

Medición en línea de pH, Temperatura y Agitación de medio de cultivo en fermentación utilizando *Saccharomyces cerevisiae*

Aldo Hernández, María Ramírez, Antonio Arízaga, Oscar Flores y Huitzil Ignacio

A. Hernández, M. Ramírez, A. Arízaga, O. Flores, I. Huitzil
Universidad Politécnica de Amozoc, Calle ampliación Luis Oropeza No. 5202, col. San Andrés las vegas
C.P. 72980
aldo.hernandez@upamozoc.edu.mx

M. Ramos., V.Aguilera., (eds.) .Ciencias de la Ingeniería y Tecnología, Handbook -©ECORFAN- Valle de Santiago, Guanajuato, 2014.

Abstract

The bioreactors are containers in which biochemical reactions can be performed, using microorganisms, enzymes, plant cells or animal cells. Its function is to provide a controlled environment to carry out the reactions in the best condition and thus transform substrates and synthesize products with high yields. In most commercial bioreactors, the control of parameters is carried out manually and the measurement of such data is not stored, the cost will increase with the increase of devices to control the parameters, for online data acquisition, their storage and graphing. In this work a system for measuring and controlling the operating parameters was developed as well as acquisition of online data, storage and graphing. The measured parameters were pH and temperature; the controlled parameters were pH and stirring speed. The transducers for these tasks were studied. The development of this system was less expensive than a commercial bioreactor and provides greater flexibility, for example the fed-batch culture can be performed.

17 Introducción

El cultivo de microorganismos en biorreactores para la obtención de productos de interés industrial, se inicia en la segunda guerra mundial con los antibióticos (Ramírez 2004). Desde entonces hasta la fecha se han obtenido una gran cantidad de productos utilizando no solo microorganismos sino también células vegetales y animales, entre otros. En la Tabla 1.1 se observan los productos principales obtenidos por fermentación que van desde biomasa hasta diversos metabolitos (Quintero Ramírez 1998). Familiarizado con el término de control de proceso está el término de automatización que es usado para describir la operación automática, en años recientes la automatización ha sido utilizada en la manufactura moderna de productos, operando de manera automática las máquinas, es decir, con la mínima interacción del humano (Bolton 2002).

Las técnicas de control también son utilizadas para los procesos biológicos, mejor conocidos como bioprocesos. Las principales preocupaciones en la industria de los bioprocesos es poder controlar el proceso manteniendo las condiciones de la reacción biológica en todo el medio de cultivo. Una de las tareas más importantes en los bioprocesos actuales es el sensado de los distintos parámetros de operación como son: pH, temperatura y oxígeno disuelto.

Estos parámetros son esenciales para el crecimiento celular y la producción de un determinado metabolito como consecuencia del metabolismo propio de la célula. Además de los parámetros de operación, también se requiere monitorear el comportamiento del crecimiento y la producción, ésta es una de las tareas más complicadas a realizar, dado que cada metabolito y célula son distintos y sería necesario contar con un sensor específico para cada uno de éstos (Nielsen y col. 1994).

Tabla 17 Principales productos de fermentación

Tipo	Producto de fermentación
Ácidos orgánicos	Acético, cítrico, fumárico, glucónico, láctico
Aminoácidos	Glutamato de sodio, L-lisina, DL-metionina, L-triptofano, L-valina
Antibióticos	Estreptomicina, penicilina, tetraciclina, neomicina, bacitracina
Esteroides	Cortisona, hidrocortisona, prednisolona, testosterona, triamcinolona
Alcoholes y solventes	Butanodiol-2,3, Acetona, butanol, etanol, glicerol
Proteína unicelular	Algas, bacterias, levaduras, hongos
Vitaminas	Ácido ascórbico, cianocobalamina, B-caroteno, rivo flavina
Otros	Alcaloides, enzimas, insecticidas biológicos, metano, nucleótidos (saborizantes), polisacáridos, promotores de crecimiento, recuperación de minerales (Fe, Cu, Pb, Zn, etc.)

