

## DESARROLLO E INTEGRACIÓN DE BIORREACTOR PARA LABORATORIO BIOTECNOLÓGICO

Martín Jamilis; M. Teresita Castañeda; Sebastián Nuñez

CONICET y Grupo de Control Aplicado, Instituto LEICI, Dto. de Electrotecnia, Fac. de Ing., UNLP,  
Calle 48 esq. 116 s/n, La Plata, Buenos Aires.  
martin.jamilis@ing.unlp.edu.ar

**Palabras clave:** biotecnología, instrumentación, control, biorreactor

### 1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología, por definición, se puede asociar con cualquier tecnología que haga uso de organismos vivos o sistemas biológicos para la producción de productos o servicios. Incluso antes de que la humanidad entendiera la biología, ya se usaba la biotecnología para la fabricación de bebidas fermentadas (vino, cerveza) y pan [1]. En el mundo moderno los bioprocesos son una parte esencial en numerosas industrias químicas, de alimentos y farmacéuticas. Mediante el uso de microorganismos o alguno de sus componentes, como enzimas, se pueden fabricar productos con valor agregado (químicos biobasados, biofarmacéuticos, biopolímeros, etc), remediar ambientes contaminados, tratar efluentes industriales, entre otros [2].

En la gran mayoría de los bioprocesos, la factibilidad económica está directamente ligada a la productividad. Esta, a su vez, se encuentra afectada por el medio en el cual se cultivan los microorganismos (calidad y concentración de nutrientes esenciales), el sistema de cultivo (batch, fed-batch o continuo) y las condiciones de entorno tales como la temperatura, pH, oxígeno disuelto (DO), alcalinidad, entre otros. Además, en procesos donde participa más de una especie de microorganismos (multiespecie) la presencia y tasa de crecimiento de otras especies de microorganismos es de relevancia. Con el fin de garantizar condiciones adecuadas para la proliferación de los microorganismos, muchos procesos se desarrollan en (bio)reactores que permiten una mejor monitorización y control de los condiciones fisicoquímicas, homogeneidad, y garantizar la esterilidad si se requiere. Uno de los biorreactores más empleados son los reactores tipo tanque agitado (STR), fabricados en vidrio o acero inoxidable, con algún dispositivo de mezclado para la homogeneización del medio de cultivo líquido. En algunos casos, por los niveles de pureza o de seguridad requeridos los procesos se realizan exclusivamente en biorreactores de este tipo, como en la producción de vacunas, hormonas o antibióticos. En otros casos, aunque el proceso final no se lleva a cabo en un biorreactor tipo STR, las etapas de desarrollo en laboratorio utilizan biorreactores de baja y mediana escala a (1 a 100L), como puede ser el caso de la digestión anaeróbica o procesos de remoción de nitrógeno en aguas.

A nivel internacional existen pocas compañías que comercializan biorreactores con niveles de instrumentación y control avanzados. Esto incluye lazos de control de temperatura, pH, DO, nivel y espuma, y un sistema de adquisición y control desde el que se pueda controlar dosificación de medios de cultivo y monitorizar y almacenar datos de las variables medidas para los lazos de control. El costo de este tipo de biorreactores es sumamente elevado para el mercado argentino, más si se tiene en cuenta que un laboratorio normalmente debería contar con varias unidades funcionando en paralelo. Otro inconveniente común en equipos comerciales es la falta de flexibilidad para la configuración de los parámetros de adquisición y control, como tasas de muestreo o la arquitectura de controladores multivariables, aún cuando las implementadas por el fabricante son deficientes como en el caso del lazo de control de DO en marcas líderes. Incluso existe la imposibilidad de agregar nuevos lazos de control para variables no controladas originalmente por el equipo.

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto para desarrollar prototipos de biorreactores altamente instrumentados y controlados, priorizando la integración de hardware industrial estándar, desarrollo de dispositivos electrónicos y la aplicación de herramientas de software que permitan implementar algoritmos de estimación y control avanzados. Se busca que el prototipo obtenido sean accesible económicamente, y que sirvan como plataforma para el desarrollo y ensayo experimental de algoritmos de monitorización, estimación y control en el área de bioprocesos. Este desarrollo no solamente tiene un gran potencial de transferencia a instituciones de investigación del área biotecnología del país, sino que los resultados obtenidos se pueden extender a plantas piloto industriales o de pymes familiares. Por ejemplo, el sistema de adquisición y control puede ser usado en biodigestores o *raceways* con microalgas, donde los sensores y actuadores son similares.

