

Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica

Volumen 24
Volume

Número 1
Number

Marzo 2003
March

Artículo:

Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Sociedad Mexicana de Ingeniería Biomédica, AC

Otras secciones de
este sitio:

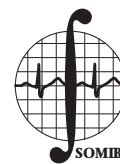
- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



Medigraphic.com



Diseño y construcción de los instrumentos de medición para un biorreactor prototipo

Rodríguez Arévalo, A.C.,*
Cabrera Llanos, A.I.* Valencia
Flores, J.I.*

* Instituto Politécnico Nacional. Unidad
Profesional Interdisciplinaria de
Biotecnología.

Correspondencia:

Rodríguez Arévalo, A.C.
Av. Acueducto s/n Col. Barrio la Laguna
Ticomán C.P. 07340, México, D. F.,
México.
E-mail: acabrera@acei.upibi.ipn.mx

RESUMEN

La importancia de la instrumentación de un biorreactor prototipo radica en la necesidad de tener en los cultivos un control que permita optimizar el proceso. La estrategia de control comienza con la medición de las variables que proveen un ambiente adecuado en un proceso de fermentación. El diseño y construcción de los elementos necesarios para el monitoreo de las variables del biorreactor, requirieron conocimientos de las necesidades del biorreactor y su operación específica, así como de los circuitos electrónicos involucrados en los dispositivos de medición. Así, se realizó el diseño de todos los dispositivos para la medición, como también los controladores de las variables tales como agitación, temperatura, nivel e impedancia. Por último, se llevó a cabo la construcción de la estación de trabajo tomando en cuenta las características de funcionalidad, dimensión, transportación del prototipo. De esta manera, se logró controlar un proceso fermentativo en un biorreactor prototipo con instrumentos de diseño y construcción propios.

Palabras clave:

Lote alimentado, cultivo, control.

ABSTRACT

The instrumentation of a bioreactor prototype is settled in the control of yeasts that allow us to optimize the process. The control strategy begins with the measurement of the variables that will provide an adequate environment in a fermentative process. The knowledge of the bioreactors, their requirements and specific operation, as well as the electronic circuits of the measurement devices, was required in order to design and construct all the necessary elements for the monitoring of the variables involved in a fermentative process. Not only the design of the devices for the measurement, but also the controllers for the variables such as agitation speed, temperature, water level and impedance was performed. Furthermore, a work station was constructed, based on the characteristics of functionality, dimensions and transport of the prototype. Finally, the control of a fermentative process in a prototype bioreactor with instruments of our own design and construction was achieved.

Key Words:

Fed-batch, yeast, control.

INTRODUCCIÓN

Las características básicas de evolución de un proceso de fermentación son representadas en forma de una curva de crecimiento y medición, éstas fueron estudiadas debido a la necesidad de caracterización de los instrumentos de medición propuestos. Se incluyen también los tipos de biorreactores, su diseño, instrumentación y modos de operación, para comprender el porqué del diseño de los medidores. Por otro lado se explican las características del microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizado en las fermentaciones. Por otra parte, debido a que el sistema de medición de concentración de biomasa se realizó basado en los principios de medición impedanciométrica, se revisan estos conceptos, explicando los antecedentes, métodos y aplicaciones, para dar una idea más clara del método propuesto para la medición. Por último, debido al diseño del sistema de agitación del biorreactor utilizado, en donde se tomaron en cuenta las características de los motores eléctricos, su arranque, medición de velocidad, instalación y control, para así poder realizar las modificaciones necesarias al sistema de agitación propuesto.

Los procesos fermentativos

El crecimiento en un sistema biológico se define con el incremento ordenado de todos los componentes químicos¹. Dicho crecimiento es de suma importancia en los procesos de fermentación, ya que manteniendo controlado dicho crecimiento, se mantiene controlada la producción del metabolito de interés.

Todo cultivo de microorganismo inoculado en un medio, pasa por diversas fases en un proceso de fermentación (Figura 1). Dichas fases son: la fase

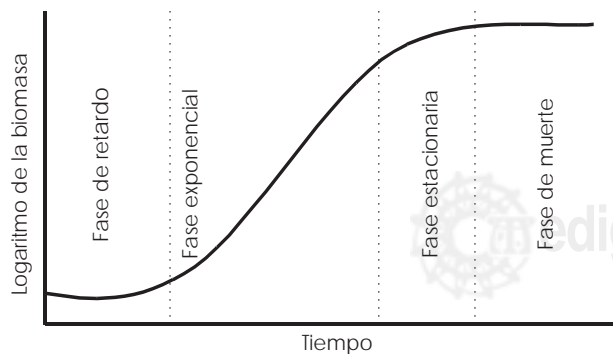


Figura 1. Curva de crecimiento de un cultivo discontinuo.

de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

Medición del crecimiento microbiano

Existen diversos métodos para medir el crecimiento de los microorganismos como peso seco, absorbancia, número de células viables, contador de células, etc.

La medición del peso seco de las células es una manera directa de conocer la biomasa. Consiste de separar las células del medio, filtrándolas con papel filtro con poros en la medida de micrómetros; posteriormente, se secan dichos filtros y se pesan. Este método es largo y no tan preciso como se desearía, es por ello que se requieren balanzas con precisiones de menos de 1 mg. Asimismo, este método no es selectivo, debido a que determina tanto las células muertas como las viables.

Otro método utilizado es la absorbancia, la cual determina la cantidad de luz dispersada por una suspensión de células. Se basa en el hecho de que las partículas pequeñas dispersan la luz de manera proporcional a su concentración¹. En fechas recientes un método basado en la relación de impedancia del medio se ha estado desarrollando, este método necesita del desarrollo de una fuente externa de corriente, que introduzca una señal oscilatoria al medio, con la cual se realice un sentido de la señal complementaria (voltaje) y así poder determinar el valor de la impedancia en el transcurso de un proceso de fermentación, esta variable es dependiente de la concentración de microorganismos en el medio y representa una alternativa de medición.

Biorreactores

Un biorreactor o fermentador se define como "aquel dispositivo que proporciona un medio ambiente controlado que permite el crecimiento eficaz de las células y la formación de un producto"². El medio ambiente adecuado que proporciona un biorreactor, tiene que tener niveles óptimos de temperatura, pH, sustrato, sales, y oxígeno, para así convertir las materias primas en productos específicos (metabolitos) de interés³.

Tipos de biorreactores

Existen distintos tipos de biorreactores, básicamente tres⁴:

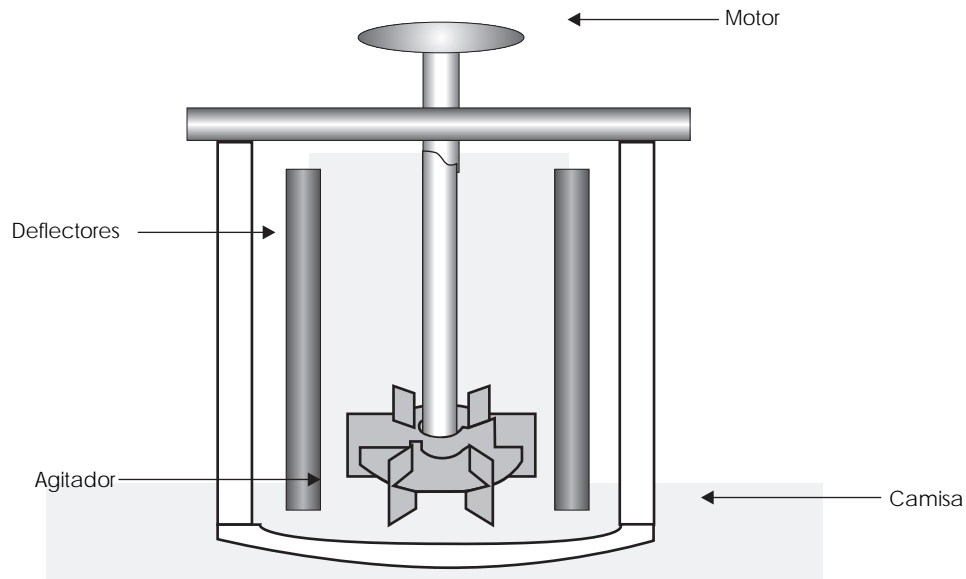


Figura 2. Biorreactor de tanque agitado mecánicamente.

