \in R$ es la salida, $f \in R$ el vector del observador. $A \in R^{n \times n}$, $B \in R^n$ y $C \in R^n$ son matrices conocidas.

A partir de la ecuación (2.36), Pacheco et al. [132] desarrolla un observador fraccionario de Luenberger (FLO) de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} {}_0^C D_t^\alpha (\hat{x}(t)) &= A\hat{x} + Bu(t) + f[y(t) - \hat{y}(t)] \\ \hat{y}(t) &= C^T \hat{x} \end{aligned} \quad (2.38)$$

el cual conserva la misma forma que (2.36), pero considerando la derivada fraccionaria con un rango de valor para el parámetro fraccionario entre $0 < \alpha < 2$. La ecuación del error de estimación fraccionario es igual a:

$${}_0^C D_t^\alpha (e(t)) = (A - fC^T)e(t), \quad (2.39)$$

La estabilidad de (2.39) se garantiza siempre que se seleccione un vector $f \in R$ tal que los valores propios de la matriz $(A - fC^T)$ estén localizados en el semiplano izquierdo (mismo objetivo de la versión entera) y se cumpla, además, que $|\arg(\text{spec}(A - fC^T))| > \alpha \frac{\pi}{2}$. Bajo estas condiciones, el sistema en (2.38) es global, asintótico y uniformemente estable y el error en (2.39) tiende a cero de forma asintótica. El FLO presenta ventajas significativas respecto a la velocidad de convergencia del error de estimación y la atenuación de perturbaciones de alta frecuencia en comparación con el observador clásico de Luenberger.

Otros ejemplos de observadores fraccionarios incluyen un observador fraccionario robusto de modos deslizantes [133, 134], un observador fraccionario no lineal [135] y un observador fraccionario para entradas desconocidas [136]. Hasta el momento, el estudio de los observadores fraccionarios mencionados se ha centrado en sistemas lineales SISO, invariantes en el tiempo con parámetros de planta conocidos. A diferencia de estos estudios, en este trabajo de tesis se explora el diseño de observadores fraccionarios en sistemas no lineales, con una entrada y múltiples salidas, variantes en el tiempo y con parámetros cinéticos desconocidos y parámetros estequiométricos parcialmente conocidos.

Además del diseño de observadores fraccionarios, en la literatura se ha propuesto el diseño de observadores enteros basado en sistemas con ecuaciones de orden fraccionario, como es el caso de los trabajos propuestos en [137, 138, 139]. A pesar de las ventajas propuestas en [137, 138, 139], donde se demuestra como el uso de derivadas fraccionarias representa mejor el modelo de ecuaciones diferenciales estudiado, en este trabajo de tesis solo se considera el estudio del modelo con metabolismo overflow con derivadas enteras.

2.5. Conclusiones

En este capítulo se hizo una introducción al proceso fermentativo de la levadura *S. cerevisiae*, el cual es un proceso altamente no lineal. Se seleccionó como modalidad de trabajo: cultivo fed-batch con alimentación continua limitada en glucosa [56] para la producción industrial de *S. cerevisiae*. Este tipo de cultivo permite disminuir los efectos generados por la sobrealimentación de glucosa (inhibición por sustrato y/o producto) y la capacidad limitada de transferencia de oxígeno de la levadura.

Podemos concluir que las estrategias de control más estudiadas en la literatura se pueden dividir en 5 grupos principales:

- Estrategias de control de RQ.
- Estrategias de control de Etanol.
- Estrategias de control de Glucosa.

- Estrategias de control de O_2 .
- Estrategias de control de velocidad de crecimiento específica.

Se encontró que las estrategias de control de RQ, glucosa y velocidad de crecimiento obtienen los mejores resultados en alta densidad. Las estrategias de control de O_2 , por lo general, se ven afectadas en alta densidad por la adición de anti-espumante [140] y la distribución celular heterogénea [57], dificultando su aplicación para el control. Para el caso de las estrategias de etanol y glucosa, dichas variables, incluso la biomasa, son difíciles de estimar cuando se encuentran en concentraciones muy bajas o muy altas. Para poder usarlas en control de proceso, se necesita incluir diseños de observadores a los lazos de control.

En el caso de las variable RQ y la velocidad de crecimiento, estas variables son las que mejor representan el estado fisiológico del microorganismo y su control es necesario para lograr altas densidades. Dado que la selección de la variable de control para cultivos fed-batch a escala industrial dependen, básicamente, de los objetivos de producción, en este trabajo de tesis se decide utilizar como variable de control, la velocidad de crecimiento y como variable manipulada, el flujo de alimentación de sustrato al fermentador utilizando una combinación de control por linealización y control adaptable. Además, como la velocidad de crecimiento es una variable que no se puede medir en línea, se utilizará combinaciones de observadores enteros y fraccionarios para su estimación.

Es interesante mencionar que, hasta este momento, no se ha reportado ningún trabajo en la literatura que combine el control por linealización por retroalimentación y el control adaptable para el control de la velocidad de crecimiento, como tampoco se ha reportado el uso de cálculo fraccionario en el control y observación de cultivos de alta densidad con metabolismo overflow, específicamente no se ha encontrado el diseño de un observador fraccionario asintótico.

El desarrollo de la estrategia de control, la selección de la variable de control y manipulada, así como los esquemas de estimación se verán en detalle en los capítulos posteriores.

Capítulo 3

Diseños de estrategias de control para ADC

En este capítulo se diseñan las estrategias de control propuestas para alta densidad.

3.1. Estrategia de control para la velocidad de crecimiento

Para el diseño de la nueva estrategia de control, se combinaron esquemas de control por linealización por retroalimentación y control adaptable [16, 17, 43, 51].

Para comenzar con el diseño, lo primero es definir las siguientes suposiciones:

- . (A.1) No hay limitación de la de concentración oxígeno.
- . (A.2) No existe formación de etanol.
- . (A.3) No hay acumulación de glucosa en condiciones de operación óptimas del biorreactor [51].

El punto de partida para la derivación de la expresión del controlador es la ecuación de balance de masa general para el sustrato alimentado definida en la (2.10). Por lo tanto, la primera tarea es derivar un modelo de entrada-salida entre la variable de control y la variable manipulada F_{in} . Suponiendo un estado cuasi-estable del sustrato, la ecuación (2.10) se puede escribir de la siguiente manera:

$$0 = -(r_1 + r_2)X - \frac{F_{in}}{V}S + \frac{F_{in}}{V}S_{in}. \quad (3.1)$$

El segundo paso es establecer un modelo de referencia lineal estable para el error de seguimiento. El modelo de referencia determina la trayectoria decreciente del error de seguimiento y se define de primer orden. La dinámica del error se define entonces como:

$$\frac{d(S_{set} - S)}{dt} = -\lambda((S_{set} - S)), \quad (3.2)$$

donde S corresponde a la concentración de sustrato (glucosa) y S_{set} corresponde al valor del set-point. La ganancia λ es una constante positiva y de ajuste arbitrario, y debe elegirse tal que la ecuación diferencial (3.2) sea estable. Considerando que el error de control se define como la diferencia entre el valor de referencia y el valor de salida $\tilde{S} = S_{set} - S$, la ecuación (3.2) se multiplica por -1, y sumando y restando los términos $\pm\lambda\tilde{S}$ y $\frac{dS_{set}}{dt}$ en el lado derecho, nos queda lo siguiente:

$$\frac{dS_{set}}{dt} - \frac{dS}{dt} = -\lambda\tilde{S} + \lambda\tilde{S} + \frac{dS_{set}}{dt} + (r_1 + r_2)X \quad (3.3)$$

Si se impone la siguiente ley de control:

$$F_{in}(t) = -V \frac{\lambda\tilde{S} + \frac{dS_{set}}{dt} + (r_1 + r_2)X}{(S - S_{in})} \quad (3.4)$$

La ecuación (3.3) se reduce a la ecuación (3.2):

$$\frac{d\tilde{S}}{dt} = -\lambda\tilde{S} \quad (3.5)$$

En condiciones oxídativas, y en ausencia de etanol durante la fermentación, la tasa de crecimiento específica μ es una función igual a la concentración del sustrato [43]. Por lo tanto, en lugar del término de concentración de sustrato en la ecuación 3.4, se puede escribir μ , tomando como valor de referencia la tasa de crecimiento específica crítica μ_{crit} . Como μ_{crit} es un variable en el tiempo, el termino $\frac{d\mu_{crit}}{dt}$ no es cero. Además, estamos considerando que $S = 0$, por tanto, reescribiendo la ecuación 3.4, nos queda:

$$F_{in}(t) = V \frac{\lambda_\mu e_\mu + \frac{d\mu_{crit}}{dt} + (r_1 + r_2)X}{S_{in}} \quad (3.6)$$

siendo la dinámica del error de control e_μ igual a:

$$\dot{e}_\mu(t) = -\lambda_\mu e_\mu - \overbrace{(\theta_\mu^* - \theta_\mu)}^{e_\theta} X \quad (3.7)$$

Dado que este tipo de sistema fermentativo suele tener parámetros desconocidos, como es el caso de las velocidades de crecimiento de las reacciones, bajo este supuesto, se puede afirmar que la suma $r_1 + r_2$ es desconocida. Redefiniendo el parámetro desconocido como $\theta_\mu = (r_1 + r_2)$, la ley de control en 3.6 se vuelve una ley de control adaptativa por linealización:

$$F_{in}(t) = V \frac{\lambda_\mu e_\mu + \frac{d\mu_{crit}}{dt} + \theta_\mu X}{S_{in}} \quad (3.8)$$

3.2. Análisis de estabilidad del error de control

Para encontrar el valor del parámetro desconocido como θ_μ , se utiliza la teoría de estabilidad de Lyapunov [65]. Se plantea la siguiente función candidata de Lyapunov:

$$V(e_\mu, e_\theta) = \frac{1}{2} \left(e_\mu^2 + \frac{e_\theta^2}{\gamma} \right) \quad (3.9)$$

donde $e_\mu = \mu_{crit} - \mu$, $e_\theta = \theta_\mu^* - \theta_\mu$ y γ es una constante estrictamente positiva. El valor de θ_μ^* es el valor ideal al cual debe tender θ_μ y se define como: $\theta_\mu^* = (r_1 + r_2)$.

Se calcula la derivada de la función de Lyapunov candidata:

$$\dot{V}(e_\mu, e_\theta) = \frac{de_\mu}{dt}e_\mu + \frac{1}{\gamma} \frac{de_\theta}{dt}e_\theta \quad (3.10)$$

Sustituyendo la ecuación de la dinámica del error (3.7) en (3.10) queda:

$$\dot{V}(e_\mu, e_\theta) = -\lambda_\mu e_\mu^2 - e_\mu e_\theta X - \frac{1}{\gamma} \frac{d\theta_\mu}{dt} e_\theta \quad (3.11)$$

Escogiendo la siguiente ley de ajuste, tal que se cancele el segundo y el tercer termino de la derivada de la función de Lyapunov:

$$\frac{d\theta_\mu}{dt} = \gamma e_\mu X \quad (3.12)$$

Finalmente, la derivada queda como:

$$\dot{V}(e_\mu, e_\theta) = -\lambda_\mu e_\mu^2 \leq 0 \quad (3.13)$$

La derivada de la función de Lyapunov es solo negativa semi definida (n.s.d) (porque puede ser cero cuando $\tilde{\mu} = 0$). Este resultado permite concluir que $\tilde{\mu}, \theta_\mu$ son acotados (sistema estable), más no permite concluir que convergen asintóticamente a cero.

Como $\dot{V}(\tilde{\mu}, \theta_\mu)$ es n.s.d, para analizar la convergencia emplearemos el Lema de Barbalat[141, 142]. Integramos la derivada de la función de Lyapunov obtenida:

$$\int_0^\infty \dot{V}(e_\mu, e_\theta) d\tau = \int_0^\infty -\lambda_\mu e_\mu^2(\tau) d\tau = -V(\infty) + V(0) < \infty \quad (3.14)$$

Esto permite afirmar que $e_\mu \in \mathcal{L}^2$. Si se asume que θ_μ es acotado, esto permite afirmar que las derivadas también son acotadas, $\dot{e}_\mu, \dot{\theta} \in \mathcal{L}^\infty$. En este punto, se utiliza el corolario del Lema de Barbalat, que plantea que si una función $g(t) \in \mathcal{L}^2 \cap \mathcal{L}^\infty$ y además su derivada

$g(t) \in \mathcal{L}^\infty$, entonces $\lim_{t \rightarrow \infty} g(t) = 0$. Basado en este corolario, entonces puede concluirse que el error tiende asintóticamente a cero:

$$\lim_{t \rightarrow \infty} e_\mu(t) = 0 \quad (3.15)$$

Respecto del error de los parámetros se tiene que $e_\theta \in \mathcal{L}^\infty$ y $\dot{e}_\theta \in \mathcal{L}^2$, pero no se tiene que $e_\theta \in \mathcal{L}^2$, por lo cual no se asegura que el error de los parámetros tienda a cero, y por lo tanto los parámetros adaptables del controlador no necesariamente tenderán a los parámetros de la planta. Una alternativa para que el error de los parámetros $e_\theta(t) \rightarrow 0$ es que haya excitación persistente a la entrada de la planta [143, 144].

3.3. Control de oxígeno disuelto

El siguiente controlador de O_2 se incluye para satisfacer la suposición (A.1). Uno de los desencadenantes del metabolismo Overflow es la falta de oxígeno bajo condiciones aeróbicas. Debido a los enormes efectos que tiene el oxígeno disuelto en el sistema, y para evitar una falta del mismo bajo condiciones aeróbicas en los diseños propuestos de control y observación propuestos en este trabajo de tesis, se incluye un controlador de oxígeno disuelto. El controlador de O_2 fue propuesto por Cárcamo et al. [33], y utiliza una estrategia PI de rango dividido que manipula secuencialmente la agitación (200-600 rpm), el flujo de aire (0,2-0,6 L/min) y la adición de oxígeno puro (0-0,6 L/min). La acción de control considera un rango dividido de 0 - 30 % para agitación (N), 30 - 50 % para aireación (G_{aire}) y 50-100 % para oxigenación (G_{O_2}), manteniendo constante el caudal total de gases (G_{total}).

Con el fin de incluir el término de oxigenación, las ecuaciones 2.15 y 2.16 sufren una modificación. En ambas ecuaciones se reemplazan los valores constantes de saturación por el término de oxigenación, tal que:

$$OTR = kla_{O_2} \left(\frac{py_{O_2}}{k_H O_2} - O_2 \right) \quad (3.16)$$

La nueva expresión de OTR considera a la constante de saturación ($O_{2,sat}$) como el cociente entre la fracción de oxígeno y_{O_2} y la constante de Henry del oxígeno ($k_H O_2$) puro a 30°C. La incorporación de la fracción de oxígeno permite aumentar en la corriente de alimentación gaseosa producto de la adición de oxígeno puro.

$$CTR = kla_{CO_2} \left(CO_2 - \frac{y_{CO_2}}{k_H CO_2} \right) \quad (3.17)$$

donde y_{CO_2} y $k_H CO_2$ son la fracción de dióxido de carbono y la constante de Henry del dióxido de carbono a 30 °C.

El valor de referencia (spO_2) del controlador de O_2 , se calcula como sigue:

$$spO_2 = 0,3 * O_{2,sat}; \text{ siendo } O_{2,sat} = P * y_{O_2} / k_H O_2; \quad (3.18)$$

Un balance de masa permite calcular el aumento de la fracción de oxígeno en aire como:

$$yO_2 = \frac{G_{O_2,aire} + 0,21G_{aire}}{G_{total}} \quad (3.19)$$

donde G_{aire} , G_{O_2} y G_{total} son el flujo de aire, el flujo de oxígeno y el flujo total de aire. Las figuras 3.1 y 3.2 muestran el comportamiento del controlador de DO y el comportamiento de las variables de agitación del biorreactor N, flujo de aire G y fracción de oxígeno yO_2 bajo control, junto con la señal del controlador PI.

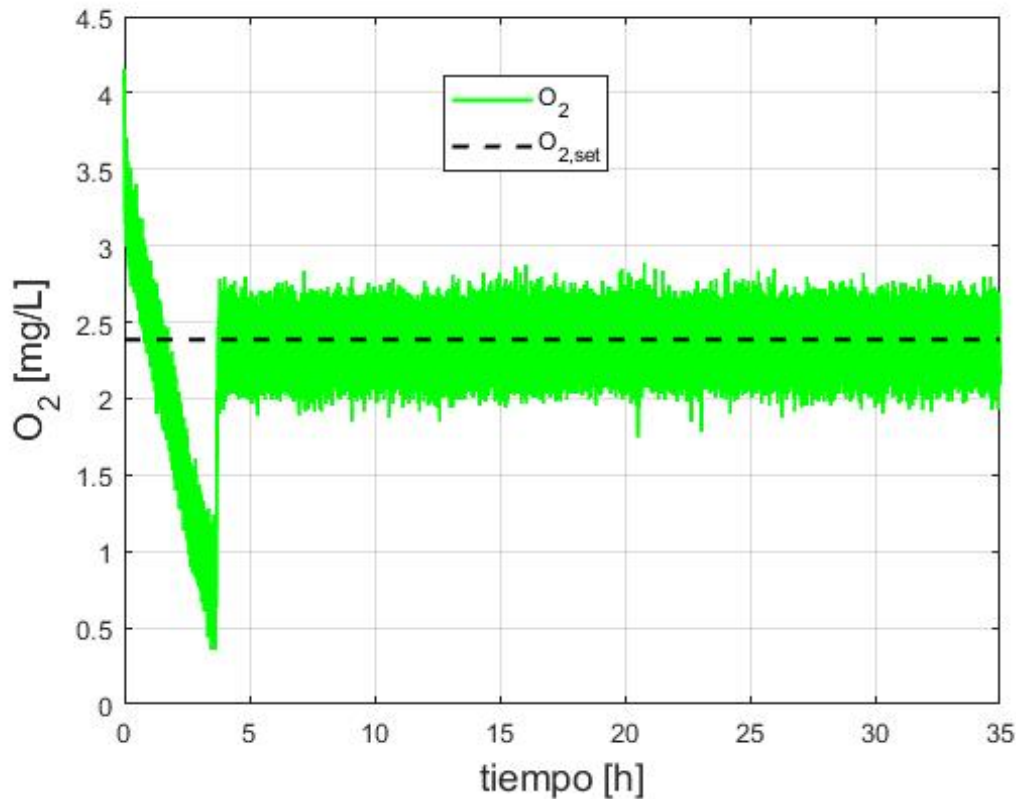


Figura 3.1: Control de oxígeno disuelto

La figura 3.1 muestra como la señal de O_2 es capaz de seguir la referencia impuesta $O_{2,set}$ durante toda la fermentación. Mientras que la figura 3.2 muestra el comportamiento de las variables manipuladas. En el tramo A de la señal de control correspondiente al rango entre 0-30 % (Figura 3.2 - Línea Negra) se activa el control de agitación (Figura 3.2 - Línea azul), cuando este la agitación se satura en 600 rpm, se activa el control de flujo de aire (Figura 3.2 - Línea roja) el cual corresponde al tramo B de la señal de control (30-50 %), una vez que se satura en su valor máximo, 0.6 g/L, se activa el control de la fracción de oxígeno yO_2 (Figura 3.2 - Línea magenta) hasta el final del tiempo de fermentación (Tramo C). Por otro lado, la 3.3 muestra el comportamiento de los coeficientes de transferencia volumétrica para el oxígeno kla_{O_2} y el dióxido de carbono kla_{CO_2} , los cuales se calculan mediante las ecuaciones (2.17) y (2.18). Tanto el coeficiente kla_{O_2} como el kla_{CO_2} se estabilizan a lo largo del tiempo.

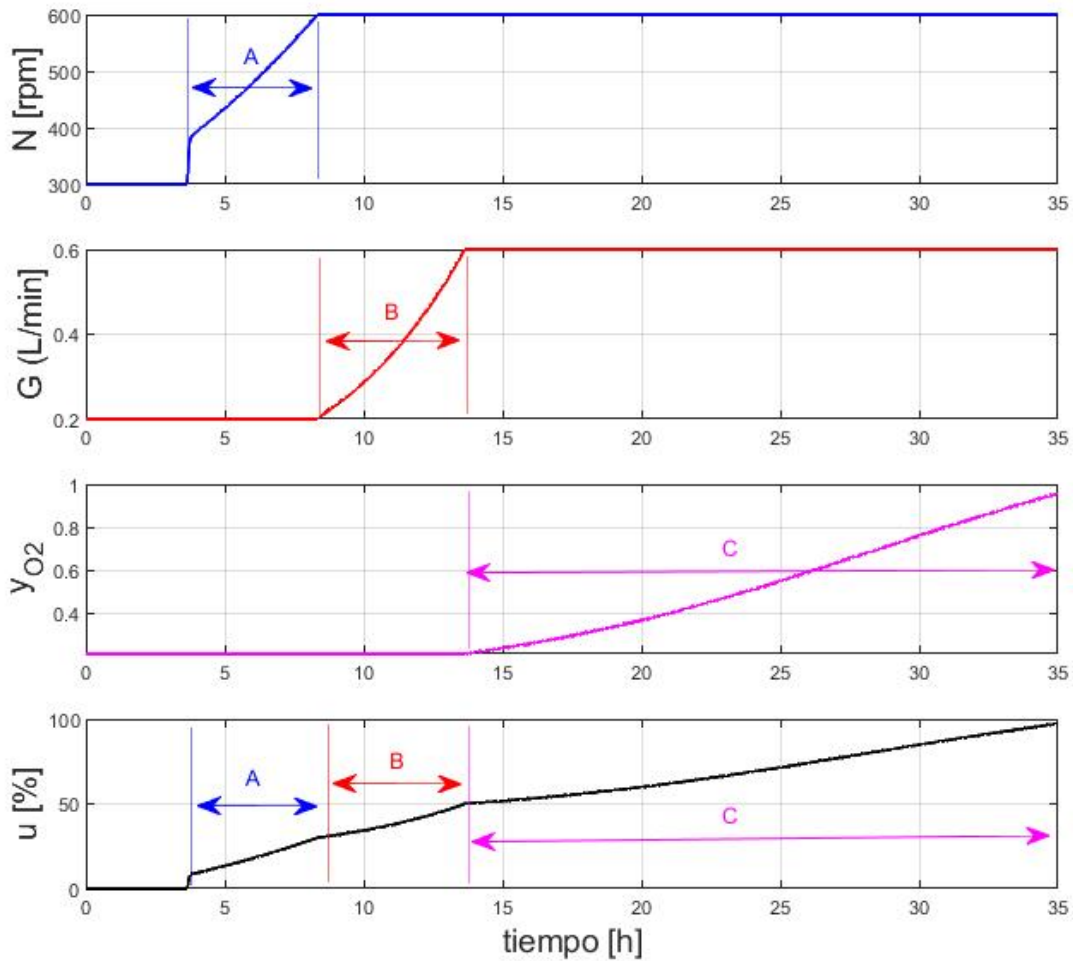


Figura 3.2: Agitación (N), flujo de aire (G), fracción de oxígeno (y_{O_2}) y señal de controlador de O_2 .

3.4. Optimización de los parámetros de los controladores

Los parámetros de los siguientes controladores fueron calculados mediante optimización utilizando PSO:

- Estrategia 1: Controlador adaptable propuesto por Dewasme et al.[17]. La señal de control F_{in} se define en la ecuación (2.25) junto con la ley de ajuste $\hat{\theta}$ (ecuación (2.26)).
- Estrategia 2: Controlador adaptable propuesto en la ecuación (3.8).
- Controlador de rango dividido para O_2 propuesto en la sección 4.2.

Para seleccionar los valores óptimos de las estrategias 1 y 2, se definió la siguiente función objetivo utilizada en el proceso de optimización cuya forma se muestra en (3.20):

$$J = \omega_1 \frac{\sum_{n=1}^{t_f} |e(t)| dt}{\sigma_e} + \omega_2 \frac{\sum_{n=1}^{t_f} u(t)^2 dt}{\sigma_u} \quad (3.20)$$

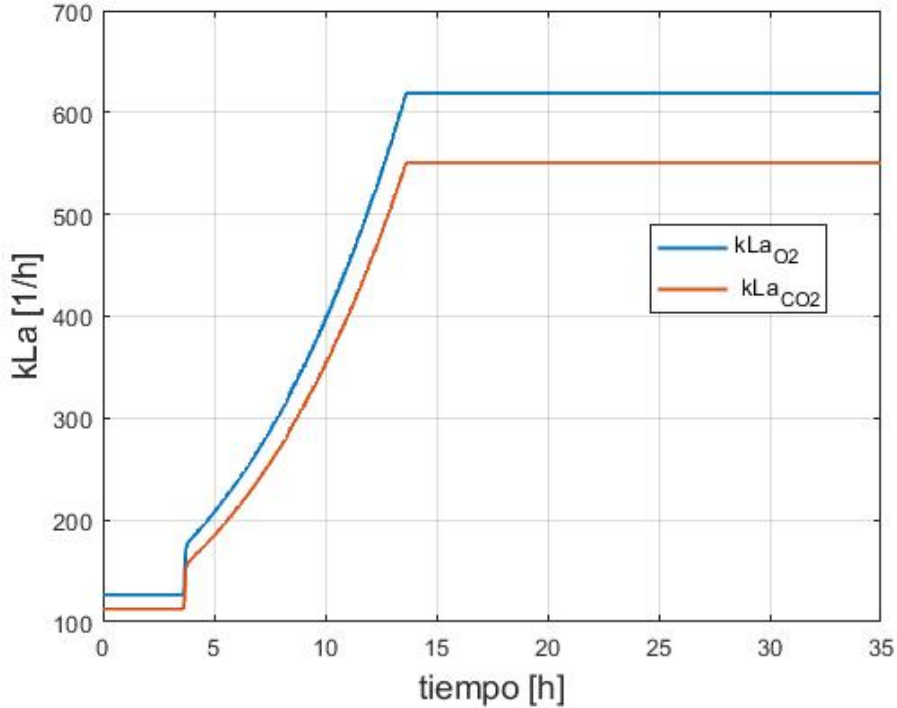


Figura 3.3: Coeficientes de transferencia volumétrica para el oxígeno kla_{O_2} y el dióxido de carbono kla_{CO_2} .

donde ω_1 , ω_2 , $e(t)$, $u(t)$, t_f , σ_e y σ_u son factores de peso (que se calculan manualmente), el error de control y/o estimación, la señal de control, el tiempo final de fermentación, y las desviaciones estándar del error y señal de control respectivamente. Los factores de peso permiten equiparar los valores nominales de cada una de las señales para considerar un *trade-off* entre el seguimiento del error y el esfuerzo del controlador. La función objetivo J minimiza el error y el esfuerzo de control, para encontrar los parámetros óptimos de control.

Para el caso de los parámetros del controlador de rango dividido para O_2 , se calcularon tal que se minimizara el error de control ($e_{O_2} = O_{2,set} - O_2$). Los parámetros de PSO más representativos que fueron utilizados en las simulaciones se resumen en la tabla 3.1:

Parámetros PSO	Estrategia 1	Estrategia 2	Estrategia 3
Tamaño de la población	10	10	10
Número de generaciones	30	30	30
Algoritmo	<i>fminsearch</i>	<i>fminsearch</i>	<i>fminsearch</i>
γ	0.0055	0.2553	-
λ_1	0.3473	0.1528	-
λ_2	0.0430	-	-
ω_1	1000	100	-
Ganancia P	-	-	1.8708
Ganancia I	-	-	1.1632e+03

Tabla 3.1: Parámetros optimizados por PSO para las estrategias de control.

3.5. Esquemas propuestos de lazos de control

Las siguientes figuras 3.4 y 3.5 representan los esquemas de control de estudio de esta tesis. Un primer esquema de control definido en la figura 3.4 muestra la modificación a la estrategia de control propuesta por Dewasme et al. [17], donde se incluye un controlador de O_2 y además un observador para la biomasa y etanol, el cual su diseño se verá en detalles en el Capítulo 5. Tal y como se ha mencionado antes, la estrategia 1 seguirá un nuevo valor de referencia fijo definido en $E_{set} = 0,5 \text{ g/L}$.

Por otra parte, el diseño en la figura 3.5 representa la estrategia de control de μ desarrollada en esta tesis, junto con el controlador de O_2 y además un observador para la biomasa y la velocidad de crecimiento. La estrategia 2 seguirá un valor de referencia variable en el tiempo igual $\mu_{set} = 0,95 \mu_{crit}$, lo cual evita el metabolismo overflow y la formación de etanol.

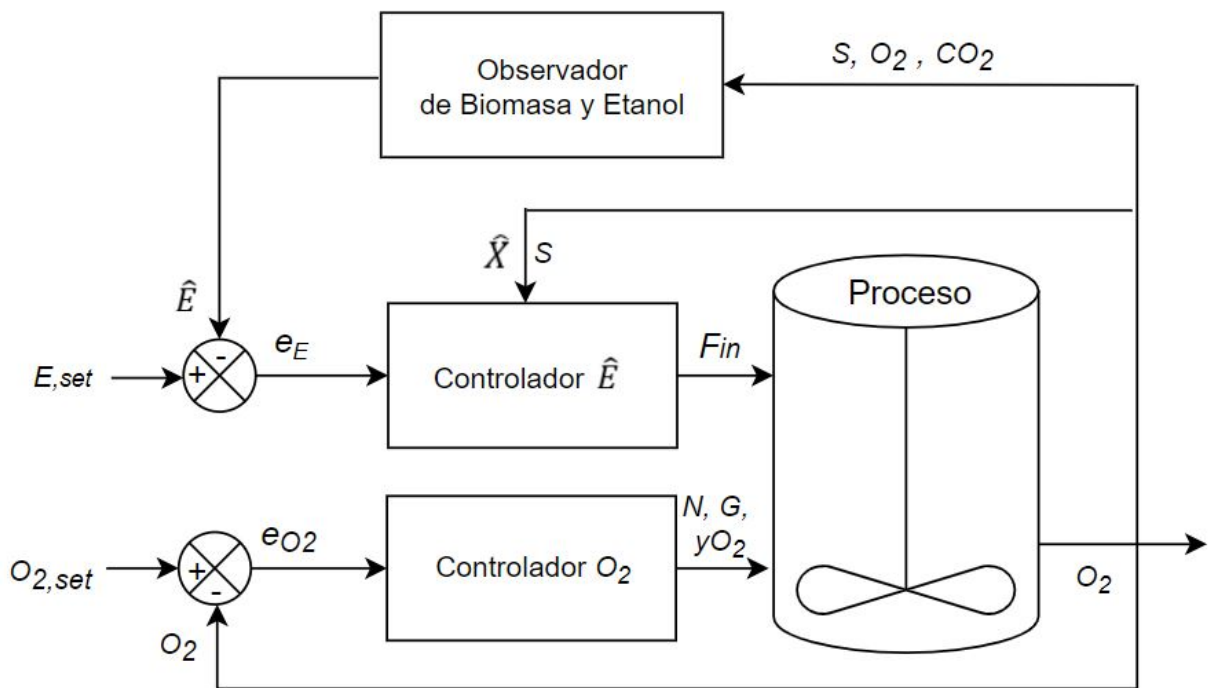


Figura 3.4: Esquema de control propuesto para la estrategia 1 que incluye observador de etanol y el controlador de O_2 .

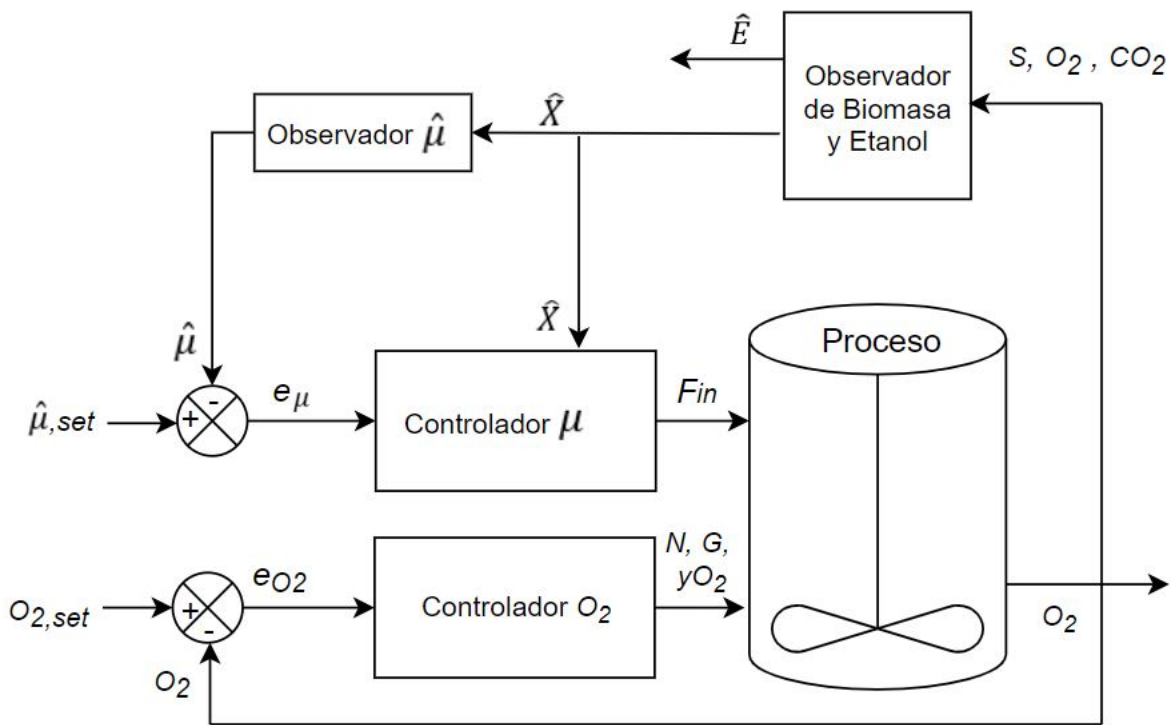


Figura 3.5: Esquema de control propuesto para la estrategia 2 que incluye observador de biomasa y velocidad de crecimiento y el controlador de O_2 .

3.6. Conclusiones

Se diseñó una estrategia de control adaptable para la velocidad de crecimiento basada en la linealización de las ecuaciones de balance de masa de la concentración de sustrato, usando un modelo de referencia lineal de primer orden. Las ventajas de controlar la tasa de crecimiento específica, es que el microorganismo se ve obligado a permanecer en un estado fisiológico determinado, lo que permite maximizar la productividad y el rendimiento en el proceso.

La tabla 3.2 muestra un resumen de las estrategias de control de F_{in} definidas en la literatura y en este trabajo de tesis:

Referencia	Estrategia Control	Cantidad de parámetros de ajuste
Chen et al. [16]	$F_{in}(t) = V \frac{(\lambda_1 + \lambda_2 \hat{X})(E^* - E) + \hat{\theta} \hat{X} + Q_E}{\frac{k_S}{k_2} S_{in} - E}$	2
Dewasme et al. [17]	$F_{in}(t) = V \frac{(\lambda_1 + \lambda_2 \hat{X})(E^* - E) + \hat{\theta} \hat{X}}{\frac{k_{E2}}{k_{S2}} S_{in} - E}$	2
Hocalar et al. [18]	$F_{in}(t) = \frac{1}{\nu_3} \left(\frac{dE^*}{dt} + (\lambda_1 + \lambda_2 \hat{X})(E^* - E) + DE + \nu_1 OTR - \nu_2 CTR \right)$	5
Hocalar et al. [43]	$F_{in}(t) = V \frac{\frac{\mu_x}{Y_{X,Ox,S}} - \lambda_p \left((\mu_s - \mu') - \frac{1}{\lambda_i} \sum (\mu_s - \mu') \right)}{S_{in}}$	2
Este Trabajo	$F_{in}(t) = V \frac{\lambda_\mu e_\mu + \frac{d\mu_{crit}}{dt} + \theta X}{S_{in}}$	1

Tabla 3.2: Estrategias de control de F_{in} .

La estrategia propuesta en esta tesis tiene varias ventajas sobre las estrategias mencionadas en la tabla 3.2. Las ventajas pueden resumirse de la siguiente manera:

- Cantidad de parámetros de ajuste. La estrategia solo necesita ajustar el parámetro λ_μ .
- Considera en el diseño la existencia de parámetros parcialmente desconocidos del modelo del biorreactor. Los parámetros desconocidos son englobados en un parámetro desconocido definido como θ .
- Considera un set-point (μ_{crit}) variable en el tiempo.
- No contiene parámetros estequiométricos.

Como desventaja, la estrategia propuesta necesita conocer la estimación de la concentración de biomasa, la velocidad de crecimiento y la velocidad de crecimiento crítica. Además, de que se necesita conocer el volumen del biorreactor.

Capítulo 4

Diseño de observadores para ADC

En este capítulo se diseñan las estrategias de observadores propuestas para alta densidad.

4.1. Introducción

En la monitorización de los procesos biotecnológicos industriales suelen usarse una amplia gama de sensores industriales. En el monitoreo en línea de variables críticas, como concentraciones de biomasa, sustratos y productos en biorreactores suelen usarse sensores basados en densidad óptica, capacitancia, ultrasónicos espectroscopía infrarroja y análisis de inyección de flujos [18]. El principal inconveniente de estos sensores es que requieren una calibración frecuente y, a menudo, proporcionan mediciones poco confiables, sobre todo, cuando se operan a altas concentraciones de biomasa (alta densidades en cultivos fed-batch) o concentraciones bajas de sustrato/producto [59, 67]. En el caso de la medición de productos, es particularmente difícil encontrar sensores confiables capaces de medir la variable deseada.

Una alternativa para estos sensores es la implementación de observadores o estimadores (sensores virtuales). Un observador no es más que un sistema que se basa en un algoritmo matemático para estimar variables no medibles basadas en variables medidas en tiempo real [51]. Los observadores se remontan al trabajo de Luenberger [68, 69, 70] para sistemas dinámicos lineales y, desde entonces, se han aplicado ampliamente en diferentes bio-procesos debido a su bajo costo, naturaleza no invasiva y versatilidad [71].

Las variables que generalmente se miden mediante sensores físicos, análisis de gases de escape y tasas de flujo en biorreactores industriales son: i) temperatura, ii) pH, iii) oxígeno disuelto (OD), iv) presión total, v) composición del gas de salida, vi) flujo másico de alimentación, y vii) nivel de espuma [56, 95, 96]. La forma más común de medir las concentraciones de O_2 y CO_2 es a través de analizadores de gases [145, 25].