La mejora del proceso se ha llevado a cabo estudiando las condiciones de operación y nutrición, los tipos de reactores y sobretodo los sistemas de cultivo, la figura 1 muestra un esquema general de lo que implica instrumentar un biorreactor. Aunado a la instrumentación es necesaria la elección de un sistema de cultivo depende del metabolismo de crecimiento y producción del microorganismo, por ejemplo muchos metabolitos se producen en condiciones de limitación o de exceso de nutrientes. Tal es el caso de biopolímeros, alcoholes y ácidos orgánicos.

Por ejemplo, estudios en bacterias productoras de polisacáridos como *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Klebsiella* mostraron que la producción del biopolímero se ve favorecida por la limitación de elementos nutritivos como nitrógeno, fósforo o azufre (Farres y col. 1997, Peiris y col. 1998) y a su vez se observó que las sustancias producidas en el medio de cultivo limitan el crecimiento celular y a su vez se ve afectada la producción de algún metabolito. Las condiciones de limitación o exceso de sustrato pueden imponerse utilizando diferentes tipos de cultivo, de esta manera se tiene la alternativa de manipular el comportamiento del microorganismo mediante la adición adecuada de sustratos limitantes.

Figura 17 Diagrama a bloques del proceso de fermentación

17.1 Materiales y métodos

Para la medición de los parámetros pH, temperatura y velocidad de agitación se utilizó un biorreactor de 4 litros construido de vidrio y acero inoxidable con la capacidad de manejar distintos modos de operación, como los son el lote, lotea alimentado y cultivo lote alimentado continuo, además este biorreactor cuenta con puertos de entrada para adquirir muestras e ingresar los diferentes electrodos para la medición de los diferentes parámetros de operación.

Medición de pH (potencial de Hidrógeno)

El pH dentro de una fermentación es uno de los parámetros más comúnmente medidos, ya que las células durante la fermentación producen ácidos como producto de su propio metabolismo.

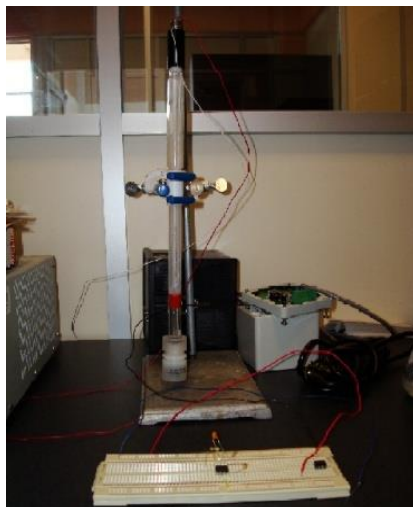
Por lo cual para generar el mayor crecimiento celular depende altamente del pH. Para medir el potencial de hidrógeno (pH) es necesario contar con un transductor adecuado que pueda ser capaz de ofrecer una señal eléctrica como un nivel de voltaje a partir de la señal física que se desea medir, como lo es el pH, y uno de estos transductores es el electrodo de vidrio.

Los electrodos de vidrio son “instrumentos de lectura directa”, leyéndose el pH de la disolución donde se introduce el electrodo de vidrio en una escala con unidades de pH, la cual se gradúa con valores de pH de referencia, suministrados por disoluciones tampón estándar. Por tanto, la determinación del pH de una disolución con este instrumento no requiere cálculos, pero debe tenerse en cuenta que:

- a) El instrumento mide actividades del ion H^+ ;
- b) Debido a las restricciones propias de la composición química de las membranas de vidrio normales, los instrumentos de electrodo de vidrio pueden usarse solamente en un margen de valores de pH de 1 a 10;
- c) La membrana de vidrio debe mantenerse limpia; cuando se use para determinar el pH de extractos celulares, etc., se debe tener mucho cuidado en no permitir la desecación de una película de proteína en su superficie.

Un medidor de pH, mide en realidad una diferencia de potencial entre el llamado electrodo de referencia y un electrodo de vidrio.

El electrodo de vidrio consiste en esencia en una membrana selectivamente permeable a los hidrogeniones (Douglas y col. 2001, Creus 2006). En la figura 2.1 se muestra el electrodo de pH.

