

MEDICIÓN Y CONTROL DE CONCENTRACIÓN DE  
METANOL EN UN BIORREACTOR PARA LA  
PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA IDShr

ANDRÉS MAURICIO NOVA VALENZUELA

Trabajo de grado de maestría

*T.G.MIE-1031*

Director

Ing. CARLOS E. COTRINO B., M.Sc.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA ELECTRÓNICA  
BOGOTÁ D.C.

2011

“La Universidad no se hace responsable de los conceptos emitidos por algunos de sus alumnos en los proyectos de grado. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y la moral católica y porque no contengan ataques o polémicas puramente personales. Antes bien, que se vea en ello el anhelo de buscar la verdad y la justicia.”

*Artículo 23 de la Resolución No. 13, del 6 de julio de 1946, por la cual se reglamenta lo concerniente a Tesis y Exámenes de Grado en la Pontificia Universidad Javeriana.*

# Contenido

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Marco teórico .....</b>	<b>3</b>
2.1 Concentración en una solución .....	3
2.2 Tecnologías de medición de concentración de metanol .....	3
2.2.1 Fotoionización .....	4
2.2.2 Tecnologías para soluciones acuosas.....	6
2.2.3 Cromatografía de Gases .....	8
2.2.4 Sensor Semiconductor.....	10
2.2.5 Sensor semiconductor en trabajos previos .....	14
2.2.6 Sonda de Pervaporación .....	16
2.3 Bomba peristáltica.....	19
<b>3. Especificaciones .....</b>	<b>21</b>
3.1 Especificaciones generales .....	22
3.2 Sistema de aire sintético .....	22
3.3 Sistema de medición de concentración .....	23
3.4 Sistema de adquisición y procesamiento .....	23
3.5 Sistema de control de concentración de metanol .....	24
<b>4. Desarrollos.....</b>	<b>25</b>
4.1 Medición y control de flujo para el aire de arrastre.....	25
4.1.1 Medición de flujo con turbina.....	25
4.1.2 Medición de flujo por efecto Coriolis .....	28
4.1.3 Medición de flujo por transferencia térmica .....	30
4.2 Tubería para la red de aire sintético.....	32
4.3 Instalación mecánica de la sonda de pervaporación .....	34
4.4 Sistema de control y adquisición.....	36

4.4.1	Interfaz de usuario.....	37
4.4.2	Adquisición de datos .....	47
4.4.3	Control de adición de metanol .....	50
4.4.4	Reportes e históricos de calibración.....	52
4.4.5	Asignación de pines para conexiones eléctricas .....	52
<b>5.</b>	<b>Análisis de resultados.....</b>	<b>54</b>
5.1	Calibración de la sonda de pervaporación.....	54
5.1.1	Sensibilidad .....	55
5.1.2	Repetibilidad .....	57
5.2	Análisis de datos de la medición de concentración .....	61
5.2.1	Precisión y exactitud sobre un rango .....	61
5.2.2	Reproducibilidad .....	63
5.2.3	Tiempo de respuesta.....	67
5.3	Funcionamiento del control de adición de metanol.....	68
5.4	Estudio de costos .....	70
<b>6.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>74</b>
<b>8.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>78</b>
8.1	Datos de calibración .....	78
8.2	Sistema Implementado.....	79
8.3	Circuito de conexión eléctrica.....	81
8.4	Manual de Usuario.....	82

# 1. Introducción

Desde comienzos del siglo pasado, se conoce que algunas enfermedades ocurren debido a fallas metabólicas, por deficiencia en una enzima, proteína ausente o menos activa que la proteína normal [1]

La producción de proteínas humanas haciendo uso de tecnología recombinante<sup>1</sup>, en especial del sistema de expresión<sup>2</sup> *Pichia Pastoris*, es un medio útil en el tratamiento de enfermedades como el Síndrome de Hunter, producido por la deficiencia de la enzima IDShr [1][2].

La *Pichia Pastoris*, catalogada como levadura metilotrófica debido a su capacidad para utilizar metanol como única fuente de carbono y energía, es un sistema de expresión para la producción de proteínas ampliamente usado por la facilidad de las técnicas genéticas requeridas para su manipulación, así como su gran capacidad para la producción de proteínas foráneas [1] [3]. Sin embargo, la concentración de metanol no debe exceder determinados valores para evitar que se alcancen niveles tóxicos para la levadura [4], como está reportado en [5] donde se trabajó hasta 4% v/v; y en el otro extremo, prevenir que la concentración de metanol no sea tan baja tal que la producción de proteínas se torne lenta [4][5].

El Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) y los departamentos de Química y Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana han venido trabajando en la expresión de proteínas recombinantes como modelos de terapia de reemplazo enzimático. Para optimizar la producción de enzimas se debe tener un ambiente controlado de modo que variables como temperatura, concentración de oxígeno disuelto (OD), concentración de metanol, pH y agitación se mantengan en los valores asignados. Este ambiente controlado se obtiene mediante el biorreactor Bioengineering KLF 2000 propiedad del IEIM, el cual está equipado con sensores y controladores para cada una de estas variables. Adicionalmente en proyectos paralelos se están desarrollando estrategias de control avanzado para variables como el oxígeno disuelto.

---

<sup>1</sup> Conjunto de técnicas que permiten aislar un gen de un organismo para su posterior manipulación e inserción en otro organismo

<sup>2</sup> Sistema diseñado específicamente para la fabricación de un producto proveniente de un gen

La primera aproximación a la medición de concentración de metanol para este biorreactor se realizó en 2006 con el trabajo de grado [6] realizado por estudiantes del departamento de Electrónica de la Pontificia Universidad Javeriana, trabajo en el cual se mide la concentración de metanol en el cultivo por medio del gas que se desprende del proceso interno en el biorreactor. Se empleó el sensor semiconductor TGS822 (Figaro Engineering Inc.) para la medición de concentración, una resistencia básica de calentamiento para adecuar y controlar la temperatura del gas que contiene la muestra de metanol en los rangos de operación del sensor semiconductor y un sistema microcontrolado de adquisición y procesamiento. Así mismo se implementó un control de tipo ON/OFF que maneja una bomba peristáltica para la adición de metanol al cultivo.

Las conclusiones de este trabajo indican que ciertas variables de proceso entre las que se encuentran el flujo de aire para manipular el OD, la temperatura y la humedad tienen un efecto en la lectura del equipo y deben ser consideradas para futuros desarrollos de sistemas de medición de concentración de metanol basados en la tecnología de sensores semiconductores.

Es por esto que en el presente trabajo se diseñó e implementó un sistema de medición de concentración de metanol, y se implementó un control ON/OFF de adición de metanol de acuerdo a los diseños realizados en [6]. Este sistema resultante permite al IEIM medir y controlar la concentración de metanol presente en el medio de cultivo en el rango 0.1%v/v a 3%v/v. Se incluyeron las recomendaciones presentadas en el proyecto [6] y se tuvieron en cuenta los avances más recientes que existen acerca de la medición de concentración de metanol.

Para ello se investigó sobre las tecnologías disponibles para la medición de la concentración de metanol y se determinó que la más apropiada es el uso de una sonda de pervaporación junto con el sensor semiconductor TGS2620 (Figaro Engineering Inc.). Se tuvieron presente las limitaciones de esta tecnología para generar estrategias que consiguieran mitigarlas y se logró un sistema de medición repetible y reproducible ante variaciones en las condiciones de operación del proceso.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Concentración en una solución

La concentración expresa la cantidad de sustancia presente en una mezcla homogénea. En química se usan los términos *soluto* para describir a la sustancia de interés y *solvente* para describir el material en el cual el soluto está disuelto y generalmente es el que está en mayor cantidad. Una solución es cualquier mezcla homogénea de dos o más sustancias químicas cuando el proceso no es el resultado de una reacción química. La solución es la suma del soluto y el solvente, en masa o en volumen [6].

Algunas unidades de concentración son [6]:

- Porcentaje en Volumen (%v/v). Es la cantidad de soluto en litros que se encuentra disuelta en 100 ml de solución, multiplicado por el 100%. Esta es la unidad de medida en que se expresará la concentración de metanol durante el presente proyecto.
- Porcentaje por Masa (%w/w). Es la cantidad de soluto que se encuentra disuelta en una cantidad de solución (expresados en gramos), multiplicado por el 100%.
- Masa por unidad de volumen (%w/v). Es la cantidad de soluto, expresada en g, que se encuentra disuelta en una cantidad de solución, expresada en ml, multiplicado por el 100%.
- Partes por millón (ppm). Es la cantidad de soluto, expresada en g, que se encuentra disuelta en  $10^6$  g de solución.

### 2.2 Tecnologías de medición de concentración de metanol

Se han desarrollado varios métodos para la medición de concentración de metanol en aplicaciones de biotecnología como lo son el uso de sensores semiconductores para detección de vapores de solventes orgánicos [3] [6]-[12]; la medición en soluciones

acuosas usando microtubos oscilantes o sensores de ultrasonido [13]-[16], la técnica de espectroscopia [17] o el método de análisis de inyección secuencial [18]. Estas últimas dos estrategias funcionan de forma efectiva pero son costosas y difíciles de implementar [7]. Así mismo, existen métodos en la industria para medir concentración de sustancias que pueden ser aplicados en el campo biotecnológico, entre los que se encuentran la medición de concentración por fotoionización y la medición por conductividad. A continuación se presentan en detalle las tecnologías más importantes para la medición de concentración de metanol.

### 2.2.1 Fotoionización

Una tecnología para medir la concentración de componentes orgánicos volátiles es la denominada *Photoionization Detector (PID)*, que consiste en ionizar el fluido a analizar mediante cierta cantidad de energía proveniente de una fuente ultravioleta (UV). Una vez ionizado el fluido, las cargas positivas y negativas que se formaron generan una corriente proporcional a la concentración de los componentes orgánicos presentes en el fluido. Luego que los iones pasen por los electrodos del medidor, se combinan nuevamente para formar la molécula original y dejar el fluido como estaba inicialmente, lo que significa que este tipo de tecnología no altera las propiedades del fluido que se está estudiando.

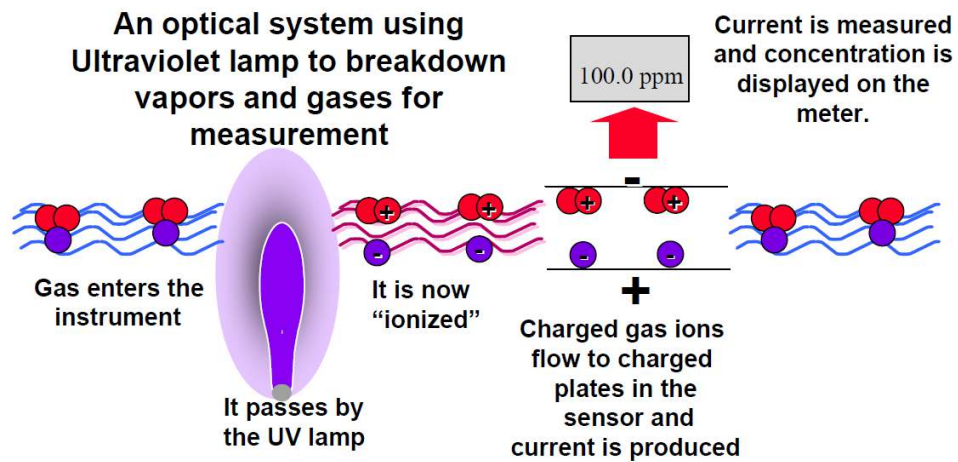


Fig. 1. Medición de concentración con la tecnología *PID* [21]



No obstante, todos los compuestos no se pueden medir con el mismo sensor *PID* y existe el caso en que no es posible ionizarlos. Esto se debe a que cada compuesto tiene un potencial de ionización (IP), medido en eV, que representa la cantidad de energía requerida para ionizarlo. Si el potencial de ionización es menor a la energía de la lámpara ultravioleta usada, entonces el gas puede ser ionizado por ese sensor *PID*. Las lámparas ultravioletas que se fabrican comercialmente son de 9.8eV, 10.6eV y 11.7eV y se conoce que para el metanol o methyl alcohol, el potencial de ionización es de 10.85eV [21].

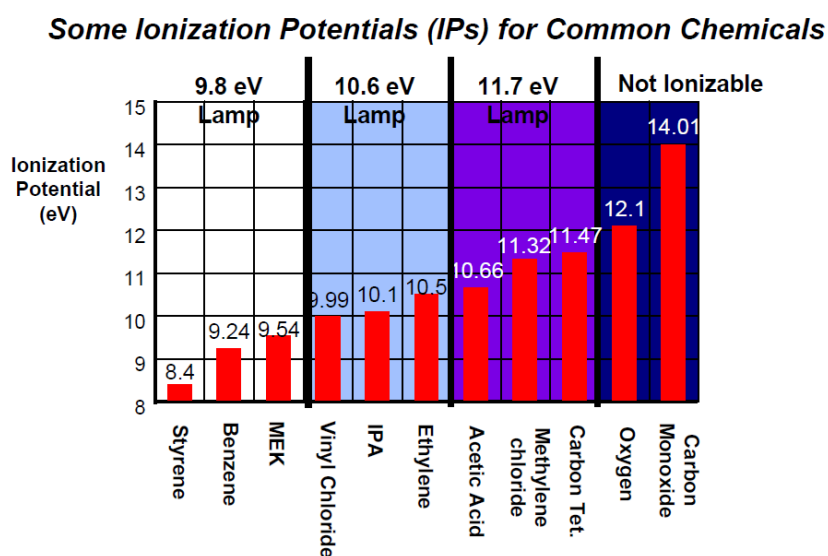


Fig. 2. Potencial de Ionización para algunos compuestos [21]

Lo anterior indica que la lámpara de radiación UV que se puede utilizar para ionizar el metanol debe tener una energía de 11.7eV. Este tipo de lámparas UV están fabricadas con Fluoruro de Litio en su recubrimiento con el fin de transmitir la alta energía de la luz ultravioleta, sin embargo, este compuesto químico es difícil de adherir a las paredes de la lámpara y absorbe gran cantidad de agua lo que genera que se despegue de la lámpara y se reduzca la cantidad de energía transmitida al fluido. El Fluoruro de Litio también tiene el inconveniente de degradarse con la luz ultravioleta, es decir que cada vez que se usa la lámpara más se deteriora, llegando a tener una vida útil entre 2 a 6 meses [21].

Todo esto, sumado con el alto costo de una lámpara de 11.7eV [21], hace que esta tecnología no sea una solución viable.

### 2.2.2 Tecnologías para soluciones acuosas

Se han investigado las distintas propiedades físicas de las soluciones acuosas en las que se encuentra presente el metanol y a su vez, se han intentado medir de diferentes formas. La constante dieléctrica, la velocidad del sonido o la densidad son algunas de las propiedades físicas que varían en función de la concentración de metanol en la solución bajo estudio.

Para el caso de la medición de la constante dieléctrica, la técnica usada es el uso de dos placas o electrodos espaciados que forman un capacitor para que entre ellos pase la solución acuosa. Con el valor medido de capacitancia se obtiene la constante dieléctrica para luego relacionarla con la concentración de metanol.

A pesar de ser un método sencillo, tiene el inconveniente que la variación de la constante dieléctrica y por consiguiente de la capacitancia es mínima para valores de concentración de metanol entre 0%v/v y 5%v/v lo cual perjudica la resolución y exactitud de la medida final [16].

La técnica de medición usando la velocidad del sonido emplea dos transductores de ultrasonido, emisor y receptor, entre los que pasa el fluido con determinada concentración de metanol. El principio de funcionamiento consiste en medir el tiempo que demora en viajar la onda de ultrasonido desde el emisor hasta el receptor, y conociendo la distancia entre los transductores, se obtiene la velocidad del sonido a través de la solución. Esto exige conocer con gran exactitud la distancia a la cual se encuentran emisor y receptor [16][22].

Para implementar esta tecnología es necesario generar una recirculación del líquido a analizar, lo que puede crear burbujas y finalmente afectar la propagación de la onda de ultrasonido resultando en medidas erróneas. Adicionalmente, la velocidad de propagación del sonido también depende de la temperatura del medio.

Una de las técnicas más recientes para la medición de concentración en soluciones acuosas es la de un sensor basado en tecnología MEMS o *Micro-electro-mechanical-systems* que representa la integración de elementos mecánicos, sensores, actuadores y electrónica usando tecnología de microfabricación [13].

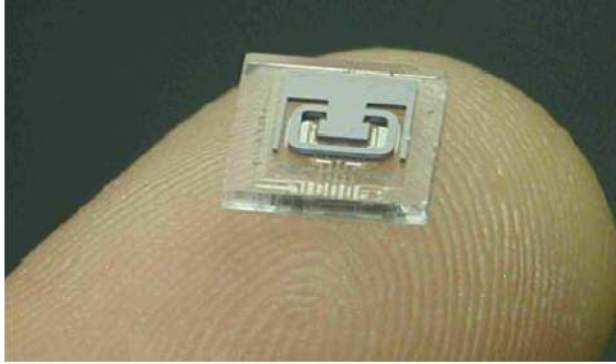


Fig. 3. Microtubo del sensor MEMS [15]

El sensor MEMS usa un microtubo que oscila a cierta frecuencia; cuando el microtubo se llena con un líquido, su frecuencia de oscilación cambia y como la densidad es proporcional a la frecuencia de oscilación, se obtiene la densidad del líquido.