La concentración de sustrato (glucosa) se puede cuantificar y medir en línea utilizando diferentes técnicas basadas en espectroscopía [96, 98], ensayos enzimáticos automatizados [21] y análisis bioquímicos en línea [97]. Hay varios sensores comerciales disponibles para la medición de glucosa en línea, como BioPAT Trace y BioPAT Multitrace (Sartorius), Cedex Bio (Roche Diagnostics GmbH), la serie de analizadores biomédicos (Yellow Springs Instru-

ments), la serie BioProfile (de Nova Biomedical) y la serie Analyzer (por SBA) [146]. Por otro lado, los métodos fuera de línea para la medición de glucosa incluyen ensayos enzimáticos [145, 99, 100, 35, 12] y químicos [102, 29, 103, 34] y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [101].

A diferencia de la concentración de sustrato, la concentración de producto (por ejemplo, etanol) es probablemente la variable más difícil de estimar en línea. Algunos métodos fuera de línea incluyen la cuantificación mediante unidades de fluorescencia (rFU) [105], cromatografía capilar de gases [21, 102], bioquímica [146] y análisis HPLC [99, 109]. En particular, Xiong et al. [103] empleó una sonda de etanol para determinar la concentración de etanol en tiempo real. A pesar de esto, la concentración de etanol, así como otros bioproductos relevantes, rara vez se mide en línea con pocos observadores reportados hasta la fecha.

La concentración de biomasa, por otra parte, se mide típicamente fuera de línea (*offline*) mediante análisis gravimétrico después de la centrifugación [145, 25, 97, 105, 39, 106, 107]. Otros métodos *offline* de medición/estimación de la concentración de biomasa incluyen: correlación de las mediciones del consumo de oxígeno disuelto (OD) con el contenido de biomasa [104, 27], *trypan blue dye exclusion test* [108], medición de la densidad óptica del cultivo [99, 100, 102, 109, 71], llenado de tubos-Eppendorf [35], recuento de células mediante un hemocitómetro [29], medición del peso celular seco (DCW) [12, 101, 103, 12, 110] y estimación por espectroscopia dieléctrica (capacitancia) [34, 111, 112] o espectroscopia infrarroja [113, 114].

En este trabajo de tesis se diseñaron dos observadores para la estimación de la concentración de biomasa, etanol y velocidad de crecimiento.

4.2. Observador Asintótico

La base de los dos observadores propuestos en esta tesis es el observador asintótico (AO) propuesto por Bastin y Dochain [51], el cuál permite estimar variables no accesibles dentro del proceso de fermentación a partir de mediciones, sin conocer *a priori* la cinética del proceso, que es desconocida y la parte más crítica del proceso. El observador asintótico es la base de los observadores propuestos en esta tesis, y su estructura se describe a continuación. La idea detrás del AO es utilizar una estructura independiente de la cinética del fermentador. Este observador puede reconstruir las variables de estado que faltan, incluso si el proceso no es exponencialmente observable y la cinética es desconocida.

Para el diseño del AO se hacen las siguientes suposiciones:

- . (B.1) Las tasas de reacción $r_1(t)$, $r_2(t)$ y $r_3(t)$ son desconocidas.
- . (B.2) La matriz de coeficientes estequiométricos ($K \in R^{n \times m}$) es conocida.
- . (B.3) El número q de variables de estado medidas es igual o mayor que el rango de la matriz K [51, 53].

El modelo presentado en [17] considera seis ecuaciones diferenciales que representan las concentraciones de biomasa (X), sustrato (S), etanol (E), oxígeno disuelto (O_2), dióxido de carbono (CO_2) y volumen (V). Estas ecuaciones diferenciales se pueden escribir en la

siguiente representación general:

$$\frac{d\xi}{dt} = Kr(t)X - D(t)\xi(t) + F(t) \quad (4.1)$$

donde $\xi(t) = [X \ S \ E \ O_2 \ CO_2]^T \in R^5$ es el vector de concentraciones del modelo (el volumen no se considera); K es la matriz de coeficientes estequiométricos, $r(t) = [r_1(t) \ r_2(t) \ r_3(t)]^T$ es el vector de las tasas de crecimiento correspondiente a las reacciones metabólicas, $D = F_{in}/V$ es la tasa de dilución y $F = [0 \ DS_{in} \ 0 \ OTR \ -CTR]^T$ es el vector de las tasas de alimentación y las tasas de salida de gases.

La ecuación (4.1) se puede dividir en dos particiones. Una partición de variables medibles (ξ_1) igual a:

$$\frac{d\xi_1}{dt} = K_1r(t) - D\xi_1 + F_1, \quad (4.2)$$

Y una partición de variables no medibles (ξ_2) igual a:

$$\frac{d\xi_2}{dt} = K_2r(t) - D\xi_2 + F_2, \quad (4.3)$$

Utilizando la siguiente transformación de estado:

$$Z = \xi_2 - K_2K_1^{-1}\xi_1, \quad (4.4)$$

donde K_1^{-1} es una matriz pseudo-inversa de K_1 , siendo K_1 de rango completo. La dinámica de la transformación de estado queda de la siguiente forma:

$$\frac{dZ}{dt} = -DZ - K_2K_1^{-1}F_1 + F_2. \quad (4.5)$$

A partir de la ecuación (4.6), podemos obtener las ecuaciones finales del observador asintótico:

$$\frac{d\hat{Z}}{dt} = -D\hat{Z} - K_2K_1^{-1}F_1 + F_2. \quad (4.6)$$

$$\hat{\xi}_2 = \hat{Z} + K_2K_1^{-1}\xi_1. \quad (4.7)$$

donde \hat{Z} y $\hat{\xi}_2$ son las estimaciones de Z y ξ_2 respectivamente.

4.3. Observador Híbrido

De acuerdo al estudio de la literatura de observadores de alta densidad en cultivo fed-batch, existen pocos diseños de observadores robustos. Este tipo de cultivo suma una dificultad relacionada con las mediciones de fermentación disponibles, las cuales, comúnmente, están sujetas a ruido, lo que dificulta la identificación de parámetros en la práctica y, por lo tanto,

el diseño de cualquier observador. Para abordar las limitaciones mencionadas a lo largo de esta tesis, en este trabajo se propone un observador híbrido inspirado en trabajos previos de Bogaerts et al. [50] para la estimación en línea de las siguientes variables clave del proceso: concentración de biomasa, etanol y velocidad de crecimiento.

La estimación se hará a partir de mediciones disponibles de O_2 , CO_2 y concentración de sustrato. El observador híbrido propuesto combina el diseño del observador asintótico de Bastin y Dochain [51] y un filtro de Kalman extendido (EKF) para estimar los variables clave mencionadas teniendo en cuenta los siguientes aspectos:

- . No hay conocimiento a priori del proceso de fermentación.(Condición (B.1))
- . No se conocen las condiciones iniciales del observador.
- . Existe incertidumbre en los parámetros estequiométricos. A pesar, de que se establece que los parámetros son conocidos, se harán estudios de su variabilidad.
- . Se considera un ruido aditivo del 5% y 10% del valor nominal de las mediciones de oxígeno disuelto, dióxido de carbono y sustrato.

La idea del observador híbrido es beneficiarse de los algoritmos asintóticos y exponenciales. El AO clásico puede estimar sin necesidad de conocer la cinética del proceso, sin embargo, su velocidad de convergencia se puede ver severamente afectada, ya que depende de las condiciones experimentales, es decir, de la tasa de dilución del biorreactor. A su vez, los observadores exponenciales (como el Filtro de Kalman extendido (EKF), Filtro de Kalman *unscented* (UKF), Luenberger extendido (EL) y Modos deslizante (SM)) presentan tasas de convergencia rápidas, aunque el modelo cinético debe conocerse *a priori*. Si el modelo no se conoce bien, las estimaciones son inexactas. Además, del observador híbrido propuesto en [50], existen otras versiones como el observador híbrido asintótico-Luenberger extendido de [93, 94].

El observador híbrido se basa en una formulación continua-discreta, donde se proporcionan estimaciones continuas a partir de mediciones en tiempo discreto. El algoritmo consta de dos pasos: 1) un paso de predicción, donde el sistema se rige por estados transformados (definidos por el AO) y, 2) un paso de corrección, definido por el filtro EKF.

Las particiones de variables medibles y no medibles seleccionadas en este trabajo de tesis son:

$$\xi_1 = [O_2 \ CO_2 \ S]^T, \quad (4.8)$$

$$\xi_2 = [X \ E]^T. \quad (4.9)$$

En estas particiones, no se considera al volumen, dado que está relacionado directamente con la tasa de dilución D , la cual es una entrada del sistema. La selección de las variables a estimar está condicionada a su uso posterior en las estrategias de control descritas en el capítulo 4. La estrategia de control modificada de Dewasme necesita la estimación del etanol y la biomasa en su ley de control, mientras que la estrategia propuesta en esta tesis utiliza las estimaciones de biomasa y velocidad de crecimiento. Por lo anterior, no existe otra combinación de variables medibles que no sea la seleccionada en (4.8) para estimar las variables en (4.9).

De acuerdo a Bastin y Dochain [51], para las particiones ξ_1 y ξ_2 , existe al menos una matriz A_0 y un vector Z (transformaciones de estado). La dimensión del vector Z es igual

a la dimensión del vector de variables de estado ξ ($n = 5$, el volumen no está incluido) menos el rango de la matriz de coeficientes de rendimiento K ($k = 3$), de modo que el vector $Z = [Z_1 \ Z_2]^T \in R^2$.

Para chequear la condición necesaria (B.3), se chequea primero el rango de la matriz $K_1 \in R^{p \times M}$. Consideremos que la matriz estequiométrica K dada por:

$$K = [K_1 \ K_2] = \begin{bmatrix} Y_{S,Ox,X} & Y_{S,Fer,X} & Y_{E,Ox,X} \\ -1 & -1 & 0 \\ 0 & Y_{S,Fer,E} & -1 \\ -Y_{S,Ox,O_2} & 0 & -Y_{E,Ox,O_2} \\ Y_{S,Ox,CO_2} & Y_{S,Fer,CO_2} & Y_{E,Ox,CO_2} \end{bmatrix} \in R^{N \times M}, \quad (4.10)$$

$$K_1 = \begin{bmatrix} -Y_{S,Ox,O_2} & 0 & -Y_{E,Ox,O_2} \\ Y_{S,Ox,CO_2} & Y_{S,Fer,CO_2} & Y_{E,Ox,CO_2} \\ -1 & -1 & 0 \end{bmatrix} \in R^{p \times M}, \quad (4.11)$$

$$K_2 = \begin{bmatrix} Y_{S,Ox,X} & Y_{S,Fer,X} & Y_{E,Ox,X} \\ 0 & Y_{S,Fer,E} & -1 \end{bmatrix} \in R^{N-p \times M}. \quad (4.12)$$

El rango de la ecuación (4.10) es 3, que es igual al número de variables de estado medidas ($q = p = 3$). Además, supongamos que Y_{S,Fer,CO_2} , Y_{E,Ox,O_2} y Y_{S,Ox,O_2} son distintos de cero, entonces K_1 es invertible. Dado que K_1 es invertible, la matriz pseudo inversa $A_0 \in R^{N-p \times q}$ tiene una solución única en la forma:

$$A_0 K_1 + K_2 = O_{N-p,M}, \quad (4.13)$$

donde N y M son, respectivamente, el número de la variable de estado y el número de reacciones. Con la condición (B.3) satisfecha, junto con la invertibilidad de K_1 , se puede definir los dos estados transformados para ξ_1 y ξ_2 como se definen en [50]:

$$Z_1 = \xi_1, \quad (4.14)$$

$$Z_2 = \xi_2 + (1 - \delta(t))A_0\xi_1, \quad (4.15)$$

con,

$$\frac{d\xi_1}{dt} = \begin{bmatrix} -Y_{S,Ox,O_2} & 0 & -Y_{E,Ox,O_2} \\ Y_{S,Ox,CO_2} & Y_{S,Fer,CO_2} & Y_{E,Ox,CO_2} \\ -1 & -1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_1(t) \\ r_2(t) \\ r_3(t) \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} O_2 \\ CO_2 \\ S \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix}, \quad (4.16)$$

$$\frac{d\xi_2}{dt} = \begin{bmatrix} Y_{S,Ox,X} & Y_{S,Fer,X} & Y_{E,Ox,X} \\ 0 & Y_{S,Fer,E} & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_1(t) \\ r_2(t) \\ r_3(t) \end{bmatrix} X - D \begin{bmatrix} X \\ E \end{bmatrix}, \quad (4.17)$$

Sustituyendo en los estados transformados (4.14) y (4.15) y derivando, se obtiene

$$\begin{aligned} \frac{dZ_1}{dt} &= \begin{bmatrix} -Y_{S,Ox,O_2} & 0 & -Y_{E,Ox,O_2} \\ Y_{S,Ox,CO_2} & Y_{S,Fer,CO_2} & Y_{E,Ox,CO_2} \\ -1 & -1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_1(t) \\ r_2(t) \\ r_3(t) \end{bmatrix} Z_{14}^- \\ D \begin{bmatrix} Z_{11} \\ Z_{12} \\ Z_{13} \end{bmatrix} &+ \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix}, \end{aligned} \quad (4.18)$$

$$\begin{aligned} \frac{dZ_2}{dt} &= \begin{bmatrix} Y_{S,Ox,X} & Y_{S,Fer,X} & Y_{E,Ox,X} \\ 0 & Y_{S,Fer,E} & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_1(t) \\ r_2(t) \\ r_3(t) \end{bmatrix} Z_{14}^- \\ D \begin{bmatrix} Z_{14} \\ Z_{15} \end{bmatrix} &+ (1 - \delta(t))A_0 \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix}, \end{aligned} \quad (4.19)$$

donde $Z_{1i} \forall i \in \{1, \dots, 5\}$ son los estados transformados de las variables originales definidas en las ecuaciones (2.9) - (2.13). El parámetro $\delta \in R$ varía entre 0 y 1 y cuantifica la confianza del modelo en la minimización del error de estimación,

El vector de salidas se define como $y(t) = \xi_1(t) \in R^3$, el cual representa las mediciones continuas construidas sobre la base de las muestras discretas $y(t_k) = \xi_1(t_k) \in R^3$. El vector de salidas continuas $y(t)$ se representa de la siguiente manera:

$$y(t) = y(t_k), t_k \leq t < t_{k+1}, \quad (4.20)$$

donde y_{t_k} es la medición discreta en t_k . Las muestras discretas vienen dadas por:

$$y(t_k) = \xi_1(t_k) + \varepsilon(t_k), \quad (4.21)$$

donde $\varepsilon(t_k)$ es el ruido blanco de media cero y varianza $Q(t_k) > 0$, satisfaciendo las siguientes condiciones:

$$\begin{cases} E[\varepsilon(t_k)] = 0, \\ E[\varepsilon(t_k)\varepsilon^T(t_l)] = \gamma_{k,l}Q(t_k) = \gamma_{k,l}diag \{ \sigma_1^T(t_k), \dots, \sigma_L^T(t_k) \}, \end{cases} \quad (4.22)$$

donde $\gamma_{k,l}$ es el tiempo de muestreo y $\sigma_1^T(t_k), \dots, \sigma_L^T(t_k)$ son las varianzas de las señales nominales de las mediciones.

Finalmente, las ecuaciones del observador híbrido se resumen a continuación:

Fase de predicción continua

$$\frac{d\hat{Z}_1}{dt} = K_1 \begin{bmatrix} r_1(t) \\ r_2(t) \\ r_3(t) \end{bmatrix} \hat{Z}_{14} - D \begin{bmatrix} \hat{Z}_{11} \\ \hat{Z}_{12} \\ \hat{Z}_{13} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix}, \quad (4.23)$$

$$\frac{d\hat{Z}_2}{dt} = \delta(t)K_2 \begin{bmatrix} r_1(t) \\ r_2(t) \\ r_3(t) \end{bmatrix} \hat{Z}_{14} - D \begin{bmatrix} \hat{Z}_{14} \\ \hat{Z}_{15} \end{bmatrix} + (1 - \delta(t))A_0 \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix}, \quad (4.24)$$

donde \hat{Z}_1 y \hat{Z}_2 son las predicciones de los estados transformados de Z_1 y Z_2 , respectivamente.

$$\frac{dP}{dt} = F(\hat{Z})P + PF(\hat{Z})^T + R \quad \forall t \in [t_k, t_{k+1}], \quad (4.25)$$

siendo $P(t_{k+1}^+) \in R^{6 \times 6}$ la predicción de la covarianza, $R \in R^{6 \times 3}$ la matriz de covarianza de los ruidos de estado. F se define como:

$$F(\hat{Z}) = \left. \frac{\partial f(Z)}{\partial Z} \right|_{Z=\hat{Z}(t)}, \quad (4.26)$$

donde, el vector de predicción de estados se redefine como:

$$\hat{Z}(t) = [\hat{Z}_1^T \hat{Z}_2^T \hat{\delta}]^T \in R^6, \quad (4.27)$$

y $f(Z)$ es igual a:

$$f(Z) = \begin{bmatrix} K_1 r(t) - DZ_1 \\ \delta(t)K_2 r(t) - DZ_2 + (1 - \delta(t))A_0 \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix} \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (4.28)$$

Fase de innovación-actualización

La ganancia de Kalman $K(t_k) \in R^{6 \times 3}$ esta dada por:

$$K(t_k) = P(t_{k+1}^-)C^T[CP(t_{k+1}^-)C^T + Q(t_{k+1})]^{-1}, \quad (4.29)$$

Mientras que la actualización del estado, la covarianza y el parámetro delta están dadas por las siguientes ecuaciones:

$$\hat{Z}(t_{k+1}^+) = \hat{Z}(t_{k+1}^-) + K(t_{k+1})(y(t_{k+1}) - \hat{\xi}_1(t_{k+1}^-)), \quad (4.30)$$

$$P(t_{k+1}^+) = P(t_{k+1}^-) - K(t_{k+1})CP(t_{k+1}^-) \quad (4.31)$$

$$\hat{\delta}(t_{k+1}^+) = \hat{\delta}(t_{k+1}^-) + K_{6j}(t_{k+1})(y(t_{k+1}) - \hat{\xi}_1(t_{k+1}^-)), \quad (4.32)$$

donde $C \in R^{3 \times 6}$ y $Q(t_{k+1}) \in R^{3 \times 3}$ son las matrices de mediciones y covarianza de los errores de medición, respectivamente. $K_{6j}(t_{k+1}) \forall j \in \{1, 2, 3\}$ son los últimos elementos de la matriz de ganancia de Kalman.

Finalmente, los estados recuperados $\hat{\xi}_1$ (4.33) y $\hat{\xi}_2$ (4.34) de los estados transformados (4.14) - (4.15) representan las estimaciones de las concentraciones de oxígeno disuelto, dióxido de carbono, sustrato, biomasa y etanol, y se calculan como,

$$\hat{\xi}_1(t) = \begin{bmatrix} \hat{O}_2 \\ C\hat{O}_2 \\ \hat{S} \end{bmatrix} = \delta(t)\hat{Z}_1 + (1 - \delta(t))y(t) \quad (4.33)$$

$$\hat{\xi}_2(t) = \begin{bmatrix} \hat{X} \\ \hat{E} \end{bmatrix} = \hat{Z}_2 - (1 - \delta(t))A_0\hat{\xi}_1(t). \quad (4.34)$$

A partir de la estimación de la concentración de biomasa actual (4.34), se puede estimar la velocidad de crecimiento específica, usando la siguiente correlación definida en [34]:

$$\hat{\mu} = \frac{1}{\hat{X}} \frac{d\hat{X}}{dt}. \quad (4.35)$$

4.4. Observador de velocidad de crecimiento

Una forma alternativa a la estimación de la velocidad de crecimiento definida en (4.35), es usar una versión del observador asintótico en cascada propuesto por Pomerleau et al. [52].

Para el diseño del observador, se propone un enfoque de estimación de dos pasos. En el primer paso, se utiliza el observador asintótico propuesto por Bastin y Dochain [51] y descrito en la subsección 4.2. En este diseño se estima la concentración de biomasa y etanol a partir de las mediciones disponibles de las concentraciones de O_2 , CO_2 y S .

Utilizando las particiones definidas en (4.8) y (4.9) y la transformación de estado (4.4), la dinámica del estado transformado se puede reescribir como:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} Z_1 \\ Z_2 \\ Z_3 \end{bmatrix} = -D \begin{bmatrix} Z_1 \\ Z_2 \\ Z_3 \end{bmatrix} - K_2 K_1^{-1} \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix} \quad (4.36)$$

con K_1 igual a (4.11) y K_2 igual a (4.12).

Para este diseño, las ecuaciones del AO están dadas por:

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \hat{Z}_1 \\ \hat{Z}_2 \\ \hat{Z}_3 \end{bmatrix} = -D \begin{bmatrix} \hat{Z}_1 \\ \hat{Z}_2 \\ \hat{Z}_3 \end{bmatrix} - K_2 K_1^{-1} \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix} \quad (4.37)$$

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} \hat{X} \\ \hat{E} \end{bmatrix} = -D \begin{bmatrix} \hat{Z}_1 \\ \hat{Z}_2 \\ \hat{Z}_3 \end{bmatrix} - K_2 K_1^{-1} \begin{bmatrix} O_2 \\ CO_2 \\ S \end{bmatrix} \quad (4.38)$$

donde \hat{X} y \hat{E} son estimaciones de las concentraciones de biomasa y etanol.

Para el estimador de la velocidad de crecimiento se define una nueva partición, de la forma:

$$\psi = K_1^{-1} \xi_1. \quad (4.39)$$

Calculando la dinámica de la nueva variable, queda:

$$\frac{d\psi}{dt} = -D\psi + \begin{bmatrix} r_1(t) \\ r_2(t) \\ r_3(t) \end{bmatrix} X + K_1^{-1} \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix} \quad (4.40)$$

El siguiente observador se construye para la ecuación (4.11):

$$\frac{d\hat{\psi}}{dt} = -D\hat{\psi} + \begin{bmatrix} \hat{r}_1(t) \\ \hat{r}_2(t) \\ \hat{r}_3(t) \end{bmatrix} \hat{X} + K_1^{-1} \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix} + C_1(\psi - \hat{\psi}) \quad (4.41)$$

donde las velocidades de crecimiento de cada reacción se estiman mediante la ecuación:

$$\begin{bmatrix} \hat{r}_1(t) \\ \hat{r}_2(t) \\ \hat{r}_3(t) \end{bmatrix} = C_2(\psi - \hat{\psi}) \quad (4.42)$$

donde C_1 y C_2 son parámetros de diseño. En Pomerleau et al.[52], la concentración de biomasa se encuentra multiplicando el término de corrección del error $(\psi - \hat{\psi})$. En esta nueva versión, se elimina dicha dependencia, quedando el término del error independiente, como en los diseños del observador extendido de Luenberger.

Los parámetros C_1 y C_2 se definen como sigue:

$$C_1 = \text{diag} \{-\omega_i\}, \forall i = 1, \dots, n; C_2 = \text{diag} \{-\nu_j\}, \forall j = 1, \dots, m; \omega_i, \nu_j \in \mathfrak{R}^+ \quad (4.43)$$

La velocidad de crecimiento crítica se calcula a partir de la suma de las velocidades críticas de cada reacción estimadas, quedando de la siguiente manera:

$$\hat{\mu} = K_{S,Ox,X}\hat{r}_1 + K_{S,Fer,X}\hat{r}_2 + Y_{E,Ox,X}\hat{r}_3 \quad (4.44)$$

La siguiente suposición, debe tenerse en cuenta en el diseño.

(B.4): Se conocen los límites superior e inferior de las funciones específicas de la tasa de crecimiento, tal que: $\hat{r}_1 < \bar{r}_1$, $\hat{r}_2 < \bar{r}_2$ y $\hat{r}_3 < \bar{r}_3$.

La velocidad de crecimiento crítica, también se puede estimar usando las estimaciones de etanol de (4.34):

$$\hat{\mu}_{crit} = \mu_{O,max} \frac{K_{S,Ox,X}}{K_{S,O,O_2}} \frac{\hat{O}_2}{\hat{O}_2 + K_{O_2}} \frac{K_{ie}}{K_{ie} + \hat{E}}. \quad (4.45)$$

El observador propuesto en (4.41) y (4.42) es un caso especial del observador asintótico dado en Pomerleau et al. [52]. En [52], el término de corrección se multiplica por la estimación de biomasa, mientras que en este trabajo los autores proponen un término de corrección independiente de la biomasa.

4.5. Observador fraccionario de velocidad de crecimiento

Una versión fraccionaria del observador propuesto en (4.41) y (4.42) es presentada en esta subsección, utilizando la aproximación de Caputo vista en el Cap. 2:

$$\frac{{}_0^C D_t^{\alpha_\psi} \hat{\psi}}{dt} = -D\hat{\psi} + \begin{bmatrix} \hat{r}_1(t) \\ \hat{r}_2(t) \\ \hat{r}_3(t) \end{bmatrix} \hat{X} + K_1^{-1} \begin{bmatrix} OTR \\ -CTR \\ DS_{in} \end{bmatrix} + C_1(\psi - \hat{\psi}) \quad (4.46)$$

$$\frac{{}_0^C D_t^{\alpha_r} \hat{r}}{dt} = C_2(\psi - \hat{\psi}) \quad (4.47)$$

Dado que los observadores asintótico de Pomerleau et al. [52] y Bastin y Dochain et al. [52] se caracterizan por la falta de parámetros de ajuste. En contraste con estos, el nuevo diseño propuesto en (4.46) y (4.47) con operadores fraccionarios, agrega al menos dos parámetros de ajuste al diseño del observador asintótico.

4.6. Análisis de Observabilidad

La observabilidad es una propiedad que permite conocer la posibilidad de estimación del sistema en base a mediciones disponibles [88]. El análisis de observabilidad de sistemas no lineales se basa en el mapa de observabilidad [147].

El mapa de observabilidad se define de la siguiente forma:

$$q(x) = \begin{bmatrix} q_1(x) \\ q_2(x) \\ \dots \\ q_p(x) \end{bmatrix}; q_i(x) = \begin{bmatrix} L_f^0 h_i(x) \\ L_f^1 h_i(x) \\ \dots \\ L_f^{k_i-1} h_i(x) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} y_i \\ \dot{y}_i \\ \dots \\ y_i^{k_i-1} \end{bmatrix}; k = \sum_{i=1}^p k_i, k \geq n, \quad (4.48)$$

donde $L_f^k h_i(x)$ es la derivada de Lie numero k a lo largo del vector f . La derivada de Lie se define como la derivada parcial de la salida con respecto a cada uno de los estados:

$$L_f^k h_i(x) = \frac{\partial(L_f^{k-1} h_i(x))}{\partial x} f(x, u), k \geq 1, L_f^0 h_i(x) = h_i(x) \quad (4.49)$$

Un sistema es globalmente observable si la inversa del mapa de observabilidad ($q_i(x)^{-1}$) existe para todo el espacio de estado y la entrada. El análisis de observabilidad se basa en que el sistema de la ecuación (4.48) tenga solución, pero dada la complejidad de algunos sistemas no lineales, no siempre se puede encontrar una solución. Para estos casos, un análisis de observabilidad local puede ser lo mas indicado. El análisis local se basa en estudiar la invertibilidad de $q_i(x)^{-1}$ pero alrededor de un punto de operación x . Un sistema es localmente observable si se cumple la prueba de Kalman:

$$rank Q(x) = n; Q(x) = \frac{\partial q(x)}{\partial x} \quad (4.50)$$

Lo cual se resume en probar que el rango de la matriz de observabilidad $rank Q(x) = rank [C \ CA \dots \ CA^{n-1}]$ sea igual a la cantidad de estados del sistema, o sea, $k = n$.

La observabilidad del sistema se puede demostrar a través de las formas canónicas, para lo cual se garantiza la invertibilidad del mapa de observabilidad y la observabilidad global [88, 147]. La forma canónica está definida por:

$$\begin{aligned} \dot{x} &= \begin{bmatrix} \dot{x}_1 \\ \dots \\ \dot{x}_i \\ \dots \\ \dot{x}_{q-1} \\ \dot{x}_q \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} f_1 = (x_1, x_2) \\ \dots \\ f_i = (x_1, \dots, x_{i+1}) \\ \dots \\ f_{q-1} = (x_1, \dots, x_q) \\ f_q = (x_1, \dots, x_q) \end{bmatrix}, \\ y &= \begin{bmatrix} h_1(x_1^1) \\ h_2(x_1^1, x_2^1) \\ \dots \\ h_{n_1}(x_1^1, \dots, x_{n_1}^1) \end{bmatrix}, \end{aligned} \quad (4.51)$$

donde $\forall i \in \{1, \dots, q\}$, $x^i \in R^{n_i}$, $n_1 \geq n_2 \geq \dots \geq n_q$,

$$\sum_{1 \leq i \leq q} n_i = n$$

$$\forall j \in \{1, \dots, n_1\} : \frac{\partial h^j}{\partial x_j^1} \neq 0, \quad (4.52)$$

$$\forall i \in \{1, \dots, q-1\} : \frac{\partial f^i}{\partial x^{i+1}} = n_{i+1},$$

donde x , y , f^i , q son el vector de estados, el vector de estados medidos, una partición de las ecuaciones de estado no lineales y el número de particiones, respectivamente.

En primer lugar, debemos comprobar si las ecuaciones del modelo (2.9) - (2.13) pueden expresarse en forma de (4.51) y (4.52). Dado que estamos usando el modelo completo sin reducciones, y considerando las tres reacciones catabólicas, el número de variables de estados medidos es uno por reacción. La única partición que satisface las condiciones (4.51) para la observación de la concentración de biomasa y etanol es $y = \xi_1 = [O_2 \ CO_2 \ S]^T$.

Dado lo anterior, la forma canónica para el modelo del proceso se puede escribir como:

$$\begin{aligned} \dot{x}^1 &= [\dot{O}_2 \ \dot{C}O_2 \ \dot{S}]^T = f^1([O_2 \ CO_2 \ S]^T, [X \ E]^T), \\ \dot{x}^2 &= [\dot{X} \ \dot{E}]^T = f^2([O_2 \ CO_2 \ S]^T, [X \ E]^T), \\ y = x^1 &= [O_2 \ CO_2 \ S]^T. \end{aligned} \quad (4.53)$$

Para analizar la condición de observabilidad, se establecen dos escenarios más relevantes:

- . Escenario 1: Crecimiento oxidativo en el consumo de glucosa y etanol ($r_1, r_3 > 0$, $r_2 = 0$).
- . Escenario 2: Crecimiento oxidativo y fermentativo en glucosa ($r_1, r_2 > 0$, $r_3 = 0$).

Como las ecuaciones de las velocidades de crecimiento de las reacciones están definidas por funciones *min-max* (2.4)-(2.6), y estas no son diferenciables. Para poder calcular las derivadas, se reescriben las ecuaciones de la siguiente manera:

$$r_1(t) = \frac{r_{scrit}}{Y_{S,Ox,X}} \quad (4.54)$$

$$r_2(t) = (r_s - r_{scrit}) \quad (4.55)$$

$$r_3(t) = \frac{Y_{S,Ox,O_2}(r_s - r_{scrit})}{Y_{E,Ox,O_2}} \frac{E}{E + K_e} \quad (4.56)$$

Para que se cumpla la observabilidad global definida en (4.52), se debe cumplir que el rango $\frac{\partial f^1}{\partial x^2} = n_2 = 2$ para todos los escenarios.

Las derivadas parciales para el Escenario 1 son,

$$rank \frac{\partial f^1}{\partial x^2} = \begin{bmatrix} \frac{\partial \dot{O}_2}{\partial X} & \frac{\partial \dot{O}_2}{\partial E} \\ \frac{\partial \dot{C}O_2}{\partial X} & \frac{\partial \dot{C}O_2}{\partial E} \\ \frac{\partial \dot{S}}{\partial X} & \frac{\partial \dot{S}}{\partial E} \end{bmatrix} = 2, \quad (4.57)$$

donde,

$$\frac{\partial \dot{O}_2}{\partial X} = -K_{S,Ox,O_2} r_{scrit} - \frac{EK_{S,Ox,O_2}(r_{scrit} - r_s)}{E + K_e}, \quad (4.58)$$

$$\frac{\partial \dot{O}_2}{\partial E} = -X \left(\frac{K_{S,Ox,O_2}(r_{scrit} - r_s)}{E + K_e} - \frac{EK_{E,Ox,O_2}K_{S,Ox,O_2}(r_{scrit} - r_s)}{(E + K_e)^2} \right), \quad (4.59)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial \dot{CO}_2}{\partial X} &= K_{S,Ox,O_2} r_{scrit} - K_{S,Ox,CO_2}(r_{scrit} - r_s) + \\ &\frac{EK_{E,Ox,CO_2}K_{S,Ox,O_2}(r_{scrit} - r_s)}{K_{E,Ox,CO_2}(E + K_e)}, \end{aligned} \quad (4.60)$$

$$\frac{\partial \dot{CO}_2}{\partial E} = X \left(\frac{K_{S,Ox,O_2}(r_{scrit} - r_s)}{E + K_e} - \frac{EK_{S,Ox,O_2}(r_{scrit} - r_s)}{(E + K_e)^2} \right), \quad (4.61)$$

$$\frac{\partial \dot{S}}{\partial X} = -r_{scrit}, \quad (4.62)$$

$$\frac{\partial \dot{S}}{\partial E} = \frac{\mu_{O,max} O_2 X K_{ie}}{k_{os}(K_{ie} + E)^2 (O_2 + K_{O_2})}, \quad (4.63)$$

Y las derivadas parciales para el Escenario 2 son:

$$rank \frac{\partial f^1}{\partial x^2} = \begin{bmatrix} \frac{\partial \dot{O}_2}{\partial X} & \frac{\partial \dot{O}_2}{\partial E} \\ \frac{\partial \dot{CO}_2}{\partial X} & \frac{\partial \dot{CO}_2}{\partial E} \\ \frac{\partial \dot{S}}{\partial X} & \frac{\partial \dot{S}}{\partial E} \end{bmatrix} = 2, \quad (4.64)$$

$$\frac{\partial \dot{O}_2}{\partial X} = r_{scrit} - r_s - \frac{EK_{S,Ox,O_2}}{(E + K_e)(O_2 + K_{O_2})}, \quad (4.65)$$

$$\frac{\partial \dot{O}_2}{\partial E} = X \frac{\mu_{O,max} O_2 K_{ie}}{(E + K_{ie})^2 (O_2 + K_{O_2})} \left(1 - \frac{1}{K_{S,Ox,O_2}} \right), \quad (4.66)$$

$$\frac{\partial \dot{CO}_2}{\partial X} = K_{S,Fer,CO_2} (r_s - r_{scrit}) + \left(\frac{K_{S,Ox,CO_2}}{K_{S,Ox,O_2}} \frac{\mu_{O,max} O_2 K_{ie}}{(E + K_{ie})(O_2 + K_{O_2})} \right), \quad (4.67)$$

$$\frac{\partial \dot{CO}_2}{\partial E} = -X \frac{\mu_{O,max} O_2 K_{ie}}{(E + K_{ie})^2 (O_2 + K_{O_2})} \left(\frac{K_{S,Ox,CO_2}}{K_{S,Ox,O_2}} - \frac{K_{S,Fer,CO_2}}{K_{S,Ox,O_2}} \right), \quad (4.68)$$

$$\frac{\partial \dot{S}}{\partial X} = -r_s, \quad (4.69)$$

$$\frac{\partial \dot{S}}{\partial E} = 0, \quad (4.70)$$

En el escenario 1, la condición de rango se cumple ya que $\text{rank} \frac{\partial f^1}{\partial x^2} = 2$ y las derivadas parciales son distintas de cero. Entonces, el sistema es globalmente observable en este escenario. En el escenario 2, sin embargo, se cumple la condición de rango (ecuación (4.64)), pero las derivadas parciales no son todas distintas de cero (ver ecuación (4.70)). Cuando el $S = 0$ no es posible estimar ninguno de los estados no medibles, dado que $r_s = 0$. Dado que la condición (4.52) no se cumple por completo, el sistema es parcialmente observable en el escenario 2.

Con la evaluación de las condiciones de estabilidad global para ambos escenarios, concluimos que el número de mediciones en ξ_1 es suficiente para estimar ξ_2 para todos los regímenes metabólicos, siempre que $S > 0$. Esta conclusión concuerda con el análisis de Veloso et al. [53], donde las particiones seleccionadas en esta tesis: (4.10) y (4.11) representan un sistema observable para un modelo de rango completo sin reducciones, y considerando las tres reacciones que describen los posibles regímenes metabólicos (2.1) a (2.3).

Además del análisis global, un análisis local de la estabilidad también es posible realizarse a partir de la prueba de Kalman [147]. Un sistema es localmente observable si:

$$\text{rank } Q(x) = n, \text{ with } Q(x) = \frac{\partial q(x)}{\partial x}, \quad (4.71)$$

donde $q(x)$ es el mapa de observabilidad. Eventualmente este análisis nos lleva a la prueba de Kalman, donde el rango de la matriz $[C \ CA \ \dots \ CA^{n-1}]$ es igual al rango del sistema n .

En el caso del observador híbrido, se puede realizar esta prueba a partir de linealizar el sistema (4.28) alrededor de los estados estimados \hat{Z} , tal que:

$$\text{rank} \begin{bmatrix} C \\ CF(\hat{Z}) \\ CF^2(\hat{Z}) \\ CF^3(\hat{Z}) \\ CF^4(\hat{Z}) \end{bmatrix} = n \quad (4.72)$$

donde el orden del sistema $n = 5$. Si el vector de salida se define como $C = [0 \ 1 \ 0 \ 1 \ 1]^T$

(sustrato, oxígeno disuelto y dióxido de carbono), la ecuación final (4.72) queda como sigue:

$$O = \begin{bmatrix} C \\ C \left[\frac{\partial f(Z)}{\partial \hat{Z}} \right]_{\hat{Z}=[\hat{z}_1 \ \hat{z}_2 \ \delta]^T} \\ C \left[\frac{\partial^2 f(Z)}{\partial \hat{Z}^2} \right]_{\hat{Z}=[\hat{z}_1 \ \hat{z}_2 \ \delta]^T} \\ C \left[\frac{\partial^3 f(Z)}{\partial \hat{Z}^3} \right]_{\hat{Z}=[\hat{z}_1 \ \hat{z}_2 \ \delta]^T} \\ C \left[\frac{\partial^4 f(Z)}{\partial \hat{Z}^4} \right]_{\hat{Z}=[\hat{z}_1 \ \hat{z}_2 \ \delta]^T} \end{bmatrix} \quad (4.73)$$

calculando el rango de O (4.70) nos queda igual 5, que es igual al orden del sistema, lo que significa que también se cumple la condición de observabilidad asintótica local para el sistema de estudio.