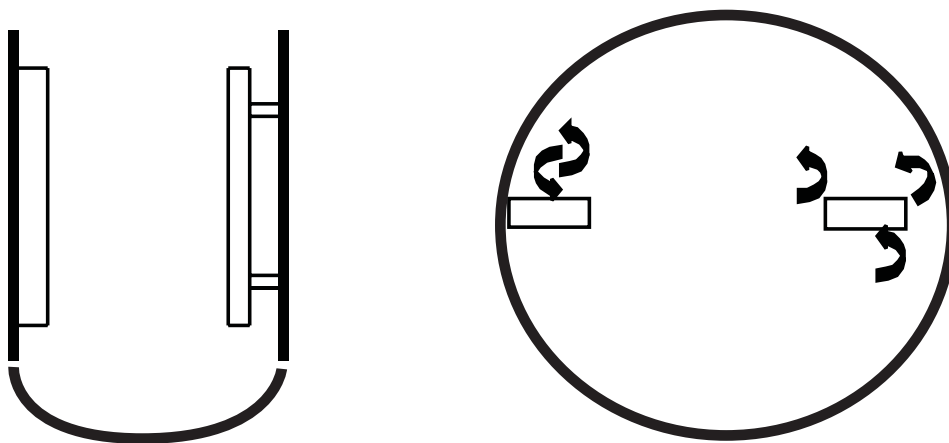


Figura 3. Deflectores.

- Fermentadores bucle agitado por aire (air-lift)
- Fermentadores de torre
- Fermentadores con agitación mecánica

Los fermentadores con agitación básicamente consisten de un tubo cilíndrico con un agitador en el fondo o en la parte superior (Figura 2), estos son los fermentadores más comúnmente usados debido a su fácil operación, confiabilidad y duración. Por estas características se eligió este tipo de biorreactor para nuestro caso.

Estos biorreactores pueden variar en capacidad desde 1 litro hasta 30 litros. En estos tipos de fermentadores es necesario un motor para poder llevar a cabo la agitación, el motor deberá generar la suficiente potencia para asegurar que el medio de cultivo en el fermentador permanezca

como una mezcla homogénea, para un biorreactor de 20 litros un motor de 1 kwatt es suficiente.

Las operaciones realizadas por estos biorreactores son las siguientes³:

1. Homogeneización, para mantener temperatura y distribución de concentración uniformes.
2. Mezcla sólido/líquido, para mantener una suspensión con una distribución de sólidos uniforme.
3. Procesos líquido/líquido, para dispersar una fase en otra, formar emulsiones y realizar extracciones.
4. Procesos gaseoso/líquido, para dispersar el gas en los líquidos, airear el líquido.
5. Intercambio de calor.

Estos biorreactores cuentan con un sistema de agitación mecánica, y el número de propelas tiene que ver con el tamaño del mismo, se coloca a lo largo del eje cilíndrico del reactor, lo cual favorece también el intercambio de calor. Asimismo, cuentan con baffles (deflectores), los cuales son cortadores de corriente para prevenir la formación de vórtices en el medio (Figura 3). Generalmente se colocan cuatro deflectores. La temperatura del medio se mantiene por la camisa de metal o vidrio.

Existen distintos tipos de agitadores, algunos mantienen el flujo en alineación axial y otros en alineación tangencial o radial. La forma de dichos agitadores depende de la viscosidad del líquido³. Dependiendo del tipo de agitador que se seleccione, será el patrón de flujo y de los vórtices generados; todo esto se calcula por parámetros como tiempo de mezclado, transferencia de masa y de calor, etc. En nuestro caso, el tipo de agitador utilizado es turbina plana con deflectores laterales.

Diseño e instrumentación de biorreactores

La instrumentación y control de un biorreactor requiere de sensores que midan las variables de un

proceso fermentativo, y sistemas que ajusten el equipo a un punto óptimo de operación. Idealmente, los sensores deben de estar en línea, para medir las propiedades físicas del cultivo, estos sensores deben ser esterilizables para asegurar la asepsia del proceso. Sin embargo, no todas las mediciones pueden ser hechas en línea, algunas medidas fuera de línea, requieren de tomar muestras y analizarlas, lo cual consume tiempo y hace lenta la respuesta de control (biomasa, sustrato, metabolitos, etc.). En la Figura 4, podemos observar los principales instrumentos de medición en un biorreactor.

Los sensores de propiedades físicas pueden ser monitoreados continuamente, y son la temperatura, presión, poder de agitación, velocidad de agitación, viscosidad del medio, flujo y concentración de gases y fluidos, espuma, volumen y masa⁵. Los utilizados en el prototipo son de agitación, temperatura y nivel de líquido.

Para la medición de las propiedades químicas se utilizan electrodos esterilizables al vapor, de pH, redox, oxígeno disuelto y CO_2 . El más utilizado es el de pH, aunque no tiene utilidad para todas las fermentaciones, sólo en las de tipo continuo donde se necesita mantener un valor estable de acidez o basicidad. Para ello, contamos con sensores de pH y oxígeno disuelto.

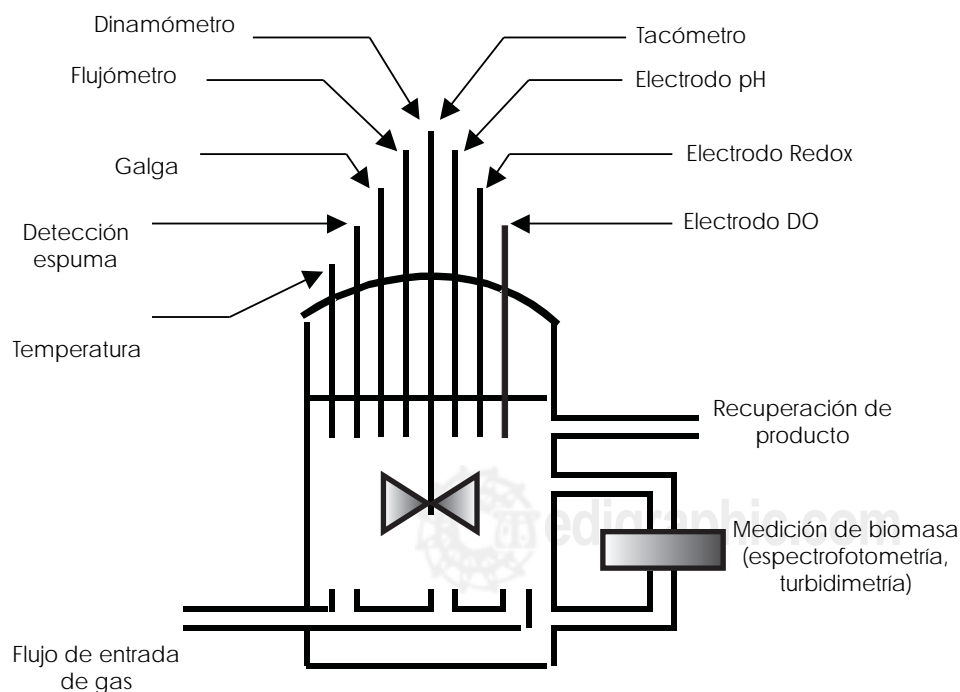


Figura 4. Instrumentación de un biorreactor.

Cuadro 1. Instrumentos de medición en línea².

| Variable | Equipo |
|------------------------------|---|
| Temperatura | Termómetros, termistores. |
| Presión | Manómetros, galgas. |
| Volumen | Sensores de nivel. |
| Espuma | Sondas metálicas. |
| Velocidad del agitador | Tacómetro |
| Velocidad del flujo gaseoso | Rotámetro, medidor térmico. |
| Flujo líquido | Agitadores, turbinas, rotámetros, transductores de flujo, bombas peristálticas. |
| pH | Electrodo de referencia de vidrio combinado. |
| O ₂ disuelto | Electrodo polarográfico. |
| CO ₂ disuelto | Electrodo. |
| O ₂ fase gaseosa | Análisis paramagnético. |
| CO ₂ fase gaseosa | Análisis infrarrojo. |
| Análisis de gases | Espectroscopia de masas. |

1. Modo lote (Batch)
2. Modo lote alimentado (Fed-Batch)
3. Modo continuo

Los modos de operación por lote, son modos discontinuos de operación, el modo lote es comúnmente llamado discontinuo, mientras que el modo lote alimentado se conoce como discontinuo alimentado a intervalos

En nuestro caso, se utilizó el modo lote, en el cual, todas las materias primas necesarias para producir (sustrato) se introducen al inicio de la fermentación, el objetivo es la producción de un metabolito cuyo valor es mayor al de la materia prima. Este cultivo se deja en operación por un cierto tiempo (tiempo de fermentación). Al final de la fermentación se recuperan los productos de interés (Figura 5). Sólo se utilizan cuando se requiere una cantidad pequeña de producto.