La densidad de un líquido está dada por:

$$\rho = \frac{1}{V} \left( \frac{Ks}{4\pi^2 f^2} - m_t \right)$$

Donde  $V$  es el volumen del tubo,  $K_s$  la constante del resorte del tubo,  $f$  la frecuencia de oscilación del tubo y  $m_t$  la masa del tubo.

Esta tecnología es usada para soluciones binarias, o soluciones que estén formadas por dos componentes y que constan de una sola fase. La concentración de metanol puede ser determinada con base en la diferencia de masas de los dos líquidos presentes, teniendo en cuenta que la resolución de la medición decrece si la densidad de los compuestos de la solución se aproximan [14][15]. Este método no se puede aplicar para el presente trabajo porque el medio no es binario ya que existen otros compuestos en el medio de cultivo con concentraciones importantes.

Por último, crear una recirculación del medio de cultivo proveniente de un biorreactor puede llegar a contaminarlo, lo que no hace viable para esta aplicación ninguna de las tecnologías mencionadas anteriormente.

### 2.2.3 Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es un método de separación que consiste en la distribución de los componentes de una muestra entre dos fases presentes en una columna cromatográfica<sup>3</sup>. Se tiene la fase estacionaria de gran área superficial y que se encuentra distribuida uniformemente sobre la columna, y la fase móvil, generalmente un gas de arrastre, que se desplaza en una sola dirección a través de la fase estacionaria.

La muestra a analizar se vaporiza antes de entrar a la columna para luego distribuirse entre las dos fases dependiendo de la solubilidad o afinidad de cada uno de sus componentes, a determinada temperatura, con la fase estacionaria de la columna. Esto indica el tiempo de retención de los distintos componentes en la columna cromatográfica ya que si la distribución inicial es mayor en la fase estacionaria, mayor será el tiempo que se demora el componente dentro de la columna.

A continuación el gas de arrastre transporta los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria de la columna para que eventualmente estos salgan de la columna en tiempos específicos determinados por su volatilidad, siendo el más volátil el primero en salir. Los componentes de la muestra se terminan de separar a medida que avanzan por la columna debido a sus distintos tiempos de retención [23].

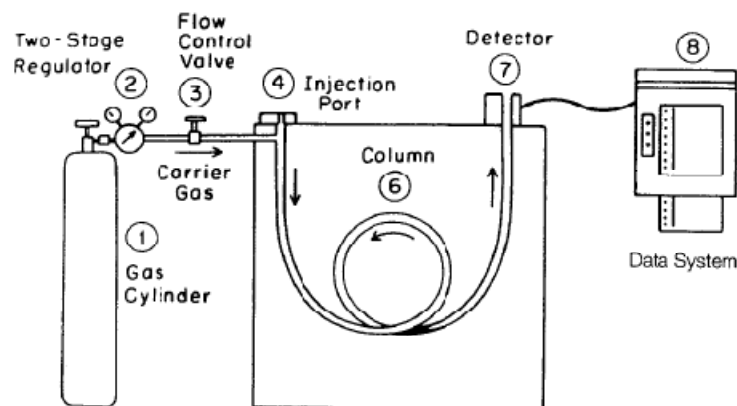


Fig. 4. Esquema de la técnica de cromatografía de gases [23]

<sup>3</sup> La columna cromatográfica es un tubo largo de vidrio o metal, generalmente en forma de espiral para ahorrar espacio, relleno de un material sólido o recubierto de un líquido con un punto de ebullición alto.

Una vez salga cada componente su concentración es medida por un detector FID o *Flame Ionization Detector* ubicado al final de la columna, el cual produce una llama de hidrógeno que quema y descompone los componentes orgánicos, creando iones que son atrapados por dos placas metálicas de modo que se genere una corriente proporcional a la cantidad de dicho componente. La señal del detector FID va a un computador encargado de presentar las concentraciones de los componentes de la muestra en sus tiempos de retención correspondientes como se observa en la figura 5.

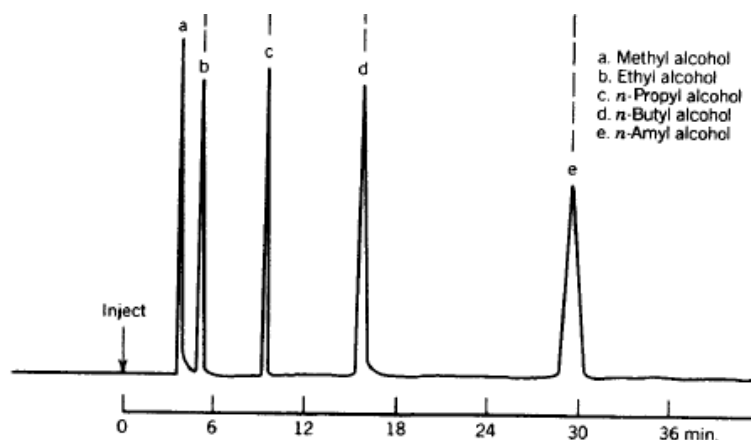


Fig. 5. Visualización de los componentes de una muestra en el cromatógrafo [23]

Si se emplea de forma correcta y con la columna cromatográfica apropiada para el componente a analizar, la técnica de medición de concentración de metanol por cromatografía de gases tiene la ventaja de entregar una medida con alta resolución, con alta sensibilidad que le permite en algunos casos medir concentraciones hasta del orden de  $\text{ppb}^4$  y medir la cantidad de cada uno de los componentes presentes en una solución por separado, sin que se generen interferencias entre ellos [23]. Por esto una medida por cromatografía se puede usar como referencia para verificar la exactitud de la lectura de concentración de metanol de cualquier equipo.

No obstante, esta tecnología no se puede emplear como método de medición en línea debido a que se debe analizar muestra por muestra, teniendo también en cuenta que el proceso de análisis tarda algunos minutos.

---

<sup>4</sup> Unidad de concentración que representa la cantidad de soluto, expresada en g, que se encuentra disuelta en  $10^9$  g de solución.

## 2.2.4 Sensor Semiconductor

Este sensor se basa en un semiconductor de dióxido de estaño ( $\text{SnO}_2$ ) que varía su conductividad en función de la concentración de gas presente. La lectura de resistencia es alta cuando pasa a través de él aire puro y empieza a bajar en función de la concentración de gases presentes como metanol, etanol y en general vapores de solventes orgánicos. Más adelante se analizan las distintas variables que tienen efecto sobre la conductividad del sensor [19].

La ecuación que describe el comportamiento del sensor semiconductor TGS2620 está dada por:

$$R_s = A * C^{-\alpha}$$

Donde  $A$  y  $\alpha$  son constantes,  $R_s$  es la resistencia del sensor y  $C$  la concentración de metanol presente [19].

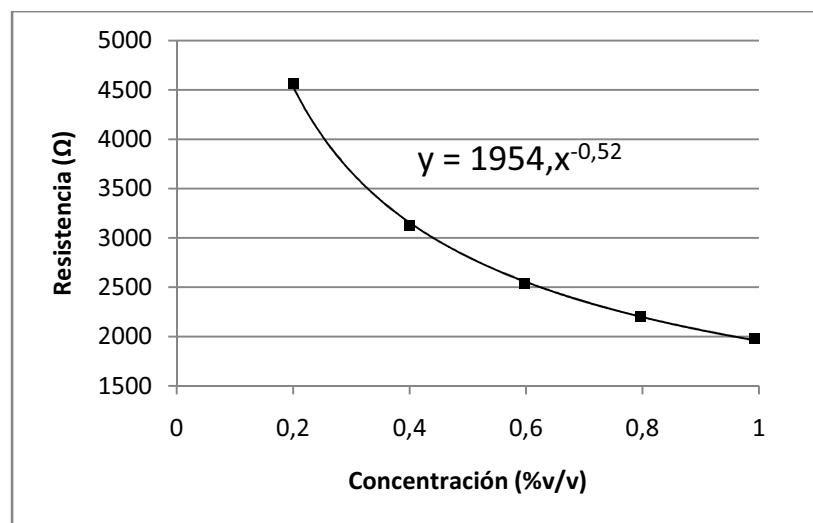


Fig. 6. Comportamiento del sensor semiconductor TGS2620

Esta relación es lineal en una escala logarítmica como se puede ver a continuación:

$$\begin{aligned} \log_{10} R_s &= \log_{10} A - \alpha * \log_{10} C \\ &= -\alpha * \log_{10} C + \log_{10} A \end{aligned}$$

La cual tiene la forma  $y = m * x + b$ , donde  $m = -\alpha$  y  $b = \log_{10} A$

Las constantes  $A$  y  $\alpha$  se obtienen durante la calibración, en la cual se mide el valor de resistencia a partir de la lectura que arroja del sensor cuando está en presencia de un gas proveniente del proceso interno del biorreactor, en el que se encuentra una solución con concentración de metanol conocida. Los valores de las constantes  $A$  y  $\alpha$  dependerán de las unidades de concentración que se trabajen, en este caso porcentaje en volumen (%v/v) que representa el volumen de metanol presente en 100mL de solución, multiplicado por 100%.

La variación de resistencia de los sensores semiconductores para detección de solventes orgánicos es también influenciada por las variables de proceso que se presentan a continuación:

#### 2.2.4.1 Presión parcial de oxígeno

Como se observa en la figura 7, el sensor aumenta su resistencia cuando aumenta la presión parcial de oxígeno en el fluido que pasa a través de él. Este es un problema que se tiene en el biorreactor ya que la concentración de oxígeno en el gas que se desprende del proceso interno varía en función del tipo de aire que se use como suministro de oxígeno para el cultivo, así como la velocidad de agitación usada para manejar la concentración de oxígeno en el medio de cultivo.

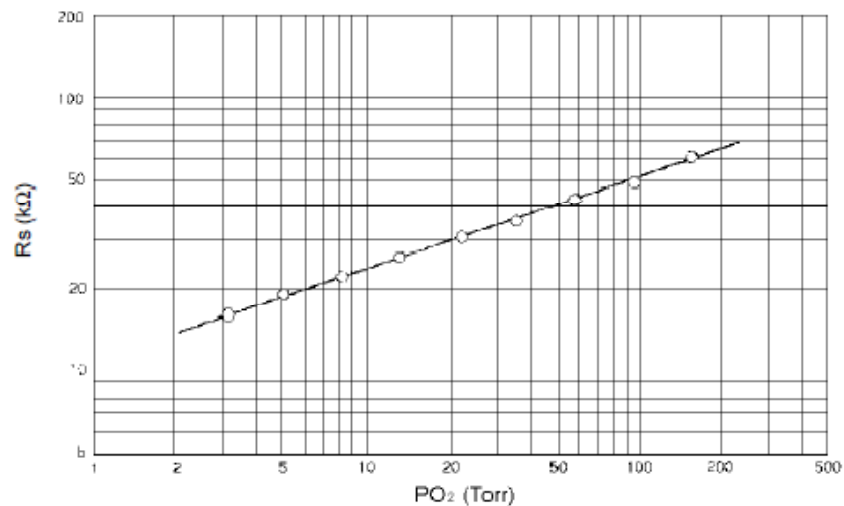


Fig. 7. Dependencia de la lectura de resistencia con la presión parcial de oxígeno [19]

#### 2.2.4.2 Tipo de gas

El sensor responde ante la presencia de varios gases como metanol, etanol y monóxido de carbono. Esto arroja una lectura errónea en el caso que se encuentren dos o más de estos gases y se quiere obtener solo la lectura de concentración de metanol. Para este caso, se usará el sensor en la fase de producción del cultivo bajo condiciones aeróbicas<sup>5</sup> en la cual *Pichia Pastoris* al ser alimentada con metanol solo produce metanol [5][7].

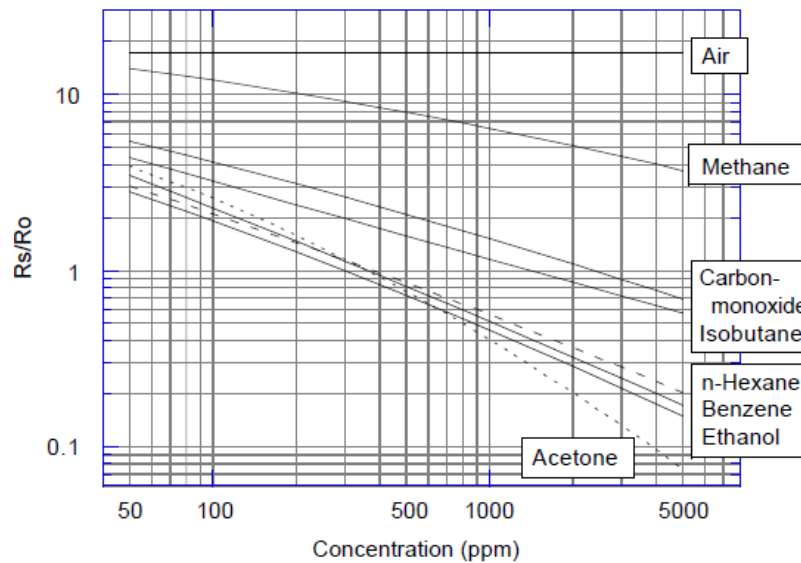


Fig. 8. Lectura de resistencia en presencia de diferentes gases [19]

#### 2.2.4.3 Respuesta del sensor

El sensor tiene un tiempo de respuesta determinado en el caso en que sea expuesto repentinamente a un gas y luego expuesto nuevamente a aire. Para la primer situación la respuesta del sensor es rápida mientras que para la segunda toma un poco más de tiempo. Sin embargo, solo se necesita una respuesta rápida del sensor en el caso en que la concentración del gas aumente repentinamente ya que es la situación que se tiene cuando se adiciona sustrato o metanol al cultivo. El metabolismo de *Pichia Pastoris* es lento y por lo tanto lo es el consumo de metanol

<sup>5</sup> Condición en la cual hay presencia de oxígeno



lo que significa una disminución lenta en la lectura de concentración, caso en el cual el sensor presenta una respuesta más retardada.

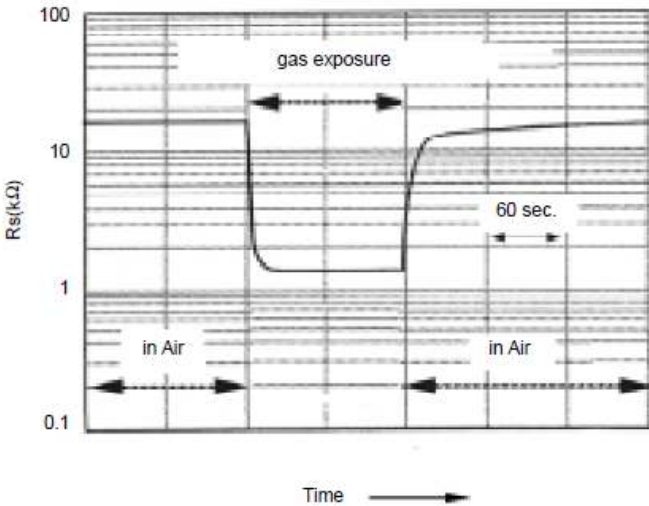


Fig. 9. Respuesta del sensor ante exposición de gas [19]

Igualmente la respuesta inicial del sensor se ve afectada debido a largos periodos en los que este permanece sin alimentación. Como se ve en la figura 10, la resistencia cae de forma abrupta los primeros segundos para luego estabilizarse. No obstante, para la aplicación que se usará el sensor no es ningún problema ya que no se pretende utilizar como alarma cuando exista presencia de gases tóxicos, aplicación en la cual se activaría la alarma de forma errónea apenas se energice el dispositivo.

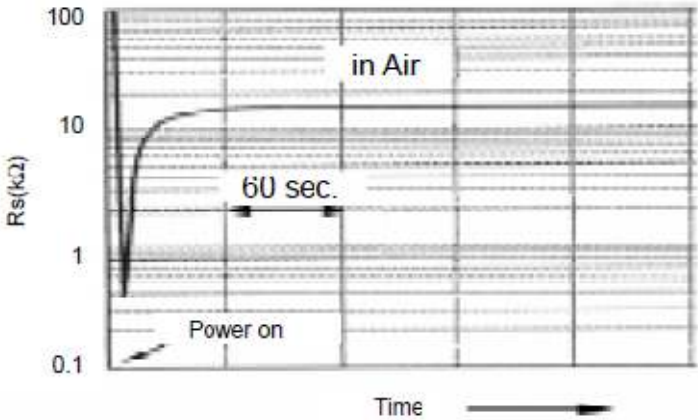


Fig. 10. Respuesta inicial del sensor [19]

#### 2.2.4.4 Temperatura y Humedad

La temperatura y la humedad cambian la velocidad de las reacciones químicas que ocurren en el sensor y generan una disminución en la resistencia debido a la absorción de vapor de agua sobre la superficie del sensor. Por esto se hace necesario mantener estas dos variables controladas en el momento en el que el gas pase a través del sensor. También es importante mantener la humedad en niveles bajos debido a que si ocurre condensación en la superficie del sensor y permanece por largos periodos, su funcionamiento se puede ver afectado.