Figura 17.1 Electrodo de vidrio para medir pH

La Tabla muestra las mediciones con las sustancias buffer de pH, estas mediciones se realizaron utilizando un electrodo de pH de vidrio marca Conductronic, las lecturas de voltaje con sustancias buffer de pH conocido son en el orden de milivolts, pero amplificados posteriormente a la salida del electrodo por un amplificador operacional.

Tabla 17.1 Voltajes obtenidos con sustancias buffer y amplificadas

pH Buffer	Voltaje con amplificación (V)
4	4.32
7	0.33
10	-3.55

Con los datos obtenidos se pretende conocer que voltajes serán medidos con cualquier sustancia de pH desconocido, una buena aproximación a partir de la información obtenida mostrada en la tabla es construir un polinomio de interpolación usando el método de Interpolación de Lagrange, y de éste modo obtener un polinomio que represente la relación voltaje-pH que es necesaria para ofrecer una medición durante el proceso de fermentación para el usuario. El polinomio que se obtuvo a partir de las tres sustancias base es el que se muestra en la ecuación.

$$P(x) = \frac{191}{10000}x^2 - \frac{1943}{2500}x + 7 \quad (17.1)$$

Medición de temperatura

En el campo de la instrumentación, las mediciones de temperatura son de lo más común, sin embargo, si no se emplean las técnicas o los equipos adecuados, estas mediciones pueden ser erróneas.

El termopar es por mucho el sensor de temperatura más usado en la industria por diferentes razones, podemos mencionar entre otras el amplio intervalo de temperatura de uso, su robustez, la relativa buena exactitud, rápida respuesta a cambios de temperatura, versatilidad de uso y bajo costo(Creus 2006).

La medición de temperatura es un parámetro del crecimiento celular muy importante debido a la relación que tiene con la cantidad de oxígeno disuelto en el biorreactor, así como permitir un funcionamiento adecuado en el mismo debido a las reacciones bioquímicas que se suscitan. El cambio de temperatura dentro de un biorreactor se produce debido al metabolismo celular, ya que mientras este se lleva a cabo se libera energía y esto le da condiciones inadecuadas al microorganismo para realizar su metabolismo, durante el análisis de crecimiento celular y producción de producto generalmente no se considera modelar en el balance de energía; es decir el cambio de temperatura, ya que si se mantiene la temperatura constante, puede considerarse despreciable.

La caracterización del termopar en cualquier experimento es fundamental, ya que aunque el fabricante ofrezca ciertas especificaciones, siempre es mejor constatar cada una de ellas, además de que es una tarea importante para obtener un polinomio de interpolación, el cual será utilizado posteriormente en la programación, indispensable para la visualización de la medición realizada (Rowe 1995, Anatyckuk 1998). En la figura 2.1 se muestra el termopar utilizado, el cual es de tipo K.

Figura 17.2 Termopar convencional



Las mediciones adquiridas en un ensayo con agua se muestran en la tabla 2.2, además se utilizó un circuito integrado MAX6675 de Maxim/Dallas Semiconductor es un convertidor analógico-digital para termopares tipo K. Dentro de este pequeño circuito se encuentra la electrónica necesaria para amplificar, compensar y convertir a digital el voltaje generado por el termopar, lo que hace muy sencilla la tarea de conectar un termopar a un microcontrolador, un procedimiento similar al de medir el pH en la sección 2.1

Tabla 17.2 Características de termopares de acuerdo al tipo

T(°C)	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80
V (mV)	0.13	0.36	0.6	0.87	1.15	1.32	1.58	1.85	2.32	2.4	2.61	2.39

Agitación del medio de cultivo

La mezcla de fluidos es un proceso importante en los procesos de fermentación, por lo general el más crítico, dado que es un parámetro importante en las fermentaciones aerobias, sin embargo también es utilizado en los procesos anaerobios.