Modos de operación

Los biorreactores, tienen básicamente tres modos de operación para realizar las fermentaciones:

Saccharomyces cerevisiae

El microorganismo utilizado, *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 6) es una levadura a la que, para obtener el producto deseado, se manipula el me-

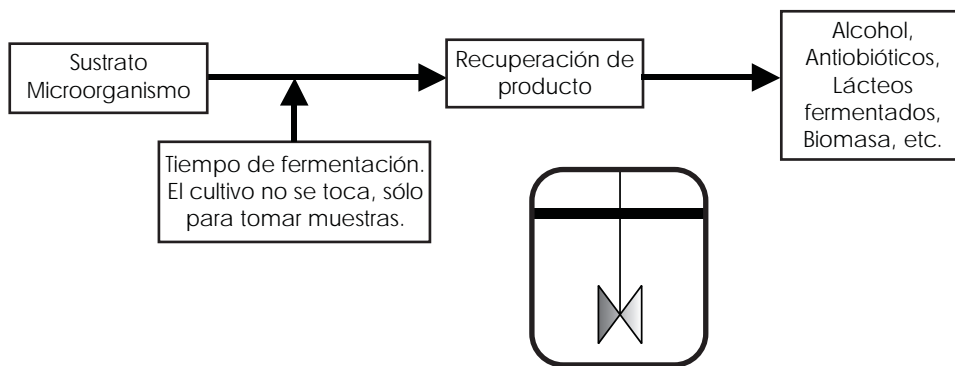


Figura 5. Diagrama de fermentación modo lote.

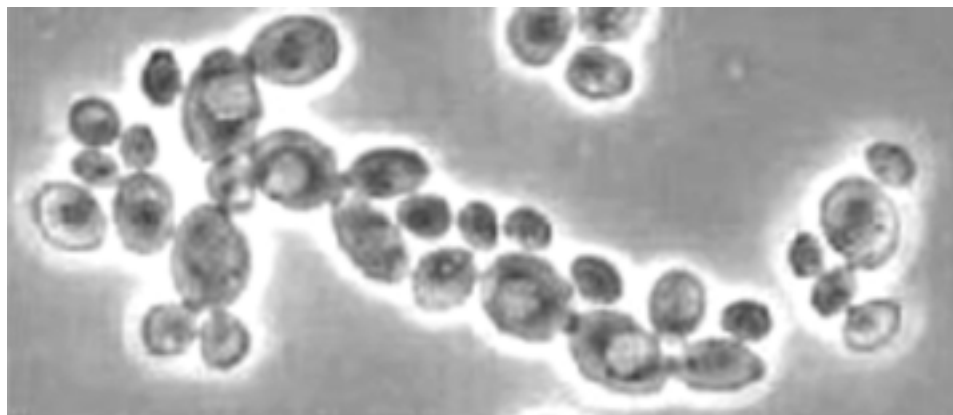


Figura 6. *Saccharomyces cerevisiae*.

Cuadro 2. Métodos impedanciométricos⁸.

| Método | Características |
|--|--|
| Puentes para medir cambios de impedancia o conductancia. | Balanceados inicialmente contra una celda estéril para disminuir variaciones de temperatura u otros parámetros. |
| Puentes para medir el cociente de impedancia de una celda de referencia sobre la suma de las impedancias de referencia y una celda inoculada | Este arreglo reduciría cambios extra-bacterianos. |
| Generador de corriente constante aplicado a una celda inoculada y un demodulador sensible a la fase. | Esta técnica permite obtener señales proporcionales a las componentes resistiva total, reactiva total y módulo de impedancia total |
| Una fuente de tensión senoidal aplicada a una celda inoculada a través de un resistor serie para medir la impedancia bipolar. | Las tensiones medidas en el resistor serie, la celda de cultivo y la fuente permiten calcular por medio de la ley de Ohm y el teorema del coseno, el módulo de la impedancia y sus componentes resistiva y reactiva totales. |
| El método tetrapolar. | Es similar al bipolar, pero evita la impedancia de la interfase electrodo-electrolito, y sólo mide la resistencia del medio de cultivo. |
| El método bi-frecuencia. | Basado en la técnica de Schwan, emplea las propiedades dependientes de la frecuencia de la impedancia de interfase para separar las componentes de medio e interfase de la impedancia bipolar. |

dio al controlar la cantidad de sustrato añadido en una fermentación por lote alimentado, podemos controlar la cantidad de producto y el producto de nuestro interés. A cantidades limitadas de sustrato, existe una mayor producción de biomasa, mientras que al aumentar el sustrato, se tiene una mayor producción de etanol.

Por ello, para este microorganismo, se controla principalmente la cantidad de CO_2 que sale y el O_2 que entra, para poder predecir el producto a obtener. Generalmente, el microorganismo se coloca en un medio de cultivo nutritivo con extracto de levadura, glucosa y minerales necesarios para su crecimiento.

Impedancia

La impedancia se define como la oposición total que un elemento ofrece ante el flujo de una corriente alterna a una frecuencia dada, y se representa como una cantidad compleja la cual es mostrada como un plano vectorial. La impedancia eléctrica como principio de transducción ha sido aplicada en una gran variedad de problemas biológicos, fisiológicos y médicos⁶. Una aplicación

relativamente reciente es el monitoreo automático de impedancia en los procesos biotecnológicos. La técnica consiste en realizar mediciones de las componentes de impedancia (por ejemplo conductancia, capacitancia, impedancia o ángulo de fase) empleando el método bipolar, o el tetrapolar, con electrodos sumergidos en una celda que contiene un medio de cultivo inoculado que es mantenido a temperatura constante.

Para medir la impedancia de un cultivo, se aplica un campo eléctrico senoidal entre dos electrodos. Existen principalmente dos parámetros que describen las propiedades eléctricas de una muestra: ϵ , que es la permitividad eléctrica para la capacitancia; y σ , que es la conductividad. Ambos parámetros se afectan por la concentración de biomasa. En un sistema de temperatura controlada, pueden utilizarse estos métodos para monitorear la biomasa. Existen instrumentos comerciales para realizar estas mediciones, como el Bactomatic o el Bactobridge, sin embargo, su costo es muy elevado⁷.

En detección y cuantificación, las ventajas de la impedancia respecto de los métodos clásicos, como el conteo de células, son notables. Los tra-

bajos publicados comúnmente se limitan a una capacitancia y resistencia total bipolar medidas a una frecuencia única, sin discriminar en la componente resistiva el medio de la interfase, y además sin comprender claramente que información representa la capacitancia o la resistencia medida. Tampoco hay una técnica común para realizar las mediciones y hasta puede encontrarse trabajos con opiniones opuestas. Como contrapartida, en las mediciones de impedancia del medio, hay más fundamentos teóricos basados en diversos trabajos que se remontan a las primeras décadas del siglo XX, pero que recientemente se aplicaron en forma práctica en la biotecnología⁸.

Métodos

Existen varios métodos para medir impedancia. Para escoger el adecuado, se deben considerar los requerimientos y condiciones de nuestras mediciones, así como factores como cobertura de frecuencia, rango de medición, precisión y facilidad de uso (Cuadro 2).

Aplicaciones

Las aplicaciones de la impedancia son muy variadas, por ejemplo, en la industria de productos lácteos, se ha propuesto emplear la impedancia como método alternativo de conteo de células. Asimismo, tiene aplicaciones en la industria cervecera, de vinos, carnes, pescados, productos farmacéuticos y cosméticos. Fuera de estas aplicaciones, se ha utilizado para detectar bacterias coliformes en desagües, así como infecciones urinarias o en sangre humana. Otras aplicaciones consisten en la investigación para antibiogramas, o estudio de características de crecimiento de microorganismos, para optimizar su producción metabólica^{8,9}.

Motores. Medición de velocidad

Los tacómetros de corriente alterna son generadores de corriente alterna monofásicos, excitados con un imán permanente, que suministran tensión proporcional a la velocidad angular. La tensión alterna se rectifica y se filtra.

Los tacómetros digitales corresponden a una rueda dentada que se monta en el eje del motor y un sensor fijo produce impulsos de tensión los cuales pueden ser manipulados, filtrados y desplegados.

Los tacómetros, como todo instrumento de medición, deben tener características de linealidad, precisión, etc.

Instalación de motores

En la instalación de motores, deben tomarse en cuenta aspectos como los esfuerzos mecánicos a los que se someten durante el funcionamiento; estos esfuerzos dependen de la carga o aplicación. Existen distintos tipos de esfuerzos, como los externos o directamente dependientes de la aplicación (momento, peso del elemento de transmisión, fuerza radial externa, fuerza axial, esfuerzos sobre la estructura); y los internos, inherentes al propio motor, independientemente de la máquina accionada (pesos propios, fuerzas radiales y axiales de atracción magnética, desequilibrios internos, etc.)¹⁰. En el caso del prototipo el motor de CD fue colocado directamente sobre la flecha del biorreactor, tomándose en cuenta los esfuerzos que realiza ésta al girar, además de ser desmontable para una mayor facilidad de mantenimiento.

Los parámetros mecánicos del motor como las tensiones en el eje, deflexiones en el eje, velocidades angulares críticas, cojinetes, etc., le confieren de características necesarias para soportar los esfuerzos; dichas características son inherentes al fabricante.