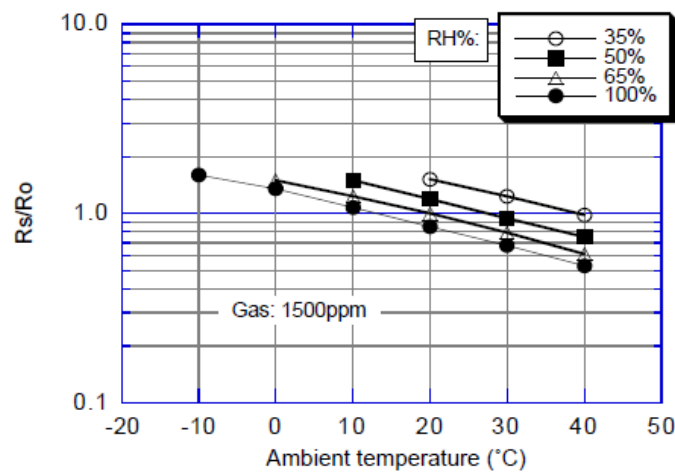


Fig. 11. Dependencia de la temperatura y humedad [19]

#### 2.2.5 Sensor semiconductor en trabajos previos

En trabajos previos en los que se ha implementado el sensor semiconductor, la estrategia de medición consiste en medir la concentración de metanol en el gas que se desprende del proceso interno del biorreactor y que sale a través del escape o salida de gas del biorreactor. Luego, dicho gas es conducido por medio de mangueras hacia una recámara en la que se encuentra el sensor.

Los autores del proyecto [6] reportaron limitaciones en el sistema desarrollado con el sensor TGS822 debido a la dependencia de la medida al cambio de gas para la alimentación de oxígeno al medio, de aire estándar a aire enriquecido en oxígeno. Así mismo encontraron una variación importante en el tiempo de respuesta del sensor cuando hay variación del flujo de gas que pasa a través de él.

Las referencias [8][9] también mencionan la influencia que tiene la tasa de flujo del gas sobre la conductividad del sensor empleado, lo que indica la necesidad del diseño de un lazo de control para mantener este parámetro en un valor constante.

Equipos comerciales como el MC-168 *Methanol Concentration Monitor and Controller* (PTI Instruments, Co.) [10] hace uso del sensor semiconductor de dióxido de estaño y tiene en cuenta algunos de los factores previamente mencionados que afectan al sensor. Este sistema viene equipado con reguladores manuales de flujo de aire para intentar contrarrestar los efectos que tiene la tasa de flujo de gas sobre el sensor, así como con la posibilidad de calibración del equipo por parte del usuario [10].

El equipo MC-168 tiene una entrada para el gas proveniente del escape del biorreactor y otra para un gas de mezcla, aire generalmente. Estos flujos de gas se mezclan en una relación conocida por medio de dos reguladores lo cual produce una reducción en la concentración de metanol en el gas para que esté siempre en el rango de medición del sensor y además aumente su sensibilidad. En otras palabras, el rango de medición del sensor se puede extender empleando este control de relación. En las referencias [7] y [8] emplearon el equipo MC-168 y adicionaron un lazo de control para el gas de escape y el aire de mezcla, así como un lazo de control de presión en la salida del biorreactor. Esto debido a que en el interior del biorreactor se tiene una fase líquida y una fase gaseosa, cuyo equilibrio depende principalmente de la presión y la temperatura en el biorreactor y está determinado por la ley de Henry<sup>6</sup>. En el caso en que la presión de operación sea diferente a la cual fue realizada la calibración del equipo de medición, la lectura de concentración será errónea.

Otro método de medición no hace uso del escape del biorreactor sino que toma una muestra de la concentración de metanol directamente en el líquido. Para ello se emplea un tubo de silicona que se sumerge en la fase líquida del proceso de modo que el metanol presente se difunda a través de una membrana semipermeable. A continuación, el gas resultante se mezcla con un aire de arrastre de tasa de flujo conocida y se lleva al mismo sensor semiconductor. En [12] se evalúan los efectos que tiene la tasa de flujo del gas de arrastre en el tiempo de respuesta del sensor.

---

<sup>6</sup> Es la relación que determina la solubilidad de un gas en un líquido. Esta constante es diferente para cada sustancia.

## 2.2.6 Sonda de Pervaporación

En [11] se toma la muestra para medir la concentración de metanol directamente en el líquido y para este propósito se emplea la sonda de pervaporación FRINGS ALKOSENS (Heinrich Frings GmbH & Co.), en la cual los solventes orgánicos presentes en el medio de cultivo se pervaporan a través de una membrana selectiva multicapa.

La pervaporación ocurre cuando un líquido, en este caso el medio de cultivo, se pone en contacto con una membrana de determinadas características para que sea absorbido por dicha membrana. A continuación, solo algunos componentes permean o pasan a través de la membrana para finalmente evaporarse y ser transportados por un aire de arrastre aplicado en el otro extremo. En las membranas de pervaporación, algunos componentes tienen mayor capacidad para difundirse que otros, lo que quiere decir que sin importar la concentración de un componente en determinada solución, éste puede separarse en su gran mayoría de la solución inicial.

La separación alcanzada de un componente depende del material de la membrana, lo que finalmente dice que tipo de membrana resulta. La sonda Frings Alkosens es del tipo hidrofóbica, lo que significa que solo los componentes orgánicos se difundirán a través de ella pero no el agua. Lo contrario ocurre con una membrana de tipo hidrofílica que permite la difusión del agua mas no el paso de los componentes orgánicos, resultando estos últimos en una forma deshidratada [20].

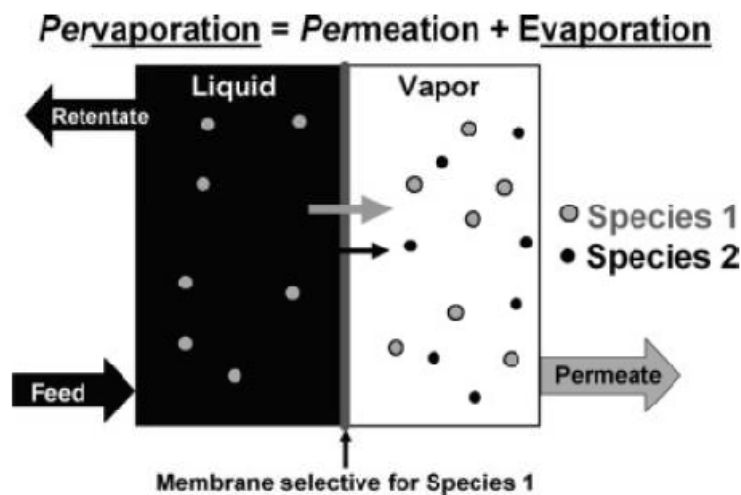


Fig. 12. Proceso de pervaporación [20]

Una vez se tiene el componente orgánico, en este caso metanol en su fase gaseosa, una corriente de aire sintético libre de contaminantes y otros solventes orgánicos transporta la muestra gaseosa de metanol hacia una recámara dentro de la misma sonda en la que se encuentra el sensor semiconductor TGS2620. De este modo se puede hacer la medida de la concentración de metanol directamente en la fase líquida o medio de cultivo.

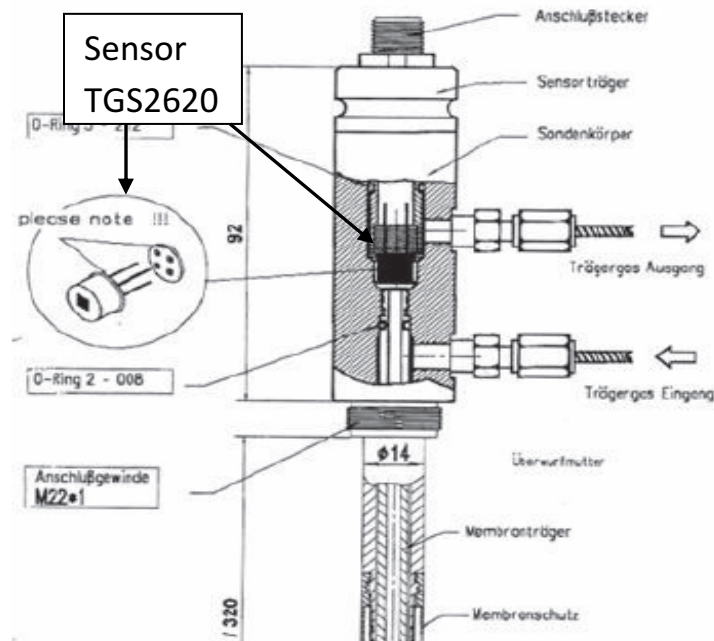


Fig. 13. Sonda de metanol Alkosens (Heinrich Frings GmbH & Co.)

La lectura de concentración de metanol que entrega la sonda de pervaporación depende de la temperatura del medio de cultivo. Sin embargo, la temperatura del medio de cultivo generalmente se mantiene constante en 28°C. Además el fabricante *Heinrich Frings GmbH & Co* menciona que la variación en la lectura de concentración es 0,05%v/v por cada grado Celsius, con lo cual se puede realizar la corrección de la lectura en software para experimentos en los que se requiere variar la temperatura.

El uso de la sonda de pervaporación mitiga todos los problemas relacionados con la dependencia del sensor de metanol a las distintas variables ambientales y de proceso que se tienen en el biorreactor.

Para el caso de la presión parcial de oxígeno, no se tendrá variación alguna ya que el nivel de oxígeno en la muestra que llega al sensor es determinado por el flujo de aire

sintético empleado como gas de arrastre, el cual proviene de un cilindro con una composición de oxígeno constante y a una tasa constante.

La dependencia de la medida con el tipo de gas seguirá existiendo debido a que la tecnología en la cual se basa la medición sigue siendo el sensor semiconductor TGS2620 y la membrana permite el paso de diversos solventes orgánicos como el etanol. Sin embargo, en las condiciones en las que se trabaja no se producen otros componentes distintos al metanol, o por lo menos no en cantidades apreciables que puedan interferir en la medida arrojada por el sensor [5][7].

La variación en el tiempo de respuesta del sensor también será controlada ya que, como se mencionó en la sección 2.2.4, este tiempo es función del flujo de gas que pasa a través de él. Con la implementación de la sonda, el tiempo de respuesta solo depende del flujo del gas de arrastre, el cual se mantiene constante, y no del flujo de gas en el escape del biorreactor, que depende del flujo de aire de suministro y que está cambiando continuamente para cumplir con los requerimientos de concentración de oxígeno disuelto en el cultivo.

En el proyecto [6] se implementó un intercambiador de calor para controlar la temperatura del gas proveniente del escape del biorreactor, y que finalmente va hacia el sensor para obtener la medida de concentración, para reducir el efecto que tiene la variación de la temperatura de la muestra en la medida, así como para evitar la condensación del gas en la superficie del sensor de modo que no sufra daños.

Con la implementación de la sonda de pervaporación, estos problemas se solucionan debido a que el gas que pasa a través del sensor, el cual contiene la muestra a medir, viene de un cilindro de aire sintético o gas de arrastre cuya temperatura es casi constante y cercana a la temperatura ambiente. También se debe tener en cuenta que la humedad en el ambiente no afecta la muestra ya que todo el proceso se lleva a cabo dentro de la sonda en la cual los únicos fluidos presentes son el gas de arrastre o aire sintético y la muestra en fase gaseosa.

Al eliminar el intercambiador de calor se simplifica el equipo de medición y se reduce el consumo de energía.

El uso de la sonda de pervaporación permite tomar la muestra para medir la concentración de metanol directamente en la fase líquida y esto hace que la medición no dependa de la presión interna del biorreactor ya que la muestra será el gas resultante luego de la pervaporación a través de la membrana de la sonda y no el gas

que se desprende del proceso interno del biorreactor, el cual contiene una concentración de metanol fuertemente dependiente de la presión [7]. Este aspecto es de gran importancia ya que la presión al interior del biorreactor está cambiando constantemente debido a que el flujo de aire de suministro para controlar la concentración de oxígeno en el medio de cultivo también está cambiando en todo momento.

### 2.2.7 Cuadro comparativo

A continuación se presentan las ventajas y desventajas de medir la concentración de metanol con cada una de las tecnologías anteriormente expuestas.

Medición de concentración de metanol en biorreactores		
Tecnología	Ventajas	Desventajas
<i>Fotoionización</i>	Se puede eliminar la interferencia de otras sustancias como el etanol	Costo elevado de repuestos, vida útil de corta duración
<i>En soluciones acuosas</i>	Bajo costo	Es necesario generar una recirculación del medio lo cual puede causar su contaminación
<i>Cromatografía de gases</i>	Alta resolución y exactitud. No existe interferencia en la medida causada por otras sustancias	No sirve para medición en línea
<i>Sensor semiconductor</i>	Permite medir en el gas que se desprende del proceso interno de biorreactor	Dependencia de la temperatura, humedad, flujo de aire y presión
<i>Sonda de pervaporación</i>	Mide directamente en fase líquida, mitiga los efectos de la temperatura, humedad y flujo de aire	Debe soportar condiciones hostiles como alta temperatura durante el proceso de esterilización

Tabla. 1 Cuadro comparativo de tecnologías de medición de concentración de metanol en biorreactores

### 2.3 Bomba peristáltica

El funcionamiento de una bomba peristáltica consiste en comprimir una manguera de material flexible contra una superficie circular por medio de rodillos. La sustancia que se encuentra atrapada entre dos rodillos es entregada a medida que la bomba gira. La cantidad de sustancia entregada por la bomba peristáltica es función del tiempo que dure la bomba encendida, la velocidad y del diámetro de la manguera empleada.

El flujo volumétrico de líquido está dado por:

$$Flujo = \frac{Volumen\ líquido}{tiempo} [ml/h]$$

Debido a que la manguera está fuertemente comprimida entre los rodillos y la superficie de la bomba, no habrá fluido devolviéndose. Esto es importante en el momento en que la bomba no esté operando porque sella momentáneamente la manguera, ya sea por un corte de energía o porque el controlador le indique que debe estar en OFF.

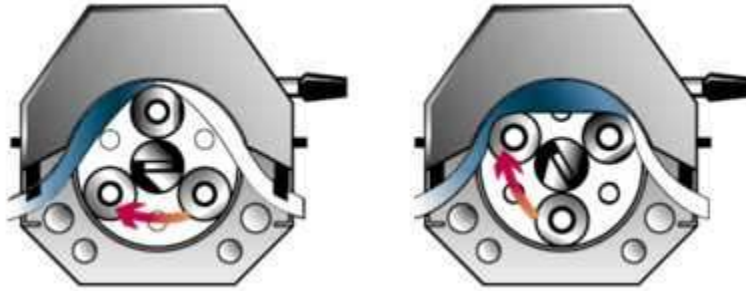


Fig. 14. Bomba peristáltica [6]

Este tipo de bombas son ideales para aplicaciones en las que se requiera un alto grado de higiene ya que la única parte en contacto con el fluido es el interior de la manguera, la cual es previamente esterilizada. Sin embargo, para suministrar la cantidad de metanol que requiere el medio de cultivo en el biorreactor del IEIM se necesita un actuador con resolución de por lo menos 1 ml/h y según las pruebas de calibración de la bomba peristáltica realizadas con una manguera del menor diámetro disponible, esta puede entregar flujos de metanol líquido con una resolución mínima de 3ml/h. Proyectos futuros para la optimización del control de concentración de metanol en el biorreactor deben resolver esta limitación.



### 3. Especificaciones

El sistema para la medición y control de la concentración de metanol consta principalmente de cuatro partes que son:

1. La red de transporte, regulador de presión y un equipo industrial para el control del flujo de gas de arrastre.
2. El sistema de medición de concentración de metanol compuesto por una sonda de pervaporación y el sensor de vapores de compuestos orgánicos,
3. La bomba peristáltica encargada de suministrar metanol líquido al cultivo
4. La unidad de control encargada de la adquisición y procesamiento de datos y el control ON/OFF para la bomba peristáltica. El controlador ON/OFF de concentración de metanol es el encargado de manejar la bomba peristáltica para la adición de metanol en estado líquido al cultivo y su diseño no hace parte del alcance del presente trabajo. Su implementación se realizó con base en los diseños del control ON/OFF de concentración de metanol configurado en el trabajo [6].