Los procesos de agitación pueden ser clasificados en dos grupos, el primero es aquel en el que se necesita algún tipo de uniformidad en el medio de cultivo y el segundo es para aquellos en los que se necesite algún tipo de transferencia de masa o reacción química como criterio de operación (Perry y col. 2001)

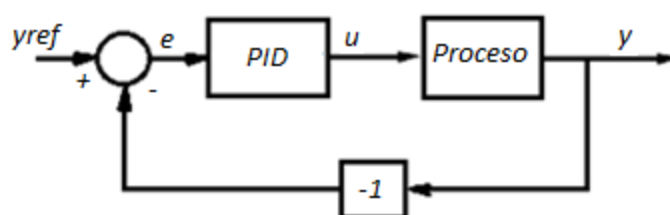
En este contexto la agitación forma parte de los procesos de transferencia de masa, debido a que el oxígeno que es un sustrato importante para el metabolismo en las fermentaciones anaerobias, debe encontrarse disponible para el microorganismo en todo momento.

La agitación permite que el oxígeno se disuelva en el medio de cultivo y así que el tamaño de burbuja sea lo suficientemente pequeño para el consumo del microorganismo y permitir que exista el suficiente oxígeno a lo largo de la fermentación.

La agitación puede llevarse a cabo de distintas maneras, la más utilizada para medios líquidos es por impulsores, los cuales son implementados con motores.

Para controlar la velocidad de un motor de corriente directa es muy común utilizar un controlador PID, ya que este controlador es robusto, estable y económico, además de que está bastante estudiado y ofrece diferentes técnicas de ser implementado. La figura 2.3 muestra el diagrama a bloques de este controlador y la ecuación 2 muestra lo que internamente contiene el bloque PID y su relación con el error generado entre el valor de referencia y el valor de la salida.

Figura 17.3 Estructura general de un controlador PID



$$u(t) = K \left(e(t) + \frac{1}{T_i} \int_0^t e(\tau) d\tau + T_d \frac{de(t)}{dt} \right) \quad (17.2)$$

Donde y_{ref} es la señal de referencia, e es el error u la entrada de control al proceso, y la salida controlada t el tiempo k es la parte proporcional de control.

17.2 Resultados y discusiones

El trabajo posterior al análisis de cada una de las secciones de implementación, es la instrumentación, ya sea física o virtual, dependiendo la complejidad y los costos. La figura muestra la fermentación realizada en laboratorio con *Saccharomyces cerevisiae*, todos los resultados mostrados en esta sección se realizaron con esta fermentación. Como ya se había mencionado, obtener los datos de forma automática es importante. Dentro de la etapa de instrumentación, hay dos formas de obtenerlas, de forma gráfica y en una tabla de datos, la mayoría de las mediciones se realiza de forma gráfica ya que esto es más sencillo de visualizar para el operador, y así verificar si dicho parámetro de operación está dentro del intervalo usual de operación.

Figura 17.4 Fermentación con aditamentos para su funcionamiento

Resultados de pH

La figura 3.2 muestra la curva de interpolación voltaje-pH que fue implementada en un microcontrolador de 32 bits, de acuerdo al polinomio construido en la ecuación 1; mientras que la figura 3.3 muestra los datos tomados en línea y manualmente de pH, durante la fermentación, a partir del metabolito producido por *Saccharomyces cerevisiae*, en esta gráfica se puede observar que la diferencia entre la toma con los dos procedimientos es muy similar, comprobando así la funcionalidad correcta del sistema de medición de pH.