4.7. Análisis de estabilidad del error de estimación

Para realizar el análisis de estabilidad de (4.42) y (4.43), definimos los siguientes errores de estimación:

$$e_\psi(t) = \psi - \hat{\psi}; \quad e_r(t) = \tilde{r} - \hat{r}; \quad (4.74)$$

Cuyas dinámicas se definen de la siguiente forma matricial:

$$\begin{bmatrix} \dot{e}_\psi \\ \dot{e}_r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -C_1 & \hat{X}(t) \\ -C_2 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e_\psi \\ e_r \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ \dot{\tilde{r}}(t) \end{bmatrix}; \quad (4.75)$$

Suponiendo que C_1 y C_2 son matrices constantes con todos los valores propios con partes estrictamente reales, y \tilde{r} es una función diferenciable. Entonces, de acuerdo con Bastin y Dochain [51], si $\hat{X}(t)$ es excitada de forma persistente, ambos errores de estimación son estables.

El análisis de estabilidad para el observador fraccionario propuesto en (4.47) y (4.76) es similar a la versión entera, la dinámica de los errores fraccionarios quedan definidos como:

$$\begin{bmatrix} {}_0^C D_t^{\alpha_\psi} e_\psi \\ {}_0^C D_t^{\alpha_r} e_r \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -C_1 & \hat{X}(t) \\ -C_2 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} e_\psi \\ e_r \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} 0 \\ \dot{\tilde{r}}(t) \end{bmatrix}; \quad (4.76)$$

Definiendo las siguientes funciones de Lyapunov para el sistema en (4.76):

$$V_1 = \frac{1}{2} e_\psi^2, \quad (4.77)$$

$$V_2 = \frac{1}{2}e_r^2, \quad (4.78)$$

Se calcula la primera derivada para V_1 y V_2 y reemplazando nos queda:

$${}_0^C D_t^{\alpha_\psi} \dot{V}_1 \leq e_\psi {}_0^C D_t^{\alpha_\psi} e_\psi \leq -C_1 e_\psi^2 + \hat{X} e_\psi e_r, \quad (4.79)$$

$${}_0^C D_t^{\alpha_r} \dot{V}_2 \leq e_r {}_0^C D_t^{\alpha_r} e_r \leq -C_2 e_\psi e_r, \quad (4.80)$$

Usando el Lema 1 propuesto en Duarte et al. [148], podemos concluir que como $-C_1 e_\psi^2 + \hat{X} e_\psi e_r$ y $-C_2 e_\psi e_r$ son funciones negativas semi definidas, esto permite afirmar que las expresiones en ${}_0^C D_t^{\alpha_\psi} \dot{V}_1$ - (4.79) y ${}_0^C D_t^{\alpha_r} \dot{V}_2$ - (4.80) son negativas semi definidas.

Por lo tanto puede concluirse que los errores del sistema, e_ψ y e_r , son estables, siempre que se cumpla que $\alpha_\psi, \alpha_r \in (0, 1)$, son ordenes positivos de la derivada fraccionaria, \hat{X} es excitada de forma persistente y, $\tilde{r}(t)$ tiende a cero.

4.8. Optimización de los parámetros de los observadores

Los parámetros del observador híbrido y del observador fraccionario fueron calculados mediante optimización utilizando PSO.

Para el observador fraccionario asintótico se obtuvieron los siguientes parámetros utilizando los parámetros de PSO de la tabla 3.1 y la misma función de costo propuesta en (3.20), pero definiendo el error como $e(t) = \mu_{set} - \hat{\mu}$ y $u(t)$ como la señal de control F_{in} de la estrategia 2 (control de μ).

Los parámetros óptimos calculados son: $\omega_{1,2,3} = 20$, $\nu_{1,2,3} = 40$, $\alpha_\psi = 0,5$, $\alpha_r = 0,1$, $k_\psi = 6$ y $k_r = 6$.

Capítulo 5

Simulaciones y análisis de Resultados

En este capítulo se analizarán los resultados por simulación de las estrategias de control y observadores propuestas en esta tesis.

5.1. Condiciones de simulación

Las simulaciones del proceso se realizaron en MATLAB R2020a (MathWorks, Natick, MA). Las condiciones iniciales del proceso se asumieron conocidas y se establecieron en $X_0 = 5g/L$, $S_0 = 0g/L$, $E_0 = 0g/L$, $O_{2,0} = 4mg/L$, $CO_{2,0} = 0,675g/L$ y $V_0 = 0,3L$.

Se asumió que las condiciones iniciales de todos los observadores propuestos son desconocidas. Para calcular su valor, se generó una secuencia de muestreo con una distribución normal con una media del valor nominal y una desviación estándar de 0,01 respecto a las condiciones iniciales del proceso (conocidas). Todas las simulaciones (controlador y observadores) se realizaron durante un periodo de 35 - 40 h de tiempo de simulación, con un tiempo de muestreo de $\gamma_{k,l}$ igual a 1 segundo.

Para el observador híbrido, se establecieron los siguientes valores:

- El valor inicial del parámetro δ se estableció en 1.
- La matriz de covarianza de ruido de estado es igual a $R = \sigma_R^2 I$ donde I es la matriz de identidad de $R^{6 \times 6}$ y $\sigma_R^2 = 10^{-5}$.
- La matriz de covarianza de ruido de medición es igual a $Q = \gamma_{k,l} \text{diag}(\sigma_{DO}^2, \sigma_{CO_2}^2, \sigma_S^2)$ donde σ_{DO}^2 , $\sigma_{CO_2}^2$ y σ_S^2 son las varianzas de las señales nominales de DO , CO_2 y S medición [105].
- El valor inicial de la matriz de covarianza es igual $P(0) = P_0 = \text{diag}(I_N, 1)$, donde I_N es igual a las condiciones iniciales del observador híbrido (ganancias de corrección para cada estado) y el valor 1 corresponde a la ganancia de corrección para delta.

En teoría, los valores iniciales P_0 de la matriz de covarianza P pueden ser iguales a cero, pero esto impide que el modelo aprenda de las mediciones. Otra opción conveniente para P_0 es igualarlo al valor cuadrado de los estados iniciales (varianza), o simplemente a los valores

de los estados iniciales (desviación estándar). En cualquiera de los dos casos, siempre que se tengan en cuenta los órdenes de magnitud, cualquier definición de P_0 es aceptable, siempre que se asegure la estabilidad y las predicciones del observador híbrido.

Para el observador fraccionario, se establecieron los siguientes valores:

- Los parámetros de las derivadas fraccionarias α_ψ, α_r toman valores en un rango entre 0 y 1.
- El bloque NID se configuró con una frecuencia entre 0.01 y 100 y $N = 10$.

La Tabla 5.1 muestra los parámetros estequiométricos y cinéticos y los parámetros de las funciones *smooth* usados en las simulaciones.

Parámetro	Valor	Desviación estándar	Unidad	Ref.
$K_{S,Ox,X}$	0.49	0.0283	$gDCW/gS$	[17]
$K_{S,Fer,X}$	0.05	0.0029	$gDCW/gS$	[17]
$K_{E,Ox,X}$	0.72	0.0415	$gDCW/gE$	[17]
$K_{S,Fer,E}$	0.32	0.0184	gE/gS	[17]
K_{S,Ox,O_2}	0.427	-	gO_2/gS	Este Trabajo
K_{S,E,Ox,O_2}	1.104	-	gO_2/gE	[17]
K_{S,Ox,CO_2}	0.59	0.0340	gCO_2/gS	[17]
K_{S,Fer,CO_2}	0.46	0.0266	gCO_2/gS	[17]
K_{E,Ox,CO_2}	0.62	0.0361	gCO_2/gE	[17]
$\mu_{O,max}$	0.128	0.0073	$gO_2/gDCW/h$	Este Trabajo
$\mu_{S,max}$	0.875	-	$gS/gDCW/h$	[33]
K_O	0.0001	5.774e-06	gO_2/L	[17]
K_S	0.1	0.0058	gS/L	[17]
K_e	0.1	0.0058	gE/L	[17]
K_{ie}	10	0.5774	gE/L	[17]
k_{HO_2}	26.409	-	$mgO_2/(L * atm)$	[149]
k_{HCO_2}	0.7498	-	$mgCO_2/(L * atm)$	[149]
α	0.034	-	-	Este Trabajo
β	1.33	-	-	Este Trabajo
γ	0.603	-	-	Este Trabajo
Δ	0.89	-	-	[150]
τ	0.0029	-	-	Este Trabajo
α_1	202.88	-	-	Este Trabajo
α_2	5715.4	-	-	Este Trabajo

Tabla 5.1: Parámetros estequiométricos, cinéticos y *smooth*

5.1.1. Función del flujo de alimentación en lazo abierto

Para probar los observadores en lazo abierto se utilizó la función no lineal para el flujo de alimentación F_{in} propuesta en [151]. La función de tasa de alimentación se describe como se

informa en otro lugar e incluye una condición adicional cuando se produce un desbordamiento:

$$F_{in}(t) = \begin{cases} \frac{\mu_{set} X_0 V_0 e^{\mu_{set} t}}{Y_{S,Ox,X} (S_{in} - S)} & \frac{dX}{dt} > 0 \text{ (crecimiento continuo)} \\ F_{in}(t_b) & \frac{dX}{dt} < 0 \text{ (} t_b \text{ fijo)} \end{cases} \quad (5.1)$$

donde, t , μ_{set} , X_0 , V_0 , $Y_{S,Ox,X}$, S_{in} y S , representan, respectivamente, el tiempo de fermentación, la velocidad de crecimiento específica establecida, los valores iniciales de concentración de biomasa y volumen de cultivo, el rendimiento de biomasa oxidativa a glucosa, la concentración de sustrato en la corriente de entrada, la concentración del sustrato. t_b indica el tiempo exacto en que cambia el signo de la concentración de biomasa. La ecuación (5.1) está diseñada para moverse entre los dos regímenes del cultivo con metabolismo Overflow. Si el proceso se encuentra en régimen respirativo (oxidativo), o sea, $\frac{dX}{dt} > 0$, F_{in} describe una función de alimentación exponencial. Si, de lo contrario, $\frac{dX}{dt} < 0$, F_{in} se fija al último valor conocido para el tiempo t_b .

Las condiciones de la ecuación (5.1) se incluyen debido a que cuando el sistema se encuentra en el régimen respiro-fermentativo, el proceso comienza a producir etanol, lo que trae como consecuencia que la concentración de biomasa, la cual representa la cantidad de microorganismos vivos en el interior del fermentador, comienza a decrecer. En otras palabras, comienza la inhibición del microorganismo, o sea, su muerte. Sino existiera la condición de cambio en (5.1), la función exponencial F_{in} induciría constantemente sustrato al cultivo, el cual no se consume, porque no quedan microorganismos para consumir la glucosa entrante. Esto trae como consecuencia una alta concentración de sustrato, lo que genera una pérdida de observabilidad no deseada.

5.1.2. Índices de desempeño

Para evaluar el desempeño, tanto del observador como de la estrategia de control, se utilizaron diferentes índices de desempeño.

Índice IAE El índice IAE corresponde a la integral del error absoluto. Este índice no solo refleja la discrepancia entre la variable verdadera y la variable estimada o de referencia, sino que también refleja el error acumulativo:

$$IAE = \int_0^{t_f} |e(t)| dt. \quad (5.2)$$

Índice ISU El índice ISU se define como la integral de la señal de control al cuadrado. Este índice se asocia a la energía, o esfuerzo del controlador:

$$ISU = \int_0^{t_f} F_{in}^2 dt. \quad (5.3)$$

Índice IAVU El índice IAVU se define la integral de la señal de control absoluta (IAVU). Este índice se aplica para evaluar la variabilidad de la variable manipulada:

$$IAVU = \int_0^{t_f} \left| \frac{dF_{in}}{dt} \right| dt \quad (5.4)$$

En las ecuaciones (5.2), (5.3) y (5.4), t_f representa el tiempo de fermentación.

5.1.3. Aproximaciones *smooth*

Las velocidades de crecimiento específicas de las reacciones definidas en (2.4) - (2.6) están representadas por funciones no lineales mín y máx. Las funciones mín-máx no son diferenciables, por lo que, para evitar problemas de diferenciación al calcular derivadas parciales con respecto a este tipo de funciones, se introducen aproximaciones 'suaves' (*smooth*). Las aproximaciones '*smooth*' utilizadas en esta tesis fueron definidas en [42] y tienen las características de que son continuas y diferenciables para todo el espacio n . Redefiniendo las ecuaciones (2.4),(2.5) y (2.6), las nuevas funciones *smooth* quedan como se muestran a continuación:

$$\tilde{r}_1(t) = -\tau \log \left(\frac{1}{2} e^{-\tau r_s} + e^{-\tau r_{s_{crit}}} \right) \quad (5.5)$$

$$\tilde{r}_2(t) = \log \left(e^{\alpha_1} + e^{(r_s - r_{s_{crit}})\alpha_1} \right) / \alpha_1 \quad (5.6)$$

$$\tilde{r}_3(t) = \log \left(e^{\alpha_2} + e^{\left(\frac{K_{S,Ox,O_2}(r_s - r_{s_{crit}})}{K_{E,Ox,O_2}} \frac{E}{E + K_e} \right) \alpha_2} \right) / \alpha_2 \quad (5.7)$$

donde, τ , α_1 y α_2 son parámetros constantes positivos.

Para seleccionar los valores óptimos de los parámetros de las funciones *smooth*, se utilizó optimización mediante enjambre de partículas (PSO) [152]. La función objetivo elegida J penaliza el error entre las variables de estado, de modo que las variables de estado suavizadas tiendan a las variables de estado originales con funciones mín-máx. El problema de optimización se resolvió fuera de línea considerando 40 h de tiempo de simulación (t_f). La función objetivo J se definió de la siguiente manera:

$$J = \int_0^{t_f} |\xi_{sm} - \xi| dt, \quad (5.8)$$

donde $\xi(t) = [X \ S \ E \ O_2 \ CO_2 \ V]$ es el vector de estado original y $\xi_{sth}(t)$ es el vector de estado con funciones *smooth* igual a $\xi_{sm}(t) = [X_{sm} \ S_{sm} \ E_{sm} \ O_{2,sm} \ CO_{2,sm} \ V_{sm}]$.

Los parámetros de PSO (los cuales se calcularon utilizando Matlab 2020a) más representativos que fueron utilizados en las simulaciones son:

Parámetros PSO - Aproximaciones <i>smooth</i>	
Tamaño de la población	10
Número de generaciones	30
Algoritmo	<i>fminsearch</i>
Función de Costo (J)	2.4648e-06
τ	0.0029729
α_1	202.88
α_2	5715.4

Tabla 5.2: Parámetros optimizados por PSO para las aproximaciones *smooth*.

Con estos valores óptimos se simuló el sistema para todos los escenarios del metabolismo: régimen respirativo (R) y respiro-fermentativo (RF). Todas las simulaciones se hicieron a lazo abierto sin ningún tipo de control, considerando un valor constante de velocidad de agitación igual a 600 rpm, 0.6 g/L de flujo de gases y 0.21 de la fracción de oxígeno.

Las figuras 5.1 y 5.2 muestran el resultado para ambos regímenes, las funciones *smooth* (Líneas discontinuas azules) son capaces de emular el comportamiento de las funciones mín-máx de forma exitosa (figuras 5.1 y 5.2 - Líneas negras). Las funciones *smooth* se utilizan posteriormente en el capítulo 5 en el diseño de los observadores.

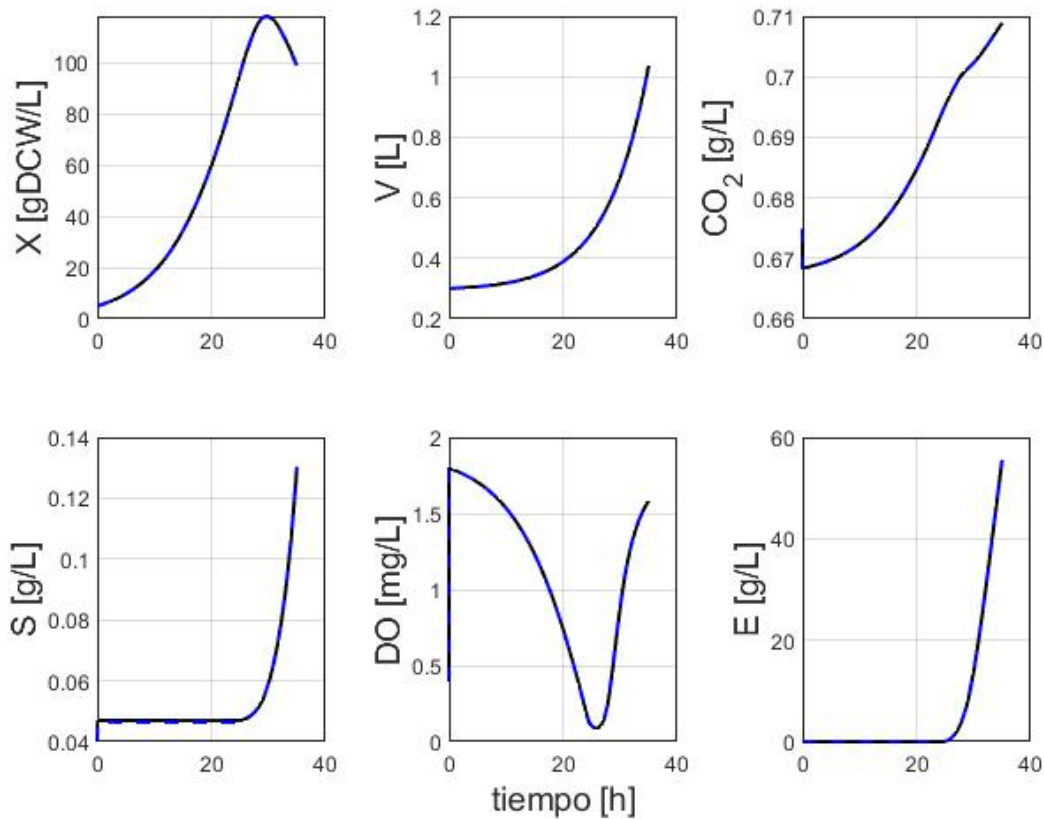


Figura 5.1: Comportamiento de las funciones *smooth* (Líneas discontinuas azules) en régimen respirativo.

5.2. Desempeño del observador híbrido a lazo abierto

De acuerdo a [57, 151, 153] cuando la velocidad de crecimiento crítica μ_{crit} es mayor que $0.14 h^{-1}$, ocurre el metabolismo Overflow (formación de etanol) en cultivos aeróbicos de *S. cerevisiae*. Por tanto, para simular los diferentes regímenes se estableció un valor de $\mu_{set} = 0,139h^{-1}$ para el régimen respirativo y un valor de $\mu_{set} = 0,147h^{-1}$ para el régimen respiro-fermentativo en la ecuación (5.1).

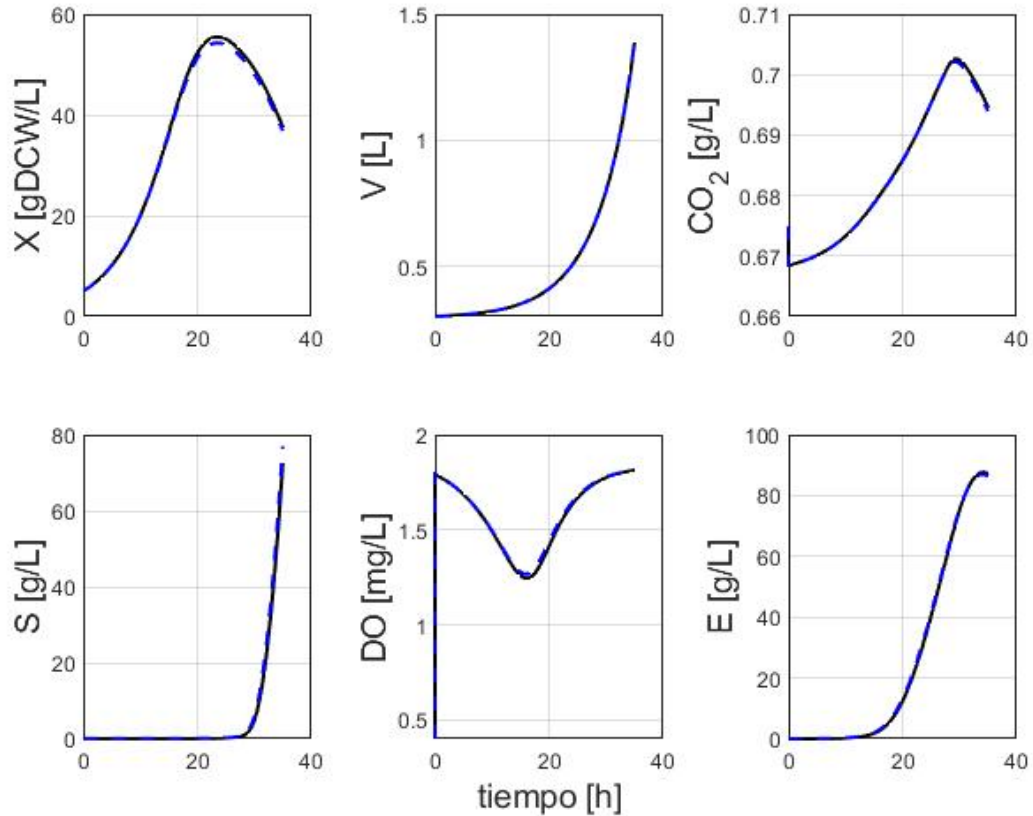


Figura 5.2: Comportamiento de las funciones *smooth* (Líneas discontinuas azules) en régimen respiro-fermentativo.

5.2.1. Comportamiento del observador híbrido en el régimen respirativo

La figura 5.3 muestra el comportamiento del observador híbrido en el régimen respirativo. El régimen respirativo (R) se caracteriza por la ausencia de producción de etanol, ya que μ (5.3-C, Línea Verde) no excede μ_{crit} (5.3-C, Línea discontinua Morada) y la glucosa no está en exceso ($S < S_{crit}$). En este escenario, las estimaciones de concentración de biomasa (5.3-A, Línea Negra: Valor real, Línea Azul: Estimado) y de etanol (5.3-B, Línea Negra: Valor real, Línea Azul: Estimado) convergieron en el valor real (Líneas negras en ambas sub-figuras), aunque con una dispersión variable, particularmente para la concentración de etanol. Al final de la simulación, el observador alcanzó una concentración alta de biomasa (175,31 gDCW/L) y una pequeña acumulación de etanol (0,0281 g/L). El comportamiento del proceso se ve reflejado en la figura 5.3 - C a través de la evolución de las variables oxígeno disuelto, coeficiente RQ, velocidad de crecimiento y velocidad de crecimiento crítica. Para el caso del oxígeno disuelto (5.3 - C, Línea Negra), este fue controlado durante toda la simulación por el controlador de rango dividido en un punto de ajuste del 30% de la saturación con aire puro a 30°C ($\sim 2,4$ mg/L). El coeficiente RQ (5.3 - C, Línea Azul), por su parte, se mantuvo en un valor cercano a 1, lo cual indica que la función exponencial F_{in} (5.1) mantuvo la capacidad oxidativa de la levadura cerca de la saturación, y también se aprecia que la velocidad de crecimiento μ (Línea Verde) se mantiene por debajo, o igual que la

velocidad de crecimiento crítica μ_{crit} (Línea discontinua Morada). Finalmente, el parámetro δ (5.3-D, Línea Roja) se mantuvo cerca de 1, lo que implica que hay una confianza absoluta en el modelo y, en consecuencia, el EKF dominó las predicciones.

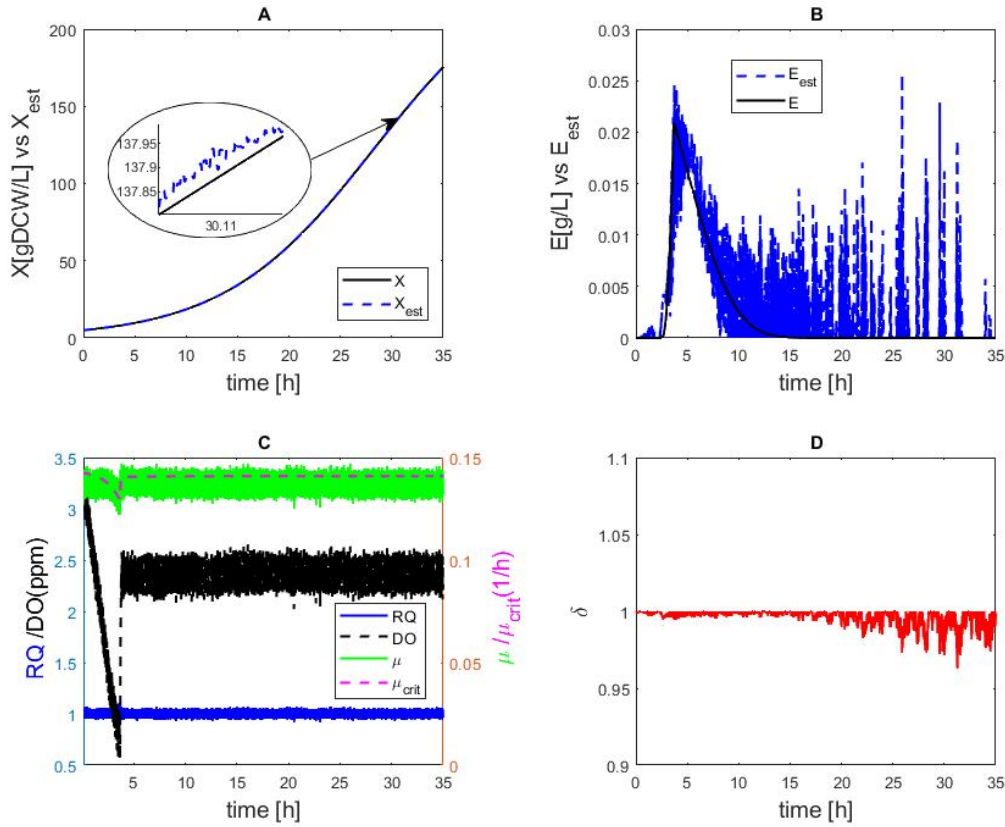


Figura 5.3: Estimaciones del observador híbrido en el régimen respirativo con $\mu_{crit} > \mu_{set} = 0,1391/h$ y 5% de ruido de medición.

5.2.2. Comportamiento del observador híbrido en el régimen respiro-fermentativo

En el régimen de respiro-fermentativo (RF), las células producen etanol a través de la vía fermentativa, μ (5.4-C, Línea Verde) excede μ_{crit} (5.4-C, Línea discontinua Morada), hay exceso de glucosa ($S > S_{crit}$) y el controlador de OD (Línea discontinua Negra) ya no está saturado. La figura 5.4 muestra el comportamiento del observador híbrido en este régimen. Las estimaciones de las concentraciones de biomasa (5.4-A, Línea Negra: Valor real, Línea Azul: Estimado) y de etanol (5.4-B, Línea Negra: Valor real, Línea Azul: Estimado) convergieron en los valores reales, siendo que el observador alcanzó una concentración baja de biomasa (39.532 gDCW/L) y una alta acumulación de etanol (84.027 g/L). El comportamiento del proceso se muestra en la figura 5.4-C, donde se confirma el régimen respiro-fermentativo a partir del valor elevado del RQ (> 1 , 5.4-C, Línea azul), una concentración de oxígeno disuelto que comienza a partir de las 30 h a dejar de estar saturada, y una velocidad de crecimiento μ (Línea Verde) muy por encima de la velocidad de crecimiento crítica μ_{crit} (Línea discontinua Morada). Para este escenario, se empieza a notar que el observador, aparentemente, se vuelve más sensible

a las altas concentraciones de sustrato y a la saturación del flujo de alimentación. El valor del parámetro δ (Línea Roja) se mantiene cerca de 1 (5.4-D), lo cual sigue indicando que el EKF sigue aprendiendo de las mediciones. De forma general, en ambos escenarios (respirativo y respiro-fermentativo), el observador híbrido garantizó la estabilidad y la convergencia en condiciones de operación realistas.

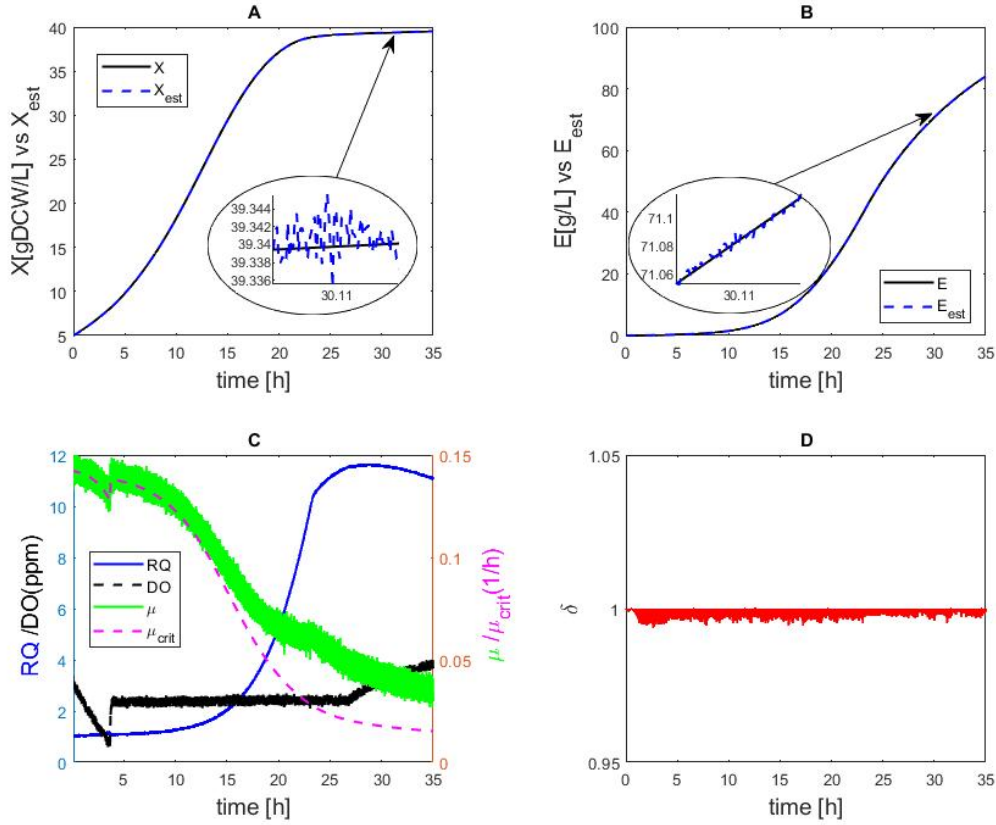


Figura 5.4: Estimaciones del observador híbrido en el régimen respiro-fermentativo con $\mu_{crit} > \mu_{set} = 0,1471/h$ y 5% de ruido de medición.

5.2.3. Evaluación de robustez del observador híbrido

Se entiende la robustez de un observador híbrido como su capacidad de asegurar la convergencia de las variables estimadas a las variables reales, aun ante la presencia de ruido en las mediciones y variaciones paramétricas.

Para verificar la robustez del observador híbrido se evaluó su desempeño en la estimación de las concentraciones de biomasa y etanol en los regímenes respirativo (R) y respiro-fermentativo (RF) bajo diferentes condiciones:

- Adición de diferentes niveles de ruido de medición (Ver Tabla 5.3).
- Variación paramétrica utilizando simulaciones de Montecarlo.

Los resultados del observador híbrido se compararon además con un observador asintótico (AO) y un filtro de Kalman extendido (EKF).

Regimes	Noise	e_X (gDCW/L)	e_E (g/L)	X_{est} (gDCW/L)	E_{est} (g/L)
AO-EKF (R)	5 %	0.5943	0.0459	175.31	0.0281
	9 %	1.0144	0.1978	175.32	0.0605
AO-EKF (RF)	5 %	0.1886	0.0775	39.532	84.027
	9 %	0.3515	0.1494	39.472	84.329
AO (R)	5 %	9.1064	3.9687	176.07	0.3263
	9 %	9.1064	3.9687	176.07	0.3263
AO (RF)	5 %	12.907	6.4738	40.262	84.432
	9 %	12.907	6.4737	40.262	84.432
EKF (R)	5 %	18.719	0.4834	173.79	0.0379
	9 %	17.694	0.5335	173.85	0.0355
EKF (RF)	5 %	0.1268	0.1129	39.519	84.100
	9 %	0.2036	0.1603	39.527	84.099

Tabla 5.3: Resultados del índice de desempeño del observador híbrido (IAE)

De la Tabla 5.3, se puede apreciar que para altos niveles de ruido (9% del valor nominal), el error de estimación de la concentración de biomasa y el etanol aumentaron en diferentes magnitudes para todos los observadores. A pesar del aumento del ruido, el observador híbrido (AO-EFK) se desempeñó de forma, en general, superior al observador asintótico (AO) y al EKF en el régimen respirativo. En el caso del régimen respiro-fermentativo, el observador híbrido logró ser ligeramente superior al EKF. En cambio, el AO fue el observador con los resultados menos robustos. Para todas las simulaciones, la matriz de covarianza P y las ganancias de Kalman de los observadores AO-EFK y EKF se estabilizaron en el tiempo.

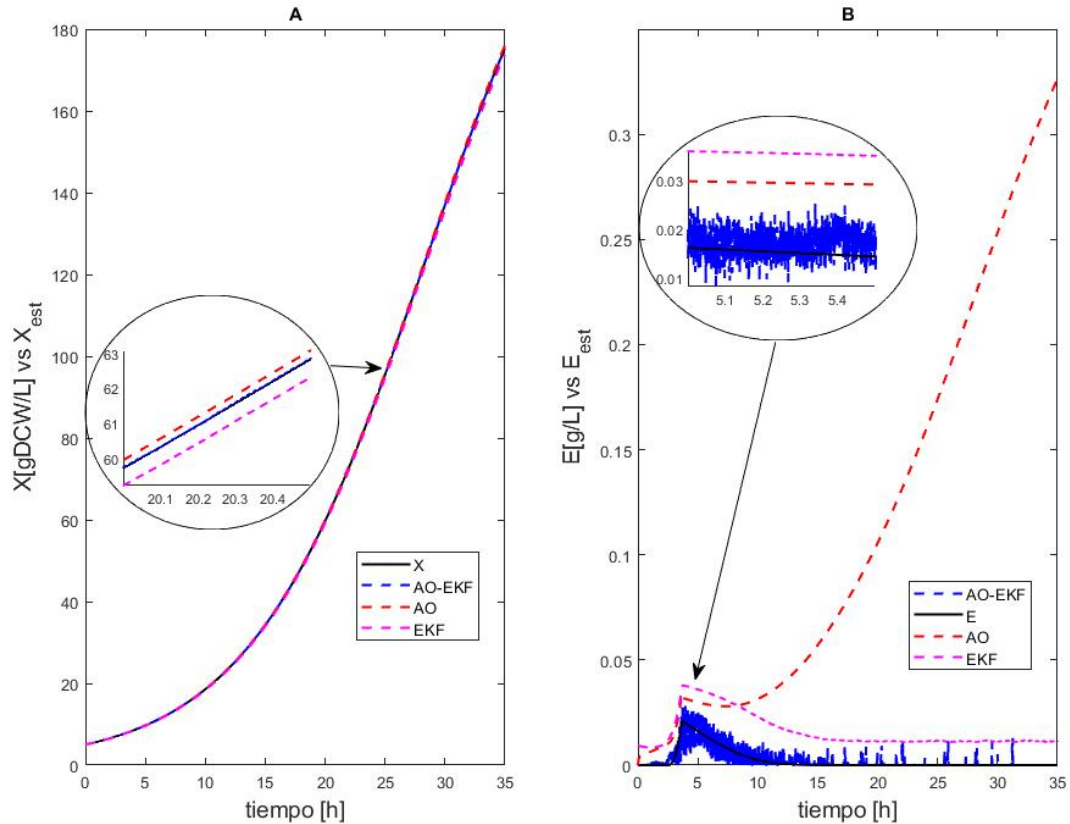


Figura 5.5: Estimaciones de biomasa (A) y etanol (B) del observador híbrido, filtro de Kalman y el observador asintótico en régimen respirativo.

Las Figuras 5.5 y 5.6 representan el comportamiento de las estimaciones de las concentraciones de biomasa y etanol para el observador híbrido (Línea discontinua azul), el observador asintótico (Línea discontinua roja) y el filtro de Kalman extendido (Línea morada) en cada régimen metabólico. Cada estimación se compara con el valor real del proceso (Línea negra). Las estimaciones son bastante satisfactorias en el régimen R, excepto por las estimaciones de concentración de etanol del AO (5.5-B). En particular, el observador AO parece ser incapaz de alcanzar la estabilidad asintótica en este régimen. La velocidad de convergencia de la estimación del AO está completamente determinada por la velocidad del flujo de alimentación (5.7), por lo que cuando el flujo de alimentación es lento (Régimen R), el AO produce errores de estimación en la concentración de etanol (5.5), y si el el flujo de alimentación es rápido

(Régimen RF), el AO muestra una respuesta mas rápida y con menos error de estimación (5.6). Otro factor que influye en el error de estimación de la concentración de etanol del observador AO es el ruido de la medición.