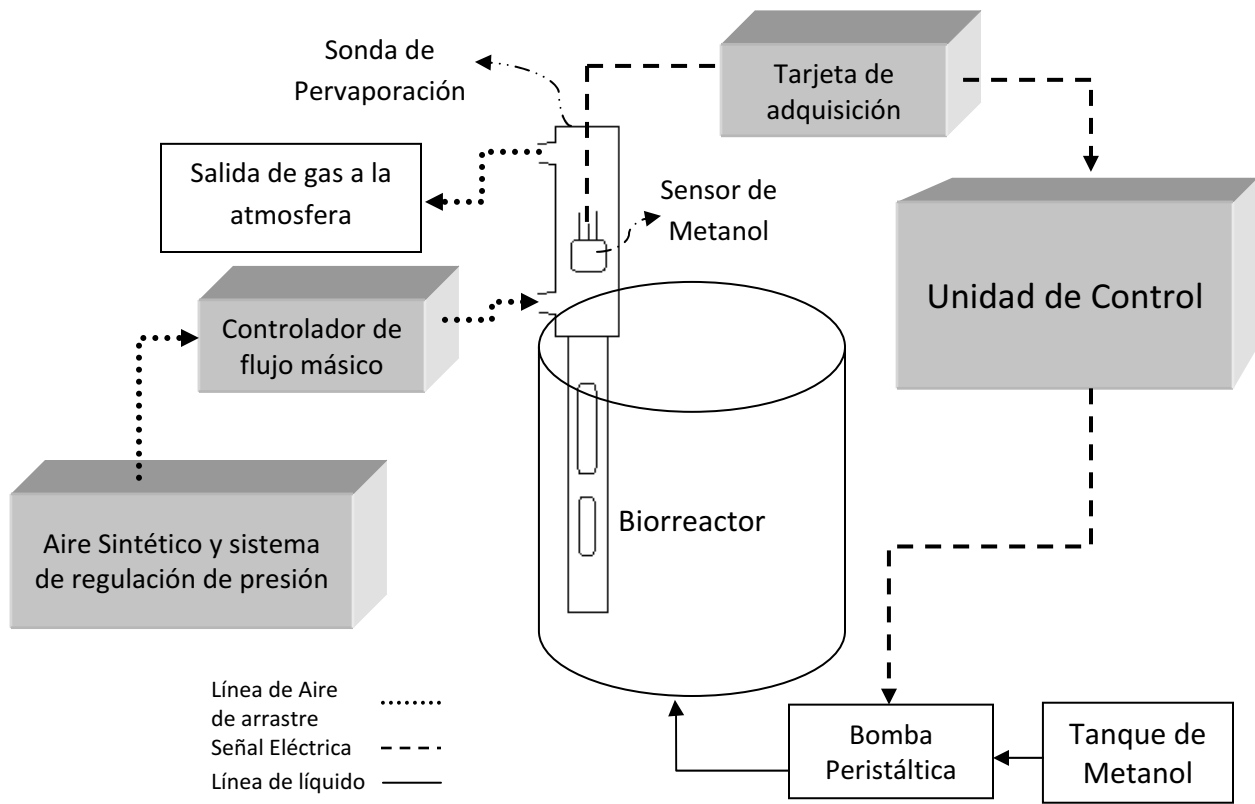


Fig. 15. Diagrama de bloques del sistema

### 3.1 Especificaciones generales

El biorreactor en el cual crece la levadura *Pichia Pastoris* debe mantener el ambiente propicio y ciertas condiciones para optimizar la producción de las enzimas que se quieren obtener.

- Biorreactor Bioengineering KLF2000 3.7L
- Volumen del cultivo: 1.6 – 2.0L
- Rango de medición de concentración de metanol: 0.1%v/v - 3%v/v
- Temperatura de operación (cultivo): 28°C ± 0.1°C
- Presión de operación en el biorreactor: 0barg – 1.5barg

### 3.2 Sistema de aire sintético

Como se explicó en la sección *Marco teórico*, la sonda de pervaporación encargada de medir la concentración de metanol requiere de un gas de arrastre que permita conducir la muestra de metanol en forma de gas hacia el sensor semiconductor. Para esto se construyó una red de aire sintético que provee a la sonda del flujo y la presión solicitada por el fabricante para obtener una medida correcta.

- Cilindro: 1m<sup>3</sup> con válvula de bronce CGA 590
- Composición aire sintético grado cero: 20% Oxígeno ±0.5% y Nitrógeno balance, humedad 3ppm máximo y total de hidrocarburos 1ppm máximo.
- Presión de entrada (cilindro): 2100 – 2900 psi
- Regulador de presión: presión de entrada hasta 3000psig, presión de salida hasta 200psig
- Tubería para transporte de aire sintético: Acero inoxidable 316L, ¼” y 1/8” OD y manguera de teflón 1/8” OD.
- Rango de control del controlador de flujo másico para aire sintético: 4–200 scc/min
- Exactitud controlador de flujo: ±1% de escala completa
- Presión de entrada al controlador de flujo: 6.1 barg
- Presión de salida del controlador de flujo: 0.1 barg
- Tipo de conexión controlador de flujo: ¼” *compression fitting*
- *Set point* de control para flujo de aire sintético: 20 cc/min @ 1atm, 15°C

### 3.3 Sistema de medición de concentración

La sonda de pervaporación, principal componente del sistema, es la encargada de generar una lectura en función de la concentración de metanol presente en el medio de cultivo. Para poder adaptarse al biorreactor Bioengineering KLF2000, la sonda se fabricó con un puerto de conexión y longitud hechos a la medida. Las siguientes son las especificaciones de la sonda fabricada por la marca Heinrich Frings GmbH & Co.

- Rango de medición: 0.1 – 3.0%v/v
- Precisión: 0,025%v/v
- Desviación máxima de la lectura de concentración:  $\pm 0,3\%$ v/v
- Rango de Temperatura: 10 – 143°C
- Presión máxima: 2barg
- Material de la sonda: 316 Ti SS
- Longitud de la sonda: 270mm
- Puerto de conexión al biorreactor: Roscado DN19
- Tipo de conexión de aire sintético: *Compression fitting*
- Diámetro de conexión aire sintético: 1/8"

### 3.4 Sistema de adquisición y procesamiento

Para el sistema de adquisición y procesamiento se implementó un controlador de tipo industrial marca *National Instruments*, programado en *LabView*, que permite obtener la medida de concentración, realizar la calibración de la sonda, hacer el control de concentración de metanol y generar reportes e históricos. Algunas de sus características son:

- Controlador de automatización programable: *CompactRIO* 9022 con Chasis 9114
- Modulo de entrada para resistencia: 0-10k $\Omega$  *Universal Analog Input* 9219, 24 bits
- Máxima tasa de muestreo con módulo de entrada NI 9219: 100S/s
- Módulo de salida en corriente:  $\pm 20$ mA *Analog output* 9265
- Voltaje de alimentación: 24V

### 3.5 Sistema de control de concentración de metanol

El control de concentración de metanol desarrollado en [6] se implementó para este sistema, el cual incluye originalmente una bomba peristáltica como actuador que no se modificó. El actuador del sistema de control, encargado de suministrar la cantidad de metanol necesaria, es la bomba peristáltica Bioengineering Peripex que entrega cierta cantidad de metanol en función del tiempo que permanezca activa y de la señal de control correspondiente a su velocidad.

- Tipo de control: ON/OFF
- Banda diferencial:  $0.005\%v/v - 0.1\%v/v$
- Rango de velocidad bomba peristáltica: 0-100rpm
- Rango de adición:  $0 - 350\text{ml/h} \pm 3\text{ml/h}$
- Señal de control: 4-20mA
- Diámetro interno de la manguera: 1/16"

## 4. Desarrollos

El sistema implementado consiste en la integración de distintos equipos para lograr el objetivo final de obtener una medida de concentración de metanol que no se vea afectada por las distintas variables involucradas en el proceso. En la figura 16 se presenta el *P&ID* del sistema de medición y control de concentración de metanol desarrollado.

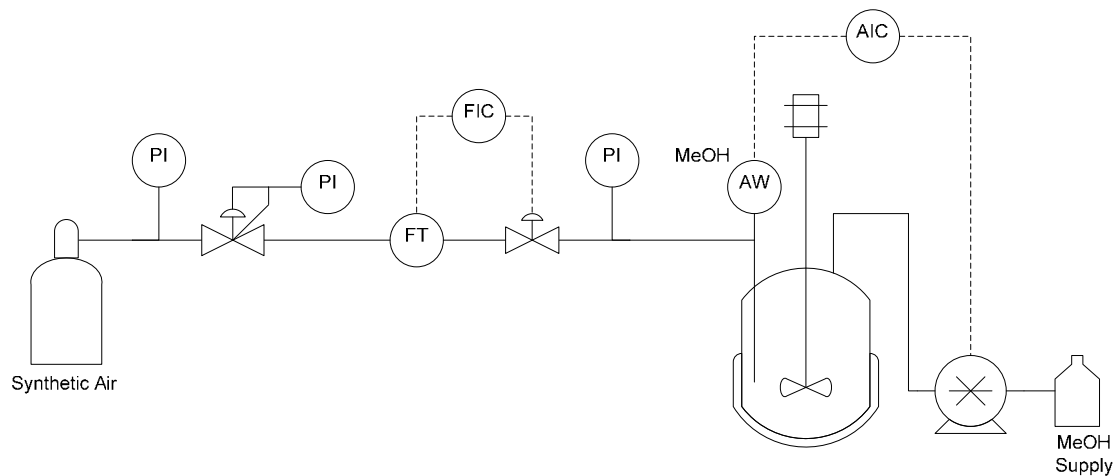


Fig. 16. P&ID del sistema

### 4.1 Medición y control de flujo para el aire de arrastre

Para la medición y control del aire de arrastre se consideraron varias tecnologías entre las que se encuentran medición de flujo volumétrico con turbina y medición de flujo másico por transferencia térmica y efecto Coriolis. A continuación se presentan cada una de ellas.

#### 4.1.1 Medición de flujo con turbina

El medidor tipo turbina consiste en un rotor de turbina montado sobre un eje que gira libremente dentro de la carcasa cilíndrica del medidor. Cuando el flujo incide sobre las palas o álabes del rotor, este gira con una velocidad angular proporcional a la velocidad del fluido que pasa a través de la turbina. El giro de la turbina es detectado por sensores magnéticos montados en el cuerpo del instrumento en los cuales se genera una señal con frecuencia proporcional a la velocidad del fluido.

Para no perder exactitud ni repetibilidad en los medidores tipo turbina, la tubería por la que se transporta el fluido debe ser recta y sin codos; en algunos casos es necesario instalar aguas arriba secciones de tubería con accesorios de adecuación del fluido para que este no tenga irregularidades y sea lo más uniforme posible.

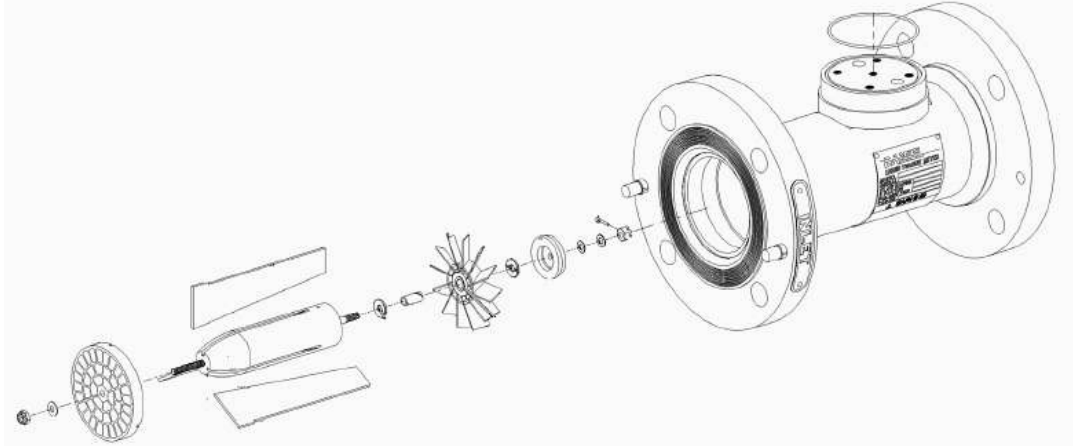


Fig. 17. Partes del medidor tipo turbina [35]

Al ser un medidor volumétrico, la medición se ve afectada por cambios en la presión y temperatura del fluido. Debido a la influencia de estas variables en la medida, se debe hacer una corrección para tener una lectura del flujo verdadero.

La presión de entrada al equipo de control de flujo recomendado por el fabricante de la sonda de pervaporación es 6barg (101.717 psia). En estas condiciones el gas es comprimido y por lo tanto su volumen disminuye. Al salir del medidor el aire sintético pierde presión y queda en condiciones estándar<sup>7</sup> con lo cual su volumen aumenta. En este punto el flujo de aire sintético que llega a la sonda debe ser igual a los 20cc/min solicitados por el fabricante para el funcionamiento correcto de la sonda de pervaporación. Por esto las unidades de flujo en condiciones estándar deben ser convertidas a unidades de flujo en condiciones de operación de modo que se corrija el efecto que tiene la presión y temperatura en la lectura de un medidor de flujo volumétrico.

$$Q_a = \frac{\rho_{std}}{\rho_a} Q_{std}$$

<sup>7</sup> ISO 5024 (1981): Presión 14.6959psia y temperatura 15°C

Donde  $Q_a$ ,  $Q_{std}$ ,  $\rho_a$  y  $\rho_{std}$  son los flujos de aire y densidades en condiciones de proceso y condiciones estándar respectivamente.

Para calcular la densidad del aire en condiciones de proceso se emplea la ecuación que relaciona en un gas real la presión, la temperatura y el volumen dada por:

$$P_a V_a = n Z_a R_0 T_a$$

Donde  $n$  es el número de moles,  $R_0$  la constante universal de los gases y  $Z_a$  el factor de compresibilidad.

Conociendo que un mol está definido como una masa de gas igual a su peso molecular  $M_w$  se obtiene  $n * M_w = m$ ; reemplazando en la ecuación de gases reales:

$$P_a V_a = \frac{m}{M_w} Z_a R_0 T_a$$

Despejando en términos de densidad y con los valores de la constante universal de los gases  $R_0 = 8.3144 \frac{J}{K mol}$  y el peso molecular del aire  $M_w = 28.96247 \frac{g}{mol}$  se obtiene

$$\frac{m}{V_a} = \frac{P_a M_w}{Z_a R_0 T_a} = \frac{M_w}{R_0} \frac{P_a}{Z_a T_a} = 3.4834 \frac{P_a}{Z_a T_a} = \rho_a$$

Finalmente se calcula la relación de densidades para el aire en condiciones estándar y condiciones de operación:

$$\frac{\rho_{std}}{\rho_a} = \frac{3.4834 \frac{P_{std}}{Z_{std} T_{std}}}{3.4834 \frac{P_a}{Z_a T_a}} = \frac{P_{std}}{Z_{std} T_{std}} \frac{Z_a T_a}{P_a}$$

Según [25] el factor de compresibilidad  $Z_a$  para el aire en las respectivas condiciones de temperatura y presión es igual a:

$$Z_a = 0.9992 @ 1bar, 250K$$

$$Z_a = 0.9999 @ 1bar, 300K$$

$$Z_a = 0.9987 @ 5bar, 250K$$

$$Z_a = 0.9974 @ 10bar, 300K$$

Para las condiciones de operación (6barg y 15°C) y condiciones estándar, el factor de compresibilidad es cercano a 1 y su efecto se puede despreciar resultando:

$$\frac{\rho_{std}}{\rho_a} = \frac{P_{std} * T_a}{P_a * T_{std}}$$

Con lo cual es posible obtener el flujo de aire sintético en condiciones de operación

$$Q_a = \frac{\rho_{std}}{\rho_a} Q_{std} = \frac{P_{std} * T_a}{P_a * T_{std}} Q_{std} = \frac{14.695psia * 15^\circ C}{101.717psia * 15^\circ C} * 20cc/min$$

$$Q_a = 0.144 * 20 \frac{cc}{min} = 2.9 \frac{cc}{min}$$

Los medidores tipo turbina que se encuentran en el mercado no tienen límites mínimos de medición tan bajos como el que se requiere medir, teniendo en cuenta también que su “rangeabilidad” es usualmente 10:1 o 20:1. Un ejemplo es la turbina MF20 de la serie *miniflow* de Hoffer Flow Controls Inc. cuyo límite mínimo de medición es 26.5 cc/min.

#### 4.1.2 Medición de flujo por efecto Coriolis

La medición por el principio de efecto Coriolis se basa en las fuerzas que se generan cuando un fluido se ve sujeto a oscilaciones perpendiculares a su dirección de movimiento. La fuerza Coriolis está dada por:

$$\vec{F}_c = 2m(\vec{v} \times \vec{\omega})$$

Donde  $F_c$  es la fuerza Coriolis,  $m$  la masa del fluido,  $v$  la velocidad radial del fluido en el sistema en rotación y  $w$  la velocidad angular.

Un medidor Coriolis consiste de un tubo por el cual pasa el fluido, generalmente en forma de u, que oscila a cierta frecuencia. La frecuencia de oscilación es registrada por dos sensores ubicados aguas arriba y aguas abajo del tubo. Cuando hay flujo mayor a cero, el tubo sufre una torsión haciendo que las oscilaciones registradas en los sensores del medidor tengan una diferencia de fase que se traduce en la cantidad de masa que está fluyendo por el tubo. La diferencia de fase es proporcional al flujo de masa. En la figura 18 se ilustra el principio de funcionamiento.