En este trabajo se presentan resultados parciales conforme al avance del proyecto. Además, cabe destacar que en el proyecto han participado varios alumnos de las carreras de Ingeniería en Electrónica y Computación en el marco de trabajos finales y prácticas profesionales supervisadas.

## 2. DESARROLLO

### 2.1. Sensores

Típicamente, en un biorreactor se mide en línea temperatura, pH y concentración de DO (si el bioproceso es aeróbico), que son las mediciones mínimas para poder garantizar un correcto desarrollo del proceso. Adicionalmente, en muchos casos se agregan sensores de nivel, espuma, balanzas para pesaje del reactor y reservorio de medios, y caudalímetros para determinar el flujo de gases de salida. Por otra parte, resulta sumamente provechoso, aunque poco usual, poder determinar concentraciones de diferentes especies tanto en fase líquida como gaseosa empleando, por ejemplo, dispositivos para determinación de biomasa microbiana, o composición de gases. Normalmente, es requisito que todo sensor que se instale en el interior de un biorreactor de laboratorio debe ser capaz de soportar múltiples ciclos de esterilización, estar fabricado con materiales anticorrosivos, y no modificar las condiciones de esterilidad dentro del biorreactor. En este proyecto, se busca además que los sensores tengan capacidad de comunicarse mediante protocolos industriales estándar, y que no requieran hardware propietario adicional para su interfaz con dispositivos de control industriales o computadoras.

Para la medición en línea de la concentración de DO se adquirió un sensor Hamilton VisiFerm DO Arc, que tiene la particularidad de determinar DO mediante métodos ópticos a partir de un elemento luminóforo sensible al oxígeno. En comparación con sensores polarimétricos clásicos, son más rápidos, fáciles de mantener, insensibles al CO<sub>2</sub> disuelto y no poseen problemas de polarización. La exactitud es mejor al  $\pm 0.5\%$  – vol y el rango es de (0–300) % – sat [3].

Para la medición en línea del pH se adquirió un sensor Hamilton EasyFerm Bio Arc, que determina pH por método potenciométrico. Este método se basa en la relación entre el potencial eléctrico de un par de electrodos y la actividad química de los iones en una solución (ecuación de Nernst) [4]. Tiene un rango de medida completo de (0–14) pH, una sensibilidad de 57 mV/pH a 25 °C y una exactitud de  $\pm 0.02$  pH [5].

Tanto el sensor de DO como el de pH pueden comunicarse digitalmente por bus RS-485 mediante protocolo Modbus RTU, o analógicamente por línea de 4-20mA. Esto resulta ventajoso para su manejo mediante controladores lógicos programables (PLC). En este proyecto, se optó por utilizar Modbus RTU para la lectura y calibración de los sensores. Adicionalmente, ambos sensores cuentan con lógica interna que permite configurar parámetros de la comunicación, unidades de medida, valores de calibración, compensación por temperatura, etc.

Para medir el caudal de aire bombeado hacia el biorreactor se utiliza un sensor Honeywell Zephyr HAF BLF0750CAAX5. El sensor determina el caudal másico de aire por transferencia de calor en un micropuente con resistencias sensibles a la temperatura. El acondicionamiento de señal se realiza dentro del mismo sensor, que provee una interfaz de salida analógica de tensión de (0–5) V. El rango de medida es de (0–750)  $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ , la exactitud es de  $\pm 0.25 \text{cm}^3 \text{min}^{-1}$  para caudales menores a  $37.5 \text{cm}^3 \text{min}^{-1}$  y de  $\pm 10\%$  para caudales mayores.

Por otra parte, se encuentra en desarrollo un prototipo de sensor de densidad óptica (OD) para la medición en línea de la concentración de biomasa microbiana. El principio de funcionamiento del sensor se basa en la ley de Beer-Lambert [6], que establece una relación lineal entre la absorción de luz de un medio y la concentración de partículas suspendidas en él. El sensor está formado básicamente por un emisor de luz (diodo láser de 625 nm y 200 mW) y dos sensores de luz OPT101 de Texas Instruments (fotodiodos integrados con amplificadores de transimpedancia), para medir las intensidades incidente y transmitida a través de la muestra. El ancho de banda de la medida se acota mediante filtros pasabajo en topología Sallen-Key. El cálculo de la absorbancia de la muestra se realiza digitalmente después de adquirir las salidas de los sensores de luz con un ADC de 12 bits integrado en un microcontrolador. Con el fin de evitar la saturación de los fotosensores e incrementar el rango de absorbancias medidas, el microcontrolador varía la corriente del láser a través de un circuito realimentado hasta obtener intensidades de luz en el rango de medida de los sensores.