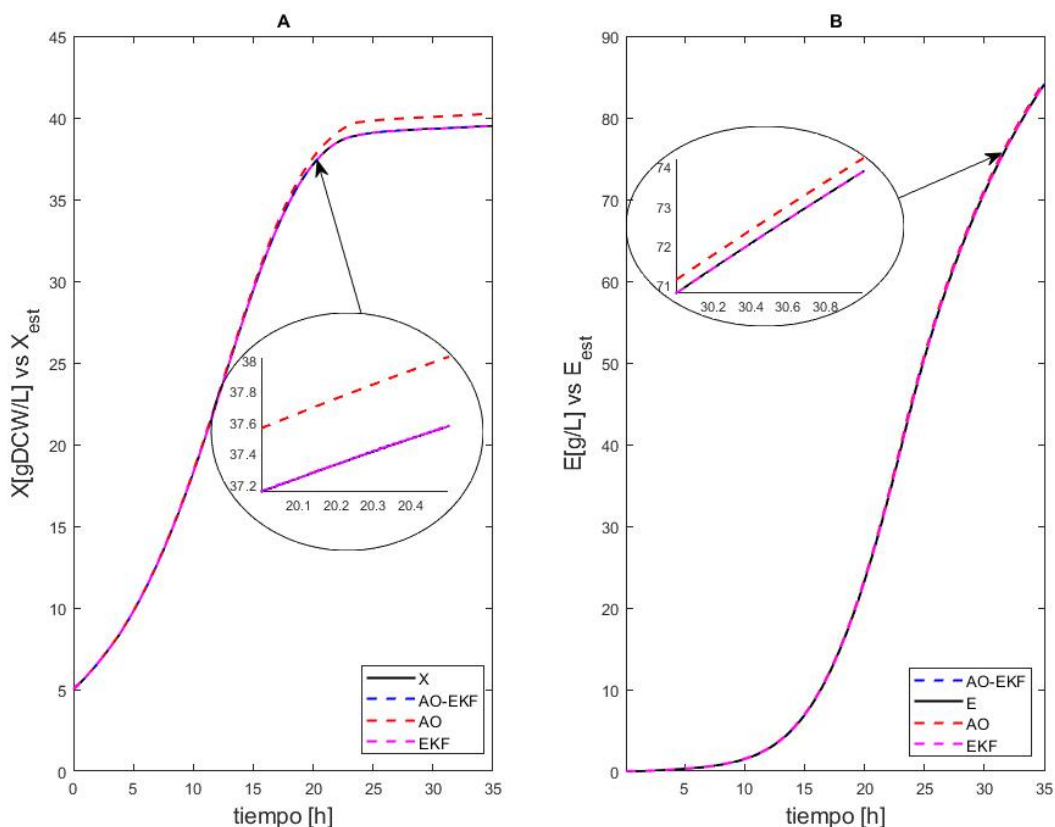


Figura 5.6: Estimaciones de biomasa (A) y etanol (B) del observador híbrido, filtro de Kalman y el observador asintótico en régimen respiro-fermentativo.

El observador híbrido muestra una alta fidelidad de predicción en presencia de ruido y condiciones iniciales aleatorias. Para las condiciones probadas, el observador híbrido se desempeña de manera consistente, muestra una alta fidelidad de predicción y es el observador más robusto bajo diferentes fuentes de incertidumbre, es decir, condiciones iniciales desconocidas y ruido de medición (5.8). El comportamiento del observador EKF por ejemplo en el régimen RF es estable y muestra un buen comportamiento de convergencia (5.4-B). Sin embargo, cuando las condiciones iniciales están ligeramente lejos de los valores reales, tanto el EKF como el AO muestran un desempeño pobre, particularmente el AO (5.8).

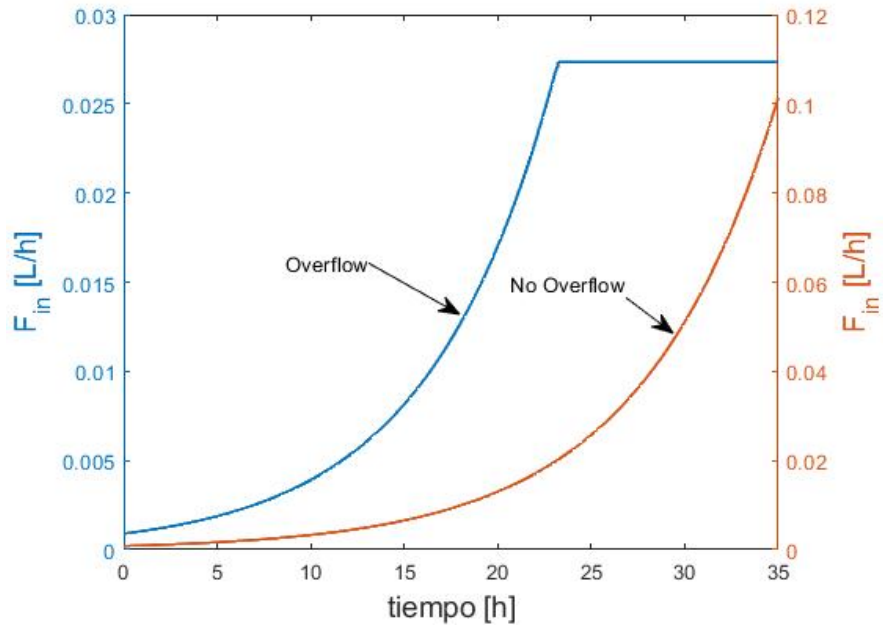


Figura 5.7: Comportamiento del flujo de alimentación en los regímenes respiro-fermentativo (Línea azul) y respirativo (Línea marrón).

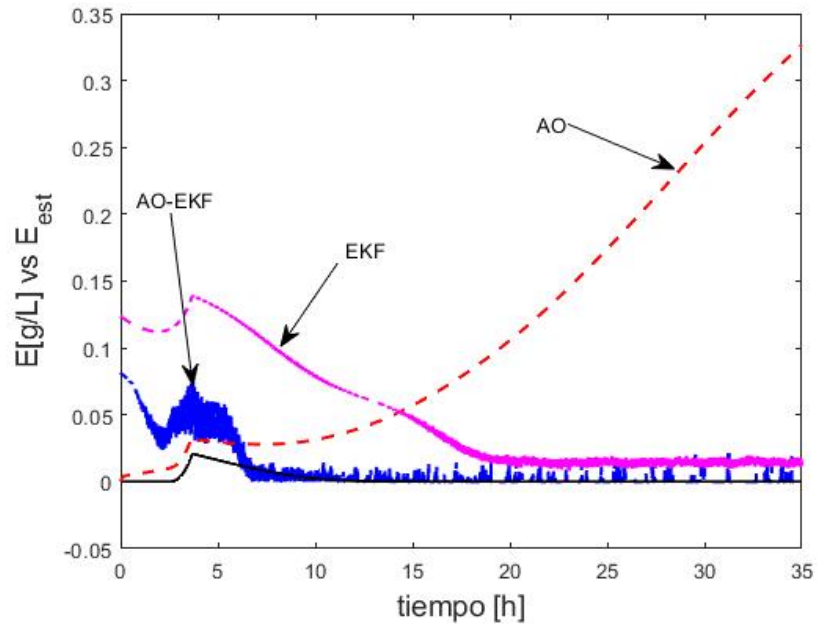


Figura 5.8: Estimaciones de etanol del observador híbrido, filtro de Kalman y el observador asintótico con 9% de ruido de medición y condiciones iniciales aleatorias en régimen respirativo.

Comportamiento del observador híbrido bajo incertidumbre paramétrica

Para evaluar la robustez del observador híbrido bajo incertidumbre paramétrica, se llevaron a cabo cien simulaciones Monte Carlo utilizando el toolbox de Matlab: *Sensitivity Analysis*. Las simulaciones se hicieron en ambos regímenes metabólicos con un 5% de ruido de medición. Los parámetros a los que se le realizaron variaciones son: $Y_{S,Ox,X}$, $Y_{S,Fer,X}$, $Y_{E,Ox,X}$, $Y_{S,Fer,E}$, Y_{S,Ox,CO_2} , Y_{S,Fer,CO_2} , Y_{E,Ox,CO_2} , $\mu_{O,max}$, K_O , K_S , K_e y K_{ie} y los valores aleatorios se calcularon a partir de distribuciones normales independientes, con una media y la desviación estándar definida en la 5.1.

Las figuras 5.9 - 5.12 muestran la dinámica del sistema para las múltiples combinaciones de parámetros en ambos regímenes. Se puede apreciar que, en el caso del régimen respirativo (5.9-5.10), en ausencia de etanol, hay menos variabilidad en las concentraciones finales de biomasa (5.9). No tanto así ocurre en el régimen respiro-fermentativo (5.11-5.12), donde la concentración de biomasa (5.11) se detiene cuando la concentración de etanol (5.12) es alta (por ejemplo, $> 20g/L$) y hay más variabilidad.

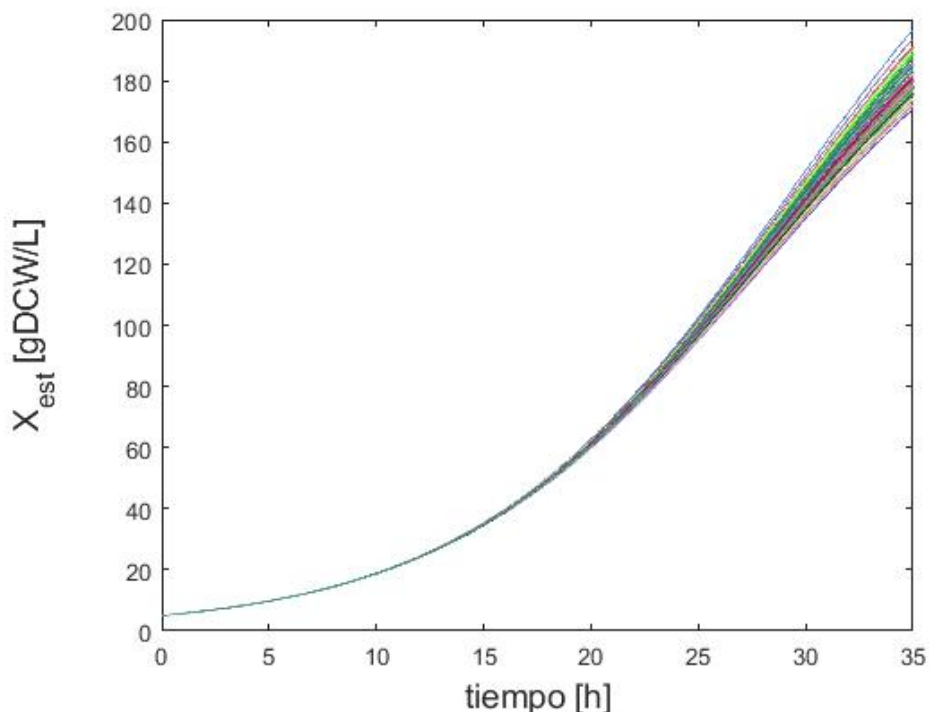


Figura 5.9: Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respirativo: Estimaciones de biomasa

Las estimaciones de μ usando la variante presentada en la ecuación (4.35) también fueron probadas bajo incertidumbre paramétrica usando las simulaciones Monte Carlo. En la figura 5.13 se muestra el régimen respiro-fermentativo, donde la acumulación de etanol afectó el crecimiento de la biomasa (Figura 5.12), que se correlacionó con la disminución de μ a cero después de 25 horas. Mientras, en la figura 5.14, las estimaciones de μ nunca llegaron a cero en el régimen respirativo ya que la biomasa creció indefinidamente (Figura 5.9).

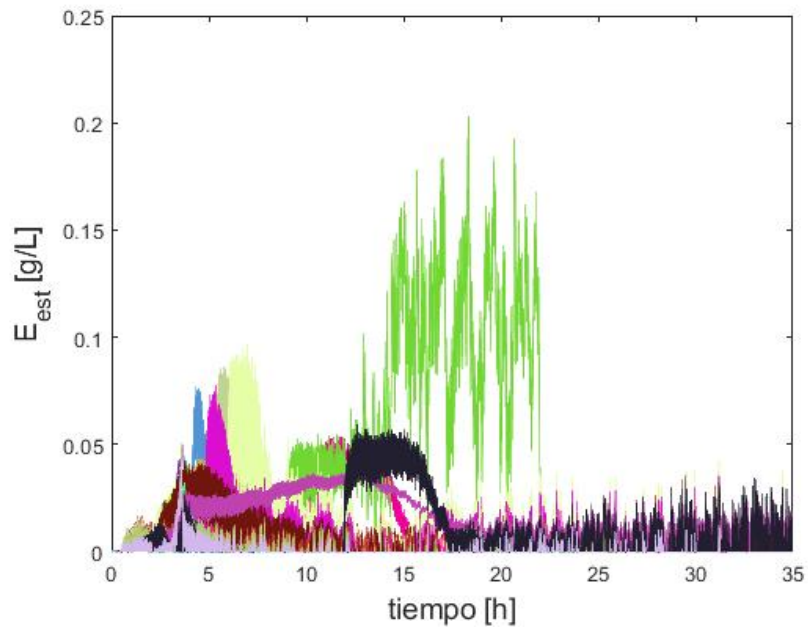


Figura 5.10: Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respirativo: Estimaciones de etanol.

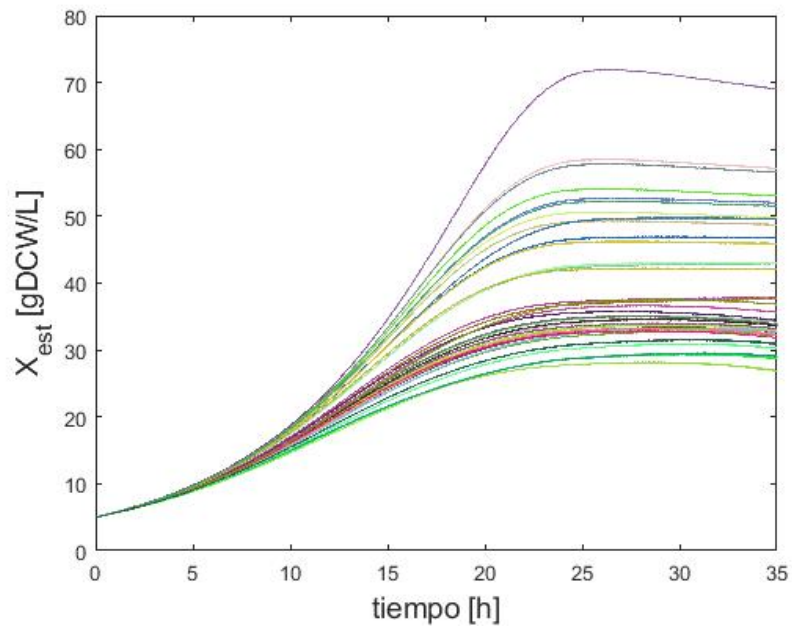


Figura 5.11: Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respi-fermentativo: Estimaciones de biomasa

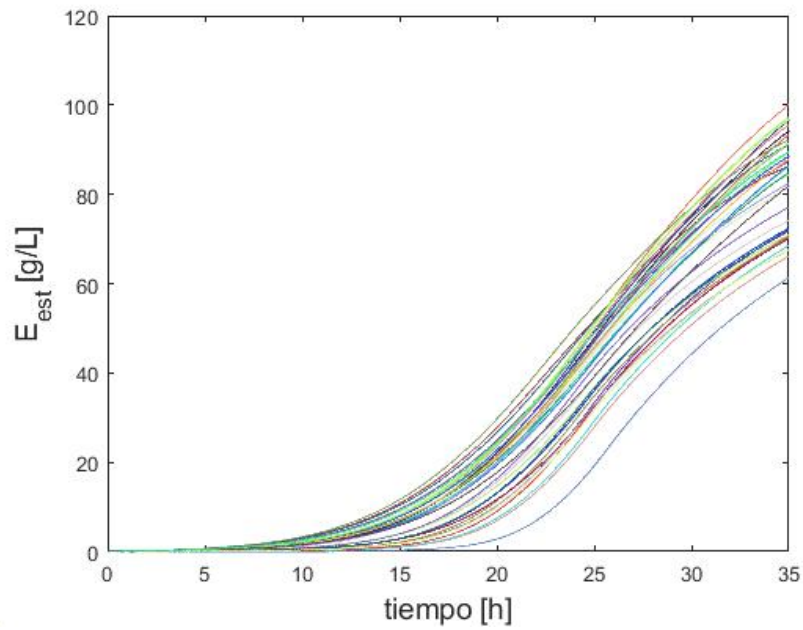


Figura 5.12: Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respiratorio: Estimaciones de etanol.

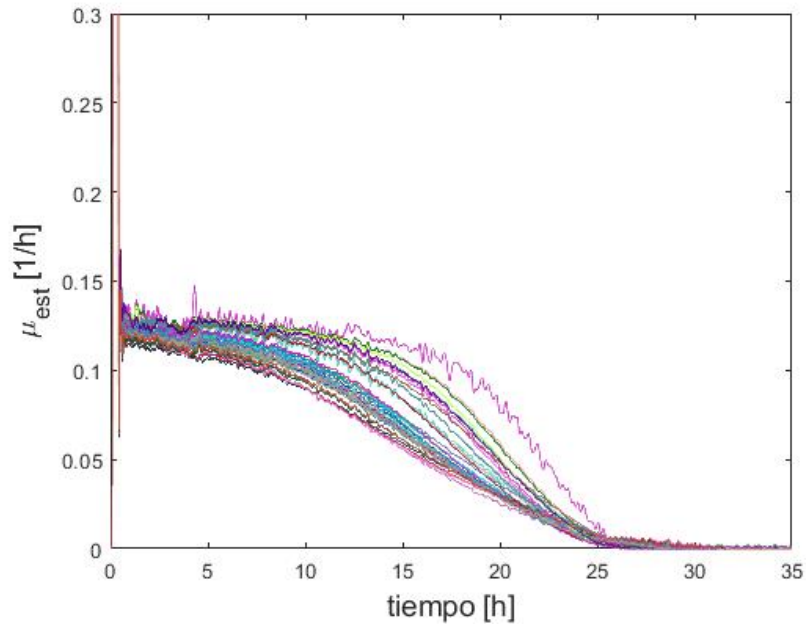


Figura 5.13: Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respiratorio: Estimaciones de velocidad de crecimiento.

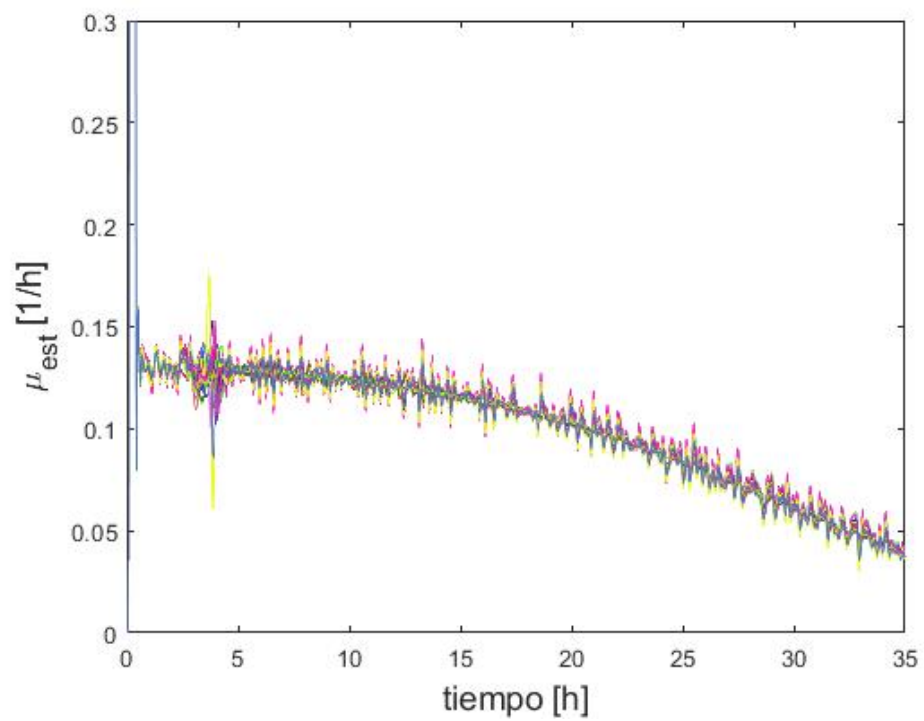


Figura 5.14: Simulaciones de Monte Carlo bajo incertidumbre paramétrica en régimen respirativo: Estimaciones de velocidad de crecimiento.

5.3. Desempeño de la estrategia de control de etanol con observador híbrido

A continuación se muestran las simulaciones del esquema de control propuesto en la figura 3.4, el cual representa la modificación a la estrategia de control propuesta por Dewasme et al. [17].

La figura 5.23 muestra el comportamiento en lazo cerrado del sistema con la estrategia de control adaptable y el observador híbrido con los parámetros óptimos de la tabla 3.1. La concentración final de biomasa en lazo cerrado es de 195,49 gDCW/L alcanzado un volumen final de 1,47 L, lo cual nos da una productividad de 4,88 gDCW/L/h para 40 h de simulación. El set-point del etanol se fijó en 0,5 g/L, y se detectó un valor máximo de etanol de 0,749 g/L.

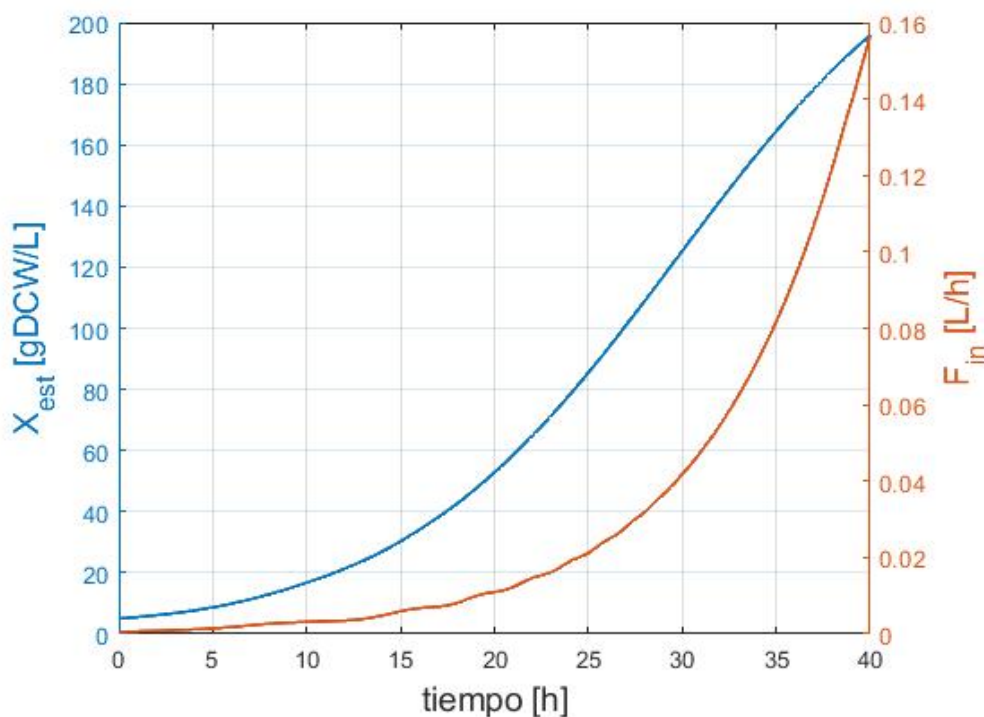


Figura 5.15: Estimación de concentración de biomasa y flujo de alimentación con un 5% de ruido.

De la figura 5.16 podemos ver como la concentración de etanol es capaz de estabilizarse en el valor de referencia 0,5 g/L. Al controlador le toman unas 5 horas lograr la estabilización, esto se debe en parte a que se está siguiendo una referencia muy pequeña de etanol (cercana a cero), además, se está usando un observador de estados y el sistema está sometido constantemente a un ruido en las mediciones. La figura 5.17 nos muestra que ocurre si cambiamos la referencia a 1 g/L. El controlador nuevamente es capaz de seguirla, pero dado que estamos imponiendo un valor mayor de etanol, la concentración final de biomasa decae a 190,35 gDCW/L alcanzado un volumen final de 1,35 L, lo cual nos da una productividad mucho menor, igual de 4,75 gDCW/L/h.

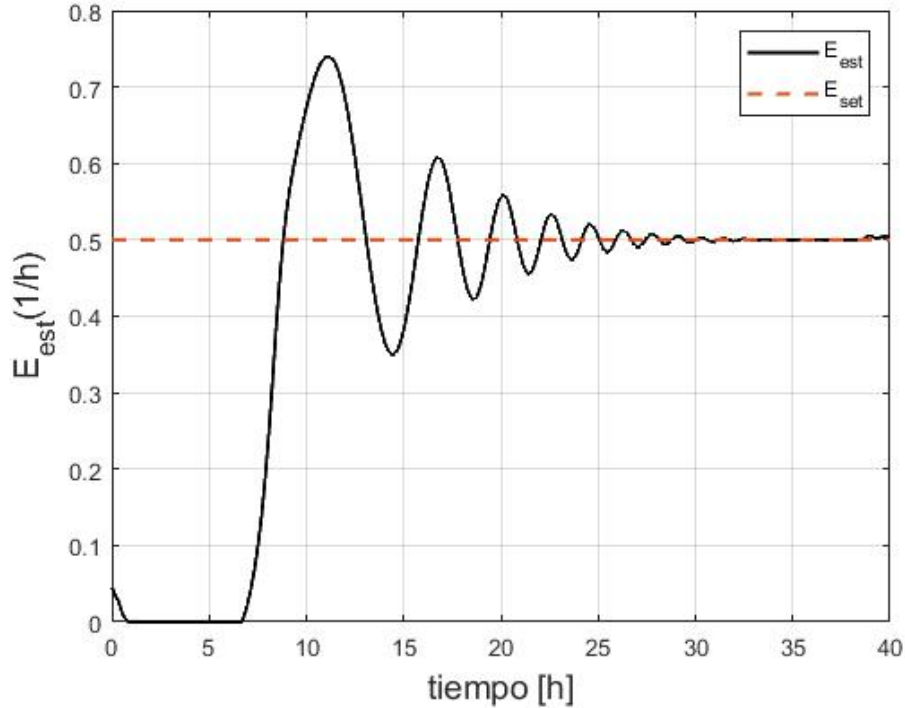


Figura 5.16: Estimación de concentración de etanol con un 5 % de ruido y un set-point igual a 0,5 g/L.

El comportamiento del sistema se muestra en la figura 5.18. Del comportamiento de las variables podemos concluir que el controlador logra mantener al sistema en el régimen respirativo. Inicialmente el valor de μ (5.18, Línea verde) parte con un valor cercano a 0,1 1/h, el cual sube a 1,42 1/h a las 2 h, sobrepasando el valor crítico μ_{crit} (5.18, Línea magenta) y comienza a oscilar hasta estabilizarse en un valor cercano a 0,127 1/h a las 25 h. Esto implica, que la acción de control F_{in} es más lenta al principio con el fin de garantizar que el etanol sea consumido junto con la glucosa. Al final de la fermentación, se aprecia una ligera pérdida de oxígeno disuelto (5.18, Línea negra), la cual no afecta al controlador. De acuerdo a lo reportado en la literatura, en Chen et al. [16] se obtuvo 80 g/L de biomasa en 65 h usando mediciones *off-line* de etanol y un observador asintótico para la biomasa, mientras que la estrategia de control adaptable de etanol de Dewasme et al. [17] lograron una concentración de biomasa de 90 g/L en 25 h. En contraste, nuestra estrategia logró una concentración de biomasa de 195,49 gDCW/L, más del doble de biomasa reportado. Sin considerar un observador, Ibañez et al. [154] probaron esta estrategia de control adaptable modificada logrando una biomasa de 196,1 gDCW/L y un volumen final de 1,54 L con una productividad de 4,80 gDCW/L/h para 40 h de simulación. Este resultado nos demuestra que las estimaciones de biomasa y etanol de nuestro observador híbrido son confiables, ya que la diferencia de la estrategia con observador y sin observador es 0,61 gDCW/L de biomasa, bajo las mismas condiciones de simulación. Lo interesante de esta estrategia es que no necesita un sensor de etanol. En resumen, el excelente desempeño de la estrategia propuesta en esta tesis se debe a efectividad de la ley de control, a la exactitud de las estimaciones de biomasa y etanol y a la oxigenación adecuada proporcionada por el controlador de O_2 .

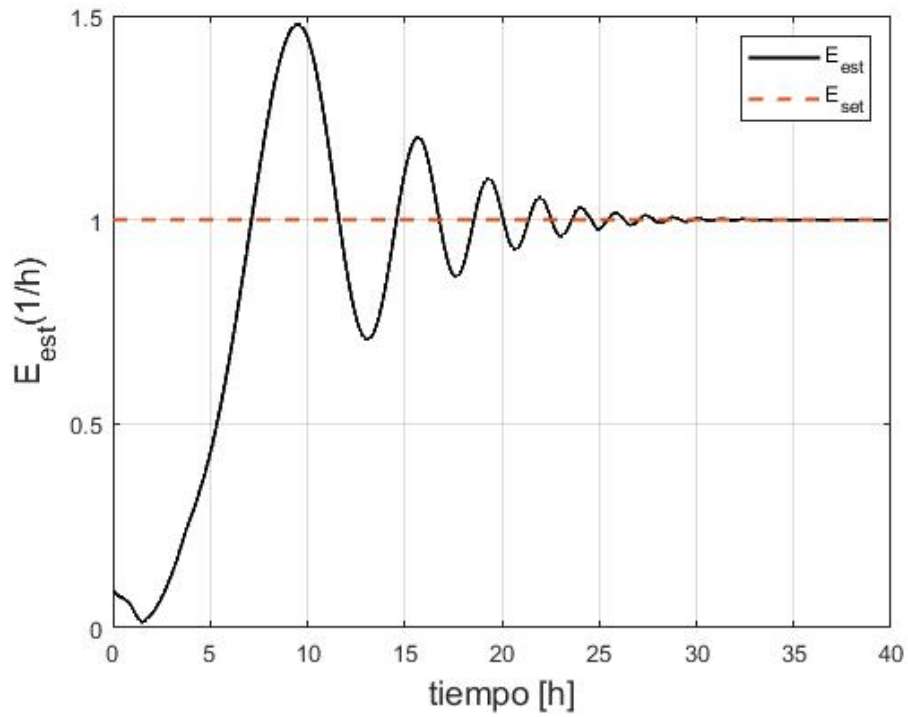


Figura 5.17: Estimación de concentración de etanol con un 5% de ruido y un set-point igual a 1 g/L.

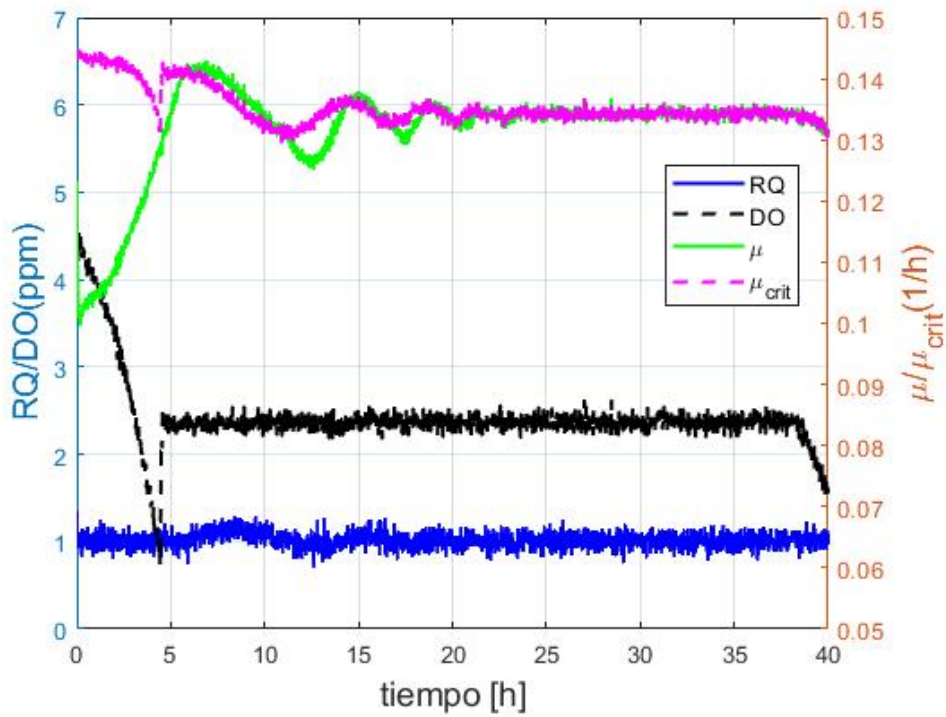


Figura 5.18: Comportamiento del sistema para la estrategia de control 1 y el observador híbrido.

5.4. Desempeño de la estrategia de control de velocidad de crecimiento con observador fraccionario

A continuación se muestran las simulaciones del esquema de control propuesto en la figura 3.5, el cual representa el controlador de velocidad de crecimiento con observador fraccionario asintótico propuesto en esta tesis de doctorado.

Para evaluar el desempeño del observador fraccionario en lazo cerrado, se llevaron a cabo diferentes simulaciones: variaciones de los órdenes de las derivadas, variaciones paramétricas utilizando simulaciones de Monte Carlo, aumento de los niveles de ruido e inclusión de perturbaciones al sistema para evaluar el error de estimación, el comportamiento de la señal de control y finalmente, el valor final de la concentración de biomasa. El observador fraccionario asintótico (FAO), además, se comparó con el observador asintótico clásico. Los parámetros óptimos del controlador y del observador se calcularon mediante optimización. Se simularon ochenta y dos combinaciones de parámetros fraccionarios, donde los valores α_ψ y α_r variaron entre 0,1 y 0,9. Dado que los valores óptimos de los parámetros fraccionarios se encontraron entre 0,5 y 0,1, se realizaron 8 simulaciones con valores cercanos a los óptimos mas el caso entero, el cual corresponde a un observador asintótico clásico, los cuales se resumen en la tabla 5.4.

Casos	Parámetros Fraccionarios	IAE (1/h)	ISU (L/h)	X_{est} (gDCW/L)	E_{est} (g/L)
1	$\alpha_\psi = 0,6, \alpha_r = 0,3$	0.0625	0.0748	192.14	2.3377
2	$\alpha_\psi = 0,6, \alpha_r = 0,2$	0.0459	0.0785	192.93	2.1695
3	$\alpha_\psi = 0,6, \alpha_r = 0,1$	0.0429	0.0778	193.04	2.1859
4	$\alpha_\psi = 0,5, \alpha_r = 0,3$	0.0318	0.0954	197.26	1.8072
5	$\alpha_\psi = 0,5, \alpha_r = 0,2$	0.0865	0.1154	197.74	1.6933
6	$\alpha_\psi = 0,5, \alpha_r = 0,1$	0.0318	0.1115	200.39	0.0995
7	$\alpha_\psi = 0,4, \alpha_r = 0,3$	0.2183	0.1040	193.28	2.2505
8	$\alpha_\psi = 0,4, \alpha_r = 0,2$	0.2980	0.1348	190.05	3.5082
9	$\alpha_\psi = 1, \alpha_r = 1$	0.3191	0.1114	71.878	11.716

Tabla 5.4: Resultados del índice de desempeño del observador fraccionario asintótico.

De la tabla 5.4 se pueden apreciar las ventajas de utilizar derivadas fraccionarias con respecto a las derivadas completas (observador clásico asintótico). En estas simulaciones, el caso 6, donde $\alpha_\psi = 0,5$ y $\alpha_r = 0,1$ se obtiene, respecto a todo al caso 9, el doble de biomasa (200,39 gDCW/L), 100 veces menos etanol, 10 veces menos el esfuerzo de control (ISU) y el IAE. Además, los otros casos fraccionarios también se mostraron robustos, ya que la producción de biomasa no se degradó (menos del 5% de diferencia respecto al caso 6) cuando se utilizaron órdenes fraccionarios no óptimos.

Las siguientes figuras muestran los resultados derivados de las variaciones de los órdenes de las derivadas. La figura 5.19 muestra el error de estimación de la velocidad de crecimiento. Para apreciar en detalle la convergencia del error, solo se muestran los primeros 0,5 segundos de simulación. Las siguientes figuras: 5.20, 5.21, 5.22 y 5.23 muestran el comportamiento de

la estimación de la biomasa, estimación de etanol, flujo de alimentación exponencial y el error paramétrico, respectivamente.

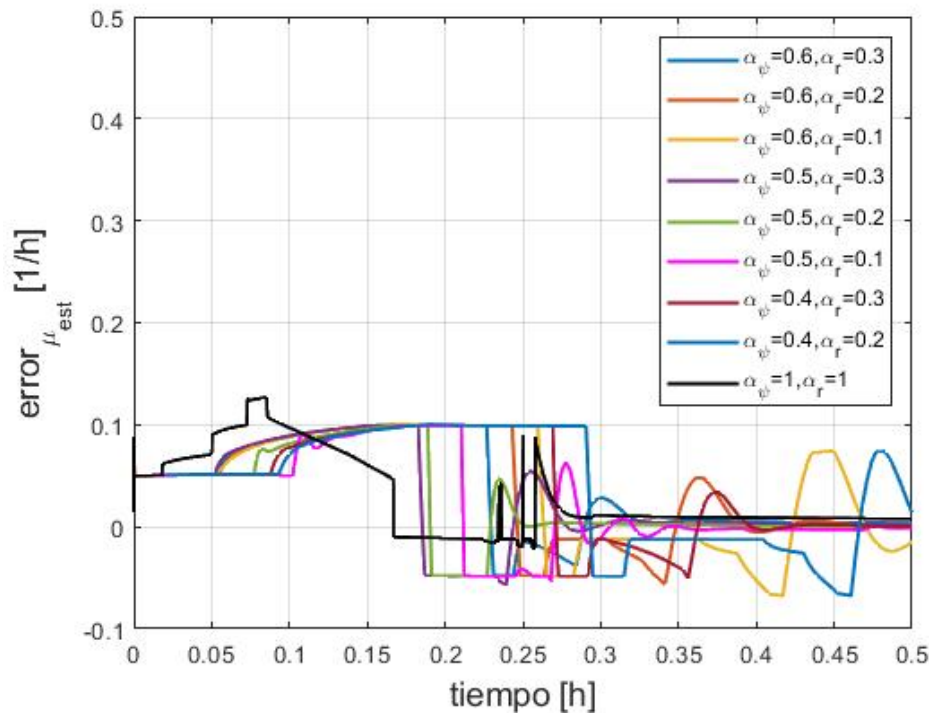


Figura 5.19: Error de estimación para diferentes órdenes de derivación con un 5% de ruido.

De las figuras mencionadas con anterioridad, podemos ver que, para los casos con derivadas fraccionarias, la convergencia del error es mucho más rápida que el caso 9 (Fig. 5.20), y no solo es rápida, sino que algunos casos presentan menos oscilaciones. La Tabla 5.4 resume los valores calculados del índice IAE y el valor final estimado de biomasa y etanol en lazo cerrado. Como era de esperar, las ventajas de utilizar derivadas fraccionarias se pueden apreciar con respecto al observador clásico. En estas simulaciones, el caso de $\alpha_{\psi} = 0,5$ y $\alpha_r = 0,1$ obtiene el menor valor del IAE y el menor esfuerzo de control (ISU), lo cual se puede ver reflejado en la figura 5.22, donde la señal de control mas rápida (Línea magenta) corresponde al caso 6, mientras que la señal mas lenta es el caso 9. La misma situación se muestra en las estimaciones de biomasa y etanol, en línea magenta se representa el caso 6 (mejor) y en línea negra el caso 9 (caso entero). La diferencia de biomasa es casi el doble (200 gDCW/L vs 70 gDCW/L), y para el etanol, se muestra una diferencia de 1 g/L vs casi 11 g/L generados. El caso 6 es un caso óptimo, donde mediante el control de velocidad de crecimiento se logra que el sistema permanezca en régimen respirativo, produciendo una baja cantidad de etanol y maximizando la productividad de la biomasa.