MATERIAL Y MÉTODOS

La instrumentación del biorreactor prototipo consiste de:

- a) Estación de trabajo.
- b) Circuitos de alimentación.
- c) Control de velocidad.
- d) Control de temperatura.
- e) Sistema de recirculación.
- f) Sensores de impedancia.

Estación

En el proceso de armado, se construyó una estructura que cumple con los requerimientos mínimos necesarios para llevar a cabo cinéticas de fermentación sin problemas.

Para la construcción de la estación del biorreactor prototipo, se construyó una estructura de acero, con soleras y ángulos (Figuras 7, 7a y 7b). Las dimensiones no son similares a la de los biorreactores comerciales, los cuales son más pequeños;

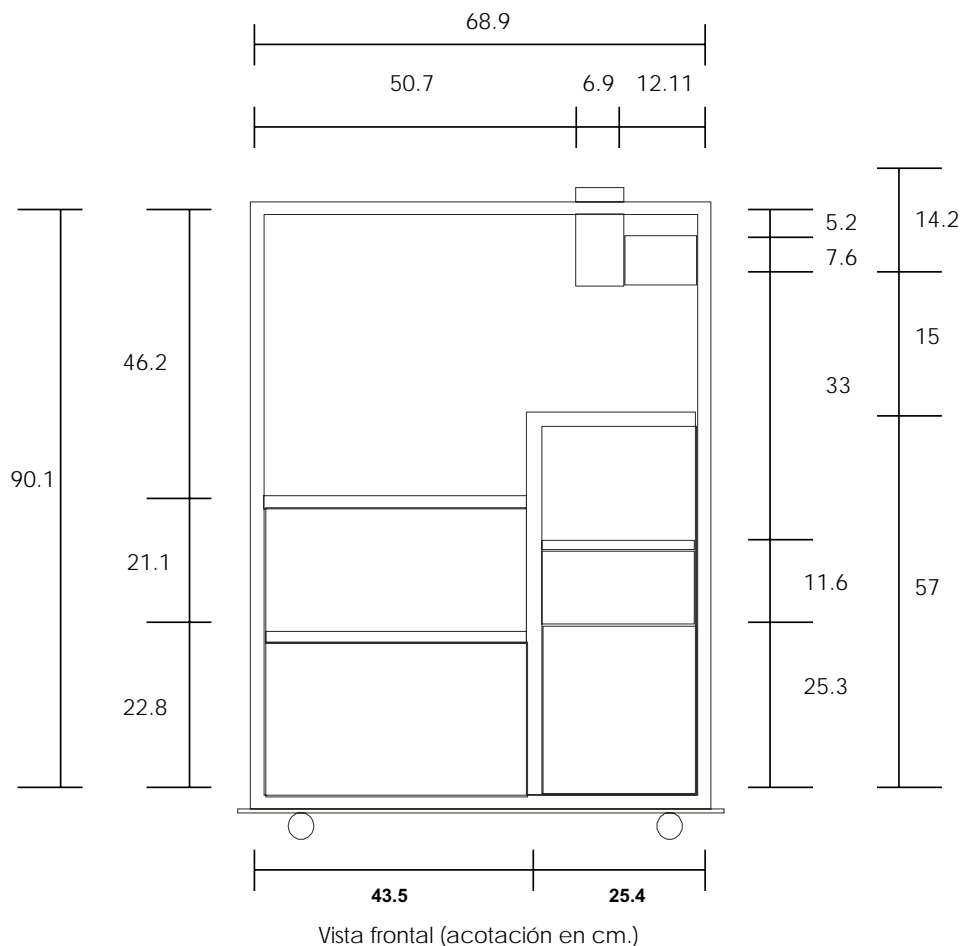


Figura 7. Diagramas de la estación

sin embargo, se observa que esta estructura está diseñada para contener todos los instrumentos necesarios.

Cerrando la estructura, se encuentran láminas de acero inoxidable en tres de los cuatro lados del biorreactor. Las láminas de acero inoxidable, fueron lijadas y pintadas para una mejor presentación. Dentro de la estructura, se colocaron ángulos de acero para soportar la instrumentación del biorreactor, así como el tanque y el motor, los cuales fueron soldados.

En la parte inferior, se colocó una tabla de madera tipo triplay de 5 mm de espesor, la cual fue sellada para volverlo impermeable, debido a que en un biorreactor se manejan líquidos que fácilmente pueden derramarse. En esta tabla se colocaron 4 ruedas que nos permiten transportar la estructura. La estructura final, contiene tanto los componentes básicos, como la instrumentación de un biorreactor.

En el biorreactor, para colocar el sustrato y el organismo a fermentar, se cuentan con dos tan-

ques de vidrio borosilicato (PIREX), de uno y tres litros de capacidad. Dichos tanques tienen una doble camisa para circulación de agua con entrada y salida. La tapa, la flecha y el agitador están fabricados de acero inoxidable. La tapa cuenta con orificios de entrada para los diversos sensores. El agitador con el que cuenta el sistema es una turbina de disco de aspas planas, la cual provee un flujo tangencial o radial, y está diseñado cuando se tiene una viscosidad menor a cinco².

Circuitos de alimentación de los instrumentos

Se diseñaron dos circuitos de alimentación para los diversos instrumentos del biorreactor –variable y constante- tomando en cuenta las características y necesidades de voltaje y corriente de cada uno.

La fuente de alimentación variable consta básicamente de cuatro etapas. La primera es la toma de corriente alterna que será la base de la alimen-

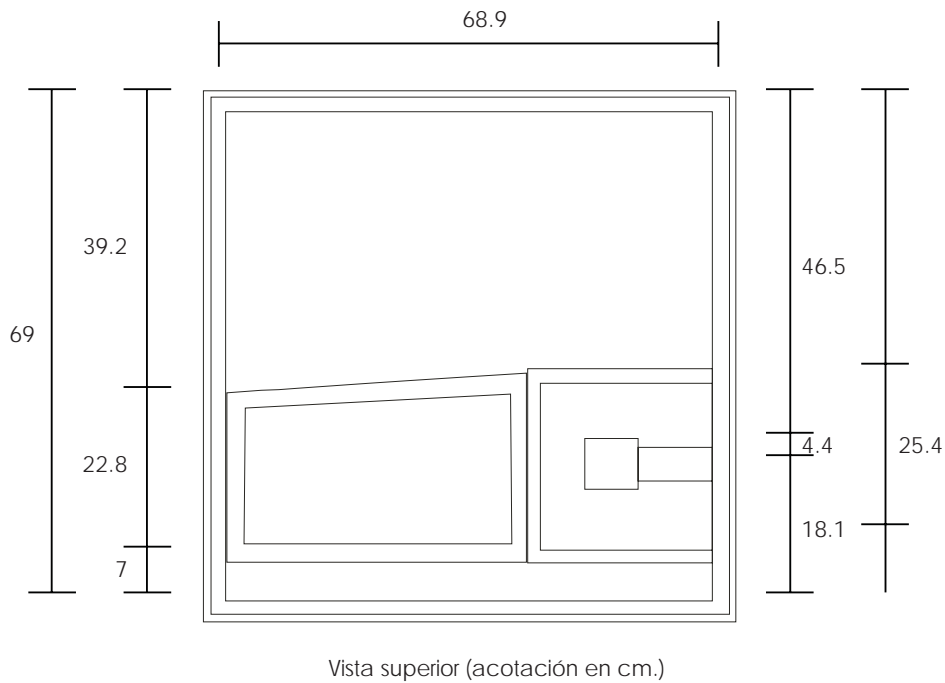


Figura 7a. Diagramas de la estación

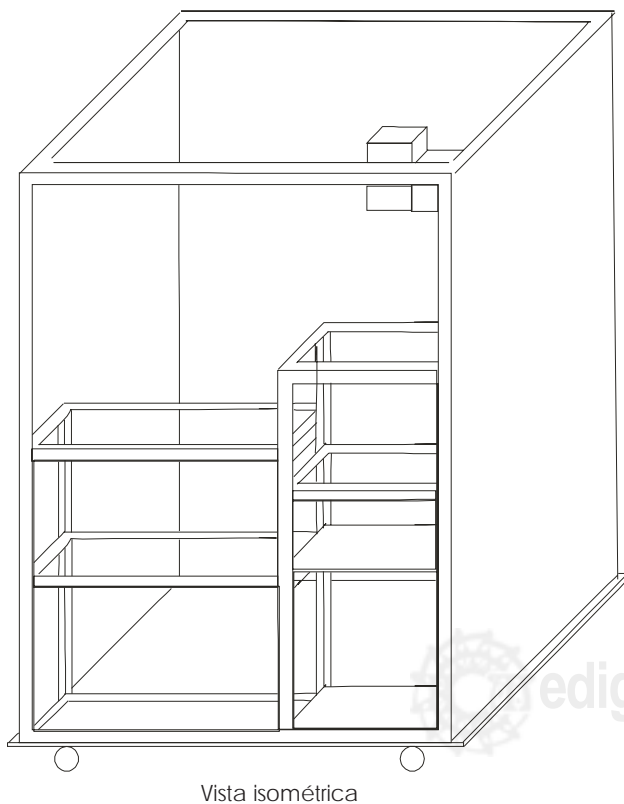


Figura 7b. Diagramas de la estación

tación de nuestro circuito, después de haber alimentado el circuito, se pasa a la etapa de rectificación de la señal obteniendo a la salida 24 volts. En la siguiente etapa se presenta la amplificación de corriente, que será entregada a la etapa de regulación por medio del circuito integrado LM723 que nos entrega una corriente de máximo 2 amperes y conjuntamente un voltaje que podrá ser variado (de 0 a 24 volts) por un divisor de voltaje que nos proporcione la salida deseada.