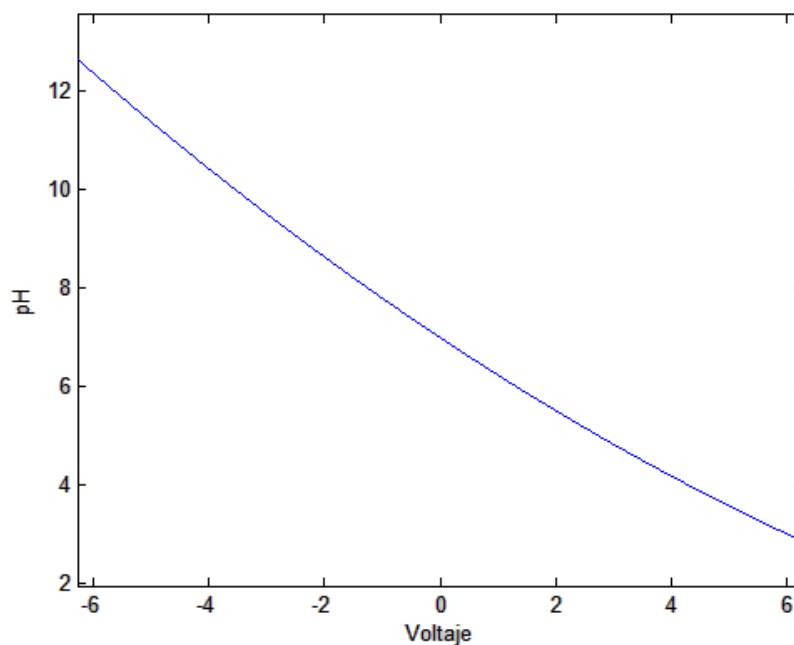
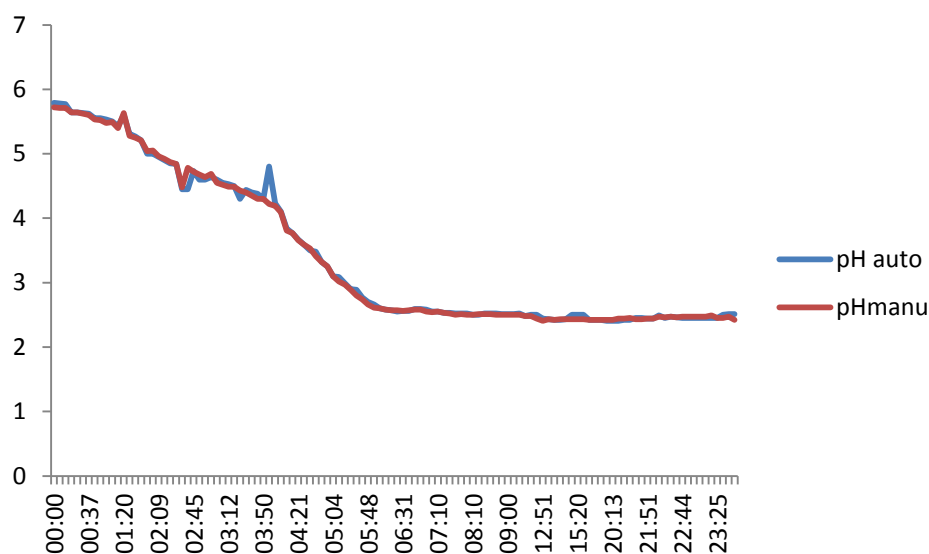
Figura 17.5 Relación Voltaje-pH

Figura 17.6 Comparación de datos de pH, manual y automático

Resultados de Temperatura

La figura 3.4 muestra una gráfica de temperatura en grados centígrados contra voltaje en milivolts. Estas mediciones fueron realizadas con un termopar tipo K. La figura 3.5 muestra la diferencia entre la temperatura medida manualmente y la temperatura medida automáticamente, mostrando así un mínima diferencia entre el sistema comercial de la marca Conducronic. Dicha comparación muestra que el sistema que se realizó en este trabajo es confiable y seguro para la medición a lo largo de una fermentación.

Una de las ventajas de este sistema es que la temperatura se adquiere automáticamente, al igual que se hizo con el pH.