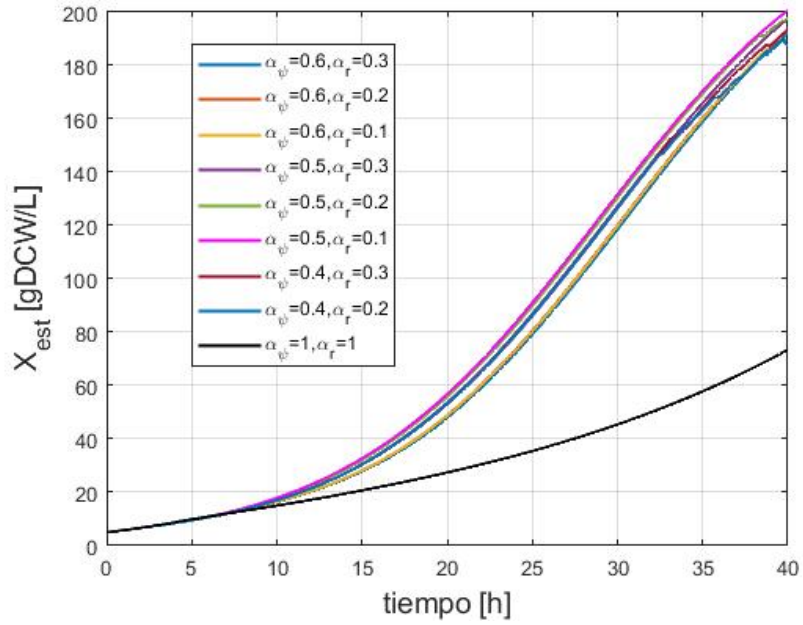


Figura 5.20: Estimación de biomasa para diferentes órdenes de derivación con un 5% de ruido.

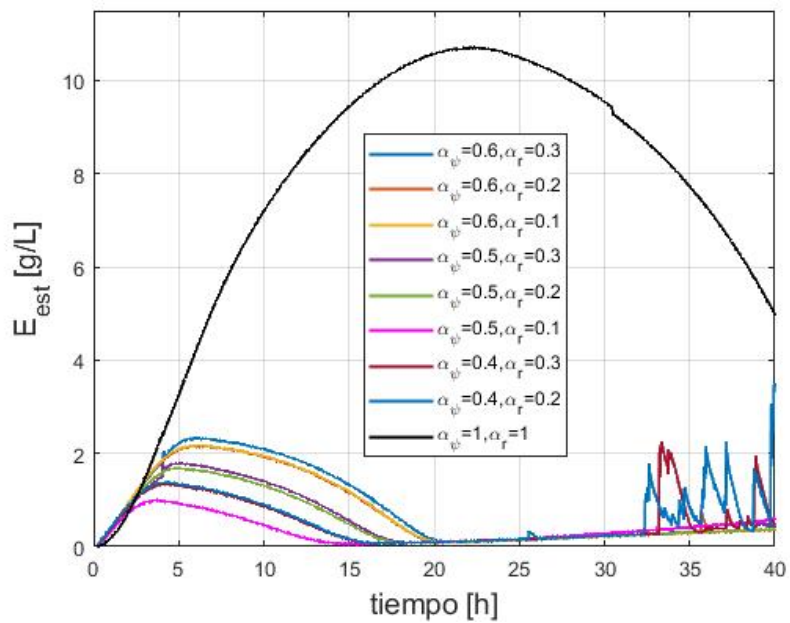


Figura 5.21: Estimación de etanol para diferentes órdenes de derivación con un 5% de ruido.

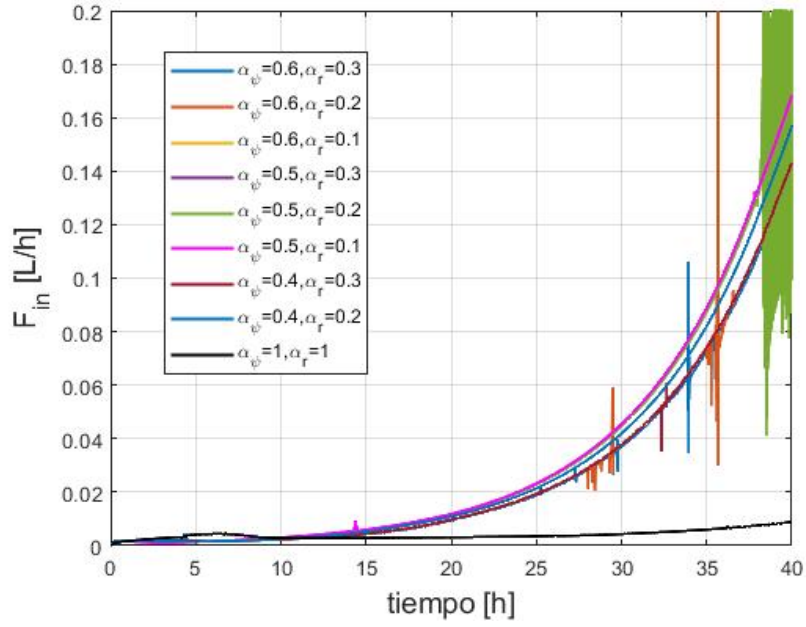


Figura 5.22: Perfiles de flujo de alimentación exponencial para diferentes órdenes de derivación con un 5% de ruido.

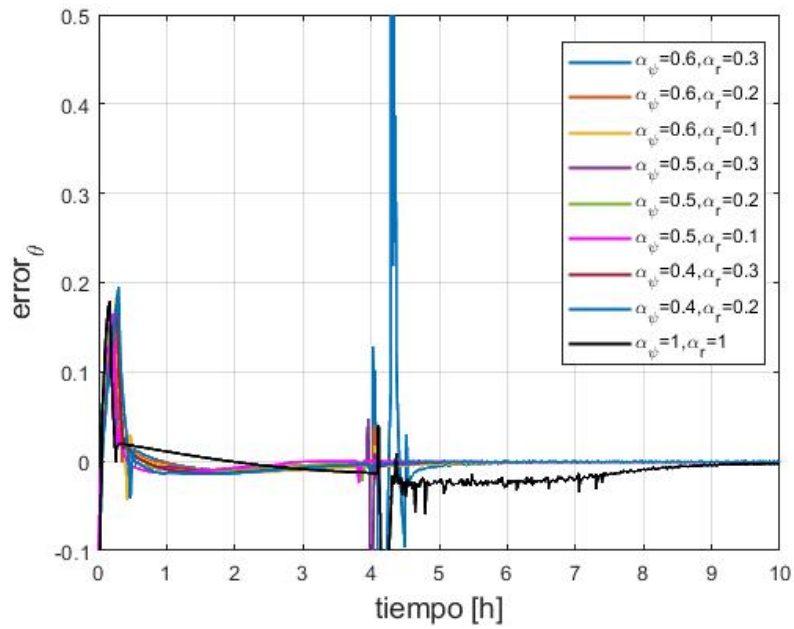


Figura 5.23: Error paramétrico para diferentes órdenes de derivación con un 5% de ruido.

Comportamiento del observador fraccionario asintótico bajo incertidumbre paramétrica

La variabilidad de los parámetros estequiométricos también se probó utilizando simulaciones de Monte Carlo. Las simulaciones más relevantes se muestran en las figuras 5.24 y 5.25 para el caso de $\alpha_\psi = 0,1$ y $\alpha_r = 0,5$. La tasa de crecimiento se mantiene constante con algunas variaciones debido al ruido (5% del valor nominal de μ) y al cambio en los parámetros, mientras que la biomasa se mantiene creciendo de forma exponencial (Fig. 5.24). La señal de control (5.26) también se ve afectada por la variabilidad; cuanto más pequeña y lenta es la señal de control, menos biomasa se obtiene. Por otro lado, cuando la señal de control es rápida y alcanza valores cercanos a 0,2 L/h, se obtienen los valores de biomasa más altos, cercanos a 200 gDCW / L (Curva púrpura en Fig. 5.24).

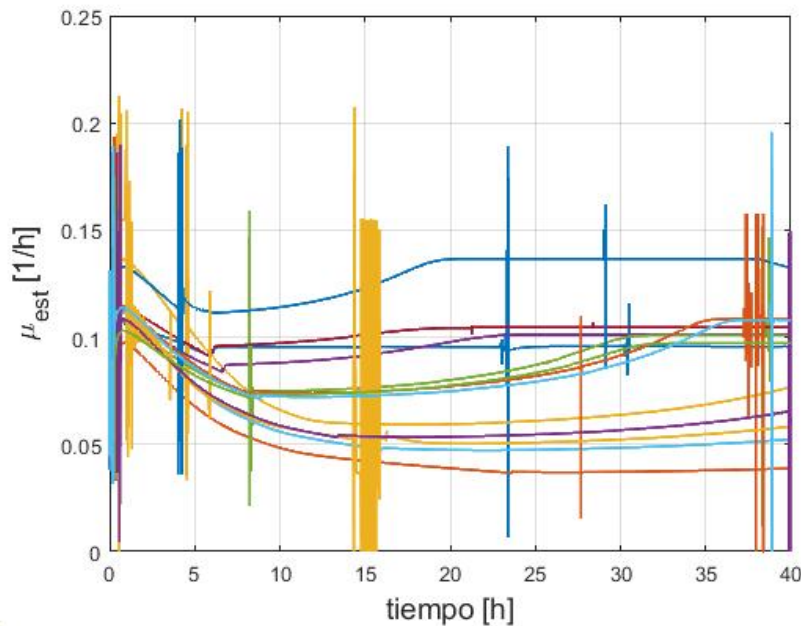


Figura 5.24: Simulaciones de Monte Carlo para la estimación de μ por el FAO bajo incertidumbre paramétrica.

Tal y como se había mostrado en las figuras 5.5 y 5.8, el comportamiento del observador AO en régimen respirativo no es robusto, pues no logra alcanzar la estabilidad asintótica en este régimen. A modo de comparación, las figuras 5.27 y 5.28 muestran el comportamiento del FAO y el AO bajo incertidumbre paramétrica (Simulaciones de Monte Carlo). Tal y como se aprecia en la 5.27, el FAO si logra estabilidad asintótica.

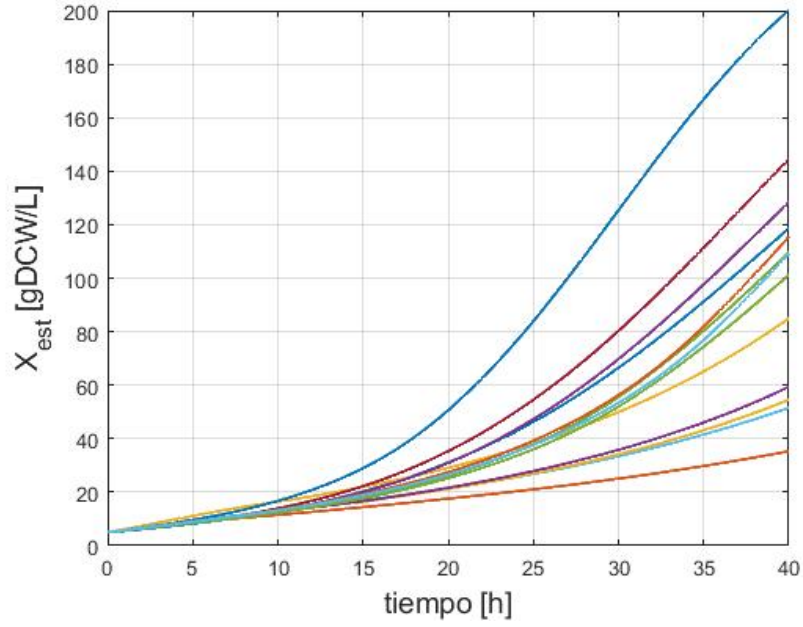


Figura 5.25: Simulaciones de Monte Carlo para la estimación de biomasa por el FAO bajo incertidumbre paramétrica.

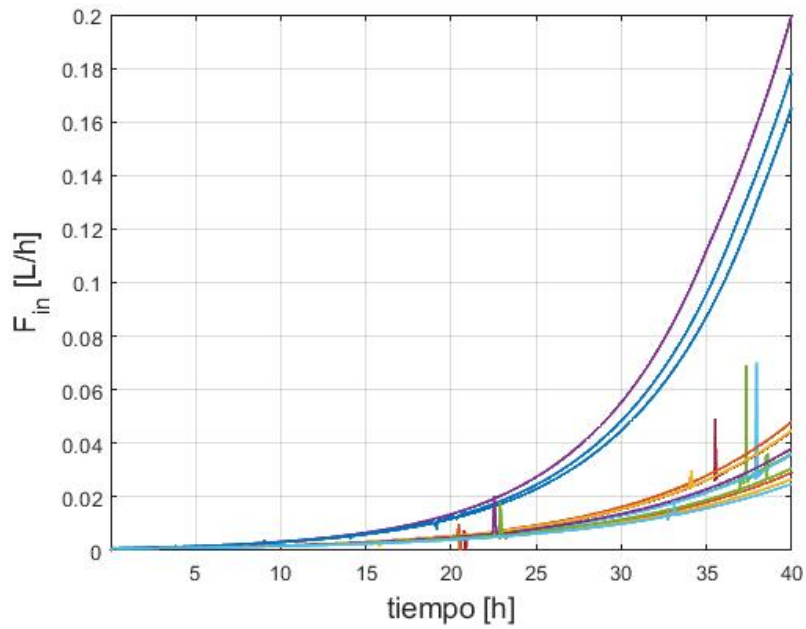


Figura 5.26: Perfiles de flujo de alimentación exponencial bajo incertidumbre paramétrica.

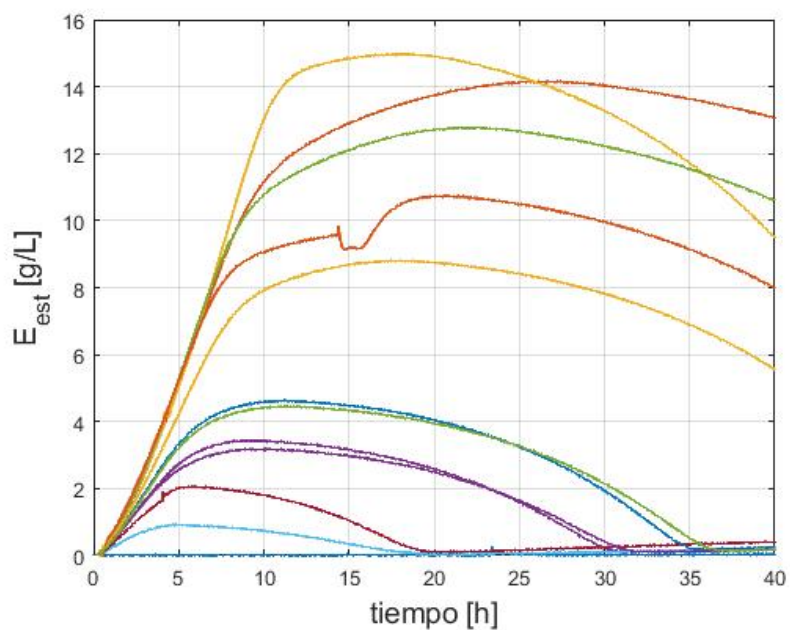


Figura 5.27: Simulaciones de Monte Carlo para la estimación de etanol por el FAO bajo incertidumbre paramétrica.

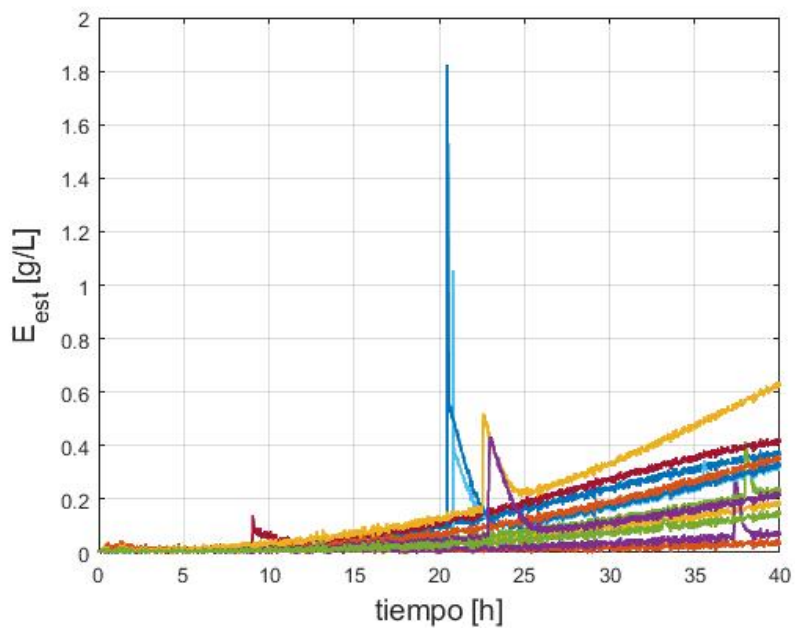


Figura 5.28: Simulaciones de Monte Carlo para la estimación de etanol por el AO bajo incertidumbre paramétrica.

Comportamiento del observador fraccionario asintótico bajo perturbaciones y ruido en la señal de control

Para estudiar la robustez del observador y del controlador respecto a perturbaciones aditivas a la señal de control. Se considera la siguiente perturbación aditiva a ley de control (3.8), tal que:

$$F_{in}(t) = V \frac{\lambda_\mu \tilde{\mu} + \frac{d\mu_{crit}}{dt} + (r_1 + r_2)X}{S_{in}} + \eta(t); \quad (5.9)$$

donde $\eta(t)$ es una perturbación aditiva desconocida, pero acotada. La perturbación $\eta(t)$ se puede cancelar, de forma interna, mediante la sobre-parametrización del controlador adaptativo [143]. Modificando la ley adaptativa θ_μ , se puede evitar que el vector θ_μ no sea acotado. La modificación tiene la siguiente forma:

$$\frac{d\phi_\mu}{dt} = \gamma e_\mu X - \theta_\mu \left(1 - \frac{|\theta_\mu|}{\theta_{max}^*}\right)^2 f(\theta_\mu) \quad (5.10)$$

tal que:

$$f(\theta_\mu) = \begin{cases} 1 & \text{si } |\theta_\mu| > \theta_{max}^* \\ 0 & \text{otro.} \end{cases} \quad (5.11)$$

La modificación anterior implica que $\theta_\mu \left(1 - \frac{|\theta_\mu|}{\theta_{max}^*}\right)^2 f(\theta_\mu)$ se utiliza para forzar al parámetro desconocido θ_μ a entrar a un set M acotado, tal que $M = (|\theta_\mu| > \theta_{max}^*)$, cuando θ_μ esta en el limite o fuera del set M .

Considerando la modificación en (5.10), la figura 5.29 muestra la respuesta del controlador y el observador con $\alpha_\psi = 0,1$ y $\alpha_r = 0,5$ sin ruido agregado, mientras que las figuras 5.30 y 5.31 muestran el comportamiento ante perturbaciones con agregado ruido del 5% y del 10% del valor nominal de la señal estimada de la velocidad crítica de crecimiento, respectivamente.

De las figuras 5.29, 5.30 y 5.31, se puede apreciar que la señal de control y las variables observadas de biomasa y velocidad de crecimiento μ muestran una recuperación de una perturbación en la ley de control F_{in} . La velocidad de crecimiento estimada se mantiene cercana al valor de set point $\mu_{set} = 0,95\mu_{crit}$ en todos los escenarios, concluyendo que la estrategia de control es capaz de recuperarse ante este tipo de perturbaciones. Dado que el proceso es muy sensible al cambio en el valor de la velocidad de crecimiento específico, la biomasa final se ve afectada por el ruido y la perturbación, hasta el punto de no superar un valor final de 80 gDCW/L en las figuras 5.30 y 5.31, aunque logra alcanzar un valor de 140 gDCW/L en la figura 5.29 (sin ruido). Estos resultados coinciden con los resultados reportados en la literatura de cálculo fraccionario, donde una de las ventajas de usar derivadas fraccionarias es la posibilidad de manejar mejor el ruido y las perturbaciones que las derivadas enteras.

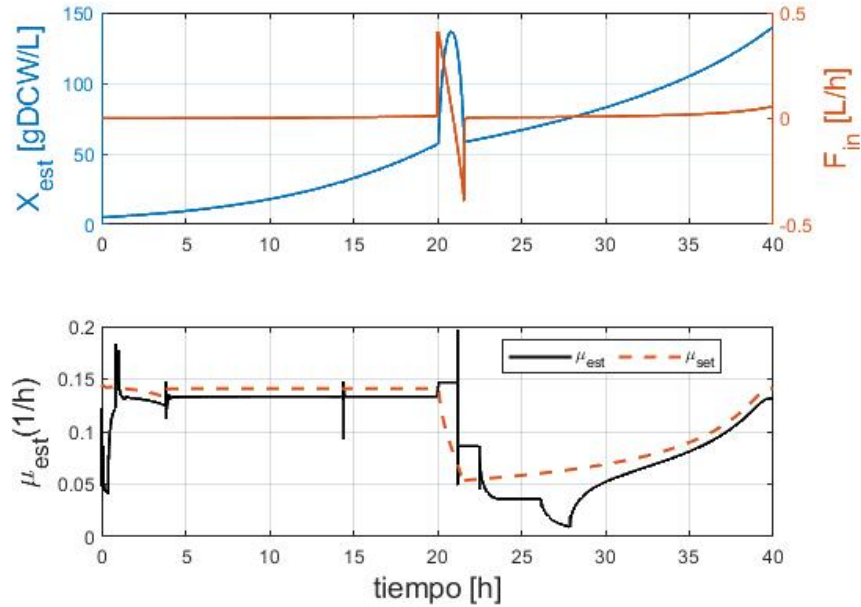


Figura 5.29: Comportamiento de la biomasa, F_{in} , μ y μ_{set} ante la perturbación de salida $\eta(t)$, sin ruido.

Además, la figura 5.32 muestra el comportamiento del error paramétrico $|\theta_\mu|$ acotado. Aquí el parámetro desconocido θ y el error paramétrico e_θ no se estabilizan en un valor constante o cero, sino que continúan variando en el tiempo debido al efecto de la perturbación $\eta(t)$. Si la perturbación tiende eventualmente a cero con el tiempo, el parámetro desconocido θ también tendera nuevamente a θ^* de forma asintótica.

Según Narendra et al. [155], para lograr la convergencia paramétrica, la entrada del sistema o la señal de control debe ser de excitación persistente. Si la entrada contiene una cantidad de líneas espectrales igual al orden del sistema n , se satisface que $\lim_{t \rightarrow \infty} \theta(t) = \theta^*$. Dado que F_{in} es una función compleja no lineal, es difícil determinar cuántas líneas espectrales tiene, por lo que se procedió a simular el sistema libre de ruido y/o cualquier perturbación que pudiera sumar líneas espectrales y lograr una convergencia paramétrica. En la figura 5.33 se puede observar que el error paramétrico se estabiliza en cero asintóticamente, lo que nos dice que el parámetro desconocido $\theta(t)$ tiende a su valor θ^* y, por lo tanto, la señal de control del sistema, F_{in} , se concluye que es de excitación persistente.

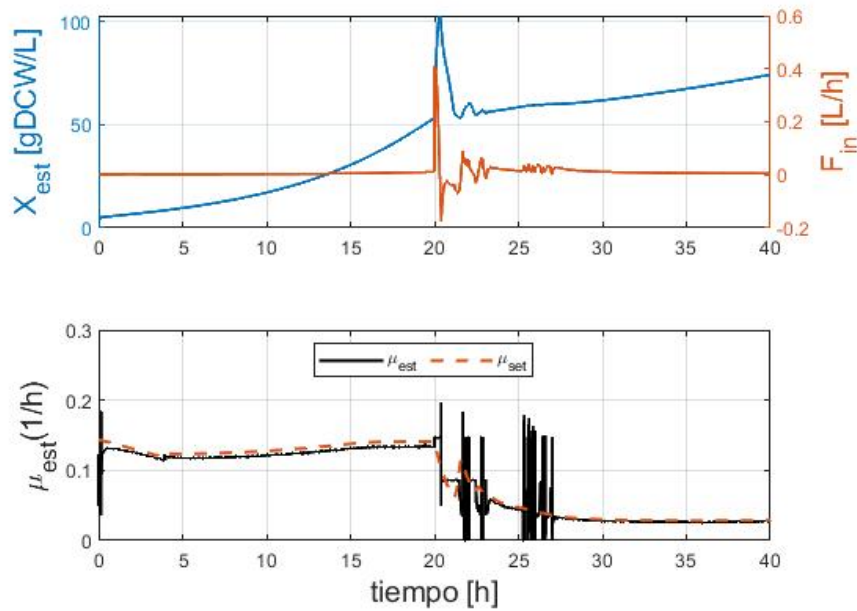


Figura 5.30: Comportamiento de la biomasa, F_{in} , μ y μ_{set} ante la perturbación de salida $\eta(t)$, con 5% de ruido.

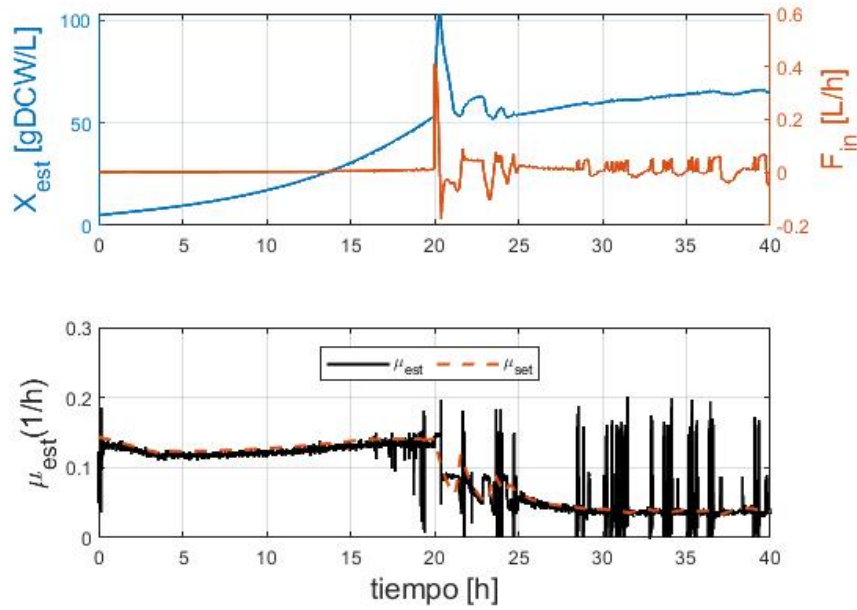


Figura 5.31: Comportamiento de la biomasa, F_{in} , μ y μ_{set} ante la perturbación de salida $\eta(t)$, con 10% de ruido.

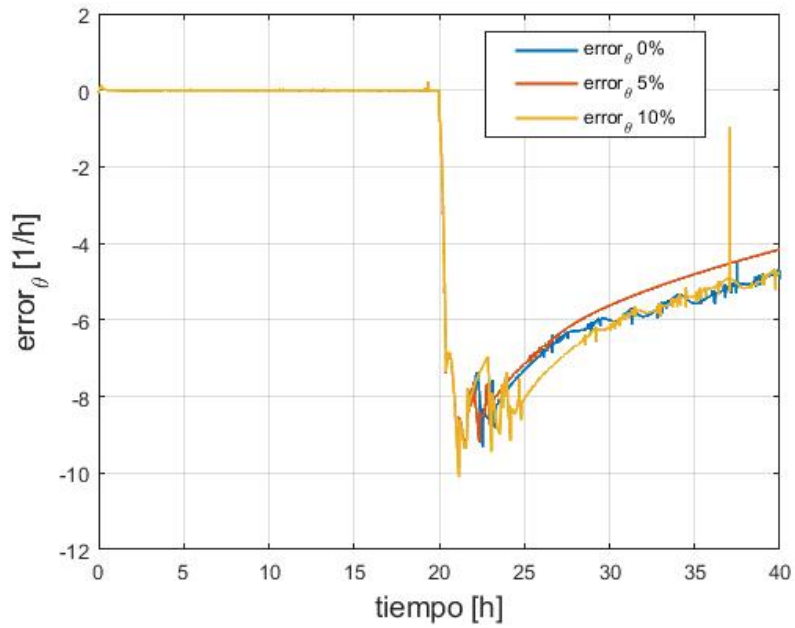


Figura 5.32: Comportamiento del error paramétrico $|\theta_\mu|$ acotado bajo la perturbación $\eta(t)$ para 0%, 5% y 10% de ruido.

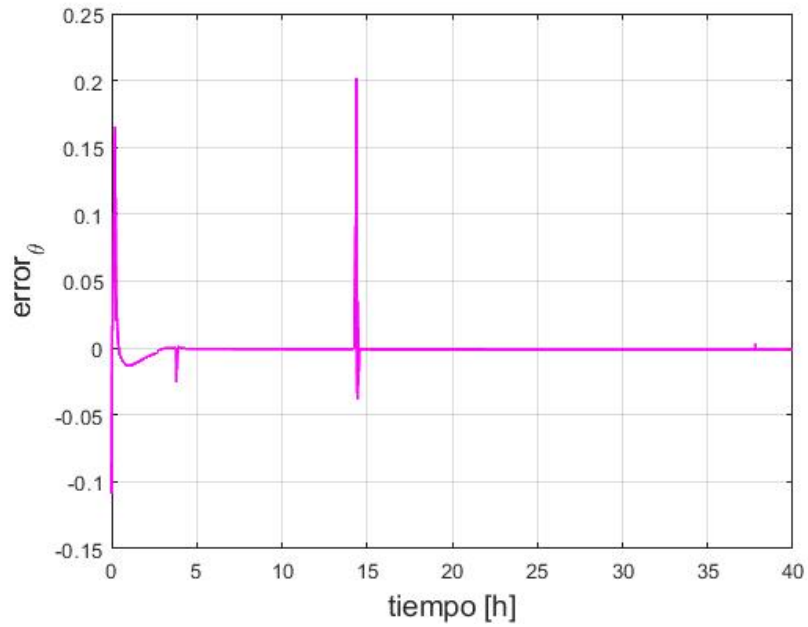


Figura 5.33: Comportamiento del error paramétrico para la estrategia de control 2 y el observador fraccionario asintótico.

A continuación se muestra el comportamiento general del esquema de control propuesto en la figura 3.4, el cual representa la estrategia de control adaptable y el observador híbrido.

La figura 5.34 nos muestra una concentración de biomasa final obtenida en lazo cerrado de 200.39 gDCW/L alcanzado un volumen final de 1.49 L, dándonos una productividad de 5 gDCW/L/h para 40 h de simulación. El set-point de la velocidad de crecimiento es variable e igual al 95 % de μ_{crit} , además, durante el cultivo solo se detectó un valor máximo de etanol de 1.099 g/L.

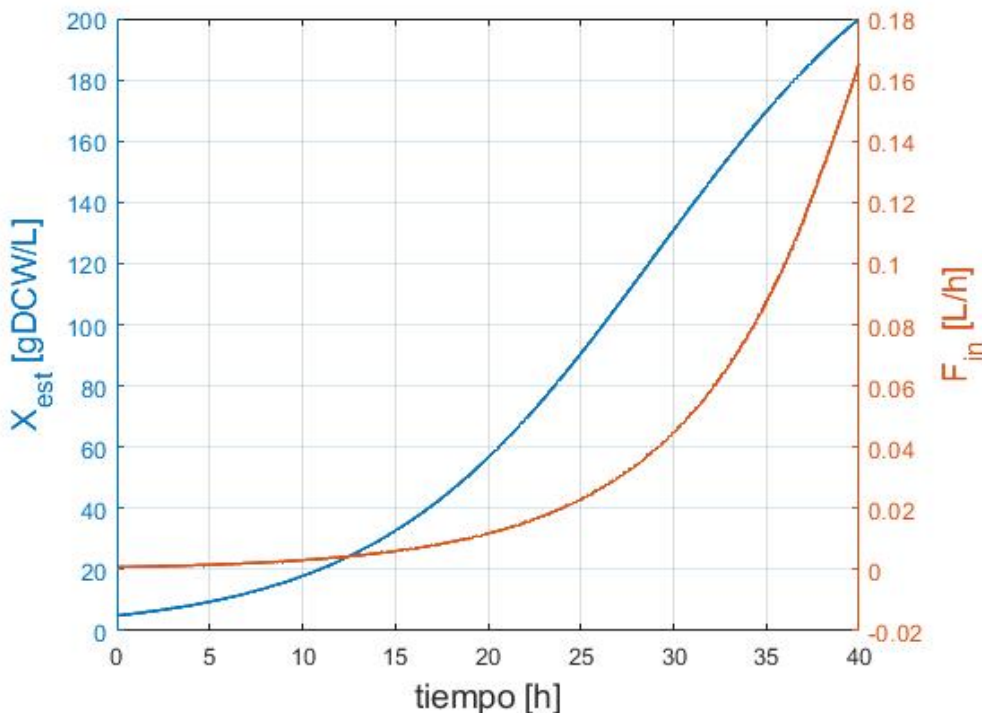


Figura 5.34: Estimación de concentración de biomasa y flujo de alimentación con un 5 % de ruido.

De la figura 5.35 podemos ver como el controlador de velocidad de crecimiento es capaz de seguir el valor de referencia variable, a pesar de que el sistema esta sometido a ruido en las mediciones y se está utilizando un observador para la estimación de μ , μ_{crit} y la concentración de biomasa. El valor de μ (5.35, Línea magenta) parte con un valor cercano a 0.14 1/h, el cual decae a 0.1 1/h a las 4 h aproximadamente, esto influye negativamente en el valor del coeficiente respirativo RQ (5.36, Línea azul), el cual llega a un valor de 2, produciéndose 1 g/l de etanol. La respuesta del controlador es que el flujo de alimentación sea mas lento, permitiendo que el etanol generado sea consumido junto con la glucosa. Pasada las 20 h, y consumido todo el etanol generado, la velocidad de crecimiento aumenta paulatinamente a valor estable de 0.13 1/h, logrando una alta concentración de biomasa.

De acuerdo a lo reportado en la literatura, el único controlador con una estructura similar al controlador de μ propuesto en esta tesis, se define en el estudio de Hocalar et al. [43], donde se obtuvieron 75 gDCW/L de biomasa final en 16 h. En contraste con el trabajo de Hocalar et al. [43] y los otros trabajos encontrados en la literatura como es el caso de los

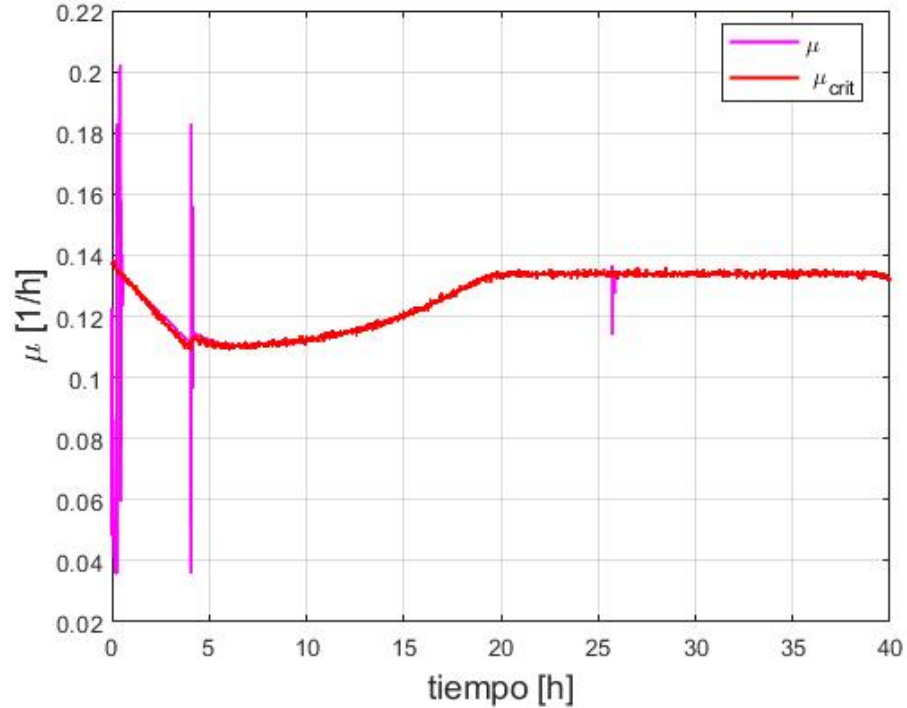


Figura 5.35: Estimación de velocidad de crecimiento con un 5% de ruido y un set-point igual a $0,95\mu_{crit}$ 1/h.

controladores PI propuestos en [34, 35, 23], nuestro controlador logró una alta concentración de biomasa de 200.39 gDCW/L en 40 h de cultivo. Sin considerar un observador, Ibañez et al. [154] probaron la estrategia de control de μ de esta tesis, logrando una biomasa de 195.9 gDCW/L y un volumen final de 1.47 L con una productividad de 4.90 gDCW/L/h para 40 h de simulación. Los resultados de esta tesis, son superiores en 5 gDCW/L de biomasa bajo las mismas condiciones de simulación, lo cual nos indica que el uso de las estimaciones del observador fraccionario asintótico son confiables y además, lo que resulto en una señal de control F_{in} (5.1) mas rápida, llegando a 0.15 L/h contra unos 0.08 L/h reportados en Ibañez et al. [154]. En resumen, el excelente desempeño de la estrategia propuesta en esta tesis se debe a efectividad de la ley de control, a la exactitud de las estimaciones de biomasa y etanol y a la oxigenación adecuada proporcionada por el controlador de O_2 .