## 2.2. Actuadores

El medio líquido se agita con una turbina tipo Rushton de 4 palas impulsada por un motor de inducción trifásico Kaifa de 4 polos, 0.25 HP y velocidad nominal 1500 rpm. La velocidad del motor se controla con un variador de frecuencia WEG CFW-10 que a su vez es comandado por el equipo de control a través de una señal analógica de tensión entre 0 y 10V. El variador tiene una resolución de 0.1 Hz, equivalente a 3 rpm con el motor utilizado. Si bien muchos biorreactores de baja escala utilizan motores de continua, el motor utilizado tiene las mismas prestaciones con un menor costo y mantenimiento. Por otra parte, aún siendo el variador la parte más costosa del conjunto, su valor es comparable al equivalente para un motor de continua, habiendo más variedad en el mercado local y pudiendo escalarse fácilmente para plantas de mayor volumen.

Para inyectar aire al biorreactor se utiliza una bomba de acuario Atman At-704 con un rango entre 5 y 300  $\text{L h}^{-1}$ . Se desarrolló un circuito electrónico para controlar la excitación de la bomba (o equivalentemente el caudal) que se comanda mediante una señal PWM o una analógica de tensión entre 0 y 5V.

Para la dosificación de medios de cultivo se adquirió una bomba peristáltica Prefluid BL-100, con un rango de velocidad de (0.1–100) rpm ((0.021–843)  $\text{mL min}^{-1}$ , para diámetros mínimo y máximo de manguera). El valor del caudal se puede establecer manualmente en la bomba o remotamente por interfaz 4-20mA o RS485 utilizando un protocolo compatible con Modbus RTU.

Para el manejo de líquidos en los que se requiere menor precisión (solución ácido/base, antiespuma) se están desarrollando bombas peristálticas. Estas se basan en motores paso a paso controlados con un microcontrolador MSP430. Actualmente, se puede controlar el caudal o volumen desplazado por las bombas por RS485 mediante protocolo serie. Se está implementando el protocolo Modbus RTU en el microcontrolador que controla las bombas.

## 2.3. Dispositivos de control y monitoreo

Para controlar la planta se utiliza un PLC Slicetex Electronics STX-8091-A2, de fabricación nacional. Este PLC posee 12 entradas digitales, 10 salidas digitales (8 relés + 2 transistores)

con PWM), 8 entradas analógicas, 1 salida analógica, puerto Ethernet y puerto RS232/RS485, sin necesidad de módulos adicionales. Además, es compatible con Modbus y 4-20mA, y puede comunicarse por protocolo UDP. La programación del PLC puede realizarse en lenguaje Ladder o texto estructurado (Pawn), siendo este último el utilizado en el proyecto.

Para la recopilación de datos y visualización en tiempo real se utiliza una Raspberry Pi 3 B+ con un panel táctil de 7 pulgadas y software ad-hoc escrito en Python y librerías Matplotlib. Adicionalmente, se está desarrollando una aplicación web para configuración de los procesos, adquisición y visualización de datos. Tanto el *Backend* como el *Frontend* están implementados con node.js, mientras que para la base de datos se usa PostgreSQL. El software también permite gestionar usuarios y permisos, y exportar datos.

#### 2.4. Cuerpo de biorreactor

Los elementos que componen el cuerpo del biorreactor (vaso, tapa y sus puertos de conexión) debe ser capaces de soportar múltiples ciclos de esterilización (temperatura y presión), no ser corrosivos, y poseer poca rugosidad para evitar la adherencia de los microorganismos. Los materiales usualmente usados son el vidrio borosilicatado y el acero inoxidable. En este proyecto, se adquirió un vaso de vidrio borosilicatado de un biorreactor New Brunswick de 2 L. La tapa se diseñó por modelado 3D, agregando múltiples puertos para sensores y manejos de líquidos. A la fecha la tapa está en proceso de fabricación en acero inoxidable, habiéndose verificado ya las medidas de puertos y roscas, y restando la soldadura de piezas y pulido.

#### 2.5. Lazos de control implementados

Al momento se han desarrollado y ensayado experimentalmente los lazos de control de pH y DO. Ambos están completamente implementados en el PLC que controla el sistema y se ensayaron primero en un esquema *Hardware in the loop*, donde los controladores se ejecutan en el PLC y la planta es simulada en software de alto nivel en una computadora. Estos ensayos fueron realizados con los actuadores conectados y energizados. Posteriormente se ensayaron experimentalmente en el biorreactor, como se describe en las Secciones 3.2 y 3.3.