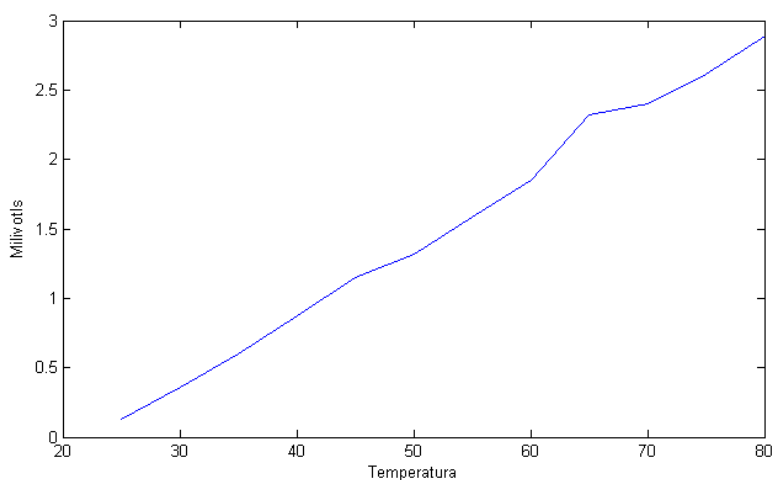
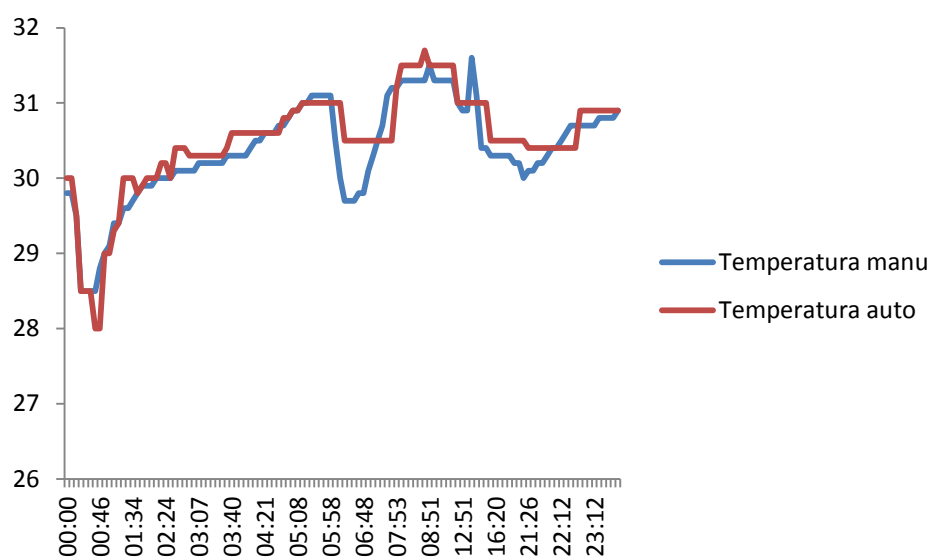
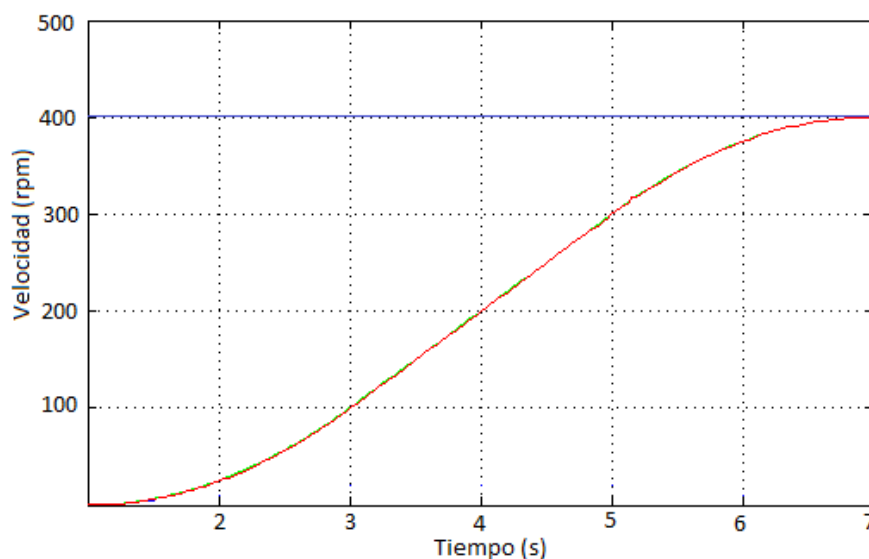
Figura 17.7 Relación temperatura-voltaje