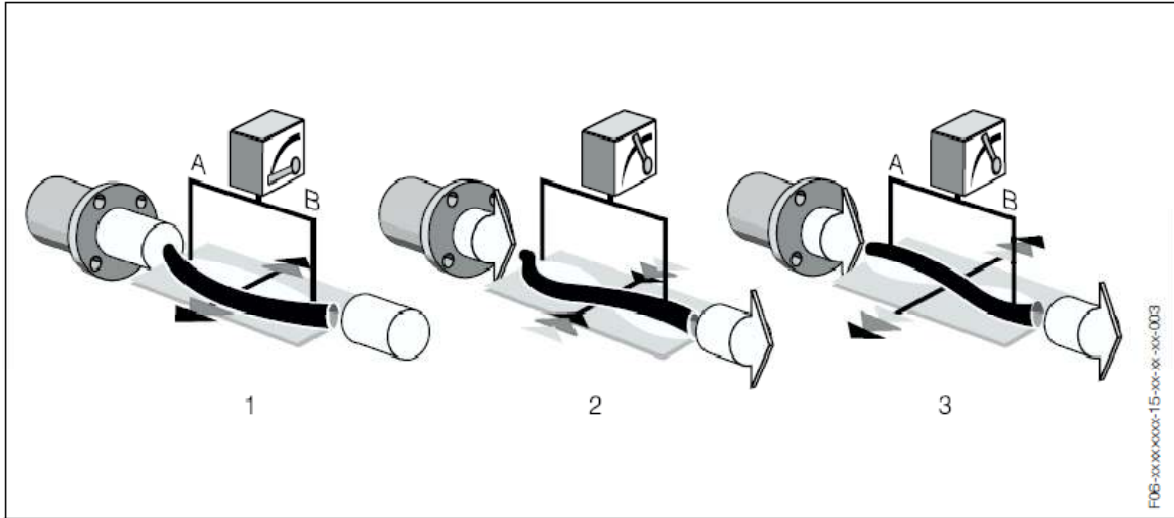


Fig. 18. Medición de flujo por efecto Coriolis [36]

Los medidores másicos por efecto Coriolis también pueden ser usados para medir la densidad de un fluido gracias a que la frecuencia de oscilación del tubo es función de la cantidad de masa presente en dicho tubo oscilante como se vio en la sección 2.2.2. Con el valor de la densidad del fluido, el medidor Coriolis puede hacer el cálculo para entregar una lectura exacta de flujo volumétrico.

Este principio de medición funciona independiente de la temperatura, presión, densidad, viscosidad y conductividad del proceso. Adicionalmente la frecuencia de oscilación del tubo es alta, evitando que la medida sea influenciada por vibraciones en la tubería.

El medidor Promass 80A DN1 de Endress+Hauser está hecho para flujos pequeños tanto de líquidos como gases. El máximo valor de escala para este medidor en volumen es 10416 cc/min con una rangeabilidad de 1000:1, es decir que el mínimo valor que puede medir es 10cc/min. Dado que el flujo de aire sintético a medir es 20scc/min, este medidor podría ser usado para la aplicación. Sin embargo un instrumento de medición pierde exactitud a medida que se acerca a su límite inferior de medición.

Según el fabricante, el máximo error en la medida para un flujo volumétrico será:

$$\pm 0.25\% \pm \left( \frac{0.001}{\text{valor medido}} \right) * 100\% = \pm 0.25\% \pm \left( \frac{0.001}{0.02} \right) * 100\% = \pm 5.25\%$$

Esto indica que la medición de flujo de aire sintético oscilará entre 21.05scc/min y 18.95scc/min. Aunque la medición por efecto Coriolis es robusta, el error debido al flujo tan bajo que se maneja es considerable.

#### 4.1.3 Medición de flujo por transferencia térmica

Otra tecnología explorada es la medición de flujo másico por transferencia térmica. El principio de operación consiste en un flujo de aire que entra al cuerpo del instrumento para luego dividirse en dos flujos distintos, uno de los cuales es conducido a través de un tubo sensor y el otro a través de un tubo que actúa como *bypass* que a la vez ayuda a crear un flujo laminar. El tubo de *bypass* genera una diferencia de presión, haciendo que se vaya una cantidad pequeña de flujo hacia el tubo sensor.

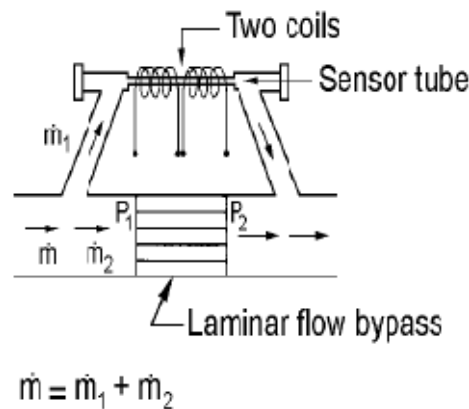


Fig. 19. Medidor de flujo internamente [24]

El sensor del controlador de flujo está constituido por dos alambres que actúan como RTD arrollados en los dos extremos de un tubo sensor que le proporcionan una cantidad de calor constante al flujo de aire que está pasando a través de él. Mientras no exista flujo de aire, la distribución de temperatura en el tubo sensor se mantiene constante, siendo la temperatura más alta en el centro y más baja en los extremos.

En el momento en que exista un flujo de aire, el flujo másico empieza a llevar calor desde el extremo del tubo sensor aguas arriba hacia el extremo del tubo sensor aguas abajo [24].

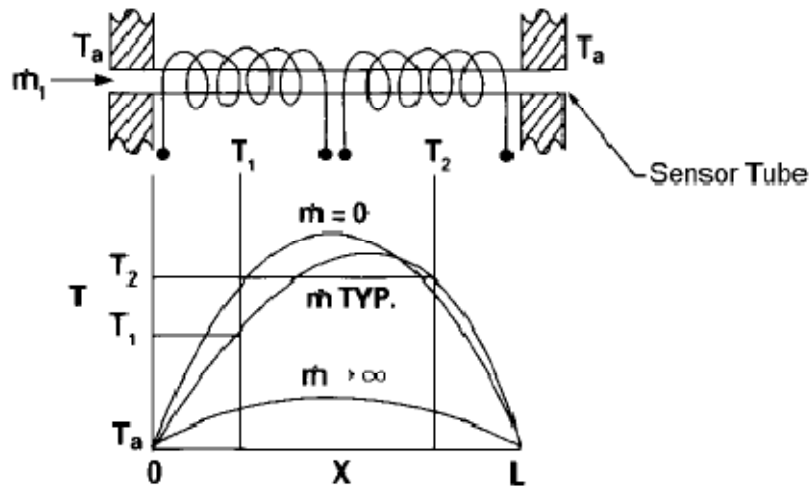


Fig. 20. Distribución de temperatura en el tubo sensor [24]

La diferencia de temperatura resultante es medida por un circuito interno que consiste de un puente del cual las dos RTD hacen parte, y el cual produce un voltaje proporcional a  $\Delta T$ . El coeficiente de calor específico del gas  $C_p$  y la cantidad de calor suministrado por los alambres arrollados se ingresan al equipo en fábrica como constantes. Con estos datos se tiene por la primera ley de la termodinámica el flujo másico del gas que pasa a través del instrumento.

$$H_i = \dot{m} * C_p(T_2 - T_1) + H_o$$

$$\dot{m} = \frac{H_i - H_o}{C_p * \Delta T}$$

Al igual que la medición por Coriolis, el medidor por transferencia térmica no se ve afectado por la densidad, presión o temperatura del proceso.

El controlador de flujo másico Smart Trak 2 Series 100 fabricado por Sierra Instruments Inc. se basa en el principio de medición por transferencia térmica y adicionalmente tiene una válvula solenoide incorporada para regular el flujo medido en el tubo sensor. Esto se logra modulando la señal de corriente que alimenta las bobinas de la válvula de modo que no solo actué en las posiciones ON y OFF sino

que también el núcleo o pistón se mantenga en la posición adecuada para que solo pase el flujo de gas que indica el *set point*.

La calibración de este equipo se realiza en fábrica en condiciones estándar y debido a esto su lectura está en unidades scc/min. Es ideal para la aplicación ya que ocupa un espacio pequeño, el flujo de gas es medido y controlado dentro del mismo instrumento y según el fabricante, el control de flujo de gas tiene una exactitud de 1% de la escala máxima a la cual se calibre. Esto indica que para un controlador de flujo másico Smart Trak 2 Series 100 calibrado hasta 20scc/min, se tiene una exactitud de 0.2scc/min y por consiguiente el flujo de gas de arrastre oscila entre 20.2 scc/min y 19.8 scc/min. Además, con este equipo se evita la necesidad de adquirir una válvula de control, instrumento adicional que se requiere como actuador para el control del flujo de aire sintético en el caso que se usen los medidores tipo turbina o efecto Coriolis.

#### **4.2 Tubería para la red de aire sintético**

Para la red de transporte de aire sintético se implementó una tubería en acero inoxidable de ¼" de diámetro con distintos accesorios marca *Swagelok* en acero inoxidable que manejan presiones de hasta 760 bar, generalmente usados en este tipo de aplicaciones y que permiten la conexión entre sus componentes: regulador de presión, controlador de flujo másico, manómetro y sonda de pervaporación.

Debido a que la sonda tiene un puerto de conexión para el aire sintético de diámetro 1/8" *compression fitting* y el controlador de flujo tiene conexiones de ¼" *compression fitting*, se hizo necesario implementar una reducción *Swagelok* ¼" OD (*outside diameter*) a 1/8" OD. Luego de esto se debe verificar que en la entrada de aire sintético a la sonda no se suba la presión a valores perjudiciales para la sonda debido a posibles taponamientos dentro de la misma por lo que se realizó el montaje de un manómetro sobre una T (*Tee*) *Swagelok* 1/8" OD x 1/8" female NPT.

Las conexiones descritas se muestran en el siguiente diagrama de tubería:

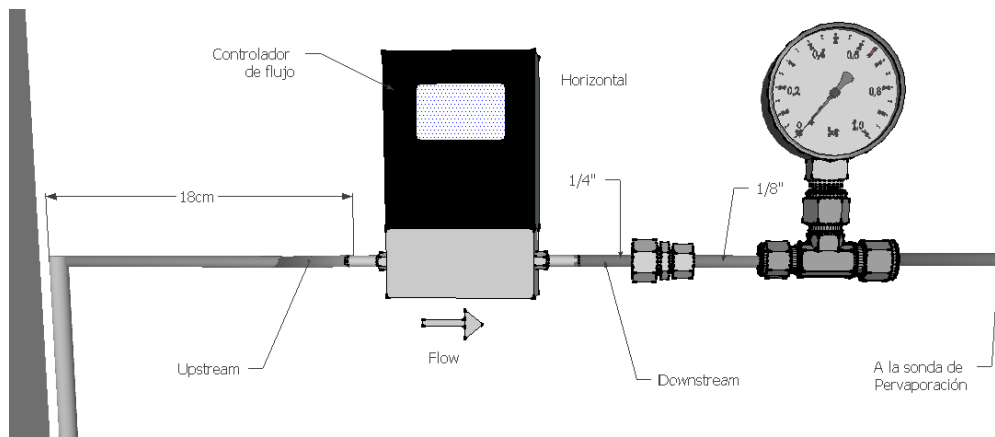


Fig. 21. Accesorios de tubería para la red de aire sintético

El montaje completo se muestra en la figura 22 donde se observa la distribución de los distintos componentes de la red de aire sintético, algunas dimensiones de la tubería, el montaje horizontal del controlador de flujo y los puertos de entrada y salida para el cilindro de aire sintético y la sonda de pervaporación respectivamente.

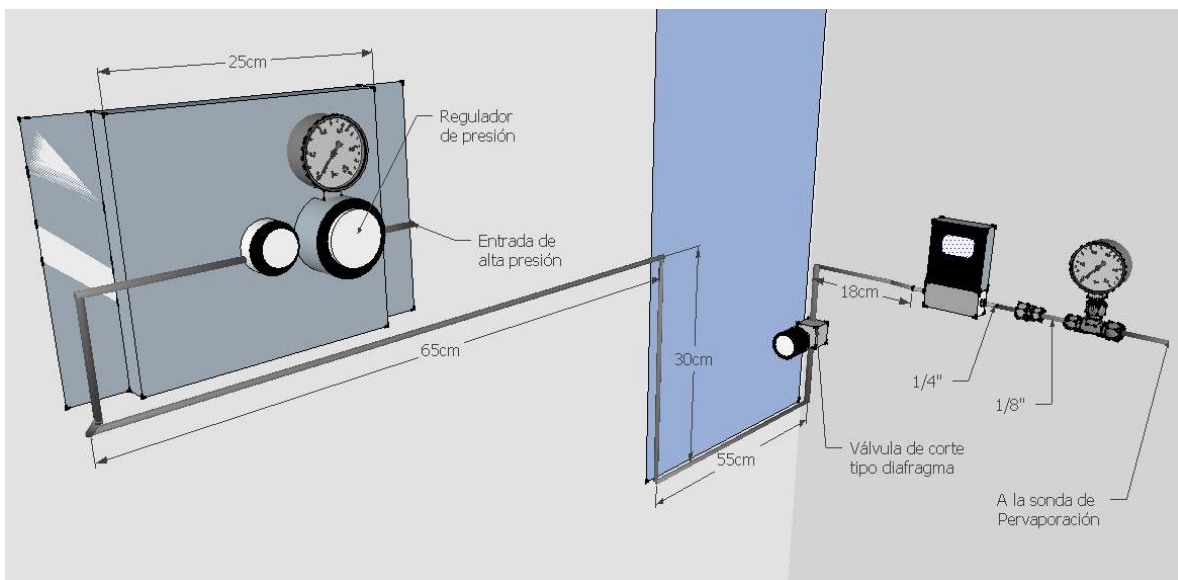


Fig. 22. Diagrama de tubería de aire sintético

### 4.3 Instalación mecánica de la sonda de pervaporación

Los puertos de conexión para adición de sustratos y las distintas sondas de medición que tiene el biorreactor KLF2000 son *Ingold port DN12* de 12mm de diámetro y un puerto adicional *Ingold Port DN19* de 19mm de diámetro.



Fig. 23. Puertos de conexión *Ingold Port* DN19 y DN12

La sonda escogida tiene para conexión a proceso un puerto *Ingold Port DN25* en su presentación estándar lo que generó la necesidad de solicitar al fabricante la construcción de una sonda hecha a la medida que permitiera acoplarla al biorreactor. Según el fabricante, el diámetro mínimo con el que se puede fabricar esta sonda es de 14mm, lo que llevó a usar el puerto *DN19* como puerto de conexión a proceso.



Fig. 24. Sonda de pervaporación Alcosens estándar

Para esto se envió al fabricante una réplica del tapón que se ajusta en el puerto DN19 disponible en el biorreactor de modo que se le hiciera a la sonda un adaptador a la medida. En la figura 25 se presenta la pieza guía.



Fig. 25. Tapa ciega para puerto *Ingold Port DN19*

Finalmente la sonda de pervaporación hecha a la medida fue instalada en el puerto *Ingold port DN19* y se verificó su correcto ajuste en busca de fugas tanto en operación normal como en modo de esterilización donde se alcanzan temperaturas de hasta 120°C dentro del biorreactor resultando en un desempeño satisfactorio.



Fig. 26. Sonda de pervaporación con conexión a proceso hecha a la medida

#### 4.4 Sistema de control y adquisición

El sistema encargado del monitoreo y control de la concentración de metanol es un equipo industrial marca *National Instruments* de la serie *CompactRIO*. Este equipo es ideal para la aplicación porque garantiza que las aplicaciones que controlan el proceso siempre estén corriendo de modo que éste nunca se detiene y además se logra una interfaz sencilla y amigable que le permite al usuario visualizar y controlar todas las variables del sistema. Para un mayor detalle de la programación realizada en el sistema de control y adquisición, se puede consultar el código fuente en los anexos (en medio magnético).

El sistema total consiste de: un PC donde corre la interfaz de usuario, se almacenan datos históricos y se ejecutan tareas que no necesitan correr en tiempo real como la rutina de calibración; un controlador industrial *CompactRIO* en el que se ejecutan las tareas vitales de adquisición y control y se almacena información importante como la curva de calibración de la sonda, y finalmente los módulos de adquisición de corriente, voltaje y resistencia. La arquitectura del sistema digital se muestra a continuación:

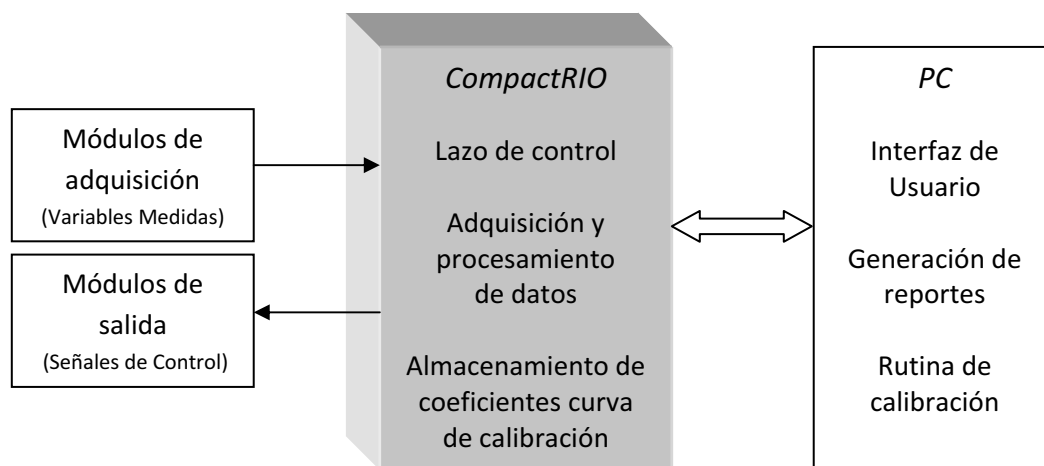


Fig. 27. Arquitectura sistema digital



#### 4.4.1 Interfaz de usuario

La interfaz de usuario, necesaria para controlar todo el sistema de medición y control, se programó en *LabView* con base en los diagramas de flujo presentados a continuación. Se compone de tres elementos principales que son: la rutina de adquisición y registro de datos, la rutina de control para la bomba peristáltica y la rutina de calibración de la sonda de pervaporación.