Para el control del pH se utilizaron dos bombas peristálticas de desarrollo propio para dosificar pequeños volúmenes de solución ácida o alcalina. Para el comando de las bombas se utilizó un controlador PID, cuya sintonización se realizó primero en base al modelo de la planta y las simulaciones [7]. Durante los ensayos experimentales se ajustaron las ganancias para mejorar la respuesta. Las acciones de control positivas las realizó la bomba con la solución alcalina y las negativas la bomba con la solución ácida. Adicionalmente, se implementó una zona muerta para evitar la dosificación continua de soluciones para corregir errores de pH despreciables.

El control de DO se realizó ajustando el caudal de aire que ingresa al biorreactor y la velocidad de agitación del medio. En esta etapa se ensayaron lazos SISO en el que un PID maneja la velocidad de agitación o el caudal de aire, mientras el otro se mantiene fijo. Cada control PID (el de caudal y el de velocidad) se ajustaron empíricamente empleando las reglas de Ziegler y Nichols durante los ensayos experimentales mostrados en la Sección 3.2.

### 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

#### 3.1. Validación de sensor de biomasa

La validación del sensor de densidad óptica se realizó empleando una suspensión madre de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con una OD a 625 nm de  $4,315 \pm 0,086$  equivalente a  $2.234 \text{ g L}^{-1}$ . Dicha solución fue utilizada para elaborar una curva de calibración en un rango de  $OD_{625}$  de 0 a 1. Luego, se contrastaron las determinaciones realizadas mediante el prototipo

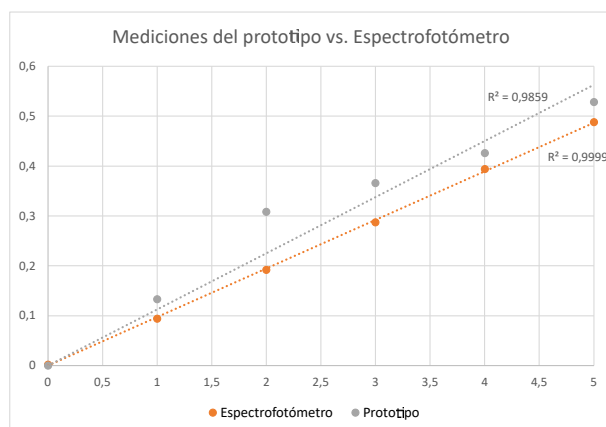


Figura 1: Validación experimental del prototipo sensor de densidad óptica desarrollado.

con las correspondientes mediciones realizadas en un espectrofotómetro comercial Beckman modelo DU. Los resultados indican una mayor linealidad en el rango de OD medido con el prototipo respecto al espectrofotómetro comercial, el cual resultó lineal hasta una  $OD_{625}$  de 0,6. En contraste, en el rango  $OD_{625}$  de 0 a 0,6, se obtuvo una mejor correlación lineal con el espectrofotómetro comercial ( $R^2 = 0,999$ ) respecto al prototipo ( $R^2 = 0,988$ ). Estos resultados se muestran en la Figura 1.

### 3.2. Validación de control de oxígeno disuelto

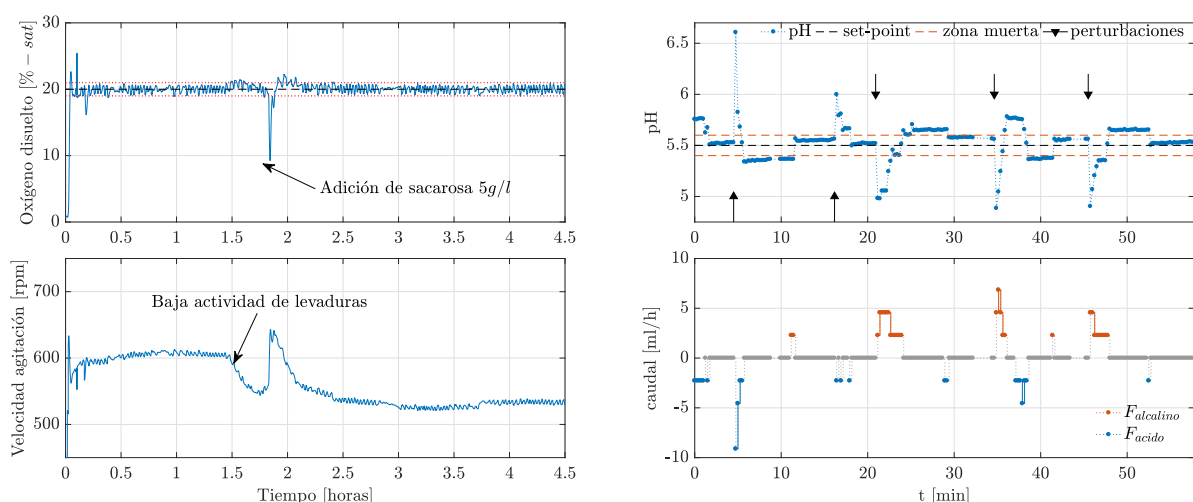
La validación experimental del control de DO se llevó a cabo mediante el cultivo de la levadura *Rhodospiridium toruloides* en un biorreactor STR marca Setric Genie Industriel de 2 L. El medio de cultivo empleado para el crecimiento en el biorreactor contenía:  $10 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa (FCE),  $3 \text{ g L}^{-1}$  de hidrolizado de caseína (FN),  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  de extracto de levadura como suplemento de minerales y vitaminas y  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de cloranfenicol (antibiótico contra bacterias). El pH del medio fue llevado a 5.5 con el agregado de ácido clorhídrico (HCl). El sistema de cultivo empleado para la validación fue un sistema batch con pulsos de alimentación de FCE. La Figura 2a muestra parte de los resultados de los ensayos experimentales del controlador DO a través de la velocidad de agitación. Durante el cultivo, las perturbaciones en el oxígeno fueron originadas por el consumo de las levaduras. En todo momento el lazo de control fue capaz de mantener la DO en un set-point de 20 %-sat. Incluso ante un rápido incremento en el consumo de oxígeno por las levaduras antes de las 2 horas, la perturbación fue rechazada en un tiempo corto.