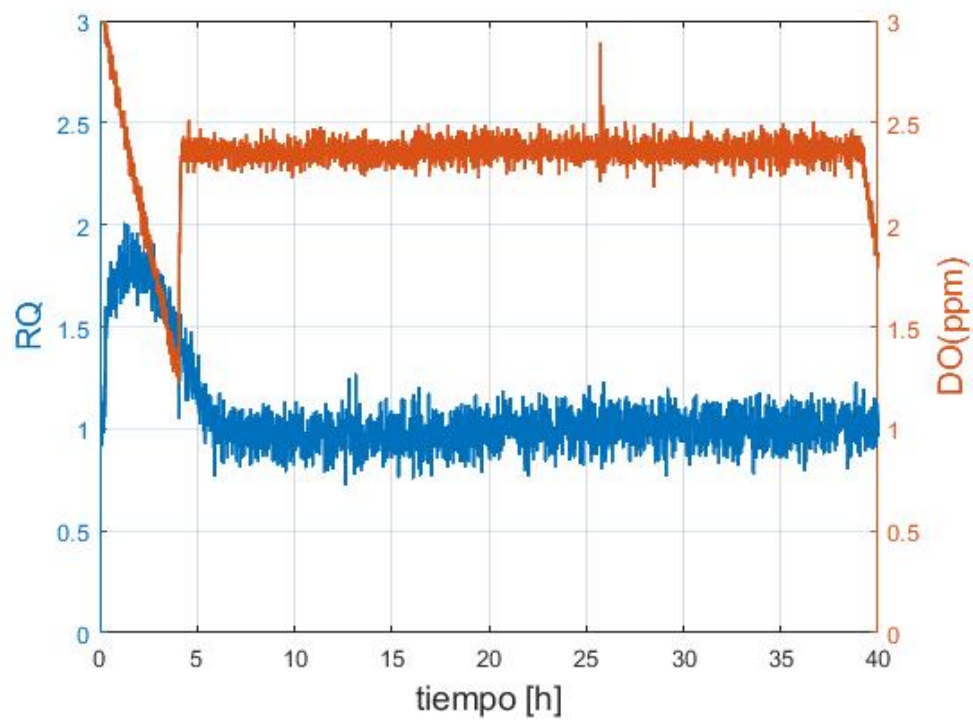


Figura 5.36: Comportamiento del sistema para la estrategia de control 2 y el observador fraccionario asintótico.

5.5. Comparación de diferentes estrategias de control de alta densidad

La estrategia de control propuesta en esta tesis fue comparada por simulación con 3 estrategias propuestas en Henes and Sonnleitner et al. [21], Ibañez et al. [154] y Dewasme et al. [17]. La figura 5.37 muestra el diagrama en bloques usado en la simulación y la tabla 5.5 resume los resultados de estas estrategias de control en alta densidad.

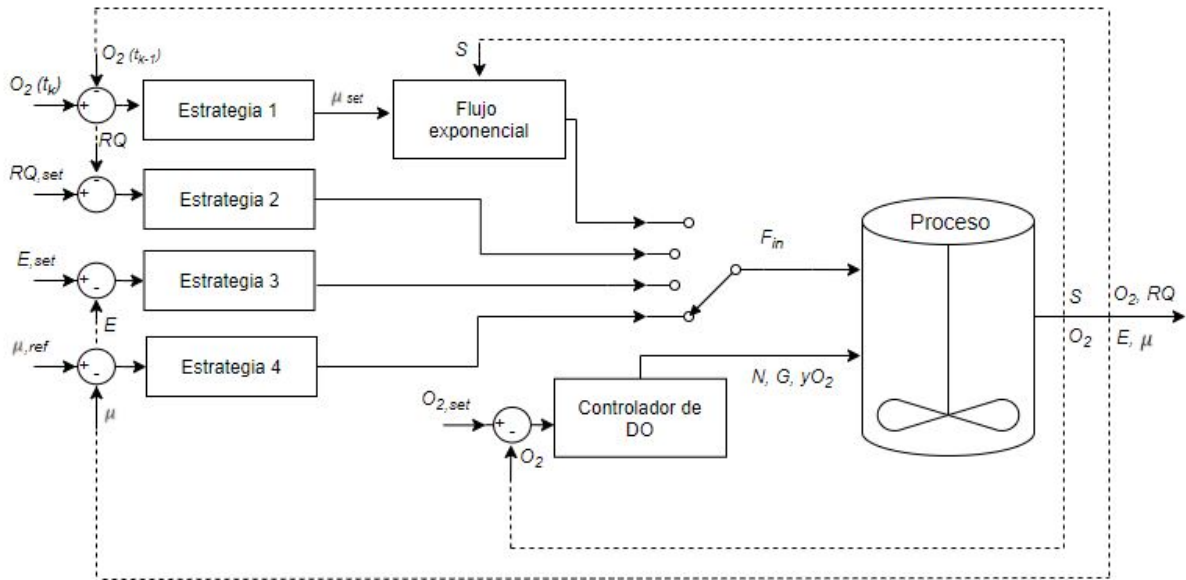


Figura 5.37: Diagrama en bloques de las estrategias de control.

Estrategias	X_f (gDCW/L)	q_x (gDCW/L/h)	V_f (L)	X_T (gDCW)
Ibañez et al. [154] - Control Heurístico	170.4	4.26	1.00	170.0
Ibañez et al. [154] - Control NMPC	201.1	5.03	1.69	340.1
Ibañez et al. [154] - Control Adaptable Etanol	196.1	4.80	1.54	301.9
Ibañez et al. [154] - Control Adaptable μ	195.9	4.90	1.47	287.6
Estrategia 1 Control Adaptable Etanol	195.49	4.88	1.47	287.3
Estrategia 2 Control Adaptable μ	200.39	5.00	1.56	312.60

Tabla 5.5: Resultados de las estrategias de control de alta densidad.

donde X_f , q_x , V_f y X_T representan la contracción final de la biomasa, la productividad volumétrica, el volumen final y la biomasa total.

Las estrategias presentadas en la tabla 5.5 fueron estudiadas por la autora de esta tesis de doctorado y presentadas en la publicación de Ibañez et al. [154]. En este trabajo se compararon 4 estrategias de control: control heurístico [21], control NMPC [154], control adaptable de etanol inicialmente propuesto por Dewasme et al. [17] y modificado por los autores en [154] y finalmente el control de μ propuesto en esta tesis de doctorado. Dado que todas las simulaciones se hicieron bajo el supuesto de que se tenía acceso a las variables de estado, a la tabla 5.5 se le añadieron 2 filas extras con los resultados obtenidos en esta tesis. Las filas 5 y 6 corresponden, respectivamente, a los resultados de las estrategias de control adaptable de etanol modificado y control de μ acopladas a observadores desarrollados en esta tesis.

Analizando los resultados, podemos ver que la estrategia de Henes y Sonnleitner et al. [21], correspondiente a un controlador heurístico de oxígeno disuelto donde se manipula el F_{in} mediante el control del oxígeno disuelto, no logró alcanzar la máxima productividad de biomasa (50% menos en comparación con el resto de las estrategias). Este comportamiento se debió a que, primero, la estrategia está diseñada para evitar la acumulación de etanol y el factor de penalización (2%) debe ser mayor que el factor de adición (1%), lo que a su vez impidió saturar la capacidad oxidativa de la levadura. En segundo lugar, el ruido de medición del O_2 afectó el desempeño del controlador de forma negativa.

Por su parte, el controlador NMPC presentado en Ibañez et al. [154] logró el mejor desempeño en cuanto a biomasa total acumulada en el biorreactor durante el cultivo fed-batch. En esta estrategia se controló el RQ y fue capaz de aprovechar la capacidad oxidativa de la levadura y, por lo tanto, muestra un rendimiento constante y similar a lo largo del proceso. La principal desventaja de la estrategia NMPC, es que al ser un controlador predictivo basado en modelo, se tiene que tener un conocimiento completo del proceso y acceso a todas las variables de proceso.

Por su parte, la estrategia modificada de Dewasme et al. [17] sin observador, tiene unos resultados superiores a los reportados en su estudio. El primer cambio con respecto a [17] fue calcular los parámetros λ_1 , λ_2 y γ de la estrategia de control 2.25 y 2.26 mediante optimización (Ecuación 3.20). Los valores óptimos calculados fueron: $\lambda_1 = 0,0055$, $\lambda_2 = 0,3475$ y $\gamma = 0,0430$. El segundo cambio fue bajar el valor del set-point de etanol de 1 g/L [17] a 0,5 g/L y el tercer cambio incluye la simulación del controlador en paralelo con el lazo de control de oxígeno disuelto, dado que Dewasme et al. [17] no considera que hay limitación de oxígeno disuelto en sus simulaciones. De los 90 g/L de biomasa reportados en el trabajo original de [17], en este trabajo se reportaron una concentración de biomasa de 196,1 gDCW/L y una biomasa total de 301,7 gDCW sin observador, mientras que con el observador acoplado, se lograron 195,49 gDCW/L de biomasa y una biomasa total de 287,6 gDCW. Los resultados obtenidos (con y sin observador) no sólo mejora la productividad del proceso (en comparación con la estrategia de Henes y Sonnleitner et al. [21] y la original Dewasme et al. [17]) sino que también tiene un efecto positivo en la biomasa total.

Finalmente, la estrategia de control μ , variable que está intrínsecamente vinculada al estado fisiológico de la levadura, es capaz de aprovechar al máximo la capacidad oxidativa de la levadura, mostrando excelentes resultados: sin observador logra una biomasa de 195,49 gDCW/L y una biomasa total de 287.3 gDCW y con observador logra una biomasa de 200.39

gDCW/L y una biomasa total de 312.60 gDCW.

Finalmente, la tabla 5.6 muestra un resumen de los índices de desempeño calculados para cada estrategia.

Estrategias	IAE	ISU	IAVU
Ibañez et al. [154] - Control Heurístico	0.6234	0.0231	0.0837
Ibañez et al. [154] - Control NMPC	0.1492	0.1317	0.1375
Ibañez et al. [154] - Control Adaptable Etanol	0.1060	0.1029	0.6528
Ibañez et al. [154] - Control Adaptable μ	0.3740	0.0915	0.9646
Estrategia 1 Control Adaptable Etanol	5.4973	0.0938	0.1553
Estrategia 2 Control Adaptable μ	0.0318	0.1115	0.1897

Tabla 5.6: Resultados de los índice de desempeño para cada controlador.

El mejor índice IAE corresponde a la estrategia de control de μ presentada en este trabajo, seguida de las estrategias de control adaptable de etanol modificado sin observador, control NMPC, control de μ sin observador, control heurístico y por ultimo control adaptable de etanol modificado con observador. La estrategia heurística presenta una desventaja, y es que no tiene una referencia dinámica, como es el caso de las otras estrategias, por lo que no puede adaptarse fácilmente al comportamiento fisiológico de la levadura durante todo el cultivo. En el caso del índice ISU, el cual representa el esfuerzo realizado por el controlador, los mejores resultados los tienen la estrategia heurística, seguida por las estrategia des control de μ con y sin observador, dado que presentan unos de los errores de control con menos variabilidad. El control NMPC presenta el mayor ISU, debido a que de todas las estrategias es la más compleja, debido a los ciclos de procesamiento y optimización que incluye su diseño. Finalmente, el índice IAVU, muestra que las estrategia heurística y NMPC tienen la menor variación absoluta en los controladores, seguido del control adaptable de etanol modificado con observador y el control de μ con observador.

Dados los excelentes resultados obtenidos, podemos inferir que las dos estrategias propuestas en esta tesis: estrategia de control adaptable de etanol modificada y estrategia de control de μ , junto con los observadores propuestos: híbrido y asintótico fraccionario pueden ser implementados experimentalmente, ya que maximizan la productividad de la biomasa, logran bajas concentraciones de etanol, necesitan solo tres mediciones para lograr las estimaciones y mantienen al sistema en el régimen de trabajo deseado: régimen respirativo.

Conclusiones

En este trabajo de tesis, se han propuesto dos tipos de observadores para cultivos fed-batch de alta densidad de *S. cerevisiae*. El primer diseño es un observador híbrido Kalman-Asintótico robusto inspirado en el trabajo de Bogaerts et al. [50], el cual se aplica en cultivos con metabolismo Overflow. Los resultados mostraron que el observador propuesto puede estimar satisfactoriamente las variables no accesibles como son la concentración de biomasa, etanol y velocidad de crecimiento, en diferentes regímenes metabólicos satisfaciendo los criterios de estabilidad y convergencia. El observador híbrido además, tuvo un excelente desempeño bajo condiciones de alto ruido de medición, incertidumbre paramétrica y condiciones iniciales desconocidas, mostrando un rendimiento superior y más robusto que los observadores clásicos como el filtro de Kalman extendido (EKF) y el observador asintótico clásico (AO). El observador híbrido, respecto al AO y al EKF, se beneficia de forma simultánea de las ventajas de ambos observadores bajo condiciones desafiantes, como es el caso del sistema de estudio de esta tesis. Dicho sistema de estudio se caracteriza por ser no lineal con estructura variable (cambios de metabolismo) y parámetros cinéticos desconocidos.

El segundo diseño es un observador fraccionario asintótico (FAO) robusto basado en el trabajo de Pomerleau et al. [52]. Al igual que el observador híbrido, el FAO puede estimar satisfactoriamente la concentración de biomasa, etanol y velocidades de crecimiento específicas, velocidad de crecimiento y velocidad de crecimiento crítica en diferentes regímenes metabólicos. Es interesante notar que, a diferencia de otros observadores (ej. ELO, EKF), que tienen parámetros de ajuste que permiten acelerar la convergencia del error, en el caso de los observadores asintóticos, la velocidad de convergencia depende completamente de la tasa de dilución. Lo anterior implica, que el nuevo diseño del observador fraccionario asintótico incluye nuevos parámetros de ajuste (parámetros fraccionarios) que aceleran la tasa de convergencia del error de estimación y por consecuencia el flujo de alimentación (señal de control), lo cual es una ventaja del observador fraccionario sobre el observador asintótico clásico. De los estudios por simulación se observó que el error de estimación con derivadas fraccionarias, las cuales tienen un orden de derivación que se encuentra en un intervalo entre $0 < \alpha < 1$, tienen una velocidad de convergencia mayor que las derivadas enteras. Respecto de la convergencia del error paramétrico, en las simulaciones a lazo cerrado se concluyó que la propuesta del flujo de alimentación (señal de control) F_{in} es de excitación persistente. Esta conclusión fue observada a partir de las diferentes pruebas realizadas al sistema, aunque no tiene respaldo analítico.

Posiblemente la mayor limitación del observador híbrido y el observador fraccionario asintótico es que requieren que se conozcan los coeficientes estequiométricos, lo cual puede ser un

desafío en los cultivos fed-batch. Es en este sentido, que los resultado mostraron que ambos observadores incluso bajo incertidumbre paramétrica, fueron capaces de describir apropiadamente la dinámica del sistema. En la práctica, esta limitación puede ser mitigada por la propia estructura inherente de los observadores. Los observadores propuestos se pueden aplicar fácilmente en el modelamiento de diferentes cultivos celulares con metabolismo Overflow, con solo modificar los parámetros de cultivo del proceso. En especial, la aplicación de estos observadores se puede extender a cultivos fed-batch de bacterias (producción de acetato) y células animales (producción de lactato).

El objetivo final de la estimación de las variables clave como la concentración de biomasa, etanol y velocidad de crecimiento, es idear estrategias de control más eficientes que permitan incrementar la productividad del proceso. Un indicador particularmente importante del desempeño del cultivo es la velocidad de crecimiento. Esta variable define el estado fisiológico de las células es decir, el régimen respiratorio o respiro-fermentativo, y en consecuencia, es fundamental controlarlo. Dada la importancia del mismo, las estrategias de control desarrolladas en esta tesis se basan en el control del etanol y la velocidad de crecimiento y de acuerdo a los resultados obtenidos, la implementación de dichas estrategias, lograron alcanzar la máxima productividad de biomasa en el cultivo fed-batch de alta densidad de *S. cerevisiae*. En la literatura estudiada, se han propuesto muchas estrategias de control para evitar el metabolismo Overflow en el contexto de cultivos fed-batch. Muchas de estas estrategias dependen de criterios heurísticos o de señales indirectas del metabolismo Overflow, lo cual hace su escalabilidad e implementación en cultivos fed-batch de alta densidad limitada y compleja. Por el contrario, las propuestas de control y observación de esta tesis, permiten una fácil implementación a escala industrial.

En este trabajo de tesis, se realizó un análisis comparativo de las estrategias de control, evaluando las ventajas y desventajas con respecto a los esquemas tradicionales y de la literatura. Las mejores estrategias fueron seleccionadas de acuerdo a los índices de desempeño (IAE, ISU e IAVU) e indicadores de proceso como productividad, biomasa y volumen final. La comparación de las estrategias de control y los observadores fue justa y se consideraron los siguientes aspectos: i) comparación con respecto a estudios de la literarias reales, y ii) aplicabilidad práctica a escala industrial, teniendo en cuenta el conocimiento y la comprensión del proceso de estudio y su facilidad de implementación (por ejemplo, el costo). De esta manera, los resultados de las comparaciones proporciona una evaluación integral del desempeño de las estrategias de control y observación para cultivos de alta densidad.

De acuerdo a lo reportado en la literatura sobre las estrategias de control adaptivo y control por linealización, los trabajos de Chen et al. [16], Dewasme et al. [17], Hocalar et al. [18] y Priyanka et al. [19] reportaron concentraciones de biomasa finales de 80 gDCW/L en 60 h, 90 gDCW/L en 25 h, 75 gDCW/L en 16 h y 160 gDCW/L en 75h, respectivamente para diferentes microorganismos, los cuales son mucho menores que los resultados alcanzados en este trabajo de tesis (195,9 gDCW/L (sin observador) y 200,39 gDCW/L (con observador) en 40h). Esto muestra que la combinación de control por linealización y control adaptable, junto con el acoplamiento a un observador fraccionario asintótico resultan en una estrategia eficiente y realista en términos de implementación experimental, y lo más importante es que proporciona un valor óptimo (μ) para operar en cultivos fed-batch de alta densidad de *S. cerevisiae*. Además, el controlador de μ tuvo un excelente desempeño bajo condiciones de

alto ruido de medición, incertidumbre paramétrica y perturbaciones desconocidas, mostrando un rendimiento superior que las estrategias reportadas en la literatura. La estabilidad del controlador fue demostrada analíticamente en este trabajo.

Las ventajas más importantes de la estrategia de control de la velocidad de crecimiento sobre la estrategia modificada de Dewasme et al. [17] son: la eliminación de la medición de etanol, la obtención de un error paramétrico más pequeño y la convergencia más rápida del error de control con solo un parámetro de ajuste. A modo de comparación, en el trabajo presentado por Xiong et al. [34], se usó la velocidad de crecimiento estimada como variable controlada con un set-point fijo de 0,15 1/h, y se logró una concentración de biomasa de 110 gDCW/L en 26h de cultivo para *S. cerevisiae* T65. Para el mismo tiempo de operación, la estrategia propuesta en este trabajo de tesis logró una concentración de biomasa similar (100,4 gDCW/L) al simular el crecimiento de *S. cerevisiae*. Una ventaja adicional de la estrategia de este trabajo está relacionada con su aplicación práctica en cultivos industriales fed-batch de alta densidad. El control de la velocidad de crecimiento facilita la inducción de la fase de producción del producto deseado (β -caroteno o β -ionona), ya que permite que la velocidad de crecimiento disminuya (por ejemplo, 0,01-0,05 1/h), lo que permite desviar el flujo de carbono hacia el producto de interés manteniendo la viabilidad del cultivo [35, 156, 157].

Finalmente, es importante mencionar que los diseños generados en esta tesis doctoral, son diseños propios. En conclusión, todos los diseños propuestos: observadores y la estrategia de control de μ son herramientas atractivas que pueden ser aplicadas en una amplia gama de sistemas fermentativos de alta densidad.

Publicaciones

Esta página contiene el listado de todas las publicaciones generadas en revistas ISI, participación en congresos y conferencias como resultado de este trabajo de tesis.

Revistas

- L. Bárzaga-Martell, M. Duarte-Mermoud, F. Ibañez, B. Gamboa and J.R. Pérez-Correa. A robust hybrid observer for monitoring high-cell density cultures exhibiting overflow metabolism. *Journal of Process Control*, vol. 104, pp. 112–125, 2021.
- L. Bárzaga-Martell, M. Duarte-Mermoud, J. C. Travieso, P. A. Saa and J.R. Pérez-Correa. Design and evaluation of a fractional asymptotic observer and adaptive controller for the robust operation of variable-structure high-cell density fed-batch cultures (Enviado a *Computers and Chemical Engineering*).
- F. Ibañez, P. A. Saa, L. Bárzaga-Martell, M. Duarte-Mermoud, D. Coutinho, M. Fernández, E. Agosin and J.R. Pérez-Correa. Assessment by simulation of heuristic and model based strategies to control fed batch bioreactors at high densities cultivation. to be published (1ra ronda revisión - *Computers and Chemical Engineering*).

Congresos

- M.A. Duarte-Mermoud, L. Bárzaga, G.E. Ceballos-Benavides, Mixed Fractional Order Adaptive Control, *Theory and Applications*, 21st IFAC World Congress, 2020.

Conferencias

- M.A. Duarte-Mermoud, G.E. Ceballos-Benavides, L. Bárzaga, “On the Fractional Order Multiple Models Adaptive Control”. *Proceedings of the Nineteenth Yale Workshop on Adaptive and Learning Systems*. K.S. Narendra Ed., June 10 - 12, 2019, New Haven, Connecticut, USA. pp. 206-211.

Nomenclatura

Abreviaciones

<i>ADC</i>	Alta densidad celular
<i>ANN</i>	Redes neuronales
<i>AO</i>	Observador asintótico
<i>DAC</i>	Control adaptativo desacoplado
<i>DIOLC</i>	Control de linealización de entrada salida desacoplado
<i>EKF</i>	Filtro de Kalman extendido
<i>ELO</i>	Observador extendido de Luenberger
<i>FAO</i>	Observador fraccionario asintótico
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta resolución en línea
<i>IAE</i>	Integral del error absoluto
<i>IAVU</i>	Integral de la señal de control absoluta
<i>ISU</i>	Integral de la señal de control al cuadrado
<i>MPC</i>	Controlador predictivo
<i>MRAC</i>	Control adaptativo por modelo de referencia
<i>PID</i>	Controlador proporcional-integral-derivativo
<i>SMO</i>	Observador de modo deslizante
<i>UKF</i>	Filtro Kalman Unscented

Letras Griegas

α_1, α_2	Parámetros positivos de las funciones smooth
----------------------	--

$\alpha_\psi, \alpha_r, \tau$	Derivadas de ordenes fraccionarios del observador
δ	Parámetro del observador híbrido
ε	Ruido blanco [depende de la variable de estado]
$\gamma_{k,l}$	Tiempo de muestra entre mediciones [h]
$\hat{\mu}$	Velocidad de crecimiento específica estimada [1/h]
μ, μ_{crit}	Velocidades de crecimiento específica y crítica [1/h]
μ_{max}, μ_{set}	Velocidades de crecimiento máxima y específica establecida [1/h]
$\mu_{O_{max}}$	Máxima velocidad de absorción específica de oxígeno [mg O ₂ /gDCW/h]
$\mu_{S_{max}}$	Máxima velocidad de consumo específica de sustrato [g S/gDCW/h]
σ^2	Potencia de ruido [depende de la variable de estado]
σ_e	desviaciones estándar del error [depende de la variable de estado]
σ_u	desviaciones estándar de la señal de control [L/h]
ξ, ζ, ψ	Vector de concentraciones [depende de la variable de estado]
ξ_{sth}	Vector de concentraciones smooth [depende de la variable de estado]

Superíndices

$\hat{}$	Estimado
$\tilde{}$	Smooth

Variables

\hat{r}_1	Velocidad crecimiento específica oxidativa de glucosa estimada [g S/gDCW/h]
\hat{r}_2	Velocidad crecimiento específica fermentativa de glucosa estimada [g S/gDCW/h]
\hat{r}_3	Velocidad crecimiento específica oxidativa de etanol estimada [g E/gDCW/h]
\hat{X}	Concentración de biomasa estimada [gDCW/L]
\tilde{r}_1, \tilde{r}_2	Velocidad crecimiento específica oxidativa y fermentativa de glucosa smooth [g S/gDCW/h]
\tilde{r}_3	Velocidad crecimiento específica oxidativa de etanol smooth [g E/gDCW/h]
${}_0^C D_t^\alpha f(t)$	Derivada de orden fraccionario de Caputo
${}_0^{RL} D_t^\alpha f(t)$	Derivada de orden fraccionario de Riemann-Liouville

C_1, C_2	Parámetros constantes del observador fraccionario
CER	Tasa de evolución de carbono [$mol CO_2/L/h$]
$CO_2 sat$	Concentración de dióxido de carbono saturado [$g L$]
CO_2	Concentración de dióxido de carbono [g/L]
CTR	Tasa de transferencia de carbono [$gCO_2/L/h$]
$D^\alpha f(t)$	Derivada de orden fraccionario de Caputo/RL
E, E_{est}	Concentraciones de etanol y etanol estimado [$g L$]
F_{in}	Flujo de alimentación [L/h]
G	Aireación [L/min]
$gDCW$	Gramos de peso celular seco
I_{pDO}	Ganancia integral controlador DO
J	Función objetivo
K	Ganancia de Kalman
K_{E,Ox,CO_2}	Coefficiente estequiométrico oxidativo de dióxido de carbono a etanol [$g CO_2/gE$]
K_{E,Ox,O_2}	Coefficiente estequiométrico oxidativo de oxígeno a etanol [$g O_2/gE$]
$K_{E,Ox,X}$	Coefficiente estequiométrico oxidativo de biomasa a etanol [$gDCW/g/E$]
K_e	Constante de inhibición de etanol [$g E/L$]
k_HCO_2	Constante de Henry para el dióxido de carbono en el agua [$mgCO_2 /L atm$]
k_HO_2	Constante de Henry para el oxígeno en el agua [$mgO_2 /L atm$]
$k_La_{CO_2}$	Coefficiente de transferencia volumétrica de dióxido de carbono [$1/h$]
$k_La_{O_2}$	Coefficiente de transferencia volumétrica de oxígeno [$1/h$]
K_{pDO}	Ganancia proporcional controlador DO
K_{S,Fer,CO_2}	Coefficiente estequiométrico fermentativo de dióxido de carbono a glucosa [$g CO_2/gS$]
$K_{S,Fer,E}$	Coefficiente estequiométrico fermentativo de etanol a glucosa [$g E/gS$]
$K_{S,Fer,X}$	Coefficiente estequiométrico fermentativo de biomasa a glucosa [$gDCW/gS$]
K_{S,Ox,CO_2}	Coefficiente estequiométrico oxidativo de dióxido de carbono a glucosa [$g CO_2/gS$]

K_{S,Ox,O_2}	Coeficiente estequiométrico oxidativo de oxígeno a glucosa [$g\ O_2/gS$]
$K_{S,Ox,X}$	Coeficiente estequiométrico oxidativo de biomasa a glucosa [$gDCW/gS$]
K_S	Constante de saturación de glucosa [$g\ S/L$]
N	Agitación [rpm]
$O_2\ sat$	Concentración de oxígeno disuelto saturado [$mg\ O_2/L$]
O_2	Concentración de oxígeno disuelto [mg/L]
OTR	Tasa de transferencia de oxígeno [$g\ O_2/L/h$]
OUR	Tasa de absorción de oxígeno [$mol\ O_2/L/h$]
P	Matriz de covarianza
p	Presión [atm]
Q	Matriz de covarianza de medición
qX	Productividad volumétrica [$gDCW/L/h$]
R	Matriz de covarianza de estados
r_1	Velocidad crecimiento específica oxidativa de glucosa [$g\ S/gDCW/h$]
r_2	Velocidad crecimiento específica fermentativa de glucosa [$g\ S/gDCW/h$]
r_3	Velocidad crecimiento específica oxidativa de etanol [$g\ E/gDCW/h$]
r_O	Velocidad de absorción específica de oxígeno [$mg\ O_2/gDCW/h$]
$r_{s\ crit}$	Velocidad crecimiento específica crítica del sustrato [$g\ S/gDCW/h$]
r_s	Velocidad crecimiento específica del sustrato [$g\ S/gDCW/h$]
RQ	Coeficiente respirativo [$mol\ CO_2/molO_2$]
S, S_{crit}	Concentraciones de sustrato y sustrato crítico [$g\ L$]
S_{in}	Concentración de sustrato en la corriente de entrada [$g\ S/L$]
t	Tiempo continuo [h]
t_k	Tiempo discreto [h]
V	Volumen dinámico [L]
V_F	Volumen final [L]

X, X_{est}	Concentraciones de biomasa y biomasa estimada [$gDCW L$]
X_F	Concentración de biomasa final [$gDCW/L$]
X_T	Concentración de biomasa total [$gDCW$]
y_{CO_2}, y_{O_2}	Porcentaje de volumen de dióxido de carbono y oxígeno [%]
y	Vector de salida de mediciones
Z	Vector de estados transformados
f_q	Ecuaciones de estado no lineal
h_{n_i}	Estado de salida de mediciones

Bibliografía

- [1] M. Mednis, J. Meitalovs, S. Vilums, J. Vanags, and V. Galvanauskas, “Bioprocess monitoring and control using mobile devices,” *Information Technology and Control*, vol. 39, no. 3, pp. 195–201, 2010.
- [2] J. M. Clomburg, A. M. Crumbley, and R. Gonzalez, “Industrial biomanufacturing: The future of chemical production,” *Science*, vol. 355, no. 6320, 2017.
- [3] J. Villadsen, J. Nielsen, and G. Lidén, *Bioreaction Engineering Principles*. Boston, MA: Springer US, third edit ed., 2011.
- [4] R. Edge, D. J. McGarvey, and T. G. Truscott, “The carotenoids as anti-oxidants — a review,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 41, no. 3, pp. 189 – 200, 1997.
- [5] L. H. Reyes, J. M. Gomez, and K. C. Kao, “Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution,” *Metabolic Engineering*, vol. 21, pp. 26 – 33, 2014.
- [6] J. López, K. Essus, I.-k. Kim, R. Pereira, J. Herzog, V. Siewers, J. Nielsen, and E. Agosin, “Production of -ionone by combined expression of carotenogenic and plant CCD1 genes in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Microb Cell Fact*, vol. 14, p. 84, Dec. 2015.
- [7] F. Shang, S. Wen, X. Wang, and T. Tan, “High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 101, no. 1, pp. 38–41, 2006.
- [8] D.-J. Li, S.-M. Lu, Y.-J. Liu, and D.-P. Li, “Adaptive Fuzzy Tracking Control Based Barrier Functions of Uncertain Nonlinear MIMO Systems With Full-State Constraints and Applications to Chemical Process,” *IEEE Trans. Fuzzy Syst.*, vol. 26, no. 4, pp. 2145–2159, 2018.
- [9] X. Li, C. Huang, C. Xu, Y. Tan, Y. Luo, K. Zou, J. Li, Z. Deng, Z. Zheng, H. Ye, X. Zhang, and N. Zheng, “High cell density culture of baker’s yeast FX-2 based on pH-stat coupling with respiratory quotient,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 66, no. 3, pp. 389–397, 2019.
- [10] E. Lorenz, M. Schmacht, U. Stahl, and M. Senz, “Enhanced incorporation yield of cysteine for glutathione overproduction by fed-batch fermentation of *Saccharomyces*

- cerevisiae,” *Journal of Biotechnology*, vol. 216, pp. 131–139, 2015.
- [11] H. Jin, Z. Zheng, M. Gao, Z. Duan, Z. Shi, Z. Wang, and J. Jin, “Effective induction of phytase in *Pichia pastoris* fed-batch culture using an ANN pattern recognition model-based on-line adaptive control strategy,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 37, no. 1, pp. 26–33, 2007.
- [12] S. Duan, Z. Shi, H. Feng, Z. Duan, and Z. Mao, “An on-line adaptive control based on DO/pH measurements and ANN pattern recognition model for fed-batch cultivation,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 30, no. 1, pp. 88–96, 2006.
- [13] S. Agatonovic-Kustrin and R. Beresford, “Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 22, no. 5, pp. 717–727, 2000.
- [14] M. Azlan Hussain, “Review of the applications of neural networks in chemical process control — simulation and online implementation,” *Artificial Intelligence in Engineering*, vol. 13, no. 1, pp. 55–68, 1999.
- [15] A. Beiroti, S. N. Hosseini, M. R. Aghasadeghi, and D. Norouzian, “Comparative study of -stat methanol feeding control in fed-batch fermentation of *Pichia pastoris* producing HBsAg: an open-loop control versus recurrent artificial neural network-based feedback control,” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 94, no. 12, pp. 3924–3931, 2019.
- [16] L. Chen, G. Bastin, and V. Van Breusegem, “A case study of adaptive nonlinear regulation of fed-batch biological reactors,” *Automatica*, vol. 31, no. 1, pp. 55–65, 1995.
- [17] L. Dewasme, D. Coutinho, and A. V. Wouwer, “Adaptive and Robust Linearizing Control Strategies for Fed-Batch Cultures of Microorganisms Exhibiting Overflow Metabolism,” in *Lecture Notes in Electrical Engineering*, vol. 89 LNEE, pp. 283–305, 2011.
- [18] A. Hocalar and M. Türker, “Model based control of minimal overflow metabolite in technical scale fed-batch yeast fermentation,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 51, no. 1, pp. 64–71, 2010.
- [19] Priyanka, S. Roy, V. Chopda, J. Gomes, and A. S. Rathore, “Comparison and implementation of different control strategies for improving production of rHSA using *Pichia pastoris*,” *Journal of Biotechnology*, vol. 290, no. December 2018, pp. 33–43, 2019.
- [20] M. Akesson, E. N. Karlsson, P. Hagander, J. P. Axelsson, and A. Tocaş, “On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients,” *Biotechnol Bioeng* ., vol. 64, no. 5, pp. 590–598, 1999.
- [21] B. Henes and B. Sonnleitner, “Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity,” *Journal of Biotechnology*, vol. 132, no. 2, pp. 118–126, 2007.
- [22] O. Johnsson, J. Andersson, and C. Johnsson, “Probing control in *B. licheniformis* fermentations,” *IFAC Proceedings Volumes*, vol. 44, no. 1, pp. 7132–7137, 2011.

- [23] T. Tavasoli, S. Arjmand, S. O. Ranaei Siadat, S. A. Shojaosadati, and A. Sahebghadam Lotfi, "A robust feeding control strategy adjusted and optimized by a neural network for enhancing of alpha 1-antitrypsin production in *Pichia pastoris*," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 144, no. January, pp. 18–27, 2019.
- [24] R. Yu, S. Dong, Y. Zhu, H. Jin, M. Gao, Z. Duan, Z. Zheng, Z. Shi, and Z. Li, "Effective and stable porcine interferon- production by *Pichia pastoris* fed-batch cultivation with multi-variables clustering and analysis," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 33, no. 4, pp. 473–483, 2010.
- [25] K. Kovárová-Kovar, S. Gehlen, A. Kunze, T. Keller, R. von Däniken, M. Kolb, and A. P. van Loon, "Application of model-predictive control based on artificial neural networks to optimize the fed-batch process for riboflavin production," *Journal of Biotechnology*, vol. 79, no. 1, pp. 39–52, 2000.
- [26] L. Santos, L. Dewasme, D. Coutinho, and A. V. Wouwer, "Nonlinear model predictive control of fed-batch cultures of micro-organisms exhibiting overflow metabolism: Assessment and robustness," *Computers & Chemical Engineering*, vol. 39, pp. 143–151, 2012.
- [27] O. Grigs, "Model Predictive Feeding Rate Control in Conventional and Single-use Lab-scale Bioreactors: A Study on Practical Application," *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal*, vol. 30, no. 1, pp. 47–60, 2016.
- [28] J. Kager, A. Tuveri, S. Ulonska, P. Kroll, and C. Herwig, "Experimental verification and comparison of model predictive, PID and model inversion control in a *Penicillium chrysogenum* fed-batch process," *Process Biochemistry*, vol. 90, no. November 2019, pp. 1–11, 2020.
- [29] H. Jin, H. Zhang, Z. Zhou, K. Li, G. Hou, Q. Xu, W. Chuai, C. Zhang, D. Han, and Q. Hu, "Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green microalga *Scenedesmus acuminatus* and application of the cells to photoautotrophic culture enhance biomass and lipid production," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 117, no. 1, pp. 96–108, 2020.
- [30] D.-S. Guo, X.-J. Ji, L.-J. Ren, G.-L. Li, F.-W. Yin, and H. Huang, "Development of a real-time bioprocess monitoring method for docosaheptaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.," *Bioresource Technology*, vol. 216, pp. 422–427, 2016.
- [31] Z. Wang, T. Tan, and J. Song, "Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production," *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 1, pp. 108–111, 2007.
- [32] Z. Q. Xiong, M. J. Guo, Y. X. Guo, J. Chu, Y. P. Zhuang, N. S. Wang, and S. L. Zhang, "RQ feedback control for simultaneous improvement of GSH yield and GSH content in *Saccharomyces cerevisiae* T65," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 46, no. 7, pp. 598–602, 2010.
- [33] M. Cárcamo, P. Saa, J. Torres, S. Torres, P. Mandujano, J. Pérez-Correa, and E. Agosin,

- “Effective Dissolved Oxygen Control Strategy for High-Cell-Density Cultures,” *IEEE Latin America Transactions*, vol. 12, no. 3, pp. 389–394, 2014.
- [34] Z.-Q. Xiong, M.-J. Guo, J. Chu, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, “On-line specific growth rate control for improving reduced glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 20, no. 5, pp. 887–893, 2015.
- [35] R. Biener, A. Steinkämper, and T. Horn, “Calorimetric control of the specific growth rate during fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Journal of Biotechnology*, vol. 160, no. 3, pp. 195–201, 2012.
- [36] N. Aguila-Camacho and M. A. Duarte-Mermoud, “Fractional adaptive control for an automatic voltage regulator,” *ISA Transactions*, vol. 52, pp. 807–815, Nov. 2013.
- [37] N. Aguila-Camacho, J. D. Le Roux, M. A. Duarte-Mermoud, and M. E. Orchard, “Control of a grinding mill circuit using fractional order controllers,” *Journal of Process Control*, vol. 53, pp. 80–94, May 2017.
- [38] B. M. Vinagre and C. A. Monje, “INTRODUCCIÓN AL CONTROL FRACCIONARIO,” p. 19.
- [39] L. Andersson, L. Strandberg, and S.-O. Enfors, “Cell Segregation and Lysis Have Profound Effects on the Growth of *Escherichia coli* in High Cell Density Fed Batch Cultures,” *Biotechnology Progress*, vol. 12, no. 2, pp. 190–195, 1996.
- [40] J. López, V. F. Cataldo, M. Peña, P. A. Saa, F. Saitua, M. Ibaceta, and E. Agosin, “Build Your Bioprocess on a Solid Strain—Carotene Production in Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 171, July 2019.
- [41] J. López, D. Bustos, C. Camilo, N. Arenas, P. A. Saa, and E. Agosin, “Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for the Overproduction of α -Ionone and Its Precursor β -Carotene,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 578793, Sept. 2020.
- [42] A. Tsoukalas, P. Parpas, and B. Rustem, “A smoothing algorithm for finite min–max–min problems,” *Optim Lett*, vol. 3, no. 1, pp. 49–62, 2009.
- [43] A. Hocalar and M. Turker, “Nonlinear control of large-scale fed-batch yeast fermentation: control of the specific growth rate,” *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, vol. 38, no. 3, pp. 338–353, 2014.
- [44] I. Rocha, *Model-based strategies for computer-aided operation of recombinant E. coli fermentation*. phdthesis, Universidades do Minho, Institute for Biotechnology and Bioengineering, 2003.
- [45] J. Doucha and K. Lívanský, “Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 24, no. 1, pp. 35–43, 2012.
- [46] P. J. Westfall, D. J. Pitera, J. R. Lenihan, D. Eng, F. X. Woolard, R. Regentin, T. Horning, H. Tsuruta, D. J. Melis, A. Owens, S. Fickes, D. Diola, K. R. Benjamin, J. D.