En esta etapa se muestra que al circuito eléctrico, conformado en su entrada por un transformador reductor a 24 volts, le sigue un puente de diodos que soporta una corriente de 2 amperes y un capacitor de $4700\mu\text{F}$ a 50 volts que se encargan de la rectificación de la señal reducida, en la siguiente etapa se presenta una amplificación de corriente generada por transistor tipo PNP de potencia 3055, este dispositivo tiene una protección por medio de un diodo interno que no permite el paso de corrientes inversas, además de una resistencia limitadora de corriente.

Al término de la etapa de potencia, la corriente se divide, entrando una parte al regulador LM723, este factor de división es generado por la cantidad de corriente que es capaz de soportar el regulador. El regulador entrega a la salida una corriente máxima de 200 mA y un voltaje regulado que va desde 0 a 24 volts. Aunado a esta salida se suma la corriente de reforzamiento, esta corriente

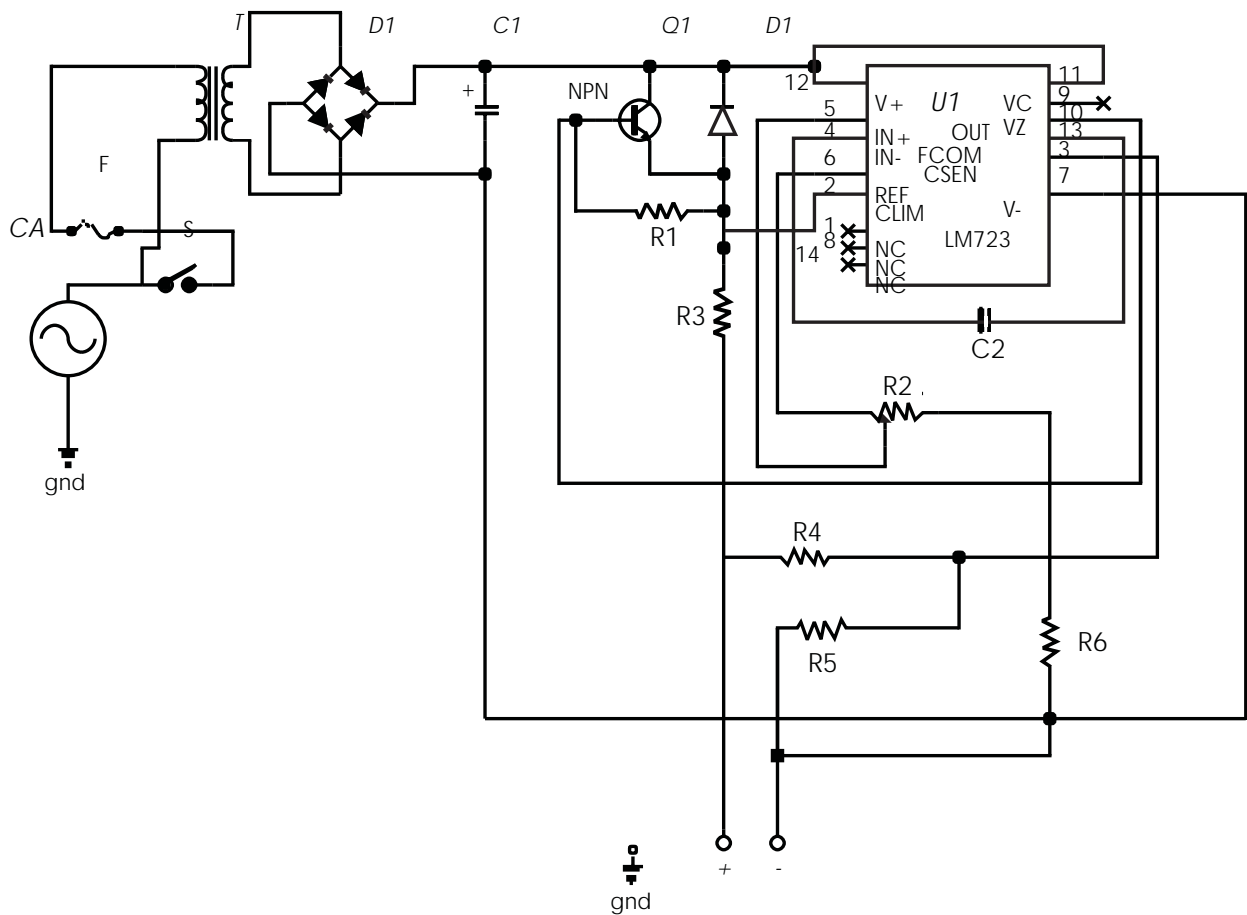


Figura 8. Alimentación variable.

proviene del divisor producido a la entrada del regulador. Esta suma de corriente nos da como resultado una salida de 2 Amperes, con un voltaje regulado al valor que nos proporcione el divisor de voltaje. Esta variación puede ser modificada por una resistencia variable (potenciómetro de $5K\Omega$) que es parte del divisor con la cual se realizan las variaciones de voltaje de salida que se necesiten. Cabe mencionar que la variación de velocidad del motor es generada por los cambios en voltaje de la alimentación del motor (Figura 8).

El sistema de alimentación fija (Figura 9) presenta un arreglo sencillo, ya que este utiliza una variedad de reguladores de voltaje, para el caso de una salida de 5 volts, se utiliza el LM7805 y para el caso de -5 volts se utiliza el regulador LM7905 y cada salida de voltaje utiliza un regulador en especial que más adelante serán especificados. En su primer etapa este circuito es alimentado por una corriente alterna de 127 V, siguiendo la etapa de rectificación por medio de puentes de diodos ca-

paces de soportar una corriente de 2 amperes, para la obtención de una corriente directa de 24 volts que será entregada a la etapa de regulación, esta etapa presenta una regulación negativa y una positiva, en cada caso por su regulador en específico, para esto se tiene un arreglo diferente en la etapa de alimentación y rectificación que se podrá observar en el diagrama eléctrico. Este arreglo es utilizado debido a que en la instrumentación del biorreactor es necesaria la alimentación positiva tanto como la negativa.

Como la fuente de alimentación es fija y se necesitan voltajes diferentes a la vez, la regulación se lleva a cabo por diferentes circuitos integrados (reguladores de voltaje) que operan al mismo tiempo entregando los voltajes requeridos (5, -5 , 12, -12 , 15, -15 volts) que serán entregados a la etapa de salida.

En el diagrama eléctrico se puede observar que se presenta un arreglo en paralelo de dos transformadores reductores a 24 volts y una corriente de

500 mA, los cuales nos entregan un voltaje para ser rectificado por dos puentes de diodos (W002 capaces de soportar una corriente máxima de 2 amperes). Cada puente de diodos nos entrega un voltaje positivo de 24 volts que es utilizado por dos reguladores al mismo tiempo, de igual manera nos entrega un voltaje negativo de -24 volts por cada puente de diodos. En el arreglo de los transformadores, una de las derivaciones laterales es tomada como común, para ser tomada por todos los reguladores, esto es, cada regulador toma el común y una alimentación positiva o negativa proveniente de uno de los dos puentes de diodos y entrega el voltaje a la salida.

En la regulación positiva utilizamos el circuito integrado LM7824 para una salida de 24 volts, el LM7815 para una salida de 15 volts, el LM7812 para 12 volts, y el LM7805 para 5 volts. En la regulación

negativa se utilizó el circuito LM7924 para una salida de -24 volts, el LM7915 para una salida de -15 volts, el LM7912 para -12 volts y el LM7905 para la salida de -5 volts.

Motor

El motor utilizado para la agitación del cultivo es de corriente directa, el cual fue adaptado tomando en cuenta las características de espacio disponible y agitación. Estos motores no presentan variación en la velocidad ni variaciones de voltaje, y su consumo de corriente es bajo (Figura 10).