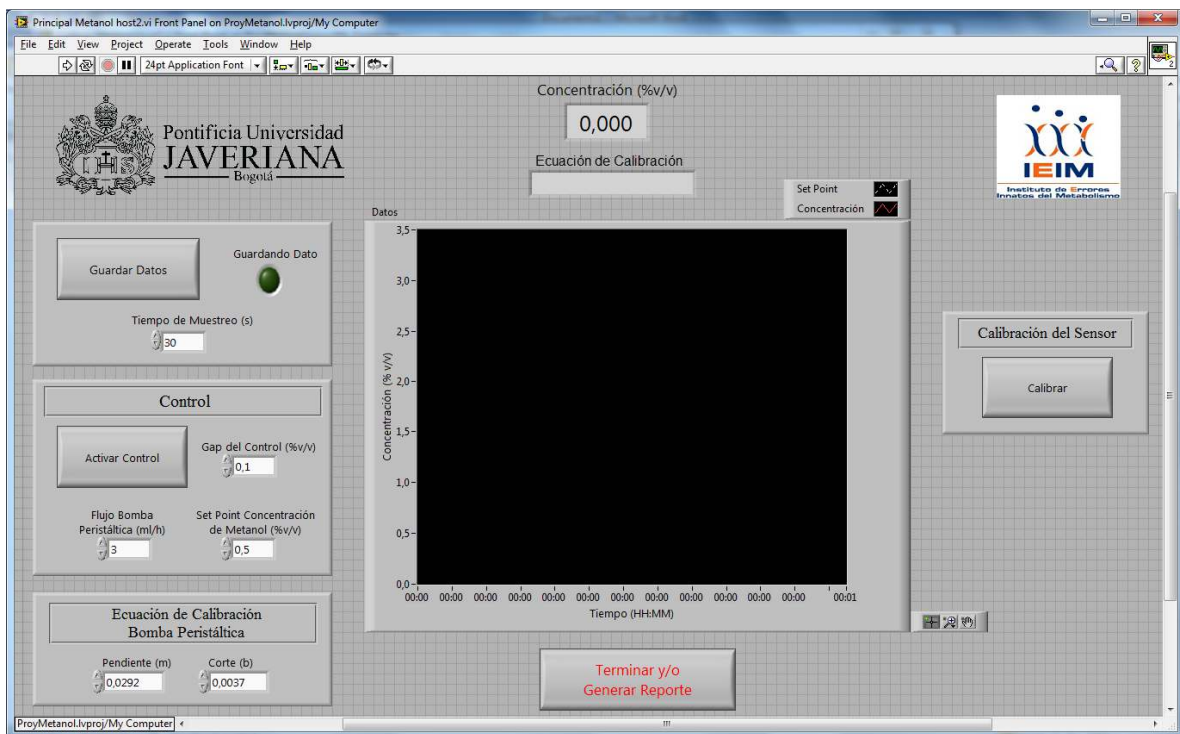


Fig. 28. Pantalla principal de la interfaz de usuario

La interfaz de usuario principal consta de un indicador numérico de concentración y otro en forma gráfica, comandos para iniciar la calibración de la sonda, para guardar los datos que se están adquiriendo en el tiempo indicado por el usuario, iniciar o terminar el control ON/OFF de la adición de metanol al biorreactor y la posibilidad de ingresar datos de *set point* y el flujo de la bomba peristáltica cuando se encuentre en estado ON.

Adicionalmente, una vez finalizada la adquisición de los datos, se genera un reporte en Excel con los valores de concentración de metanol con su respectiva fecha y hora, así como una gráfica de los datos registrados. En las figuras 29 y 30 se presentan los diagramas de flujo que dirigen este proceso.

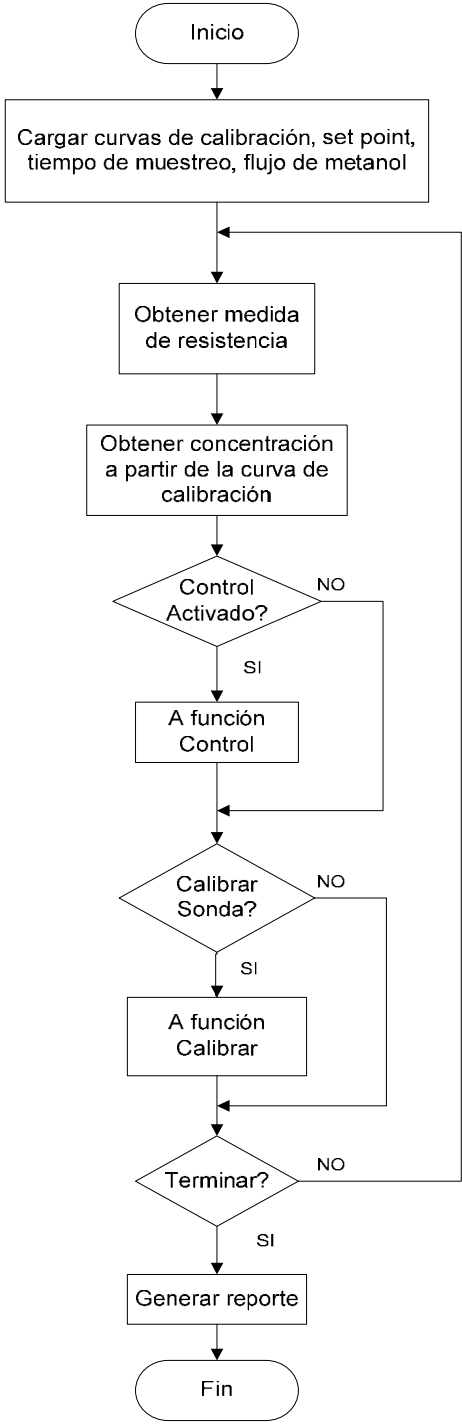


Fig. 29. Diagrama de flujo rutina de medición

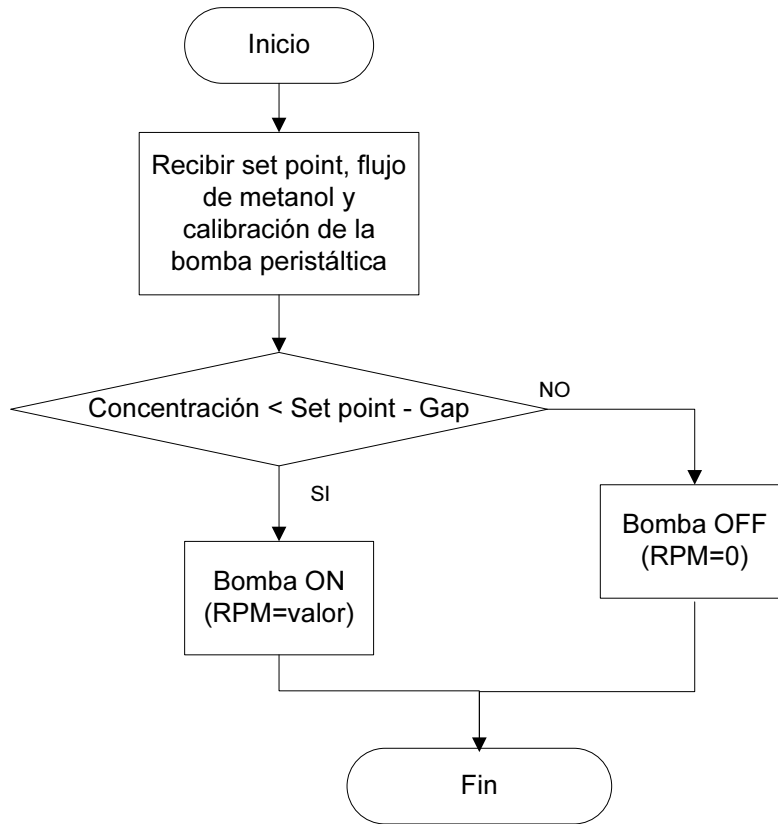


Fig. 30. Diagrama de flujo control ON/OFF

Se generaron las rutinas de calibración con el fin de que el usuario tenga la posibilidad de observar las variaciones a través del tiempo en el comportamiento de la lectura que produce la sonda, tanto en los valores de resistencia que entrega para concentraciones de metanol determinadas como en su tiempo de respuesta. Además, tener la rutina de calibración incorporada en el software del sistema de supervisión y control permite generar un histórico de calibraciones con el cual se advierta el desgaste de la sonda de pervaporación, es decir se pierda sensibilidad en la medida a tal punto que la variación de resistencia en el rango de 0,2%v/v a 5%v/v sea menor a 1000Ω. Esta situación señala la necesidad de realizar un mantenimiento o el cambio de piezas de repuesto.

La sonda de pervaporación se someterá a condiciones hostiles cada vez que se requiera medir la concentración de metanol en el cultivo de *Pichia Pastoris*. Dado que las membranas a través de las cuales se separa el metanol por pervaporación son

susceptibles a la temperatura, la etapa de esterilización al biorreactor que se realiza en cada cultivo cambia ligeramente las propiedades de las membranas causando que la curva de calibración sufra un corrimiento y deba ser ajustada al inicio de la etapa de medición de concentración de metanol en cada cultivo.

Para la rutina de calibración se tienen tres ventanas: la primera le presenta al usuario la posibilidad de hacer una calibración sobre punto o realizar una nueva calibración, siempre mostrando la función de calibración con la que se está obteniendo actualmente el valor de concentración. Una vez se calibre la sonda con una de las dos alternativas mencionadas, se presenta al usuario la nueva función de calibración, para la cual se almacenan los coeficientes de la curva de calibración obtenida de modo que estén guardados hasta que el usuario decida recalibrar la sonda de pervaporación.



Fig. 31. Interfaz rutina de calibración inicial

La segunda ventana de la rutina de calibración permite al usuario realizar una nueva calibración de la sonda. Esta calibración se hace generalmente con agua y cantidades de metanol determinadas para tener concentraciones de metanol similares a las que se tendrán en el cultivo [11]. Se pueden usar hasta 5 puntos de calibración en los cuales el usuario debe ingresar el valor de concentración de metanol presente en el biorreactor y esperar a que el valor de resistencia se estabilice.

En la interfaz de calibración se pueden usar hasta 5 puntos de calibración, generalmente entre 0,2%v/v y 2,0%v/v, en la cual el usuario debe ingresar el valor de concentración de metanol de la solución que adicionó al biorreactor y esperar a que el valor de resistencia que entrega la sonda se estabilice; este procedimiento se realiza para cada punto de calibración.

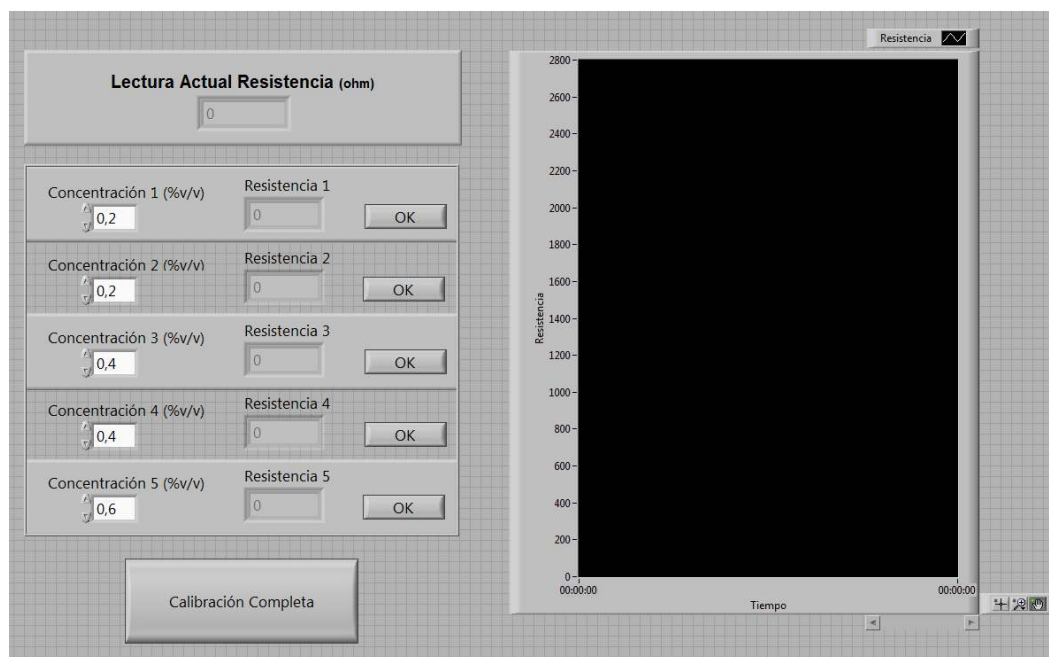


Fig. 32. Interfaz rutina de calibración principal

Cuando el usuario oprime el botón OK en cada punto de calibración, se toman 5 muestras del dato para generar una nube de puntos que permitan hacer un mejor ajuste a una curva potencial. Una vez se obtienen los puntos de calibración, se realiza una regresión por el método de mínimos cuadrados a los vectores de datos correspondientes a concentraciones y resistencias para obtener los coeficientes  $A$  y  $\alpha$  de la curva que describe el comportamiento del sensor y con esto generar la curva de calibración. El diagrama de flujo de la figura 33 describe de manera general este procedimiento.

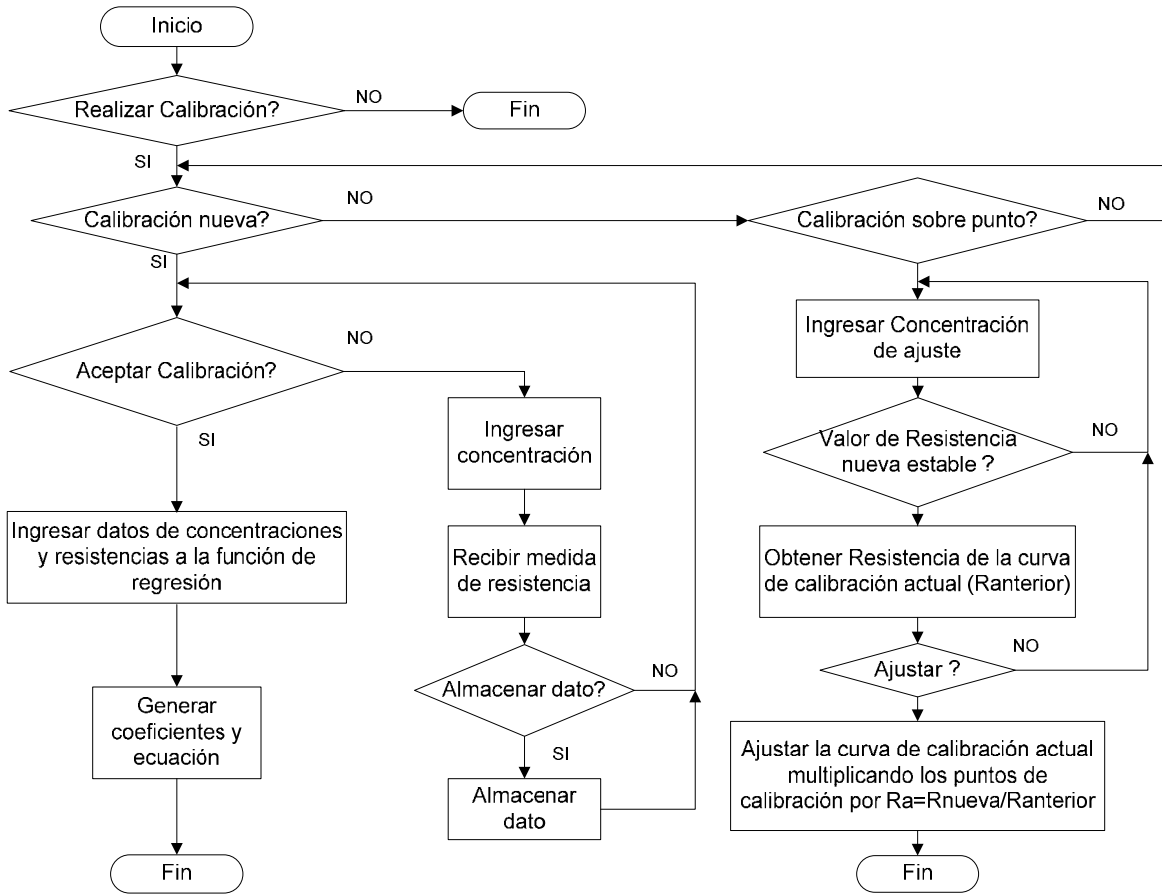


Fig. 33. Diagrama de flujo rutina de calibración

Como se presentó en la sección 2.2.4 *Sensor semiconductor*, es posible obtener una relación lineal entre las nuevas variables  $m(\alpha)$  y  $b(A)$ , con el fin de realizar una regresión lineal que permita obtener las constantes de calibración de la ecuación que describe el comportamiento del sensor semiconductor y por consiguiente de la sonda de pervaporación.