- Keasling, M. D. Leavell, D. J. McPhee, N. S. Renninger, J. D. Newman, and C. J. Paddon, "Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinin acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 3, pp. E111–E118, 2012.
- [47] T. Ma, B. Shi, Z. Ye, X. Li, M. Liu, Y. Chen, J. Xia, J. Nielsen, Z. Deng, and T. Liu, "Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene," *Metabolic Engineering*, vol. 52, no. July 2018, pp. 134–142, 2019.
- [48] B. Shi, T. Ma, Z. Ye, X. Li, Y. Huang, Z. Zhou, Y. Ding, Z. Deng, and T. Liu, "Systematic Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Lycopene Overproduction," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, no. 40, pp. 11148–11157, 2019.
- [49] Z. Wang, X. Li, C. Yu, S. Lu, S. Xiong, and Y. Yuan, "Continuous Self-Cycling Fermentation Leads to Economical Lycopene Production by *Saccharomyces cerevisiae*," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, no. May, pp. 1–12, 2020.
- [50] P. Bogaerts, "A hybrid asymptotic-Kalman observer for bioprocesses," *Bioprocess Engineering*, vol. 20, no. 3, p. 249, 1999.
- [51] G. Bastin and D. Dochain, *On-line Estimation and Adaptive Control of Bioreactors*, vol. 1. ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, 1990.
- [52] Y. Pomerleau and M. Perrier, "Estimation of multiple specific growth rates in bioprocesses," *AIChE J.*, vol. 36, pp. 207–215, Feb. 1990.
- [53] A. C. A. Veloso, I. Rocha, and E. C. Ferreira, "Monitoring of fed-batch *E. coli* fermentations with software sensors," *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 32, no. 3, pp. 381–388, 2009.
- [54] L. Dewasme, G. Goffaux, A.-L. Hantson, and A. V. Wouwer, "Experimental validation of an Extended Kalman Filter estimating acetate concentration in *E. coli* cultures," *Journal of Process Control*, vol. 23, no. 2, pp. 148–157, 2013.
- [55] G. A. Pimentel, M. Benavides, L. Dewasme, D. Coutinho, and A. V. Wouwer, "An Observer-based Robust Control Strategy for Overflow Metabolism Cultures in Fed-Batch Bioreactors," *IFAC-PapersOnLine*, vol. 48, no. 8, pp. 1081–1086, 2015.
- [56] L. Bodizs, M. Titica, N. Faria, B. Srinivasan, D. Dochain, and D. Bonvin, "Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation," *Journal of Process Control*, vol. 17, no. 7, pp. 595–606, 2007.
- [57] D. Riesenberger and R. Guthke, "High-cell-density cultivation of microorganisms," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, no. 4, pp. 422–430, 1999.
- [58] B. Sonnleitner and O. Käppeli, "Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis," *Biotechnol Bioeng.*, vol. 28, no. 6, pp. 927–937, 1986.

- [59] B. Sonnleitner, “Automated Measurement and Monitoring of Bioprocesses: Key Elements of the M3C Strategy,” in *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 123, pp. 1–33, 2012.
- [60] P. N. Royce, “Effect of changes in the pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations,” *Biotechnol Bioeng* ., vol. 40, no. 10, pp. 1129–1138, 1992.
- [61] X. Li, C. Yu, J. Yao, Z. Wang, and S. Lu, “An Online Respiratory Quotient-Feedback Strategy of Feeding Yeast Extract for Efficient Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina*,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, no. JAN, pp. 1–11, 2018.
- [62] A. Hocalar, M. Türker, C. Karakuzu, and U. Yüzgeç, “Comparison of different estimation techniques for biomass concentration in large scale yeast fermentation,” *ISA Transactions*, vol. 50, no. 2, pp. 303–314, 2011.
- [63] G. Chang, J. Wu, C. Jiang, G. Tian, Q. Wu, M. Chang, and X. Wang, “The relationship of oxygen uptake rate and k_La with rheological properties in high cell density cultivation of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. S31,” *Bioresource Technology*, vol. 152, pp. 234–240, 2014.
- [64] F. Ma, A. Zhang, D. Chang, O. D. Velev, K. Wiltberger, and R. Kshirsagar, “Real-time monitoring and control of CHO cell apoptosis by in situ multifrequency scanning dielectric spectroscopy,” *Process Biochemistry*, vol. 80, no. January, pp. 138–145, 2019.
- [65] K. Narendra and A. Annaswamy, *Stable Adaptive Systems*. Dover Publications, 2012.
- [66] V. Galvanauskas, O. Grigs, J. Vanags, K. Dubencovs, and V. Stepanova, “Model-based optimization and pO_2 control of fed-batch *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cultivation processes,” *Engineering in Life Sciences*, vol. 13, no. 2, pp. 172–184, 2013.
- [67] V. Vojinović, J. Cabral, and L. Fonseca, “Real-time bioprocess monitoring,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 114, no. 2, pp. 1083–1091, 2006.
- [68] D. G. Luenberger, “Observing the state of a linear system,” *IEEE Transactions on Military Electronics*, vol. 8, no. 2, pp. 74–80, 1964.
- [69] D. G. Luenberger, “An introduction to observers,” *IEEE Trans Autom Control*, vol. 16, no. 6, pp. 596–602, 1971.
- [70] D. G. Luenberger, “Observers for multivariable systems,” *IEEE Trans Autom Control*, vol. 11, no. 2, pp. 190–197, 1986.
- [71] J. M. Ali, N. H. Hoang, M. A. Hussain, and D. Dochain, “Review and classification of recent observers applied in chemical process systems,” *Computers and Chemical Engineering*, vol. 76, pp. 27–41, 2015.

- [72] M. Gundale Mangesh and A. K. Jana, "A comparison of three sets of DSP algorithms for monitoring the production of ethanol in a fed-batch baker's yeast fermenter," *Measurement*, vol. 41, no. 9, pp. 970–985, 2008.
- [73] N. Kazantzis, C. Kravaris, and R. A. Wright, "Nonlinear Observer Design for Process Monitoring," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 39, no. 2, pp. 408–419, 2000.
- [74] M. Soroush, "Nonlinear state-observer design with application to reactors," *Chemical Engineering Science*, vol. 52, no. 3, pp. 387–404, 1997.
- [75] M. Zeitz, "The extended Luenberger observer for nonlinear systems," *Systems & Control Letters*, vol. 9, no. 2, pp. 149–156, 1987.
- [76] C.-T. Chen and C.-S. Dai, "Robust controller design for a class of nonlinear uncertain chemical processes," *Journal of Process Control*, vol. 11, no. 5, pp. 469–482, 2001.
- [77] C.-T. Chen and S.-T. Peng, "A sliding mode control scheme for non-minimum phase non-linear uncertain input-delay chemical processes," *Journal of Process Control*, vol. 16, no. 1, pp. 37–51, 2006.
- [78] J. Picó, H. De Battista, and F. Garelli, "Smooth sliding-mode observers for specific growth rate and substrate from biomass measurement," *Journal of Process Control*, vol. 19, no. 8, pp. 1314–1323, 2009.
- [79] H. De Battista, J. Picó, F. Garelli, and A. Vignoni, "Specific growth rate estimation in (fed-)batch bioreactors using second-order sliding observers," *Journal of Process Control*, vol. 21, no. 7, pp. 1049–1055, 2011.
- [80] G.-B. Wang, S.-S. Peng, and H.-P. Huang, "A sliding observer for nonlinear process control," *Chemical Engineering Science*, vol. 52, no. 5, pp. 787–805, 1997.
- [81] T. Zhang and M. Guay, "Adaptive nonlinear observers of microbial growth processes," *Journal of Process Control*, vol. 12, no. 5, pp. 633–643, 2002.
- [82] D. Dochain, "State and parameter estimation in chemical and biochemical processes: a tutorial," *Journal of Process Control*, vol. 13, no. 8, pp. 801–818, 2003.
- [83] F. Xu, Y. Wang, and X. Luo, "An Adaptive Soft Sensor Based on Nonlinear Differential-Algebraic Observer for Chemical Processes," *IEEE Sensors J.*, vol. 15, no. 6, pp. 3249–3257, 2015.
- [84] Z. Zhang and S. Xu, "Observer design for uncertain nonlinear systems with unmodeled dynamics," *Automatica*, vol. 51, pp. 80–84, 2015.
- [85] P. Cougnon, D. Dochain, M. Guay, and M. Perrier, "On-line optimization of fed-batch bioreactors by adaptive extremum seeking control," *IFAC Proceedings Volumes*, vol. 43, no. 6, pp. 108–113, 2010.
- [86] A. C. Dubach and H. Märkl, "Application of an extended kalman filter method for

- monitoring high density cultivation of *Escherichia coli*,” *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 73, no. 5, pp. 396–402, 1992.
- [87] R. Neeleman, “Estimation of the respiration quotient in a bicarbonate buffered batch cell cultivation,” *Journal of Biotechnology*, vol. 80, no. 1, pp. 85–94, 2000.
- [88] L. Dewasme, G. Goffaux, A.-L. Hantson, and A. Vande Wouwer, “Extended Kalman Filter Design for Acetate Estimation in *E. coli* Cultures,” *Journal of Process Control*, vol. 23, pp. 148–157, 2013.
- [89] J. Wang, X. Feng, L. Zhao, and T. Yu, “Unscented Transformation Based Robust Kalman Filter and Its Applications in Fermentation Process,” *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 18, no. 3, pp. 412–418, 2010.
- [90] S. B. Chitralkha, J. Prakash, H. Raghavan, R. Gopaluni, and S. L. Shah, “A comparison of simultaneous state and parameter estimation schemes for a continuous fermentor reactor,” *Journal of Process Control*, vol. 20, pp. 934–943, 2010.
- [91] S. Li, M. Gong, and Y. Liu, “Neural network-based adaptive control for a class of chemical reactor systems with non-symmetric dead-zone,” *Neurocomputing*, vol. 174, pp. 597–604, 2016.
- [92] R. Aguilar-López and R. Martinez-Guerra, “State estimation for nonlinear systems under model unobservable uncertainties,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 108, pp. 139–144, 2005.
- [93] X. Hulhoven, A. V. Wouwer, and P. Bogaerts, “Hybrid extended Luenberger-asymptotic observer for bioprocess state estimation,” *Chemical Engineering Science*, vol. 61, no. 21, pp. 7151–7160, 2006.
- [94] P. Bogaerts and D. Coutinho, “Robust nonlinear state estimation of bioreactors based on H hybrid observers,” *Computers & Chemical Engineering*, vol. 60, pp. 315–328, 2014.
- [95] J. S. Alford, “Bioprocess control: Advances and challenges,” *Computers & Chemical Engineering*, vol. 30, no. 10, pp. 1464–1475, 2006.
- [96] V. Santos, C. Galdeano, E. Gomez, A. Alcon, and F. Garcia-Ochoa, “Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 32, no. 3, pp. 198–204, 2006.
- [97] V. R. Chopda, A. S. Rathore, and J. Gomes, “Maximizing biomass concentration in baker’s yeast process by using a decoupled geometric controller for substrate and dissolved oxygen,” *Bioresource Technology*, vol. 196, pp. 160–168, 2015.
- [98] L. Habegger, K. Rodrigues Crespo, and M. Dabros, “Preventing Overflow Metabolism in Crabtree-Positive Microorganisms through On-Line Monitoring and Control of Fed-Batch Fermentations,” *Fermentation*, vol. 4, no. 3, pp. 1–9, 2018.

- [99] A. C. L. Horta, A. J. d. Silva, C. R. Sargo, I. D. Cavalcanti-MontaÃ, I. D. Galeano-Suarez, A. M. Velez, M. P. Santos, V. M. GonÃ, R. C. Giordano, and T. C. Zangirolami, "ON-LINE MONITORING OF BIOMASS CONCENTRATION BASED ON A CAPACITANCE SENSOR: ASSESSING THE METHODOLOGY FOR DIFFERENT BACTERIA AND YEAST HIGH CELL DENSITY FED-BATCH CULTURES," *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 32, pp. 821 – 829, 12 2015.
- [100] V. Babaeipour, S. A. Shojaosadati, S. M. Robatjazi, R. Khalilzadeh, and N. Maghsoudi, "Over-production of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*," *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 112-117, 2007.
- [101] Z. A. Irani, A. Maghsoudi, S. A. Shojaosadati, and E. Motamedian, "Development and in silico analysis of a new nitrogen-limited feeding strategy for fed-batch cultures of *Pichia pastoris* based on a simple pH-control system," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 98, pp. 1–9, 2015.
- [102] D. Rodrigues, O. Pillaca-Pullo, K. Torres-Obreque, J. Flores-Santos, I. Sánchez-Moguel, M. V. Pimenta, T. Basi, A. Converti, A. M. Lopes, G. Monteiro, L. P. Fonseca, and A. J. Pessoa, "Fed-Batch Production of *Saccharomyces cerevisiae* L-Asparaginase II by Recombinant *Pichia pastoris* MUTs Strain," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, p. 16, 2019.
- [103] Z.-Q. Xiong, M.-J. Guo, Y.-X. Guo, J. Chu, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, "Real-time viable-cell mass monitoring in high-cell-density fed-batch glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* T65 in industrial complex medium," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 105, no. 4, pp. 409–413, 2008.
- [104] S. J. Park, S.-J. Lee, K.-H. Kim, and S.-K. Kim, "High cell density fed-batch fermentation for the production of recombinant *E. coli* K-12 ghost vaccine against streptococcal disease," *Biotechnol Bioproc E*, vol. 16, no. 4, pp. 733–738, 2011.
- [105] S. Ulonska, D. Waldschitz, J. Kager, and C. Herwig, "Model predictive control in comparison to elemental balance control in an *E. coli* fed-batch," *Chemical Engineering Science*, vol. 191, pp. 459–467, 2018.
- [106] A. R. Ferreira, F. Ataíde, M. von Stosch, J. M. L. Dias, J. J. Clemente, A. E. Cunha, and R. Oliveira, "Application of adaptive DO-stat feeding control to *Pichia pastoris* X33 cultures expressing a single chain antibody fragment (scFv)," *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 35, no. 9, pp. 1603–1614, 2012.
- [107] G. Chang, N. Gao, G. Tian, Q. Wu, M. Chang, and X. Wang, "Improvement of docosahexaenoic acid production on glycerol by *Schizochytrium* sp. S31 with constantly high oxygen transfer coefficient," *Bioresource Technology*, vol. 142, pp. 400–406, 2013.
- [108] S. Craven, J. Whelan, and B. Glennon, "Glucose concentration control of a fed-batch mammalian cell bioprocess using a nonlinear model predictive controller," *Journal of Process Control*, vol. 24, no. 4, pp. 344–357, 2014.
- [109] A. C. L. Horta, C. R. Sargo, A. J. da Silva, M. de Carvalho Gonzaga, M. P. dos Santos,

- V. M. Gonçalves, T. C. Zangirolami, and R. de Campos Giordano, "Intensification of high cell-density cultivations of rE. coli for production of S. pneumoniae antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control," *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 35, no. 8, pp. 1269–1280, 2012.
- [110] K.-K. Cheng, J. Zeng, J.-H. Jian, J.-F. Zhu, G.-X. Zhang, and D.-H. Liu, "Model-based temperature control for improving lactic acid production from glycerol," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 21, pp. 11614–11620, 2019.
- [111] D. Ehgartner, T. Hartmann, S. Heinzl, M. Frank, L. Veiter, J. Kager, C. Herwig, and J. Fricke, "Controlling the specific growth rate via biomass trend regulation in filamentous fungi bioprocesses," *Chemical Engineering Science*, vol. 172, no. 23, pp. 32–41, 2017.
- [112] M. M. Schuler and I. W. Marison, "Real-time monitoring and control of microbial bioprocesses with focus on the specific growth rate: current state and perspectives," *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol. 94, no. 6, pp. 1469–1482, 2012.
- [113] Z. I. Soons, M. Streefland, G. van Straten, and A. J. van Boxtel, "Assessment of near infrared and "software sensor" for biomass monitoring and control," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, vol. 94, no. 2, pp. 166–174, 2008.
- [114] B. Warth, G. Rajkai, and C.-F. Mandenius, "Evaluation of software sensors for on-line estimation of culture conditions in an Escherichia coli cultivation expressing a recombinant protein," *Journal of Biotechnology*, vol. 147, no. 1, pp. 37–45, 2010.
- [115] R. Urniezius, A. Survyla, D. Paulauskas, V. A. Bumelis, and V. Galvanauskas, "Generic estimator of biomass concentration for Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae fed-batch cultures based on cumulative oxygen consumption rate," *Microb Cell Fact*, vol. 18, no. 1, p. 190, 2019.
- [116] P. Wechselberger, P. Sagmeister, and C. Herwig, "Real-time estimation of biomass and specific growth rate in physiologically variable recombinant fed-batch processes," *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 36, no. 9, pp. 1205–1218, 2013.
- [117] M. Farza, M. M'Saad, T. Maatoug, and M. Kamoun, "Adaptive observers for nonlinearly parameterized class of nonlinear systems," *Automatica*, vol. 45, no. 10, pp. 2292–2299, 2009.
- [118] Y. Pomerleau and M. Perrier, "Estimation of multiple specific growth rates: Experimental validation," *AIChE J.*, vol. 38, pp. 1751–1760, Nov. 1992.
- [119] R. Oliveira, E. Ferreira, and S. Fayo de Azevedo, "Stability, dynamics of convergence and tuning of observer-based kinetics estimators," *Journal of Process Control*, vol. 12, pp. 311–323, Feb. 2002.
- [120] V. N. Lubenova, "Stable adaptive algorithm for simultaneous estimation of time-varying parameters and state variables in aerobic bioprocesses," *Bioprocess Engineering*, vol. 21, no. 3, p. 219, 1999.

- [121] V. Lubenova, I. Rocha, and E. C. Ferreira, "Estimation of multiple biomass growth rates and biomass concentration in a class of bioprocesses," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 25, pp. 395–406, July 2003.
- [122] M. R. Rapaic and A. Pisano, "Variable-Order Fractional Operators for Adaptive Order and Parameter Estimation," *IEEE Trans. Automat. Contr.*, vol. 59, pp. 798–803, Mar. 2014.
- [123] D. Valério and J. Sá da Costa, "Variable Order Fractional Controllers: Variable Order Fractional Controllers," *Asian J Control*, vol. 15, pp. 648–657, May 2013.
- [124] A. A. Kilbas and S. A. Marzan, "Nonlinear differential equations with the Caputo fractional derivative in the space of continuously differentiable functions," *Diff Equat*, vol. 41, pp. 84–89, Jan. 2005.
- [125] P. Shah and S. Agashe, "Review of fractional PID controller," *Mechatronics*, vol. 38, pp. 29–41, Sept. 2016.
- [126] I. Tejado, S. H. HosseinNia, and B. M. Vinagre, "ADAPTIVE GAIN-ORDER FRACTIONAL CONTROL FOR NETWORK-BASED APPLICATIONS," p. 21.
- [127] M. Bongulwar and B. Patre, "Design of PID controller for global power control of Pressurized Heavy Water Reactor," *ISA Transactions*, vol. 69, pp. 234–241, July 2017.
- [128] R. Lamba, S. K. Singla, and S. Sondhi, "Fractional order PID controller for power control in perturbed pressurized heavy water reactor," *Nuclear Engineering and Design*, vol. 323, pp. 84–94, Nov. 2017.
- [129] L. A. D. Isfer, M. K. Lenzi, and E. K. Lenzi, "IDENTIFICATION OF BIOCHEMICAL REACTORS USING FRACTIONAL DIFFERENTIAL EQUATIONS," *Latin American Applied Research*, p. 6, 2010.
- [130] A. Flores-Tlacuahuac and L. T. Biegler, "Optimization of Fractional Order Dynamic Chemical Processing Systems," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 53, pp. 5110–5127, Apr. 2014.
- [131] D. Valério, "NINTEGER: A NON-INTEGGER CONTROL TOOLBOX FOR MATLAB," p. 7.
- [132] C. Pacheco, M. A. Duarte-Mermoud, N. Aguila-Camacho, and R. Castro, "Fractional-order State Observers for Integer-Order Linear Systems," *Journal of Applied Nonlinear Dynamics*, p. 14, 2017.
- [133] S. Dadras and H. R. Momeni, "Fractional sliding mode observer design for a class of uncertain fractional order nonlinear systems," in *IEEE Conference on Decision and Control and European Control Conference*, (Orlando, FL, USA), pp. 6925–6930, IEEE, Dec. 2011.
- [134] J. Fei and C. Lu, "Adaptive fractional order sliding mode controller with neural esti-

- mator,” *Journal of the Franklin Institute*, vol. 355, pp. 2369–2391, Mar. 2018.
- [135] S. Dadras and H. R. Momeni, “Fractional terminal sliding mode control design for a class of dynamical systems with uncertainty,” *Communications in Nonlinear Science and Numerical Simulation*, vol. 17, pp. 367–377, Jan. 2012.
- [136] I. N’Doye, H. Voos, M. Darouach, J. G. Schneider, and N. Knauf, “An unknown input fractional-order observer design for fractional-order glucose-insulin system,” in *2012 IEEE-EMBS Conference on Biomedical Engineering and Sciences*, (Langkawi, Malaysia), pp. 595–600, IEEE, Dec. 2012.
- [137] S. Dadras and H. R. Momeni, “A New Fractional Order Observer Design for Fractional Order Nonlinear Systems,” in *Volume 3: 2011 ASME/IEEE International Conference on Mechatronic and Embedded Systems and Applications, Parts A and B*, (Washington, DC, USA), pp. 403–408, ASMEDC, Jan. 2011.
- [138] E. A. Boroujeni and H. R. Momeni, “Non-fragile nonlinear fractional order observer design for a class of nonlinear fractional order systems,” *Signal Processing*, vol. 92, pp. 2365–2370, Oct. 2012.
- [139] J. Sabatier, C. Farges, M. Merveillaut, and L. Feneteau, “On Observability and Pseudo State Estimation of Fractional Order Systems,” *European Journal of Control*, vol. 18, pp. 260–271, Jan. 2012.
- [140] Z.-J. Wang, H.-Y. Wang, Y.-L. Li, J. Chu, M.-Z. Huang, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, “Improved vitamin B12 production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process,” *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 8, pp. 2845–2852, 2010.
- [141] N. Aguila-Camacho and M. A. Duarte-Mermoud, “Improving the control energy in model reference adaptive controllers using fractional adaptive laws,” *IEEE/CAA Journal of Automatica Sinica*, vol. 3, no. 3, pp. 332–337, 2016.
- [142] Aguila-Camacho and C. Ponce, “Improving the control energy use for first order plus time delay plants with fractional proportional integral controllers: a preliminary analysis,” 2018. event-place: Greater Concepci on, Chile.
- [143] K. Narendra, A. Annaswamy, and P. S. Raghuvansh, “A general approach to the stability analysis of adaptive systems,” *International Journal of Control*, vol. 41, no. 1, 1985.
- [144] K. Narendra and A. Annaswamy, “A new adaptive law for robust adaptation without persistent excitation,” *IEEE Transactions on Automatic Control*, vol. 32, no. 2, pp. 134–145, 1987.
- [145] J. Kager, C. Herwig, and I. V. Stelzer, “State estimation for a penicillin fed-batch process combining particle filtering methods with online and time delayed offline measurements,” *Chemical Engineering Science*, vol. 177, pp. 234–244, 2018.

- [146] K. Pontius, D. Semenova, Y. E. Silina, K. V. Gernaey, and H. Junicke, “Automated Electrochemical Glucose Biosensor Platform as an Efficient Tool Toward On-Line Fermentation Monitoring: Novel Application Approaches and Insights,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 436, 2020.
- [147] P. Bogaerts and A. Wouwer, “Parameter identification for state estimation—application to bioprocess software sensors,” *Chemical Engineering Science*, vol. 59, no. 12, pp. 2465–2476, 2004.
- [148] M. A. Duarte-Mermud, L. Bárzaga, and G. Ceballos-Benavides, “Mixed Fractional Order Adaptive Control: Theory and Applications,” *IFAC-PapersOnLine*, vol. 53, no. 2, pp. 1543–1548, 2020.
- [149] C. W. NIST, “Oxygen chemistry properties,” 2020.
- [150] P. N. Royce and N. F. Thornhill, “Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations,” *AIChE Journal*, vol. 37, no. 11, pp. 1680–1686, 1991.
- [151] D. Riesenberg, W.-D. Deckwer, E. Sanders, V. Schulz, H.-D. Pohl, W. Knorre, A. Roß, and D. Korz, “High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate,” *Journal of Biotechnology*, vol. 20, no. 1, pp. 17–28, 1991.
- [152] L. Mears, S. M. Stocks, G. Sin, and K. V. Gernaey, “A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes,” *Journal of Biotechnology*, vol. 245, pp. 34–46, 2017.
- [153] S. Tippmann, G. Scalcinati, V. Siewers, and J. Nielsen, “Production of farnesene and santalene by *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch cultivations with RQ -controlled feed,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 113, no. 1, pp. 72–81, 2016.
- [154] F. Ibañez, P. Saa, L. Bárzaga, M. Duarte, M. Fernández, E. Agosin, and J. R. Pérez-Correa, “Simulation based assessment of probing and model based control strategies for robust operation of high-cell density cultures in fed-batch mode,” p. 24, 2021.
- [155] K. S. Narendra and A. M. Annaswamy, “Persistent Excitation in Dynamical Systems,” in *1984 American Control Conference*, (San Diego, CA, USA), pp. 336–338, IEEE, July 1984.
- [156] W.-C. Liu, T. Gong, Q.-H. Wang, X. Liang, J.-J. Chen, and P. Zhu, “Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement,” *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 1–12, 2016.
- [157] W.-C. Liu, S. Inwood, T. Gong, A. Sharma, L.-Y. Yu, and P. Zhu, “Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production,” *Crit Rev Biotechnol.*, vol. 39, no. 2, pp. 258–271, 2019.
- [158] K. Kiviharju, K. Salonen, U. Moilanen, and T. Eerikäinen, “Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors,” *Journal of*

Industrial Microbiology & Biotechnology, vol. 35, no. 7, pp. 657–665, 2008.

- [159] S. Azadi, S. Sadjady, S. Mortazavi, N. Naghdi, A. Mahboubi, and R. Solaimanian, “Bioprocess and downstream optimization of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*,” *Research in Pharmaceutical Sciences*, vol. 13, no. 3, pp. 222–222, 2018.
- [160] E. F. Camacho and C. Bordons, *Model Predictive Control*. Advanced Textbooks in Control and Signal Processing, London: Springer London, 1999.
- [161] C. J. Franzén, E. Albers, and C. Niklasson, “Use of the inlet gas composition to control the respiratory quotient in microaerobic bioprocesses,” *Chemical Engineering Science*, vol. 51, no. 13, pp. 3391–3402, 1996.
- [162] A. Maghsoudi, S. Hosseini, S. A. Shojaosadati, E. Vasheghani-Farahani, M. Nosrati, and A. Bahrami, “A new methanol-feeding strategy for the improved production of -galactosidase in high cell-density fed-batch cultures of *Pichia pastoris* Mut+ strains,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 17, no. 1, pp. 76–83, 2012.
- [163] C. Ratledge, “The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems,” *Biotechnology Letters*, vol. 36, no. 8, pp. 1557–1568, 2014.
- [164] L. Sang Yup, “High cell-density culture of *Escherichia coli*,” *Trends in Biotechnology*, vol. 14, no. 3, pp. 98–105, 1996.
- [165] S. Yamawaki, T. Matsumoto, Y. Ohnishi, Y. Kumada, N. Shiomi, T. Katsuda, E. K. Lee, and S. Katoh, “Production of Single-Chain Variable Fragment Antibody (scFv) in Fed-Batch and Continuous Culture of *Pichia pastoris* by Two Different Methanol Feeding Methods,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 104, no. 5, pp. 403–407, 2007.
- [166] Paul M. Muchinsky, “Summary for Policymakers,” in *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (Intergovernmental Panel on Climate Change, ed.), vol. 53, pp. 1–30, Cambridge: Cambridge University Press, 2012.
- [167] A. Escalante-Sánchez, J. Barrera-Cortés, H. M. Poggi-Varaldo, T. Ponce-Noyola, and I. S. Baruch, “A soft sensor based on online biomass measurements for the glucose estimation and control of fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 41, no. 10, pp. 1471–1484, 2018.
- [168] T. G. Byun, A. P. Zeng, and W. D. Deckwer, “Reactor comparison and scale-up for the microaerobic production of 2,3-butanediol by *Enterobacter aerogenes* at constant oxygen transfer rate,” *Bioprocess Engineering*, vol. 11, no. 4, pp. 167–175, 1994.
- [169] Y. Chen, Z. Wang, J. Chu, B. Xi, and Y. Zhuang, “The glucose RQ-feedback control leading to improved erythromycin production by a recombinant strain *Saccharopolyspora erythraea* ZL1004 and its scale-up to 372-m³ fermenter,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 38, no. 1, pp. 105–112, 2015.

- [170] C. A. Duran-Villalobos, S. Goldrick, and B. Lennox, “Multivariate statistical process control of an industrial-scale fed-batch simulator,” *Computers & Chemical Engineering*, vol. 132, pp. 106620–106620, 2020.
- [171] R. Oliveira, J. Clemente, A. Cunha, and M. Carrondo, “Adaptive dissolved oxygen control through the glycerol feeding in a recombinant *Pichia pastoris* cultivation in conditions of oxygen transfer limitation,” *Journal of Biotechnology*, vol. 116, no. 1, pp. 35–50, 2005.
- [172] G. Potvin, A. Ahmad, and Z. Zhang, “Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 64, pp. 91–105, 2012.
- [173] C. Bandaipheth and P. Prasertsan, “Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 66, no. 2, pp. 216–228, 2006.
- [174] B. Jabarivelisdeh, R. Findeisen, and S. Waldherr, “Model Predictive Control of a Fed-batch Bioreactor Based on Dynamic Metabolic-Genetic Network Models,” *IFAC-PapersOnLine*, vol. 51, no. 19, pp. 34–37, 2018.
- [175] J. Smith, *Biotechnology*. Cambridge: Press, Cambridge University, fourth ed., 2004.
- [176] M. Chitra, N. Pappa, and A. Abraham, “Dissolved Oxygen Control of Batch Bioreactor using Model Reference Adaptive Control scheme,” *IFAC-PapersOnLine*, vol. 51, no. 4, pp. 13–18, 2018.
- [177] S. Wen, T. Zhang, and T. Tan, “Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Process Biochemistry*, vol. 41, no. 12, pp. 2424–2428, 2006.
- [178] T. J. B. Mesquita, C. R. Sargo, J. R. Fuzer, S. A. H. Paredes, R. D. C. Giordano, A. C. L. Horta, and T. C. Zangirolami, “Metabolic fluxes-oriented control of bioreactors: a novel approach to tune micro-aeration and substrate feeding in fermentations,” *Microbial Cell Factories*, vol. 18, no. 1, pp. 150–150, 2019.
- [179] M. S. I. Mozumder, H. De Wever, E. I. Volcke, and L. Garcia-Gonzalez, “A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production,” *Process Biochemistry*, vol. 49, no. 3, pp. 365–373, 2014.
- [180] M.-J. Seo, H.-J. Choi, K.-H. Chung, and Y.-R. Pyun, “Production of salmosin, a snake venom-derived disintegrin, in recombinant *Pichia pastoris* using high cell density fed-batch fermentation,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 17, no. 5, pp. 1068–1075, 2012.
- [181] M. Z. b. Mohd Zain, J. Kanesan, G. Kendall, and J. H. Chuah, “Optimization of fed-batch fermentation processes using the Backtracking Search Algorithm,” *Expert Systems with Applications*, vol. 91, pp. 286–297, 2018.

- [182] M. Dabros, M. M. Schuler, and I. W. Marison, "Simple control of specific growth rate in biotechnological fed-batch processes based on enhanced online measurements of biomass," *Bioprocess Biosyst Eng.*, vol. 33, no. 9, pp. 1109–1118, 2010.
- [183] H. Y. Lin, B. Mathiszik, B. Xu, S. O. Enfors, and P. Neubauer, "Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch cultivations of *Escherichia coli*," *Biotechnol Bioeng.*, vol. 73, no. 5, pp. 347–357, 2001.
- [184] J. Pinsach, C. de Mas, and J. López-Santín, "A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 29, no. 3, pp. 235–242, 2006.
- [185] B. S. Kim, S. Lee, S. Lee, and Y. Chang, "High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 26, no. 3, pp. 147–150, 2004.
- [186] M.-J. Seo, H.-J. Choi, and K.-H. Chung, "Production of a platelet aggregation inhibitor, salmosin, by high cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli*," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 21, no. 10, pp. 1053–1056, 2011.
- [187] F. Garcia-Ochoa and E. Gomez, "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview," *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 2, pp. 153–176, 2009.
- [188] V. F. Cataldo, N. Arenas, V. Salgado, C. Camilo, F. Ibáñez, and E. Agosin, "Heterologous production of the epoxy-carotenoid violaxanthin in *Saccharomyces cerevisiae*," *Metabolic Engineering*, vol. 59, pp. 53–63, 2020.
- [189] M. Rocha, R. Mendes, O. Rocha, I. Rocha, and E. C. Ferreira, "Optimization of fed-batch fermentation processes with bio-inspired algorithms," *Expert Systems with Applications*, vol. 41, no. 5, pp. 2186–2195, 2014.
- [190] M. A. Duarte-Mermoud, N. Aguila-Camacho, and R. A. Prieto, "Performance index for quality response of dynamical systems," *ISA Transactions*, vol. 43, pp. 133–145, 2004.
- [191] S. Metze, S. Ruhl, G. Grelle, C. Grimm, and J. Scholz, "Monitoring online biomass with a capacitance sensor during scale-up of industrially relevant CHO cell culture fed-batch processes in single-use bioreactors," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 43, pp. 193–205, 2020.
- [192] H. K. Khalil, "High-Gain Observers in Nonlinear Feedback Control," (COEX, Seoul, Korea), 2008.
- [193] K. C. Veluvolu and Y. C. Soh, "High-Gain Observers With Sliding Mode for State and Unknown Input Estimations," *IEEE TRANSACTIONS ON INDUSTRIAL ELECTRONICS*, vol. 56, no. 9, pp. 3386–3393.
- [194] A. C. L. Horta, A. J. d. Silva, C. R. Sargo, I. D. Cavalcanti-Montaño, I. D. Galeano-Suarez, and A. M. Velez, "On-Line Monitoring Of Biomass Concentration Based On

A Capacitance Sensor: Assessing The Methodology For Different Bacteria And Yeast High Cell Density Fed-Batch Cultures.,” vol. 32, no. 4, pp. 821–829, 2015.

- [195] C.-T. Chen and S.-T. Peng, “A Sliding Mode Control Scheme for Uncertain Non-Minimum Phase CSTRs,” *J. Chem. Eng. Japan / JCEJ*, vol. 39, no. 2, pp. 181–196, 2006.
- [196] G. Goffaux, A. Vande Wouwer, and O. Bernard, “Improving continuous–discrete interval observers with application to microalgae-based bioprocesses,” *Journal of Process Control*, vol. 19, no. 7, pp. 1182–1190, 2009.
- [197] R. Aguilar-López and R. Maya-Yescas, “State estimation for nonlinear systems under model uncertainties: a class of sliding-mode observers,” *Journal of Process Control*, vol. 15, no. 3, pp. 363–370, 2005.
- [198] R. Aguilar-López and R. Martinez-Guerra, “State estimation for nonlinear systems under model unobservable uncertainties: application to continuous reactor,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 108, no. 1-2, pp. 139–144, 2005.
- [199] D. Dochain, “State observers for processes with uncertain kinetics,” *International Journal of Control*, vol. 76, no. 15, pp. 1483–1492, 2003.
- [200] A. Iratni, R. Araújo, S. Rastegar, and M. Mostefai, “Sensorless Nonlinear Control of Fed-Batch *Escherichia coli* Cultivation Bioprocess Using the State-Dependent Approach,” in *CONTROL 2016* (P. Garrido, F. Soares, and A. P. Moreira, eds.), vol. 402, pp. 299–310, Cham: Springer International Publishing, 2017. Series Title: Lecture Notes in Electrical Engineering.
- [201] J. Wang, L. Zhao, and T. Yu, “On-line Estimation in Fed-batch Fermentation Process Using State Space Model and Unscented Kalman Filter,” *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 18, no. 2, pp. 258–264, 2010.
- [202] S. I. Biagiola and J. L. Figueroa, “A high gain nonlinear observer: application to the control of an unstable nonlinear process,” *Computers & Chemical Engineering*, vol. 28, no. 9, pp. 1881–1898, 2004.
- [203] A. M. Boker and H. K. Khalil, “Nonlinear observers comprising high-gain observers and extended Kalman filters,” *Automatica*, vol. 49, no. 12, pp. 3583–3590, 2013.
- [204] M. Nadri, I. Trezzani, H. Hammouri, P. Dhurjati, R. Longin, and J. Lieto, “Modeling and observer design for recombinant *Escherichia coli* strain,” *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 28, no. 4, pp. 217–225, 2006.
- [205] S. Nuñez, F. Garelli, and H. De Battista, “Second-order sliding mode observer for biomass concentration and growth rate estimation in batch photo-bioreactors,” *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 39, no. 16, pp. 8772–8779, 2014.
- [206] J. Cook, “Basic properties of the soft maximum,” p. 4.