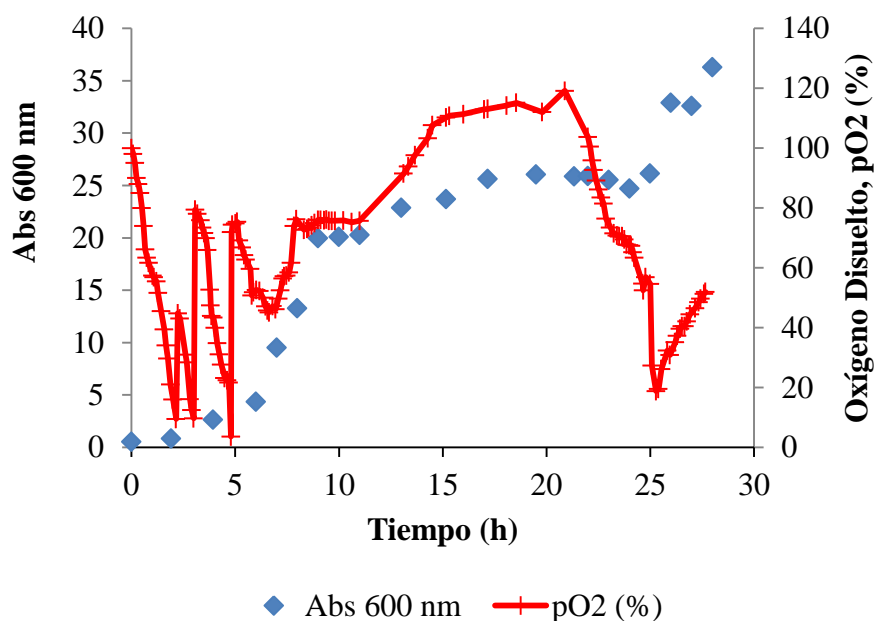
Figura 17.8 Comparación de datos de Temperatura, manual y automático

Resultados de Velocidad de Agitación

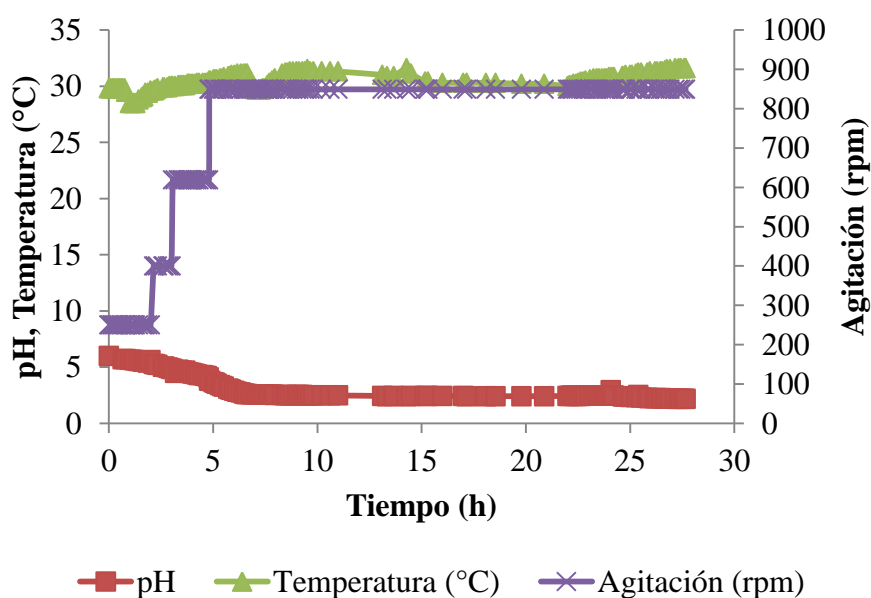
La simulación del medio de cultivo está en función de la velocidad de un motor de corriente continua, y así aumentar la aireación en el medio de cultivo; la cantidad de oxígeno disuelto se puede ver en la medición de oxígeno disuelto en medio de cultivo. La figura muestra la simulación de la velocidad del motor utilizando la ley de control PID (Astrom y Hagglund 1995).