Con este motor las mediciones obtenidas de las fermentaciones se pueden considerar que están bajo las mismas condiciones de velocidad de agitación, esta agitación se aplica aproximadamente desde 150 rpm que se mantienen constantes

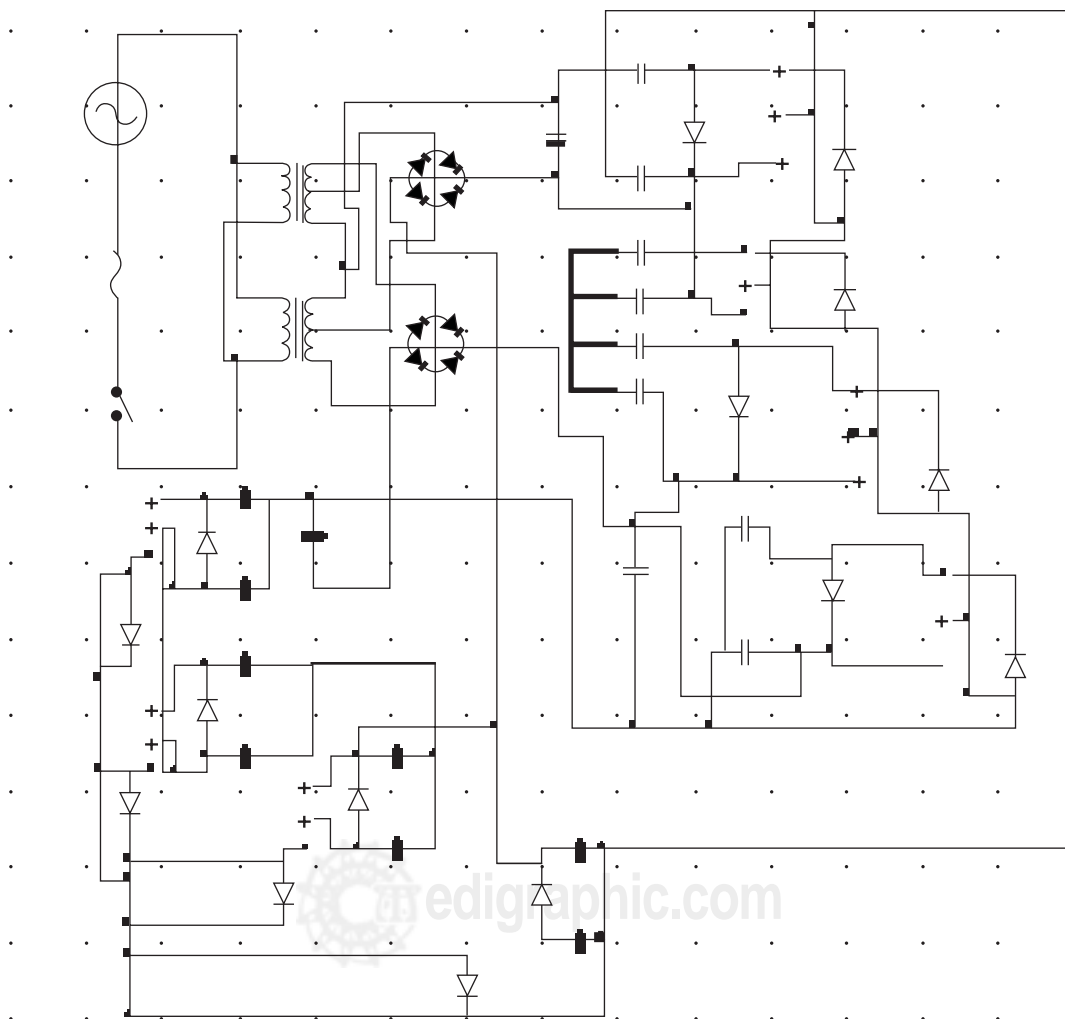


Figura 9. Alimentación fija.

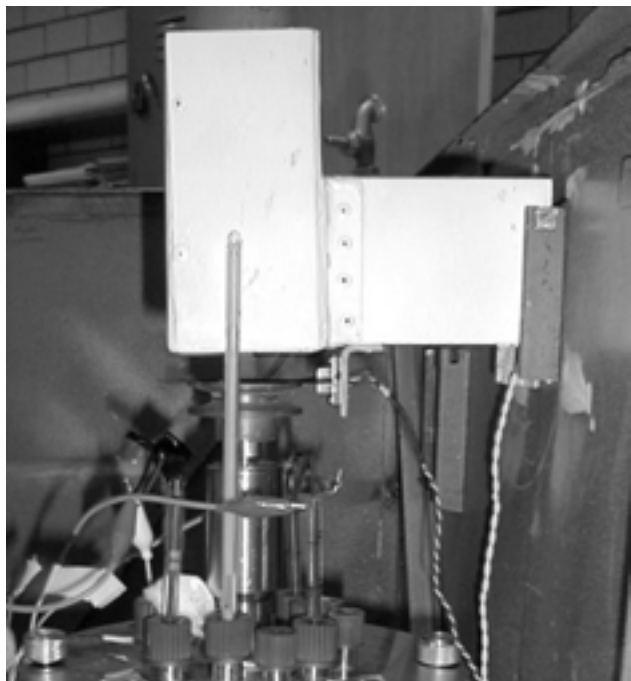


Figura 10. Motor de corriente continua

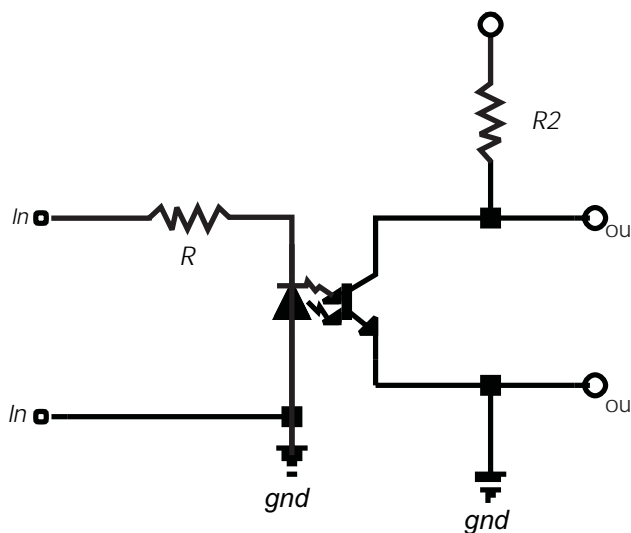


Figura 11. Etapa de sensado.

hasta un valor de 600 rpm que es el límite máximo de agitación.

Para la instalación del motor, se diseñó una base de 15 cm de largo por 20 de ancho y 7 cm de profundidad, colocado en la parte superior de la flecha del biorreactor haciéndola girar al unirla con la flecha del motor, eliminando así la necesidad de la banda y a su vez proporcionando una me-

nor potencia para la realización de este trabajo. Asimismo, se diseñó el control de velocidad basado en una fuente variable de corriente directa, que varía de 0 a 24 volts, con la cual obtenemos los voltajes necesarios para generar las velocidades necesarias para la agitación del biorreactor.

Tacómetro

El tacómetro diseñado para el tanque agitado del biorreactor prototipo está diseñado para trabajar a frecuencias entre 0 y 33.33 Hz (de 0 a 2000 rpm). Dicho diseño consta de varias etapas. La primera etapa es la de sensado (Figura 11). Se utilizó un circuito integrado ITR 1180, el cual es un interruptor óptico con salida de modo transistor. Internamente, es un diodo emisor infrarrojo, el cual está colocado frente a un fototransistor de silicón NPN en un molde de plástico. Una ranura en el montaje entre el emisor y el detector nos provee los medios para interrumpir mecánicamente el haz infrarrojo. Trabaja con una corriente de colector de 5 mA, con un voltaje de entrada de 5 volts. El voltaje de saturación es de 1.8mA¹¹. Este dispositivo nos entrega una señal cuadrada con una frecuencia relativa a las revoluciones por minuto de velocidad del motor. Para obtener esta señal, se colocó un disco en el eje con una ranura, la cual permite el paso de luz por el optointerruptor obteniendo así un tren de pulsos.

En la siguiente etapa se trata la señal invirtiéndola y amplificándola. La inversión es requerida puesto que el optointerruptor, mientras se interrumpe el haz, nos entrega una señal de nivel alto, al dejar pasar el haz infrarrojo, tenemos un nivel bajo. De esta manera, el tren de pulsos es adecuado para mandarlo a la etapa de conversión. Se amplifica la señal debido a que a la salida tiene un valor de voltaje muy pequeño, y la siguiente etapa requiere de una señal de voltaje mayor.

En la etapa final (Figura 12), comúnmente se elegiría un circuito contador de pulsos; sin embargo, se eligió un CI LM2917, el cual es un convertidor de frecuencia a voltaje¹², cuya aplicación más importante es la construcción de tacómetros. La mayoría de los circuitos convertidores de frecuencia a voltaje requieren de un gran número de componentes adicionales para poder ser utilizados en la construcción de circuitos. En cambio, el circuito LM2917, tiene todos los elementos necesarios para su funcionamiento, y de esta manera, sólo necesita un número mínimo de componentes externos.