- [207] M. Farza, I. Bouraoui, T. Ménard, R. Ben Abdennour, and M. M'Saad, "Adaptive observers for a class of uniformly observable systems with nonlinear parametrization and sampled outputs," *Automatica*, vol. 50, no. 11, pp. 2951–2960, 2014.
- [208] C.-L. Ko and F.-S. Wang, "On-line estimation of biomass and intracellular protein for recombinant *Escherichia coli* cultivated in batch and fed-batch modes," *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, vol. 38, no. 3-4, pp. 197–203, 2007.
- [209] M. Hajatipour and M. Farrokhi, "Chattering free with noise reduction in sliding-mode observers using frequency domain analysis," *Journal of Process Control*, vol. 20, no. 8, pp. 912–921, 2010.
- [210] R. Spann, C. Roca, D. Kold, A. Eliasson Lantz, K. V. Gernaey, and G. Sin, "A probabilistic model-based soft sensor to monitor lactic acid bacteria fermentations," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 135, pp. 49–60, 2018.
- [211] N. Kazantzis, N. Huynh, and R. A. Wright, "Nonlinear observer design for the slow states of a singularly perturbed system," *Computers & Chemical Engineering*, vol. 29, no. 4, pp. 797–806, 2005.
- [212] H. De Battista, J. Picó, F. Garelli, and A. Vignoni, "Specific growth rate estimation in (fed-)batch bioreactors using second-order sliding observers," *Journal of Process Control*, vol. 21, no. 7, pp. 1049–1055, 2011.
- [213] Z. Soons, J. Voogt, G. van Straten, and A. van Boxtel, "Constant specific growth rate in fed-batch cultivation of *Bordetella pertussis* using adaptive control," *Journal of Biotechnology*, vol. 125, no. 2, pp. 252–268, 2006.
- [214] A. Hocalar and M. T. Rker, "Nonlinear control of large-scale fed-batch yeast fermentation: control of the specific growth rate," vol. 38, pp. 338–353, 2014.
- [215] Z.-Q. Xiong, M.-J. Guo, Y.-X. Guo, J. Chu, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, "Real-time viable-cell mass monitoring in high-cell-density fed-batch glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* T65 in industrial complex medium," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 105, no. 4, pp. 409–413, 2008.
- [216] D. G. Luenberger, "Observing the State of a Linear System," *IEEE Trans. Mil. Electron.*, vol. 8, no. 2, pp. 74–80, 1964.
- [217] H. Weichert and M. Becker, "Online glucose-lactate monitoring and control in cell culture and microbial fermentation bioprocesses," *BMC Proc*, vol. 7, no. S6, pp. P18, 1753–6561–7–S6–P18, 2013.
- [218] S. Nuñez, F. Garelli, and H. De Battista, "Second-order sliding mode observer for biomass concentration and growth rate estimation in batch photo-bioreactors," *International Journal of Hydrogen Energy*, vol. 39, no. 16, pp. 8772–8779, 2014.
- [219] M. Nadri, I. Trezzani, H. Hammouri, P. Dhurjati, R. Longin, and J. Lieto, "Modeling and observer design for recombinant *Escherichia coli* strain," *Bioprocess Biosyst Eng*,

vol. 28, no. 4, pp. 217–225, 2006.

- [220] A. M. Boker and H. K. Khalil, “Nonlinear observers comprising high-gain observers and extended Kalman filters,” *Automatica*, vol. 49, no. 12, pp. 3583–3590, 2013.
- [221] S. I. Biagiola and J. L. Figueroa, “A high gain nonlinear observer: application to the control of an unstable nonlinear process,” *Computers & Chemical Engineering*, vol. 28, no. 9, pp. 1881–1898, 2004.
- [222] J. S. Alford, “Bioprocess control: Advances and challenges,” *Computers & Chemical Engineering*, vol. 30, pp. 1464–1475, Sept. 2006.
- [223] S. Agatonovic-Kustrin and R. Beresford, “Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 22, pp. 717–727, June 2000.
- [224] X. Li, C. Huang, C. Xu, Y. Tan, Y. Luo, K. Zou, J. Li, Z. Deng, Z. Zheng, H. Ye, X. Zhang, and N. Zheng, “High cell density culture of baker’s yeast FX-2 based on pH-stat coupling with respiratory quotient,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 66, pp. 389–397, May 2019.
- [225] Z. Wang, X. Li, C. Yu, S. Lu, S. Xiong, and Y. Yuan, “Continuous Self-Cycling Fermentation Leads to Economical Lycopene Production by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, pp. 1–12, May 2020.
- [226] J. M. Clomburg, A. M. Crumbley, and R. Gonzalez, “Industrial biomanufacturing: The future of chemical production,” *Science*, vol. 355, no. 6320, 2017.
- [227] M. Azlan Hussain, “Review of the applications of neural networks in chemical process control — simulation and online implementation,” *Artificial Intelligence in Engineering*, vol. 13, pp. 55–68, Jan. 1999.
- [228] R. Yu, S. Dong, Y. Zhu, H. Jin, M. Gao, Z. Duan, Z. Zheng, Z. Shi, and Z. Li, “Effective and stable porcine interferon- production by *Pichia pastoris* fed-batch cultivation with multi-variables clustering and analysis,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 33, pp. 473–483, May 2010.
- [229] X. Li, C. Yu, J. Yao, Z. Wang, and S. Lu, “An Online Respiratory Quotient-Feedback Strategy of Feeding Yeast Extract for Efficient Arachidonic Acid Production by *Mortierella alpina*,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 5, pp. 1–11, Jan. 2018.
- [230] M. Akesson, E. N. Karlsson, P. Hagander, J. P. Axelsson, and A. Tocaj, “On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients,” *Biotechnol Bioeng* ., vol. 64, no. 5, pp. 590–598, 1999.
- [231] Aguila-Camacho and C. Ponce, “Improving the control energy use for first order plus time delay plants with fractional proportional integral controllers: a preliminary analysis,” (Greater Concepci on, Chile), Oct. 2018.

- [232] O. Johnsson, J. Andersson, and C. Johnsson, "Probing control in *B. licheniformis* fermentations," *IFAC Proceedings Volumes*, vol. 44, no. 1, pp. 7132–7137, 2011.
- [233] M. Farza, M. M'Saad, T. Maatoug, and M. Kamoun, "Adaptive observers for nonlinearly parameterized class of nonlinear systems," *Automatica*, vol. 45, no. 10, pp. 2292–2299, 2009.
- [234] W.-C. Liu, T. Gong, Q.-H. Wang, X. Liang, J.-J. Chen, and P. Zhu, "Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement," *Scientific Reports*, vol. 6, pp. 1–12, 2016.
- [235] W.-C. Liu, S. Inwood, T. Gong, A. Sharma, L.-Y. Yu, and P. Zhu, "Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production," *Crit Rev Biotechnol .*, vol. 39, no. 2, pp. 258–271, 2019.
- [236] D. Ehgartner, T. Hartmann, S. Heinzl, M. Frank, L. Veiter, J. Kager, C. Herwig, and J. Fricke, "Controlling the specific growth rate via biomass trend regulation in filamentous fungi bioprocesses," *Chemical Engineering Science*, vol. 172, no. 23, pp. 32–41, 2017.
- [237] S. Metze, S. Ruhl, G. Grelle, C. Grimm, and J. Scholz, "Monitoring online biomass with a capacitance sensor during scale-up of industrially relevant CHO cell culture fed-batch processes in single-use bioreactors," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 43, pp. 193–205, 2020.
- [238] L. Habegger, K. Rodrigues Crespo, and M. Dabros, "Preventing Overflow Metabolism in Crabtree-Positive Microorganisms through On-Line Monitoring and Control of Fed-Batch Fermentations," *Fermentation*, vol. 4, no. 3, pp. 1–9, 2018.
- [239] M. M. Schuler and I. W. Marison, "Real-time monitoring and control of microbial bioprocesses with focus on the specific growth rate: current state and perspectives," *Appl Microbiol Biotechnol .*, vol. 94, no. 6, pp. 1469–1482, 2012.
- [240] Z. Wang, T. Tan, and J. Song, "Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production," *Process Biochemistry*, vol. 42, no. 1, pp. 108–111, 2007.
- [241] M. A. Duarte-Mermoud, N. Aguila-Camacho, and R. A. Prieto, "Performance index for quality response of dynamical systems," *ISA Transactions*, vol. 43, pp. 133–145, 2004.
- [242] M. Rocha, R. Mendes, O. Rocha, I. Rocha, and E. C. Ferreira, "Optimization of fed-batch fermentation processes with bio-inspired algorithms," *Expert Systems with Applications*, vol. 41, no. 5, pp. 2186–2195, 2014.
- [243] K. Narendra and A. Annaswamy, "A new adaptive law for robust adaptation without persistent excitation," *IEEE Transactions on Automatic Control*, vol. 32, no. 2, pp. 134–145, 1987.

- [244] K. Narendra, A. Annaswamy, and P. S. Raghuvansh, "A general approach to the stability analysis of adaptive systems," *International Journal of Control*, vol. 41, no. 1, 1985.
- [245] V. F. Cataldo, N. Arenas, V. Salgado, C. Camilo, F. Ibáñez, and E. Agosin, "Heterologous production of the epoxy-carotenoid violaxanthin in *Saccharomyces cerevisiae*," *Metabolic Engineering*, vol. 59, pp. 53–63, 2020.
- [246] I. Rocha, *Model-based strategies for computer-aided operation of recombinant E. coli fermentation*. PhD Thesis, Universidades do Minho, Institute for Biotechnology and Bioengineering, 2003.
- [247] P. N. Royce and N. F. Thornhill, "Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations," *AIChE Journal*, vol. 37, no. 11, pp. 1680–1686, 1991.
- [248] F. Garcia-Ochoa and E. Gomez, "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview," *Biotechnology Advances*, vol. 27, no. 2, pp. 153–176, 2009.
- [249] M. Cárcamo, P. Saa, J. Torres, S. Torres, P. Mandujano, J. Pérez-Correa, and E. Agosin, "Effective Dissolved Oxygen Control Strategy for High-Cell-Density Cultures," *IEEE Latin America Transactions*, vol. 12, no. 3, pp. 389–394, 2014.
- [250] R. Biener, A. Steinkämper, and T. Horn, "Calorimetric control of the specific growth rate during fed-batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Biotechnology*, vol. 160, no. 3, pp. 195–201, 2012.
- [251] M.-J. Seo, H.-J. Choi, and K.-H. Chung, "Production of a platelet aggregation inhibitor, salmosin, by high cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli*," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 21, no. 10, pp. 1053–1056, 2011.
- [252] P. N. Royce, "Effect of changes in the pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations," *Biotechnol Bioeng*, vol. 40, no. 10, pp. 1129–1138, 1992.
- [253] B. S. Kim, S. Lee, S. Lee, and Y. Chang, "High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 26, no. 3, pp. 147–150, 2004.
- [254] L. Dewasme, G. Goffaux, A.-L. Hantson, and A. Vande Wouwer, "Extended Kalman Filter Design for Acetate Estimation in *E. coli* Cultures," *Journal of Process Control*, vol. 23, pp. 148–157, 2013.
- [255] J. Pinsach, C. de Mas, and J. López-Santín, "A simple feedback control of *Escherichia coli* growth for recombinant aldolase production in fed-batch mode," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 29, no. 3, pp. 235–242, 2006.
- [256] H. Y. Lin, B. Mathiszik, B. Xu, S. O. Enfors, and P. Neubauer, "Determination of the maximum specific uptake capacities for glucose and oxygen in glucose-limited fed-batch

- cultivations of *Escherichia coli*,” *Biotechnol Bioeng* ., vol. 73, no. 5, pp. 347–357, 2001.
- [257] B. Sonnleitner and O. Käppeli, “Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis,” *Biotechnol Bioeng* ., vol. 28, no. 6, pp. 927–937, 1986.
- [258] M. Dabros, M. M. Schuler, and I. W. Marison, “Simple control of specific growth rate in biotechnological fed-batch processes based on enhanced online measurements of biomass,” *Bioprocess Biosyst Eng* ., vol. 33, no. 9, pp. 1109–1118, 2010.
- [259] M. Z. b. Mohd Zain, J. Kanesan, G. Kendall, and J. H. Chuah, “Optimization of fed-batch fermentation processes using the Backtracking Search Algorithm,” *Expert Systems with Applications*, vol. 91, pp. 286–297, Jan. 2018. Publisher: Elsevier Ltd.
- [260] Z. Q. Xiong, M. J. Guo, Y. X. Guo, J. Chu, Y. P. Zhuang, N. S. Wang, and S. L. Zhang, “RQ feedback control for simultaneous improvement of GSH yield and GSH content in *Saccharomyces cerevisiae* T65,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 46, no. 7, pp. 598–602, 2010. Publisher: Elsevier Inc.
- [261] E. Lorenz, M. Schmachl, U. Stahl, and M. Senz, “Enhanced incorporation yield of cysteine for glutathione overproduction by fed-batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Journal of Biotechnology*, vol. 216, pp. 131–139, Dec. 2015. Publisher: Elsevier B.V.
- [262] S. Tippmann, G. Scalcinati, V. Siewers, and J. Nielsen, “Production of farnesene and santalene by *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch cultivations with RQ -controlled feed,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 113, pp. 72–81, Jan. 2016.
- [263] M.-J. Seo, H.-J. Choi, K.-H. Chung, and Y.-R. Pyun, “Production of salmosin, a snake venom-derived disintegrin, in recombinant *Pichia pastoris* using high cell density fed-batch fermentation,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 17, pp. 1068–1075, Oct. 2012.
- [264] V. R. Chopda, A. S. Rathore, and J. Gomes, “Maximizing biomass concentration in baker’s yeast process by using a decoupled geometric controller for substrate and dissolved oxygen,” *Bioresource Technology*, vol. 196, pp. 160–168, Nov. 2015. Publisher: Elsevier Ltd.
- [265] A. Hocalar and M. Turker, “Nonlinear control of large-scale fed-batch yeast fermentation: control of the specific growth rate,” *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, vol. 38, no. 3, pp. 338–353, 2014.
- [266] M. S. I. Mozumder, H. De Wever, E. I. Volcke, and L. Garcia-Gonzalez, “A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production,” *Process Biochemistry*, vol. 49, pp. 365–373, Mar. 2014. Publisher: Elsevier Ltd.
- [267] K. Narendra and A. Annaswamy, *Stable Adaptive Systems*. Dover Publications, 2012. Pages: 512 Publication Title: Dover Publications.

- [268] H. Jin, H. Zhang, Z. Zhou, K. Li, G. Hou, Q. Xu, W. Chuai, C. Zhang, D. Han, and Q. Hu, "Ultrahigh-cell-density heterotrophic cultivation of the unicellular green microalga *Scenedesmus acuminatus* and application of the cells to photoautotrophic culture enhance biomass and lipid production," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 117, pp. 96–108, Jan. 2020.
- [269] L. Chen, G. Bastin, and V. Van Breusegem, "A case study of adaptive nonlinear regulation of fed-batch biological reactors," *Automatica*, vol. 31, pp. 55–65, Jan. 1995.
- [270] D. Dochain, "State and parameter estimation in chemical and biochemical processes: a tutorial," *Journal of Process Control*, vol. 13, pp. 801–818, Dec. 2003.
- [271] V. Galvanauskas, O. Grigs, J. Vanags, K. Dubencovs, and V. Stepanova, "Model-based optimization and pO₂ control of fed-batch *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cultivation processes," *Engineering in Life Sciences*, vol. 13, pp. 172–184, Mar. 2013.
- [272] L. Dewasme, D. Coutinho, and A. V. Wouwer, "Adaptive and Robust Linearizing Control Strategies for Fed-Batch Cultures of Microorganisms Exhibiting Overflow Metabolism," in *Lecture Notes in Electrical Engineering*, vol. 89 LNEE, pp. 283–305, 2011.
- [273] Priyanka, S. Roy, V. Chopda, J. Gomes, and A. S. Rathore, "Comparison and implementation of different control strategies for improving production of rHSA using *Pichia pastoris*," *Journal of Biotechnology*, vol. 290, pp. 33–43, Jan. 2019. Publisher: Elsevier.
- [274] L. Santos, L. Dewasme, D. Coutinho, and A. V. Wouwer, "Nonlinear model predictive control of fed-batch cultures of micro-organisms exhibiting overflow metabolism: Assessment and robustness," *Computers & Chemical Engineering*, vol. 39, pp. 143–151, Apr. 2012. Publisher: Elsevier Ltd.
- [275] K. Kovárová-Kovar, S. Gehlen, A. Kunze, T. Keller, R. von Däniken, M. Kolb, and A. P. van Loon, "Application of model-predictive control based on artificial neural networks to optimize the fed-batch process for riboflavin production," *Journal of Biotechnology*, vol. 79, pp. 39–52, Apr. 2000.
- [276] O. Grigs, "Model Predictive Feeding Rate Control in Conventional and Single-use Lab-scale Bioreactors: A Study on Practical Application," *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal*, vol. 30, pp. 47–60, Apr. 2016.
- [277] T. J. B. Mesquita, C. R. Sargo, J. R. Fuzer, S. A. H. Paredes, R. D. C. Giordano, A. C. L. Horta, and T. C. Zangirolami, "Metabolic fluxes-oriented control of bioreactors: a novel approach to tune micro-aeration and substrate feeding in fermentations," *Microbial Cell Factories*, vol. 18, pp. 150–150, Dec. 2019. Publisher: BioMed Central.
- [278] J. Kager, A. Tuveri, S. Ulonska, P. Kroll, and C. Herwig, "Experimental verification and comparison of model predictive, PID and model inversion control in a *Penicillium chrysogenum* fed-batch process," *Process Biochemistry*, vol. 90, pp. 1–11, Mar. 2020. Publisher: Elsevier.

- [279] A. Hocalar and M. Türker, “Model based control of minimal overflow metabolite in technical scale fed-batch yeast fermentation,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 51, pp. 64–71, Aug. 2010.
- [280] S. Duan, Z. Shi, H. Feng, Z. Duan, and Z. Mao, “An on-line adaptive control based on DO/pH measurements and ANN pattern recognition model for fed-batch cultivation,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 30, pp. 88–96, May 2006.
- [281] P. J. Westfall, D. J. Pitera, J. R. Lenihan, D. Eng, F. X. Woolard, R. Regentin, T. Horning, H. Tsuruta, D. J. Melis, A. Owens, S. Fickes, D. Diola, K. R. Benjamin, J. D. Keasling, M. D. Leavell, D. J. McPhee, N. S. Renninger, J. D. Newman, and C. J. Paddon, “Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinin acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, pp. E111–E118, Jan. 2012.
- [282] Z. A. Irani, A. Maghsoudi, S. A. Shojaosadati, and E. Motamedian, “Development and in silico analysis of a new nitrogen-limited feeding strategy for fed-batch cultures of *Pichia pastoris* based on a simple pH-control system,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 98, pp. 1–9, June 2015. Publisher: Elsevier B.V.
- [283] S. Wen, T. Zhang, and T. Tan, “Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*,” *Process Biochemistry*, vol. 41, pp. 2424–2428, Dec. 2006.
- [284] M. Chitra, N. Pappa, and A. Abraham, “Dissolved Oxygen Control of Batch Bioreactor using Model Reference Adaptive Control scheme,” *IFAC-PapersOnLine*, vol. 51, no. 4, pp. 13–18, 2018. Publisher: Elsevier B.V.
- [285] T. Tavasoli, S. Arjmand, S. O. Ranaei Siadat, S. A. Shojaosadati, and A. Sahebghadam Lotfi, “A robust feeding control strategy adjusted and optimized by a neural network for enhancing of alpha 1-antitrypsin production in *Pichia pastoris*,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 144, pp. 18–27, Apr. 2019.
- [286] A. Beiroti, S. N. Hosseini, M. R. Aghasadeghi, and D. Norouzian, “Comparative study of -stat methanol feeding control in fed-batch fermentation of *Pichia pastoris* producing HBsAg: an open-loop control versus recurrent artificial neural network-based feedback control,” *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 94, pp. 3924–3931, Dec. 2019.
- [287] V. Vojinović, J. Cabral, and L. Fonseca, “Real-time bioprocess monitoring,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 114, pp. 1083–1091, Apr. 2006.
- [288] Z.-J. Wang, H.-Y. Wang, Y.-L. Li, J. Chu, M.-Z. Huang, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, “Improved vitamin B12 production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process,” *Bioresource Technology*, vol. 101, pp. 2845–2852, Apr. 2010. Publisher: Elsevier Ltd.
- [289] J. Smith, *Biotechnology*. Cambridge: Press, Cambridge University, fourth edi ed., 2004. Pages: 271.

- [290] B. Jabarivelisdeh, R. Findeisen, and S. Waldherr, "Model Predictive Control of a Fed-batch Bioreactor Based on Dynamic Metabolic-Genetic Network Models," *IFAC-PapersOnLine*, vol. 51, no. 19, pp. 34–37, 2018. Publisher: Elsevier B.V.
- [291] C. Bandaipheth and P. Prasertsan, "Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7," *Carbohydrate Polymers*, vol. 66, pp. 216–228, Oct. 2006.
- [292] G. Potvin, A. Ahmad, and Z. Zhang, "Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 64, pp. 91–105, May 2012. Publisher: Elsevier B.V.
- [293] R. Oliveira, J. Clemente, A. Cunha, and M. Carrondo, "Adaptive dissolved oxygen control through the glycerol feeding in a recombinant *Pichia pastoris* cultivation in conditions of oxygen transfer limitation," *Journal of Biotechnology*, vol. 116, pp. 35–50, Mar. 2005.
- [294] C. A. Duran-Villalobos, S. Goldrick, and B. Lennox, "Multivariate statistical process control of an industrial-scale fed-batch simulator," *Computers & Chemical Engineering*, vol. 132, pp. 106620–106620, Jan. 2020. Publisher: Elsevier Ltd.
- [295] B. Henes and B. Sonnleitner, "Controlled fed-batch by tracking the maximal culture capacity," *Journal of Biotechnology*, vol. 132, pp. 118–126, Oct. 2007.
- [296] Y. Chen, Z. Wang, J. Chu, B. Xi, and Y. Zhuang, "The glucose RQ-feedback control leading to improved erythromycin production by a recombinant strain *Saccharopolyspora erythraea* ZL1004 and its scale-up to 372-m³ fermenter," *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 38, pp. 105–112, Jan. 2015.
- [297] T. G. Byun, A. P. Zeng, and W. D. Deckwer, "Reactor comparison and scale-up for the microaerobic production of 2,3-butanediol by *Enterobacter aerogenes* at constant oxygen transfer rate," *Bioprocess Engineering*, vol. 11, pp. 167–175, Sept. 1994.
- [298] D.-S. Guo, X.-J. Ji, L.-J. Ren, G.-L. Li, F.-W. Yin, and H. Huang, "Development of a real-time bioprocess monitoring method for docosaheptaenoic acid production by *Schizochytrium* sp.," *Bioresource Technology*, vol. 216, pp. 422–427, Sept. 2016.
- [299] F. Ma, A. Zhang, D. Chang, O. D. Velev, K. Wiltberger, and R. Kshirsagar, "Real-time monitoring and control of CHO cell apoptosis by in situ multifrequency scanning dielectric spectroscopy," *Process Biochemistry*, vol. 80, pp. 138–145, May 2019. Publisher: Elsevier.
- [300] J. Villadsen, J. Nielsen, and G. Lidén, *Bioreaction Engineering Principles*. Boston, MA: Springer US, third edit ed., 2011. Pages: 561 Publication Title: Bioreaction Engineering Principles.
- [301] T. Ma, B. Shi, Z. Ye, X. Li, M. Liu, Y. Chen, J. Xia, J. Nielsen, Z. Deng, and T. Liu, "Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene," *Metabolic Engineering*, vol. 52,

pp. 134–142, Mar. 2019. Publisher: Elsevier Inc.

- [302] M. Mednis, J. Meitalovs, S. Vilums, J. Vanags, and V. Galvanauskas, “Bioprocess monitoring and control using mobile devices,” *Information Technology and Control*, vol. 39, no. 3, pp. 195–201, 2010.
- [303] F. Shang, S. Wen, X. Wang, and T. Tan, “High-cell-density fermentation for ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 101, pp. 38–41, Jan. 2006.
- [304] V. Santos, C. Galdeano, E. Gomez, A. Alcon, and F. Garcia-Ochoa, “Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 32, pp. 198–204, Dec. 2006.
- [305] L. Andersson, L. Strandberg, and S.-O. Enfors, “Cell Segregation and Lysis Have Profound Effects on the Growth of *Escherichia coli* in High Cell Density Fed Batch Cultures,” *Biotechnology Progress*, vol. 12, pp. 190–195, Apr. 1996.
- [306] A. Escalante-Sánchez, J. Barrera-Cortés, H. M. Poggi-Varaldo, T. Ponce-Noyola, and I. S. Baruch, “A soft sensor based on online biomass measurements for the glucose estimation and control of fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*,” *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 41, pp. 1471–1484, Oct. 2018. Publisher: Springer Berlin Heidelberg.
- [307] Paul M. Muchinsky, “Summary for Policymakers,” in *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis* (Intergovernmental Panel on Climate Change, ed.), vol. 53, pp. 1–30, Cambridge: Cambridge University Press, 2012.
- [308] L. Bodizs, M. Titica, N. Faria, B. Srinivasan, D. Dochain, and D. Bonvin, “Oxygen control for an industrial pilot-scale fed-batch filamentous fungal fermentation,” *Journal of Process Control*, vol. 17, pp. 595–606, Aug. 2007.
- [309] S. Yamawaki, T. Matsumoto, Y. Ohnishi, Y. Kumada, N. Shiomi, T. Katsuda, E. K. Lee, and S. Katoh, “Production of Single-Chain Variable Fragment Antibody (scFv) in Fed-Batch and Continuous Culture of *Pichia pastoris* by Two Different Methanol Feeding Methods,” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 104, pp. 403–407, Jan. 2007.
- [310] B. Shi, T. Ma, Z. Ye, X. Li, Y. Huang, Z. Zhou, Y. Ding, Z. Deng, and T. Liu, “Systematic Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Lycopene Overproduction,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 67, pp. 11148–11157, Oct. 2019.
- [311] S. Ulonska, D. Waldschitz, J. Kager, and C. Herwig, “Model predictive control in comparison to elemental balance control in an *E. coli* fed-batch,” *Chemical Engineering Science*, vol. 191, pp. 459–467, Dec. 2018. Publisher: Elsevier Ltd.
- [312] L. Sang Yup, “High cell-density culture of *Escherichia coli*,” *Trends in Biotechnology*, vol. 14, no. 3, pp. 98–105, 1996.

- [313] H. Jin, Z. Zheng, M. Gao, Z. Duan, Z. Shi, Z. Wang, and J. Jin, “Effective induction of phytase in *Pichia pastoris* fed-batch culture using an ANN pattern recognition model-based on-line adaptive control strategy,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 37, pp. 26–33, Oct. 2007.
- [314] C. Ratledge, “The role of malic enzyme as the provider of NADPH in oleaginous microorganisms: a reappraisal and unsolved problems,” *Biotechnology Letters*, vol. 36, pp. 1557–1568, Aug. 2014.
- [315] A. Maghsoudi, S. Hosseini, S. A. Shojaosadati, E. Vasheghani-Farahani, M. Nosrati, and A. Bahrami, “A new methanol-feeding strategy for the improved production of -galactosidase in high cell-density fed-batch cultures of *Pichia pastoris* Mut+ strains,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 17, pp. 76–83, Feb. 2012.
- [316] G. Chang, J. Wu, C. Jiang, G. Tian, Q. Wu, M. Chang, and X. Wang, “The relationship of oxygen uptake rate and kLa with rheological properties in high cell density cultivation of docosahexaenoic acid by *Schizochytrium* sp. S31,” *Bioresource Technology*, vol. 152, pp. 234–240, Jan. 2014.
- [317] L. Mears, S. M. Stocks, G. Sin, and K. V. Gernaey, “A review of control strategies for manipulating the feed rate in fed-batch fermentation processes,” *Journal of Biotechnology*, vol. 245, pp. 34–46, 2017.
- [318] C. J. Franzén, E. Albers, and C. Niklasson, “Use of the inlet gas composition to control the respiratory quotient in microaerobic bioprocesses,” *Chemical Engineering Science*, vol. 51, pp. 3391–3402, July 1996.
- [319] D. Riesenberger, W.-D. Deckwer, E. Sanders, V. Schulz, H.-D. Pohl, W. Knorre, A. Roß, and D. Korz, “High cell density cultivation of *Escherichia coli* at controlled specific growth rate,” *Journal of Biotechnology*, vol. 20, no. 1, pp. 17–28, 1991.
- [320] E. F. Camacho and C. Bordons, *Model Predictive Control*. Advanced Textbooks in Control and Signal Processing, London: Springer London, 1999. Pages: 280.
- [321] S. Azadi, S. Sadjady, S. Mortazavi, N. Naghdi, A. Mahboubi, and R. Solaimanian, “Bioprocess and downstream optimization of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris*,” *Research in Pharmaceutical Sciences*, vol. 13, no. 3, pp. 222–222, 2018.
- [322] D. Riesenberger and R. Guthke, “High-cell-density cultivation of microorganisms,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 51, pp. 422–430, Apr. 1999.
- [323] J. Doucha and K. Lívanský, “Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 24, pp. 35–43, Jan. 2012.
- [324] B. Sonnleitner, “Automated Measurement and Monitoring of Bioprocesses: Key Elements of the M3C Strategy,” in *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 123, pp. 1–33, 2012.
- [325] N. Aguila-Camacho and M. A. Duarte-Mermoud, “Improving the control energy in mo-

- del reference adaptive controllers using fractional adaptive laws,” *IEEE/CAA Journal of Automatica Sinica*, vol. 3, pp. 332–337, July 2016.
- [326] K. Kiviharju, K. Salonen, U. Moilanen, and T. Eerikäinen, “Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors,” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, vol. 35, pp. 657–665, July 2008.
- [327] S. Tippmann, G. Scalcinati, V. Siewers, and J. Nielsen, “Production of farnesene and santalene by *Saccharomyces cerevisiae* using fed-batch cultivations with RQ -controlled feed,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 113, pp. 72–81, Jan. 2016.
- [328] Z.-Q. Xiong, M.-J. Guo, J. Chu, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, “On-line specific growth rate control for improving reduced glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 20, pp. 887–893, Sept. 2015.
- [329] S. C. Patwardhan, S. Manuja, S. Narasimhan, and S. L. Shah, “From data to diagnosis and control using generalized orthonormal basis filters. Part II: Model predictive and fault tolerant control,” *Journal of Process Control*, vol. 16, no. 2, pp. 157–175, 2006.
- [330] Z. A. Irani, A. Maghsoudi, S. A. Shojaosadati, and E. Motamedian, “Development and in silico analysis of a new nitrogen-limited feeding strategy for fed-batch cultures of *Pichia pastoris* based on a simple pH-control system,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 98, pp. 1–9, 2015.
- [331] Z. A. Irani, A. Maghsoudi, S. A. Shojaosadati, and E. Motamedian, “Development and in silico analysis of a new nitrogen-limited feeding strategy for fed-batch cultures of *Pichia pastoris* based on a simple pH-control system,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 98, pp. 1–9, 2015.
- [332] I. Rocha, A. Veloso, S. Carneiro, R. Costa, and E. Ferreira, “IMPLEMENTATION OF A SPECIFIC RATE CONTROLLER IN A FED-BATCH E. COLI FERMENTATION,” *IFAC Proceedings Volumes*, vol. 41, no. 2, pp. 15565–15570, 2008.
- [333] A. Beiroti, S. N. Hosseini, M. R. Aghasadeghi, and D. Norouziyan, “Comparative study of -stat methanol feeding control in fed-batch fermentation of *Pichia pastoris* producing HBsAg: an open-loop control versus recurrent artificial neural network-based feedback control,” *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 94, pp. 3924–3931, Dec. 2019.
- [334] V. R. Chopda, A. S. Rathore, and J. Gomes, “Maximizing biomass concentration in baker’s yeast process by using a decoupled geometric controller for substrate and dissolved oxygen,” *Bioresource Technology*, vol. 196, pp. 160–168, Nov. 2015.
- [335] J. Doucha and K. Lívanský, “Production of high-density *Chlorella* culture grown in fermenters,” *J Appl Phycol*, vol. 24, pp. 35–43, Jan. 2012.
- [336] A. Hocalar and M. T. Rker, “Nonlinear control of large-scale fed-batch yeast fermentation: control of the specific growth rate,” p. 16.
- [337] T. Ma, B. Shi, Z. Ye, X. Li, M. Liu, Y. Chen, J. Xia, J. Nielsen, Z. Deng, and T. Liu,

- “Lipid engineering combined with systematic metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for high-yield production of lycopene,” *Metabolic Engineering*, vol. 52, pp. 134–142, Mar. 2019.
- [338] B. Shi, T. Ma, Z. Ye, X. Li, Y. Huang, Z. Zhou, Y. Ding, Z. Deng, and T. Liu, “Systematic Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Lycopene Overproduction,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, pp. 11148–11157, Oct. 2019.
- [339] T. Tavasoli, S. Arjmand, S. O. Ranaei Siadat, S. A. Shojaosadati, and A. Sahebghadam Lotfi, “A robust feeding control strategy adjusted and optimized by a neural network for enhancing of alpha 1-antitrypsin production in *Pichia pastoris*,” *Biochemical Engineering Journal*, vol. 144, pp. 18–27, Apr. 2019.
- [340] Z. Wang, X. Li, C. Yu, S. Lu, S. Xiong, and Y. Yuan, “Continuous Self-Cycling Fermentation Leads to Economical Lycopene Production by *Saccharomyces cerevisiae*,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 8, p. 420, May 2020.
- [341] P. J. Westfall, D. J. Pitera, J. R. Lenihan, D. Eng, F. X. Woolard, R. Regentin, T. Horning, H. Tsuruta, D. J. Melis, A. Owens, S. Fickes, D. Diola, K. R. Benjamin, J. D. Keasling, M. D. Leavell, D. J. McPhee, N. S. Renninger, J. D. Newman, and C. J. Paddon, “Production of amorphadiene in yeast, and its conversion to dihydroartemisinin acid, precursor to the antimalarial agent artemisinin,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, pp. E111–E118, Jan. 2012.
- [342] Z.-Q. Xiong, M.-J. Guo, J. Chu, Y.-P. Zhuang, and S.-L. Zhang, “On-line specific growth rate control for improving reduced glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*,” *Biotechnol Bioproc E*, vol. 20, pp. 887–893, Sept. 2015.
- [343] I. Bouraoui, M. Farza, T. Menard, R. B. Abdennour, and M. M’Saad, “On-line estimation of the reaction rates from sampled measurements in bioreactors,” *IFAC-PapersOnLine*, vol. 49, no. 7, pp. 1205–1210, 2016.
- [344] Y. Pomerleau and M. Perrier, “Estimation of multiple specific growth rates in bioprocesses,” *AIChE J.*, vol. 36, pp. 207–215, Feb. 1990.
- [345] Y. Pomerleau and M. Perrier, “Estimation of multiple specific growth rates: Experimental validation,” *AIChE J.*, vol. 38, pp. 1751–1760, Nov. 1992.
- [346] D. Selişteanu, E. Petre, M. Roman, and D. Şendrescu, “Estimation of kinetic rates in a baker’s yeast fed-batch bioprocess by using non-linear observers,” *IET Control Theory Appl.*, vol. 6, no. 2, p. 243, 2012.
- [347] P. Siegwart, J. Cote, K. Male, J. Luong, M. Perrier, and A. Kamen, “Adaptive Control at Low Glucose Concentration of HEK-293 Cell Serum-Free Cultures,” *Biotechnol. Prog.*, vol. 15, pp. 608–616, Aug. 1999.
- [348] I. Y. Smets, J. E. Claes, E. J. November, G. P. Bastin, and J. F. Van Impe, “Optimal adaptive control of (bio)chemical reactors: past, present and future,” *Journal of Process Control*, vol. 14, pp. 795–805, Oct. 2004.

- [349] N. Aguila-Camacho, J. D. Le Roux, M. A. Duarte-Mermoud, and M. E. Orchard, "Control of a grinding mill circuit using fractional order controllers," *Journal of Process Control*, vol. 53, pp. 80–94, May 2017.
- [350] D. Valério and J. Sá da Costa, "Variable Order Fractional Controllers: Variable Order Fractional Controllers," *Asian J Control*, vol. 15, pp. 648–657, May 2013.
- [351] D. Matignon, "Stability properties for generalized fractional differential systems," *ESAIM: Proc.*, vol. 5, pp. 145–158, 1998.
- [352] D. Matignon and C. Prieur, "Asymptotic stability of linear conservative systems when coupled with diffusive systems," *ESAIM: COCV*, vol. 11, pp. 487–507, July 2005.
- [353] A. P. Morgan and K. S. Narendra, "On the Uniform Asymptotic Stability of Certain Linear Nonautonomous Differential Equations," *SIAM J. Control Optim.*, vol. 15, pp. 5–24, Jan. 1977.
- [354] K. S. Narendra, "A General Approach to the Stability Analysis of Adaptive Systems," p. 6.
- [355] L. H. Reyes, J. M. Gomez, and K. C. Kao, "Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution," *Metabolic Engineering*, vol. 21, pp. 26–33, 2014.
- [356] S. Rubat, I. Varas, R. Sepúlveda, D. Almonacid, F. González-Nilo, and E. Agosin, "Increasing the intracellular isoprenoid pool in *Saccharomyces cerevisiae* by structural fine-tuning of a bifunctional farnesyl diphosphate synthase," *FEMS Yeast Research*, vol. 17, June 2017.
- [357] R. Martinez-Martinez, J. L. Mata-Machuca, R. Martinez-Guerra, J. A. Leon, and G. Fernandez-Anaya, "A new observer for nonlinear fractional order systems," in *IEEE Conference on Decision and Control and European Control Conference*, (Orlando, FL, USA), pp. 3319–3324, IEEE, Dec. 2011.
- [358] Y.-x. Zhao, X. Du, and G.-l. Xia, "A Novel Fractional-Order PID Controller for Integrated Pressurized Water Reactor Based on Wavelet Kernel Neural Network Algorithm," *Mathematical Problems in Engineering*, vol. 2014, pp. 1–13, 2014.
- [359] A. Kumar and V. Kumar, "A novel interval type-2 fractional order fuzzy PID controller: Design, performance evaluation, and its optimal time domain tuning," *ISA Transactions*, vol. 68, pp. 251–275, May 2017.
- [360] W. Zheng, Y. Luo, X. Wang, Y. Pi, and Y. Chen, "Fractional order PI D controller design for satisfying time and frequency domain specifications simultaneously," *ISA Transactions*, vol. 68, pp. 212–222, May 2017.
- [361] H. S. Sánchez, F. Padula, A. Visioli, and R. Vilanova, "Tuning rules for robust FOPID controllers based on multi-objective optimization with FOPDT models," *ISA Transactions*, vol. 66, pp. 344–361, Jan. 2017.