### 3.3. Validación del control de pH

La Figura 2b muestra algunos resultados de ensayos experimentales de la validación del controlador de pH. En este caso, con el fin de ensayar el controlador en condiciones no amortiguadas y probar el hardware desarrollado, no se inoculó al biorreactor y las perturbaciones de pH se produjeron artificialmente mediante la adición de pequeños volúmenes de solución ácida o alcalina (0.25 molar) a un medio de agua destilada. El experimento se realizó en el mismo biorreactor descrito en la Sección 3.2. A pesar de que la resolución de las bombas utilizadas para el ensayo es baja, los resultados muestran que el sistema es capaz de estabilizar al pH en valores muy próximos al deseado.

## 4. CONCLUSIONES

Si bien aún quedan mejoras por hacer a los actuadores desarrollados y lazos de control ya implementados, el avance del proyecto muestra la capacidad de desarrollo de un sistema de monitoreo y control con similares prestaciones a los de primeras marcas. A su vez, la futura



(a) Respuesta del lazo de DO durante un cultivo de *R. toruloides*. Arriba: concentración de oxígeno disuelto. Abajo: velocidad de agitación.

(b) Respuesta del lazo de pH a perturbaciones artificiales (indicadas con flechas). Arriba: pH. Abajo: caudal de soluciones ingresado.

Figura 2: Resultados experimentales de lazos de control.

incorporación del sensor de densidad óptica para la medición en línea de biomasa constituye una característica distintiva frente a una gran parte de las plantas comerciales actuales.

A partir de la implementación de los lazos de control de pH y oxígeno disuelto, ya es posible realizar cultivos de varios días en el biorreactor, pudiendo recopilarse toda la información de sensores y actuadores en línea. Esto resulta un avance muy importante para el desarrollo de la línea de control y monitoreo de bioprocesos del instituto LEICI.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por proyectos de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2019-3635, PICT 2019-3476, PICT 2017-3211), CONICET (PIP 0837) y la Universidad Nacional de La Plata (UNLP I253). Especial agradecimiento a Lucas Gioia, Federico Burgardt, Matías Fagan, Joaquín Larsen, Emmanuel Retribe, Juan Gomez y Joaquín Jamilis por sus aportes al proyecto.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Alízio, D. E. Bowen, and S. F. R., *Understanding biotechnology*. Prentice Hall PTR, 2003.
- [2] P. M. Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. London: Academic Press, second edition ed., 2013.
- [3] "VisiFerm DO Arc 225 Specification Sheet (Part/REF # 243666-131)," tech. rep., Hamilton Bonaduz AG, 2018.
- [4] E. K. Springer, "pH Measurement Guide," tech. rep., Hamilton Bonaduz AG, 2014.
- [5] "EasyFerm Bio HB Arc 225 Specification Sheet (Part/REF # 243632-2343)," tech. rep., Hamilton Bonaduz AG, 2018.
- [6] D. F. Swinehart, "The beer-lambert law," *Journal of chemical education*, vol. 39, no. 7, p. 333, 1962.
- [7] K. J. Åström, T. Hägglund, and K. J. Astrom, *Advanced PID control*, vol. 461. ISA-The Instrumentation, Systems, and Automation Society Research Triangle . . . , 2006.