Figura 17.9 Velocidad de agitación en medio de cultivo

La gráfica de la figura muestra el consumo de oxígeno disuelto, durante las primeras 21 horas la fermentación corrió en cultivo lote, a partir de la hora 21 se empezó el cultivo lote alimentado, la gráfica muestra como hasta antes de agregar sustrato limitante al reactor no había consumo de oxígeno, mostrando así que el metabolismo celular se encontraba estancado en cuanto a crecimiento celular, y esto debe observarse en el crecimiento celular, es decir en la producción de biomasa.

Figura 17.10 Análisis simultaneo de los parámetros de operación

La gráfica de la figura muestra el comportamiento de los parámetros de operación en la fermentación, los cuales son, pH, temperatura y agitación, cada uno analizado por separado no ofrece mucha información del comportamiento del sistema el cual es el cultivo celular, sin embargo si se analizan simultáneamente puede obtenerse información del comportamiento del microorganismo, es decir, si se está consumiendo o no el sustrato en base al consumo de oxígeno disuelto, y si el aumento o disminución de pH está afectando el metabolismo celular así como la temperatura.

Figura 17.11 Consumo de oxígeno disuelto en fermentación en modo de operación cultivo lote y cultivo lote alimentado

17.3 Conclusiones

Mediante a instrumentación de algunos parámetros de operación de un biorreactor como lo son el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto permitió tomar los datos en línea y de esta manera automatizar al menos estos parámetros, tomar los datos en línea es uno de los procesos más cansados dentro de una fermentación, ya que las fermentaciones pueden durar desde 8 horas como mínimo e incluso 30 días si se trata de células vegetales, algunas de estas mediciones pueden tomarse en intervalos de 5 minutos como lo es el caso de pH o temperatura, pero en el caso del oxígeno disuelto puede tomarse incluso cada 10 segundos, resultando impreciso o tendencioso en algunos de los casos si no se tiene la técnica adecuada. Además de lo antes mencionado, se pueden tomar los datos de manera simultánea entre temperatura pH y velocidad de agitación, lo cual puede ofrecer un panorama general de que es lo que está sucediendo con el microorganismo. Cabe destacar que un biorreactor es un ambiente controlado y que el campo de la instrumentación es amplio y poco estudiado, razón de ellos es el alto costo de los equipos comerciales y que además no se realiza en nuestro país.

Referencias

- Astrom K., Hagglund T. 1995. PID Controllers: Theory, Desing, and Tunning. Second Edition.
- Anatychuk L, (1998) Physics of Thermoelectricity. Institute of Thermoelectricity.
- Bolton W. (2002) Control Systems. Elsevier Ltd.
- Creus S. A. (2006) Instrumentación Industrial. Editorial Alfa Omega, Séptima Edición, México.
- Douglas S.A., Holler F.J., Nieman T. (2001). Principios de análisis instrumental. Quinta edición, Ed. McGraw Hill.
- Farrés J., Carminal G., López-Santin J. (1997) Influence of phosphate on rhamnose-containing exopolysaccharide rheology and production by *Klebsiella* I-714. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 522-527.
- Nielsen J., Villadsen J., Lidén G. (1994). Bioreaction Engineering Principles. Second edition. Academic/Plenum Publishers.
- Perry R.H., Green D.W., Maloney J.O. (2001) Manual del Ingeniero Químico. 7ma. Edición, McGraw Hill.
- Peiris P. S., Dlamini A. M., Bavor H. J. (1998) Optimization of bioprocess conditions for exopolysaccharide production by *Klebsiella oxytoca*. *Word J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 917-919.
- Quintero R.R. (1997) Ingeniería Bioquímica, Teoría y aplicaciones. Primera edición
- Ramírez R.O.T. (2004) Capítulo IX Ingeniería bioquímica. En: Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna (Bolívar Zapata F.G. ed.) Primera edición, El Colegio Nacional.
- Rowe D.M. (1995) CRC Handbook of Thermoelectrics. CRC Press.