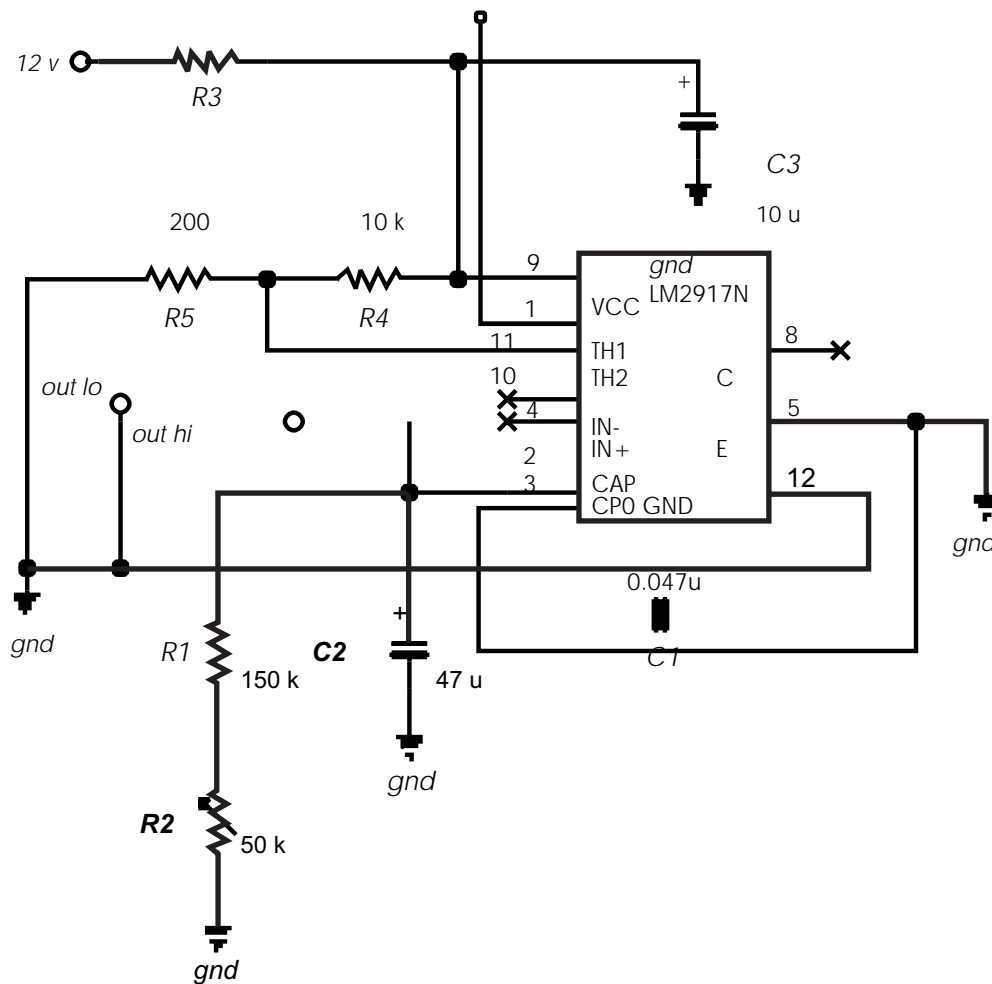


Figura 12. Etapa de conversión de frecuencia a voltaje.

Este circuito tiene tres componentes básicos: un amplificador de entrada con histéresis incluida, un convertidor de frecuencia a voltaje de "bomba de carga", y un amplificador operacional comparador con un transistor de salida. Además, cuenta con un diodo zener que cumple la función de regulación. El amplificador de entrada tiene una histéresis a $\pm 15\text{mv}$, la cual provee un switcheo limpio donde se presente ruido en la señal de entrada, y nos permite un rechazo total del ruido debajo de la amplitud donde no hay señal de entrada.

La bomba de carga, convierte la frecuencia de entrada en voltaje de corriente directa. Para ello se requiere de un capacitor, una resistencia de salida y un capacitor integrativo. Cuando el estado de entrada cambia, el capacitor se carga o se descarga linealmente entre dos voltajes cuya diferencia es $V_{CC}/2$. Entonces, en la mitad de un ciclo de la frecuencia de entrada o en un tiempo

igual a $\frac{1}{2} f_{in}$ el cambio en la carga del capacitor es igual a $V_{CC}/2 * C$. La cantidad promedio de corriente bombeada hacia o desde el capacitor es igual a:

$$i_{c(AVG)} = C_1 \frac{V_{CC}}{2} 2f_{IN} \quad (1)$$

El capacitor integrativo depende solamente de la cantidad de voltaje de rizo permitible y el tiempo de respuesta requerida.

Sistema de recirculación

En nuestro caso, el vaso cuenta con una doble camisa la cual permite el reflujos de agua a diferentes temperaturas, para el mantenimiento de la temperatura deseada. El contenedor de agua está fabricado de polipropileno, en el cual se coloca la resistencia, bomba de reflujos, el sensor de nivel, sistema de desagüe.

La tubería que conecta al contenedor con la camisa del vaso del biorreactor, está constituida por tubería de PVC en una parte y el complemento es de manguera de látex. La primera parte es rígida, ya que no se necesita movimiento, además de ser una opción más factible hacia el colocado y fijado, la segunda parte de la tubería se instaló de hule látex ya que las uniones necesitan mayor movilidad para el enroscado.

Para la distribución de agua a través de las tuberías y vaso, se utiliza una bomba de reflujo, la cual nos proporciona la fuerza necesaria para cu-

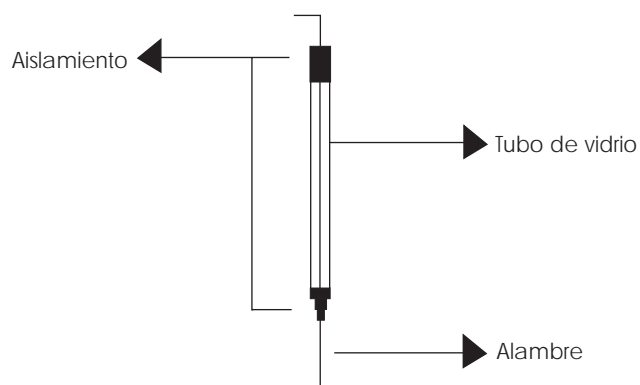


Figura 13. Sensor de impedancia.



Figura 14. Estación del biorreactor.

brir la necesidad de proporcionar temperatura al cultivo. En el interior del tanque contenedor de agua, se localiza el sensor de nivel, el cual fue diseñado con un tubo de PVC y conductores que nos indican el nivel de agua. La detección de nivel de este sensor se da al alcanzar el nivel de agua a alguno de los conductores, el agua se comporta como un electrolítico, generando continuidad que se podrá observar en unos diodos emisores de luz (LED's), los cuales están acomodados de tal forma que indiquen un nivel alto, medio o bajo. La comparación del nivel de agua se realiza con respecto al nivel mínimo de agua con que puede trabajar la bomba de reflujo, cabe mencionar que este tipo de bombas al trabajar sin la mínima cantidad de agua pueden sufrir daños y hasta quemarse, y el nivel máximo es considerado por la cantidad máxima de agua que se puede calentar en un tiempo determinado (10 min), nuestro cálculo es de aproximadamente 5 litros, y un flujo de 4.33 litros por minuto, con los que se cumplen los dos requerimientos para un óptimo trabajo de nuestro sistema de reflujo.

Sensores de impedancia

Para la medición de la impedancia en el medio de cultivo, se utilizaron electrodos cuyo diseño consta de un alambre de aleación cobalto-titanio con un recubrimiento de vidrio pirex. Estos electrodos se colocan en el tanque del biorreactor con una disposición geométrica distanciados 8 cm y se conectan al equipo de medición de impedancia (Figura 13).

RESULTADOS

Estación

La estación construida contiene la instrumentación necesaria para que se lleve a cabo la fermentación además de incluir al motor y al tanque donde se adiciona el medio (Figura 14).

Motor

El sistema de alimentación variable nos entrega un voltaje de cero hasta 24 volts para la alimentación del motor. Este sistema no presenta variaciones de voltaje que afecten el crecimiento de los microorganismos, obteniendo resultados satisfactorios en la aplicación de este sistema. El motor se conecta a la flecha del tanque de manera directa.

Velocidad del motor

El sistema de alimentación variable nos entrega un voltaje de cero hasta 24 volts para la alimentación del motor encargado del giro de la flecha del vaso del biorreactor y de la agitación del sistema. Este sistema no presenta variaciones de voltaje que nos afecten el crecimiento de los microorganismos. Obteniendo resultados satisfactorios en la aplicación de este sistema. El sistema de alimentación constante nos entrega los voltajes utilizados por los circuitos de sensado y control de las variables de biorreactor como son el tacómetro digital, entre otros.