Obtener el mejor ajuste de los datos a una curva potencial es ahora un problema de regresión lineal por mínimos cuadrados que pretende hallar una recta  $y = mx + b$  que minimice el error cuadrático respecto a los distintos valores de calibración  $(x_i, y_i)$ .

$$S = \sum_{i=1}^n (y_i - y(x_i))^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - (mx_i + b))^2$$

Para  $m$

$$\begin{aligned}\frac{dS}{dm} &= \frac{dS}{dm} \sum_{i=1}^n (y_i - (mx_i + b))^2 = \sum_{i=1}^n \frac{dS}{dm} (y_i - (mx_i + b))^2 = 0 \\ \frac{dS}{dm} &= -2 \sum_{i=1}^n (y_i - (mx_i + b)) x_i = 0 \\ &= \sum_{i=1}^n x_i y_i = m \sum_{i=1}^n x_i^2 + b \sum_{i=1}^n x_i\end{aligned}$$

Para  $b$

$$\begin{aligned}\frac{dS}{db} &= \frac{dS}{db} \sum_{i=1}^n (y_i - (mx_i + b))^2 = \sum_{i=1}^n \frac{dS}{db} (y_i - (mx_i + b))^2 = 0 \\ \frac{dS}{db} &= -2 \sum_{i=1}^n (y_i - (mx_i + b)) = 0 \\ &= \sum_{i=1}^n y_i = m \sum_{i=1}^n x_i + bn\end{aligned}$$

Resolviendo para  $m$  y  $b$  se obtiene

$$\begin{aligned}m &= \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \\ b &= \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n y_i - m * \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i = \bar{y} - m\bar{x}\end{aligned}$$

Con estos dos valores se pueden despejar los coeficientes de la ecuación que describe el comportamiento del sensor  $\alpha$  y  $A$ , para luego ser almacenados en la memoria del *CompactRIO*. Esto con el fin de tener los coeficientes siempre disponibles sin importar el computador que se use para correr las aplicaciones correspondientes a la interfaz de usuario.

Experimentalmente se observó que la curva de calibración de la sonda de pervaporación presenta una variación a causa de la esterilización que se realiza al

biorreactor previa al cultivo real, etapa en la que se alcanza una temperatura de 120°C, y los valores de resistencia para cada valor de concentración de la curva de calibración se modifican, todos en igual proporción.

Por esto se generó una segunda rutina de calibración en la cual se hace una corrección, denominada calibración sobre punto, que ajusta la curva de calibración realizada antes de la esterilización para que coincida con la curva de calibración real, es decir la curva de calibración después de esterilizar. Esto es posible dado que los puntos de calibración sufren un corrimiento en igual proporción por lo que solo basta conocer el corrimiento en un punto para hacer el ajuste a toda la curva.

En una de las fases del cultivo con *Pichia Pastoris* se agrega una cantidad conocida de metanol y por consiguiente se conoce la concentración de metanol presente en el medio. El software compara el valor de resistencia obtenido para la concentración de metanol presente en el biorreactor con el valor de resistencia que se obtuvo para esa misma concentración de metanol antes de esterilizar. De esta comparación resulta el valor del corrimiento que sufrió la curva de calibración.

La ventana número tres de la rutina de calibración es para dicha calibración sobre punto y se muestra en la figura 34.

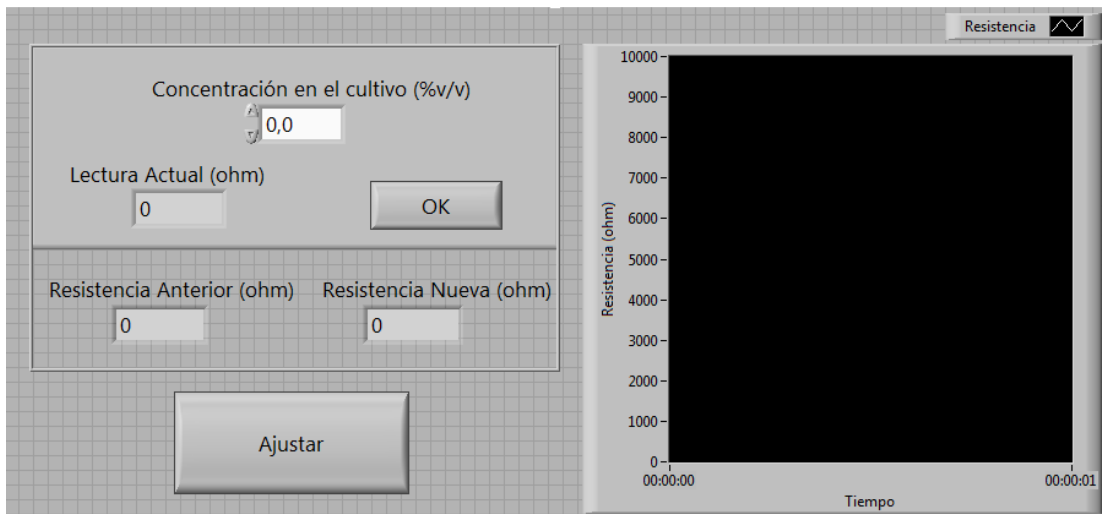


Fig. 34. Interfaz de usuario para calibración sobre punto

Para comprobar que la rutina de calibración sobre un punto entrega una curva de calibración que coincide con las nuevas lecturas de la sonda de pervaporación, se hizo



una calibración con agua y metanol y luego se esterilizó el biorreactor. Una vez esterilizado el biorreactor, se realizó una nueva calibración. En la figura 35 se muestran las curvas de calibración antes y después de la esterilización y la curva de calibración resultante luego de la calibración sobre el punto 0,6%v/v.

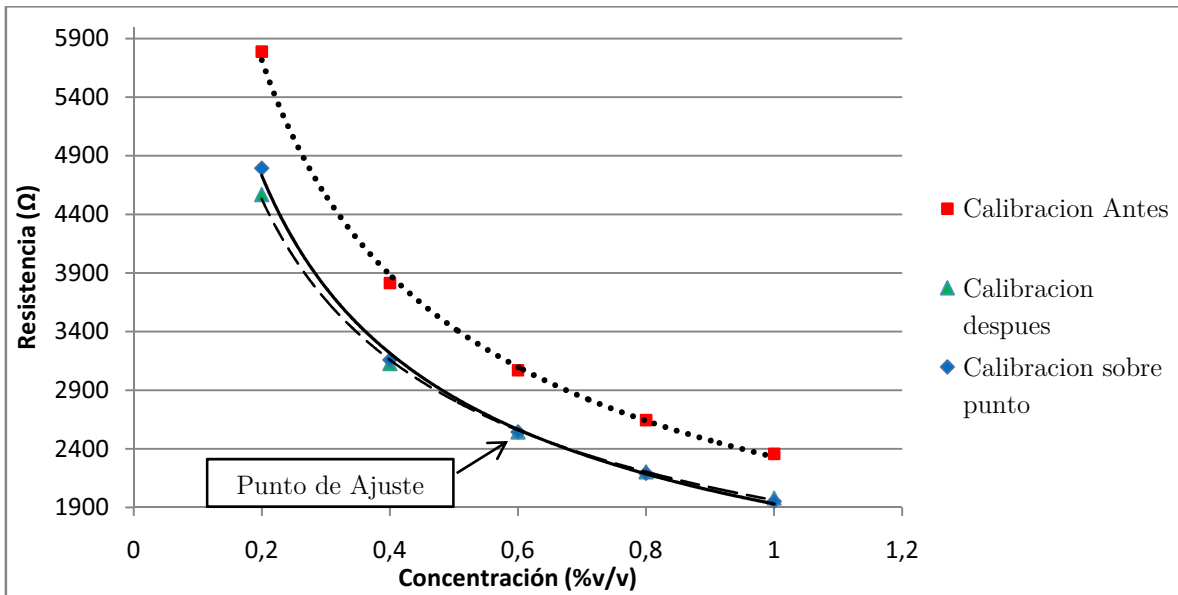


Fig. 35. Curvas de calibración antes (••••) y después (- - -) de esterilizar y calibración sobre punto (—)

Para obtener mejores resultados con la calibración sobre un punto, se elige como punto de calibración el valor de concentración de metanol en el que se quiera controlar durante el cultivo, de modo que en esta región se tenga el mayor ajuste entre las curvas como se observa en la figura 35.

El ajuste se realiza hallando la relación entre los valores de resistencia antes y después de esterilizar obtenidos para una concentración determinada. Luego se desplazan los demás puntos de calibración, específicamente los valores de resistencia, multiplicándolos por la relación que se acaba de encontrar.

A continuación se presenta la forma como el sistema realiza la calibración sobre punto:

Concentración (%v/v)	Resistencia Calibración Antes ( $\Omega$ )	Resistencia Calibración Después ( $\Omega$ )
0,2	5789	4568
0,4	3814	3126
0,6	3070	2542
0,8	2645	2202
1	2357	1979

Tabla. 2 Valores de resistencia antes y después de esterilizar

Calibrando sobre el punto 0,6%v/v se obtiene una relación de resistencias:

$$R_a = \frac{2542 \Omega}{3070 \Omega} = 0,828$$

Se obtienen los puntos para generar la nueva curva de calibración multiplicando la relación de ajuste  $R_a$  con cada uno de los valores de resistencia anteriores:

Concentración (%v/v)	Resistencia Calibración Antes ( $\Omega$ )	Relación de ajuste (Concentración=0,6%v/v)	Calibración sobre punto ( $\Omega$ )	Resistencia Calibración Después ( $\Omega$ )	$\Delta R$ ( $\Omega$ )
0,2	5789	0,828	4793,3	4568	225,4
0,4	3814		3158,0	3126	32,0
0,6	3070		2542,0	2542	0,0
0,8	2645		2190,1	2202	-12,1
1	2357		1951,6	1979	-27,5

Tabla. 3 Calibración sobre punto

La creación de una nueva curva de calibración dependerá de la exactitud con la que el usuario desea obtener la medida de concentración de metanol. El fabricante de la sonda especifica que su exactitud es de  $\pm 0,3\%$ v/v en el rango de concentración 0-6%v/v, sin embargo el usuario puede requerir una exactitud mayor. La exactitud de la sonda puede ser verificada agregando al biorreactor una solución con concentración de metanol conocida y con la lectura obtenida, se verifica la desviación respecto a la

lectura esperada o verdadera. Si la desviación en la lectura no cumple con la exactitud requerida por el usuario, es necesario realizar una nueva calibración.

#### 4.4.2 Adquisición de datos

Para la adquisición de la señal proveniente de la sonda de pervaporación se tienen varias tecnologías existentes en el mercado que permiten acondicionar la señal para que sea adquirida por el controlador CompactRIO.

Entre las soluciones comunes está: la conversión de resistencia a voltaje que se implementó en el trabajo [6], solución que aconseja el fabricante de los sensores semiconductores Figaro Engineering Inc., la conversión de resistencia a corriente que permite transmitir la señal grandes distancias y el uso de módulos de adquisición y acondicionamiento de señales.

##### 4.4.2.1 Transmisor 4-20mA

Para el acondicionamiento de la salida que proviene del sensor en ohmios, una alternativa es usar un transmisor de corriente 4-20mA, el cual generará la señal de corriente de entrada a los módulos de entrada/salida del controlador *National Instruments*, específicamente al módulo de entrada de corriente NI 9208.

Debido a que el sensor puede disipar una potencia máxima de 15mW y conociendo que el valor máximo de resistencia del sensor es de 12k $\Omega$  aproximadamente (en aire) [6][19], la corriente de excitación máxima para el sensor debe ser:

$$P_s \leq 15mW = I^2 * R_{smax} = I^2 * 12k\Omega \quad \Rightarrow \quad I \leq \sqrt{\frac{15mW}{12k\Omega}} = 1.1mA$$

El transmisor de corriente 4 – 20mA de Texas Instruments XTR112 cumple con esta especificación ya que posee dos fuentes de corriente de precisión de 250 $\mu$ A [26].

Con una corriente de excitación para el sensor de metanol de  $250\mu\text{A}$  y conociendo los valores para las constantes  $A$  y  $\alpha$  de la ecuación que describen el comportamiento del sensor obtenidas en [6] iguales a 501 y 0.55 respectivamente, se tendrán los siguientes valores de resistencia para el rango de concentración a medir:

$$R_{sCmin} = 501 * 0.1^{-0.55} = 1780\Omega$$

$$R_{sCmax} = 501 * 3^{-0.55} = 274\Omega = R_z$$

A continuación se muestra la configuración requerida para el transmisor XTR112:

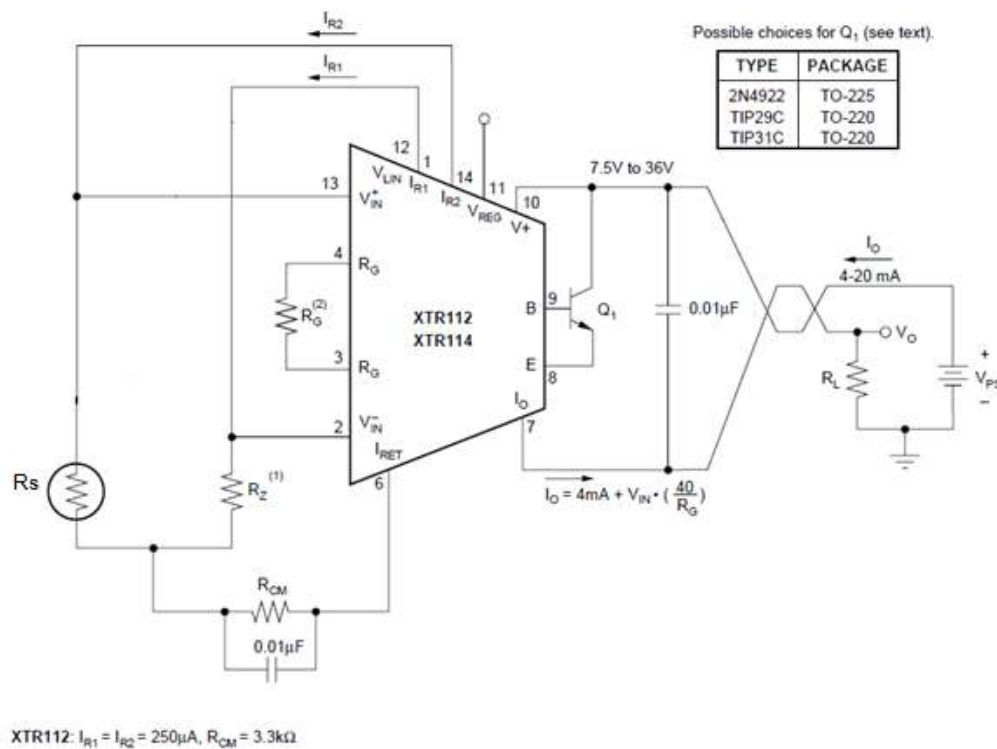


Fig. 36. Transmisor 4-20mA[26]

El máximo voltaje diferencial de entrada será igual a:

$$URV = 250\mu\text{A} * (R_{sCmin} - R_{sCmax}) = 250\mu\text{A} * (1780\Omega - 274\Omega) = 377\text{mV}$$

Según la hoja de especificaciones del transmisor XTR112, el valor de la resistencia que determina el *span*<sup>8</sup> de la medida será:

$$R_G = 2500 * V_{FS} = 2500 * 377mV = 943\Omega$$

Con el cual se obtiene una salida de:

$$I_o = 4mA + V_{in} * \frac{40}{R_G} = 4mA + 377mV * \frac{40}{943\Omega} = 19.99mA$$

Esto indica que con esta configuración se debe hacer una corrección en el controlador de modo que la salida 20mA del transmisor corresponda al valor de concentración máximo y el valor de 4mA corresponda a la mínima concentración.

Usar un transmisor 4-20mA puede ser útil ya que la sonda de pervaporación y el controlador *National Instruments* están a una distancia considerable, haciendo que la longitud del cable empiece a incidir en la lectura de concentración obtenida, siendo más notoria en el caso en que se tenga una alta concentración ya que la sensibilidad del sensor semiconductor se ve disminuida considerablemente.

Sin embargo, esta solución requiere que el hardware adicional deba estar cercano a la sonda, la cual estará expuesta a temperaturas altas en el momento de la esterilización del biorreactor que pueden causar cambios en el comportamiento habitual de los componentes electrónicos. Igualmente el rango de medición es dependiente de resistencias fijas externas requeridas por el transmisor XTR 112, lo que disminuye la resolución de la medida si se calcula un *span* muy amplio; esto puede suceder debido a que el sensor en presencia de pequeñas cantidades de gas (300ppm=0,03%v/v) puede entregar valores de resistencia entre 1k $\Omega$  y 5k $\Omega$  [9].

#### 4.4.2.2 Módulo 9219 *National instruments*

Otra alternativa para medir la señal de resistividad que entrega el sensor semiconductor hace uso de uno de los módulos de entrada/salida de propósito general que es compatible con el sistema CompactRIO de *National Instruments*. Con el

---

<sup>8</sup> Diferencia entre el valor mínimo y el valor máximo del mesurando al cual está calibrado un instrumento de medición.

módulo NI 9219 de la serie C es posible medir directamente la resistividad del sensor con una resolución de 24 bits en un rango de 0 a 10k $\Omega$ .