Tacómetro

El tacómetro diseñado nos permite conocer las revoluciones por minuto que nos genera el motor de corriente directa en un rango de 0 a 2000 rpm. El rango que sensa es muy amplio, debido a las características del circuito integrado LM2917 utilizado.

Para conocer el comportamiento de este circuito, así como para conocer el nivel de voltaje correspondiente a cada frecuencia, se realizó la caracterización a las condiciones de uso del tacómetro, dentro del biorreactor (Cuadro 3).

La curva de caracterización del tacómetro nos muestra el comportamiento claramente lineal y el coeficiente de correlación calculado es de 0.998 (Figura 15); dicho comportamiento nos permite aseverar que se tiene un control preciso de la velocidad de agitación del cultivo, y que, por lo tanto no afecta de manera negativa al crecimiento

Cuadro 3. Caracterización del tacómetro digital.

| Frecuencia de entrada (Hz) | Velocidad (rpm) | Voltaje de salida (v) |
|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| 0.238 | 1428 | 0.048 |
| 7.518 | 451.12 | 0.4 |
| 7.96 | 477.64 | 0.56 |
| 9.2 | 552.05 | 0.61 |
| 11.87 | 712.27 | 0.76 |
| 13.62 | 817.28 | 0.84 |
| 14.35 | 861.08 | 0.9 |
| 17.33 | 1039.90 | 1 |
| 19.76 | 1185.71 | 1.1 |
| 23.52 | 1411.34 | 1.4 |
| 26.1 | 1566.15 | 1.5 |
| 30.21 | 1812.78 | 1.6 |
| 35.33 | 2120.01 | 1.8 |

del microorganismo sino que provee de una homogeneización de todos los nutrientes y oxígeno en el cultivo.

Sistema de circulación de agua

Se diseñó el sistema de circulación de agua a través de la camisa del tanque del biorreactor el cual tiene la finalidad de mantener una temperatura óptima para nuestro cultivo. El agua en el conte-

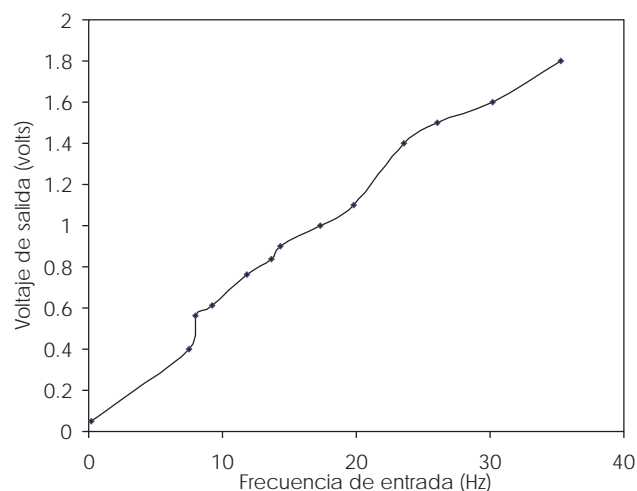


Figura 15. Curva de caracterización del tacómetro

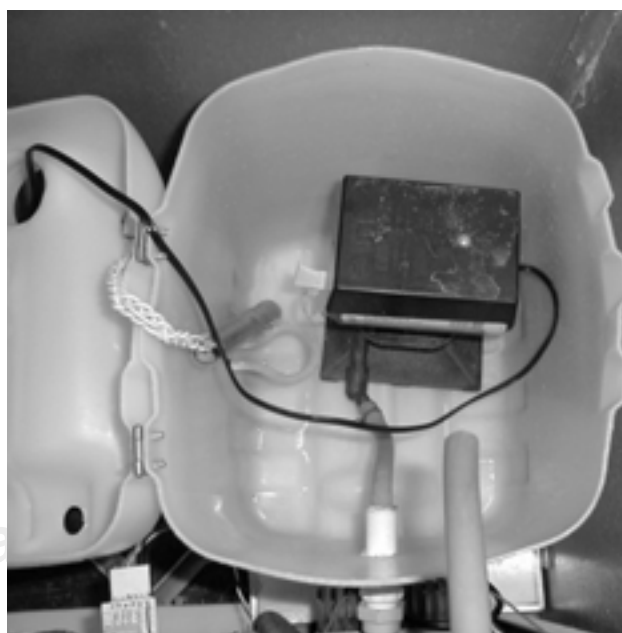


Figura 16. Contenedor y tomas del sistema de reflujos de agua.

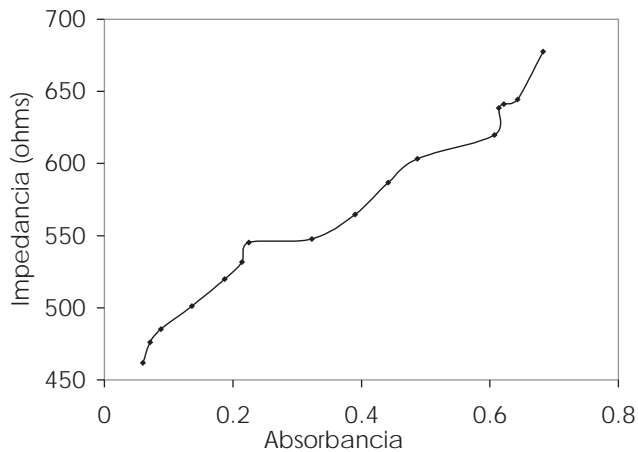


Figura 17. Comparación entre absorbancia e impedancia.

nedor se calienta por medio de una resistencia con alimentación de línea para ser impulsada hasta la entrada inferior de la camisa del biorreactor por medio de una bomba y que posteriormente retorne al contenedor. (Figura 16).

Sensor de temperatura

Se diseñó un circuito que se basa en la lectura de un sensor (circuito LM35). El LM35 es un circuito capaz de entregarnos un voltaje de 10 mV por grado centígrado, el sensor se caracteriza con respecto a termómetros de mercurio y a un termocouple. El comportamiento que presenta el sensor es lineal por lo que podemos decir que este dispositivo es confiable en la medición.

Tomando como referencia el valor obtenido del sensor de temperatura, éste se introduce en un circuito comparador, el cual se encargará de controlar los valores bajos y altos de temperatura.

Sensor de impedancia

Se realizaron fermentaciones en un medio mínimo -malta-levadura, glucosa y minerales con el microorganismo *Saccharomyces cerevisiae*. Las fermentaciones se realizaron en el biorreactor prototipo con el fin de validar el método impedanciométrico utilizado. En la evolución de la impedancia (Figura 17) se observa un aumento

de la impedancia con el tiempo con una tendencia básicamente lineal. Se compararon estos resultados con muestras de absorbancia obteniendo una relación lineal (coeficiente de correlación de 0.98).

CONCLUSIONES

Se diseñó y construyó un prototipo de biorreactor para fines experimentales en donde se desarrolló la instrumentación elemental para las mediciones de temperatura, nivel, velocidad de agitación, biomasa; con dispositivos adecuados y reemplazables con facilidad que además cuentan con características de precisión aceptables en comparación con los equipos comerciales. Se empleó una nueva técnica para la medición de biomasa de menor costo y mayor accesibilidad, la cual se realiza en línea evitando retrasos en el tiempo de muestreo y que mostró resultados satisfactorios. La importancia de todo esto radica en que nos permite utilizar medios electrónicos accesibles para el sensado de las variables implicadas en los procesos biotecnológicos de una manera rápida y económica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stanier R, Adelberg E, Ingraham J. General Microbiology. MacMillan Press LTD. [Great Britain], 1977.
2. Ward OP. Biotecnología de la Fermentación. Acribia. [España], 1991.
3. Schügerl K. Bioreaction Engineering. Vol. 2. John Wiley and Sons. [Great Britain], 1990.
4. McNeil B, Harvey LM. Fermentation: a practical approach. In: Laboratory Fermenters. IRL press. Oxford University, 1990.
5. Bailey JE. Biochemical Engineering Fundamentals. Second edition. McGraw-Hill. [Singapore], 1986.
6. Geddes LA, Baker LE. Principles of applied biomedical instrumentation. John Wiley & Sons. [New York], 1989.
7. Schügerl, "Biotechnology", Vol. 4.
8. Felice C. Microbiología de Impedancia, Tesis de doctorado. [Argentina], 1992.
9. Richards JCS, Jason AC, Hobbs G, Gibson DM, Christie RH. Electronic measurement of bacterial growth. Journal of Physics E. 11: 560-568.
10. Lobosco O, Dias J. Selección y aplicación de motores eléctricos. Siemens Aktiengesellschaft. Marcombo. [Barcelona], 1989.
11. Motorola Optoelectronics Device Data. Motorola. [U.S.A.], 1989.
12. National Semiconductor Linear Applications Handbook. National Semiconductor. [USA], 1986.