Con la conexión a 4 hilos, el módulo entrega una corriente a través de los pines Ex+ y Ex- que varía en función de la carga conectada. Esta corriente de excitación hace que se genere una caída de voltaje sobre la resistencia que luego será medido por el ADC interno entre los pines HI y LO. Con base en este valor de voltaje se obtiene el valor de resistencia del sensor semiconductor. Además, gracias a la alta impedancia de entrada del ADC, la corriente que fluye entre HI y LO es despreciable por lo que la resistencia de los cables y por consiguiente su longitud no afecta la medida realizada.

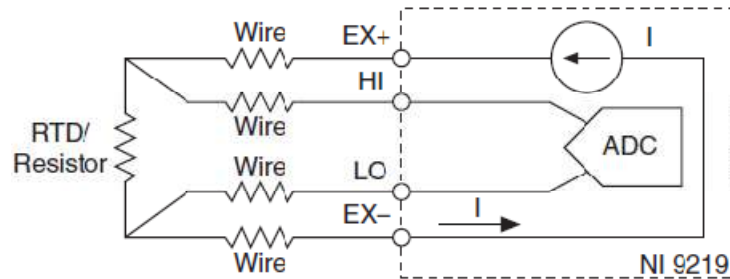


Fig. 37. Conexión a 4 hilos módulo NI 9219 [27]

El módulo NI 9219 tiene voltajes de excitación pequeños que cumplen con el requerimiento del sensor TGS2620 de no sobrepasar 15mW de potencia disipada, siendo el peor de los casos 0.48mW la potencia que disiparía una carga resistiva.

Load Resistance ( $\Omega$ )	Excitation (mV)
120	50
350	150
1 k	430
10 k	2200

Fig. 38. Voltajes de excitación del módulo NI 9219 [27]

#### 4.4.3 Control de adición de metanol

Para la adición de metanol, el usuario selecciona un flujo fijo de metanol líquido para adicionar cuando la concentración de metanol sea menor al *set point*. Por esta razón

en [6] se desarrollo un control ON/OFF que se implementó en el sistema *CompactRIO* como mecanismo de control para este trabajo. Para corregir la adición de metanol extra que se produce debido al tiempo de respuesta de la sonda, se agregó un *gap* o banda diferencial en el control de modo que se apague la bomba peristáltica cuando se alcance una concentración de metanol cercana pero inferior a la referencia.

El *gap* lo determina el valor que aumenta la concentración del cultivo si se adiciona metanol en el tiempo de respuesta de la sonda. Esto es la cantidad de metanol entregada a un volumen determinado de medio de cultivo en el tiempo de respuesta de la sonda.

$$\Delta C(\%v/v) = \frac{(\tau + t_r) * F_m * P_M}{V_c}$$

Donde  $\tau + t_r$  es el tiempo de respuesta de la sonda en horas, tomando en cuenta el efecto del retardo y de la constante de tiempo,  $F_m$  el flujo de metanol en *ml/h*,  $V_c$  el volumen del cultivo en *ml* y  $P_M$  la pureza del metanol. En esta ecuación no se tiene en cuenta el consumo de metanol por parte del microorganismo debido a que no se conoce de manera precisa. Sin embargo, el tiempo en el que el microorganismo consume una cantidad determinada de metanol no es comparable con el tiempo de respuesta de la sonda y es posible despreciarlo.

En la interfaz de usuario se ingresan los valores de flujo de metanol y los coeficientes de la curva de calibración realizada previamente a la bomba. Con estos valores, se entrega una corriente en el rango de 4-20mA que determina la velocidad adecuada para que la bomba peristáltica entregue el flujo ingresado.

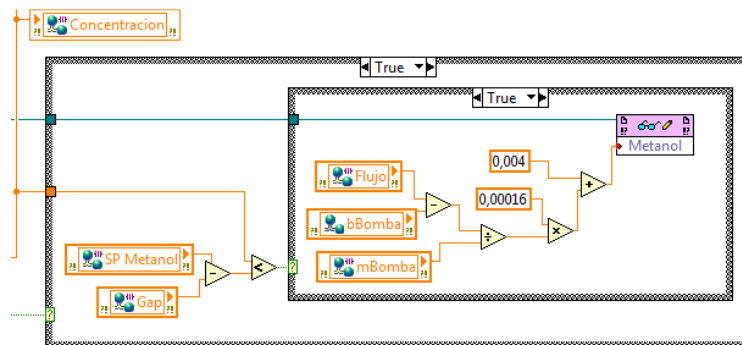


Fig. 39. Control ON/OFF en estado ON

#### **4.4.4 Reportes e históricos de calibración**

El sistema cuenta con la posibilidad de generar reportes de los datos de concentración, así como de generar un histórico de calibración para monitorear el comportamiento de la sonda de pervaporación a lo largo del tiempo.

Cuando el usuario tenga la necesidad de guardar los datos que se están generando de concentración de metanol, solo debe oprimir el botón *Guardar Datos* en la interfaz principal para que se inicie el registro de los valores de concentración, junto con la hora y la fecha, que luego serán organizados a manera de tabla en un archivo en Excel para el cual el usuario escoge su nombre y ubicación en la memoria del computador. Se requiere el comando *Guardar Datos* debido a que en el momento de realizar la calibración no es importante guardar los valores de concentración que se están obteniendo, sin embargo es decisión del usuario generar un reporte en condiciones de calibración.

Simultáneamente, se está generando una copia en archivo de texto de los valores de concentración con su respectiva hora y fecha cada vez que se recibe un dato. Esto con el fin de conservar la información en un eventual corte de energía que apague el sistema de control y adquisición.

Para monitorear el comportamiento de la sonda de pervaporación a lo largo de su uso, se genera un archivo de texto automáticamente cada vez que el usuario realiza una nueva calibración, ya sea sobre un punto o con nuevos puntos de calibración, que contiene la nueva función de calibración, los puntos de calibración y valores de resistencia obtenidos y los datos de hora y fecha. Con este histórico de calibraciones se tiene una herramienta para verificar el desgaste de la sonda y anticipar los mantenimientos y cambios de piezas que se le deben realizar.

#### **4.4.5 Asignación de pines para conexiones eléctricas**

Las conexiones eléctricas de las señales de control para los distintos sensores y actuadores que hacen parte del sistema se muestran a continuación en la figura 40.



Módulo	Pines (Nombre)	Conexión a	Pines (Nombre)	Descripción
9219 (Ch 0) Analog Input	3 (HI)	Sonda (Sensor de metanol con cable de conexión eléctrica)	2 (Sensor electrode +)	Excitación y adquisición de la señal del sensor semiconductor para la medición de concentración de metanol
	5 (LO)		1 (Sensor electrode -)	
9208 Analog Input	1 (AI 0)	Módulo de temperatura del biorreactor (Conector DIN-6)	1 (Variable medida)	Adquisición de la señal de temperatura del cultivo para corregir la medida de concentración de metanol
	9 (COM)		2 (Ground)	
9265 Analog Output	0 (AO 0)	Bomba peristáltica	10 (Remote Set point +)	Se controla la velocidad de la bomba peristáltica con señal 4-20mA
	1 (COM 0)		11 (Remote Set point -)	
	2 (AO 1)	Controlador de flujo másico	8 (Set point)	Señal 4-20mA para controlar el flujo de aire sintético a 20ml/m
	3 (COM 1)		10 (Ground/Set point)	
	8 (Vsup)	Fuente de voltaje	+24V	Fuente de potencia para proveer corriente a los dispositivos conectados al módulo
	9 (Power Supply COM)		GND	

Fig. 40. Asignación de pines para los módulos de entrada/salida

En la figura 41 se indican las conexiones eléctricas correspondientes a los voltajes de alimentación para cada equipo. Esta alimentación proviene de la fuente de voltaje industrial marca *B&B* DP-660 adquirida específicamente para el proyecto.

	Pines	Conexión a	Pines
Fuente de Voltaje	+ 24V	CompactRIO	V1
	GND		C
	+24V	Controlador de flujo	6 (Power Input +)
	GND		5 (Power Return -)
	+5V	Sensor semiconductor	3 (Heater)
	GND		4 (Heater)

Fig. 41. Asignación de pines para la fuente de voltaje

El circuito de conexión eléctrica se presenta en la sección *Anexos*.

## 5. Análisis de resultados

Las mediciones de concentración de metanol realizadas en condiciones de operación constantes así como cambiantes se analizaron para verificar la repetibilidad, reproducibilidad y exactitud del sistema total.

### 5.1 Calibración de la sonda de pervaporación

Antes de iniciar cualquier proceso de medición se debe realizar la calibración de los instrumentos de medida con el fin de obtener lecturas lo más exactas posible. Es por esto que la sonda de pervaporación se calibró en repetidas ocasiones para verificar que su comportamiento siempre se ajuste a una curva potencial y que sea repetible.

En una de las calibraciones realizadas con puntos de calibración 0.2%v/v, 0.4%v/v, 0.6%v/v, 0.8%v/v y 1.0%v/v, solución de agua y metanol, volumen de cultivo 1650ml, velocidad del agitador 600rpm, temperatura 28°C y flujo de aire para suministro de oxígeno al medio 0 l/min se obtuvo la siguiente curva de calibración:

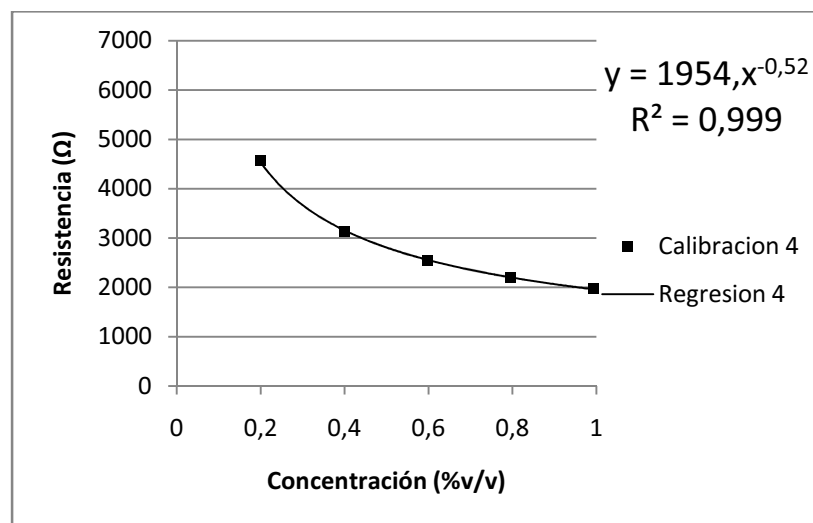


Fig. 42. Curva de calibración #4

Como se observa en la figura 42, el comportamiento de la sonda de pervaporación es descrito por una función potencial ya que se tiene un coeficiente de determinación de 0,999 entre los datos y la curva obtenida luego de la regresión.

Una vez calibrada la sonda hasta una concentración de 1%v/v, se procedió a verificar la curva de calibración simulando una caída de concentración, esto se hizo por medio de una dilución para reducir la concentración de la solución a la mitad, es decir 0,5%v/v. Para este propósito se retiró la mitad de la solución presente en el biorreactor y se cambió por agua.

Terminado el proceso de dilución descrito anteriormente, la lectura de concentración en estado estable fue de 0,498%v/v como se observa en la figura 43, lo cual corresponde al valor de concentración de metanol esperado.

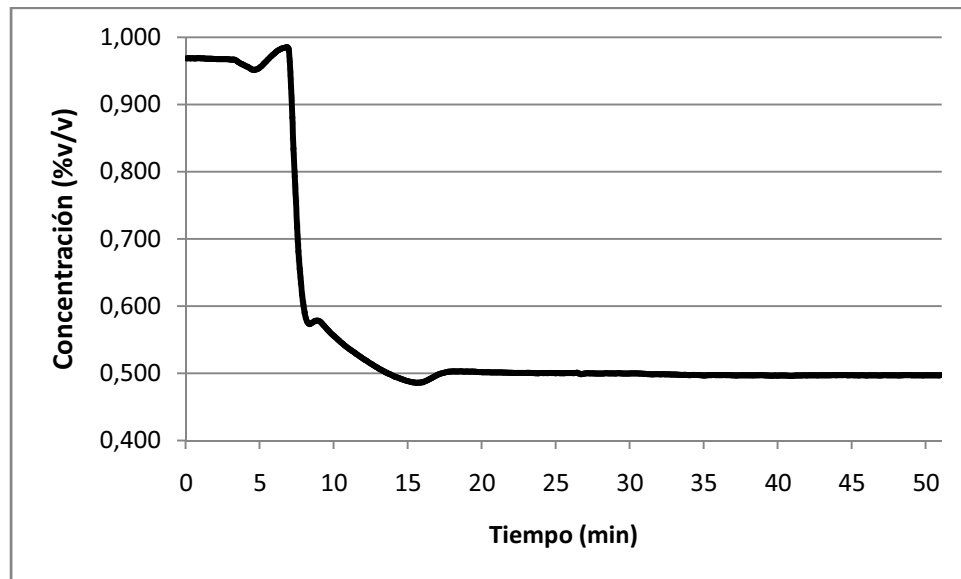


Fig. 43. Lectura de concentración de metanol luego de diluir el medio a la mitad

### 5.1.1 Sensibilidad

La sensibilidad de un instrumento de medición está definida como la relación entre el cambio de su respuesta y el cambio correspondiente en la entrada o estímulo [34]. La pendiente de la curva de calibración indica la sensibilidad del instrumento.

$$Sensibilidad = K_T = \frac{\Delta Salida}{\Delta Entrada} \frac{[\Omega]}{[\% v/v]}$$

Para calcular la sensibilidad de la sonda, se realizó una curva de calibración en todo el rango de medición propuesto, es decir hasta 3%v/v, con puntos de calibración 0.2%v/v, 0.6%v/v, 1.0%v/v, 2.0%v/v y 3.0%v/v, solución de agua y metanol, volumen de cultivo 1650ml, velocidad del agitador 600rpm, temperatura 28°C y flujo de aire para suministro de oxígeno al medio 0 l/min y se obtuvo la siguiente curva de calibración.

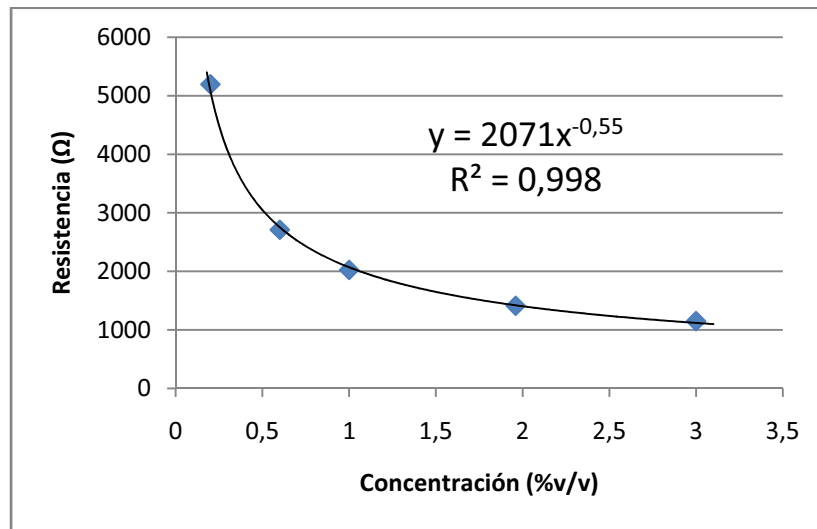


Fig. 44. Curva de calibración en todo el rango de medición

Posteriormente se linealizó la curva tomando como puntos de operación las concentraciones de calibración. De esta forma se halló la sensibilidad, en  $\Omega/\%v/v$ , alrededor de cada punto de operación a partir de la pendiente de cada una de las rectas obtenidas.

$$f(x) = A * x^{-\alpha} = 2071 * x^{-0,55}$$

$$f(x) \cong f(\bar{x}) + \left. \frac{df(x)}{dx} \right|_{\bar{x}} (x - \bar{x}) = A * (\bar{x})^{-\alpha} - A\alpha(\bar{x})^{-(\alpha+1)}(x - \bar{x})$$

Para  $\bar{x} = 0.2$

$$f(x) = -13802x + 7779$$

Para  $\bar{x} = 0.6$

$$f(x) = -2514x + 4251$$

Para  $\bar{x} = 1.0$

$$f(x) = -1139x + 3210$$

Para  $\bar{x} = 2.0$

$$f(x) = -388x + 2192$$

Para  $\bar{x} = 3.0$

$$f(x) = -207x + 1754$$

Los resultados indican que la sonda pierde sensibilidad a medida que la concentración de metanol aumenta. No obstante, en el rango de medición propuesto (0-3%v/v) la sonda de pervaporación tiene una sensibilidad suficiente para detectar variaciones de concentración hasta en los valores más altos del *span*.

### 5.1.2 Repetibilidad

Según [34], la repetibilidad es la cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud por medir, efectuadas en las mismas condiciones de medición. Las condiciones de proceso para todas las calibraciones fueron: solución de agua y metanol, volumen de cultivo 1650ml, velocidad del agitador 600rpm, temperatura 28°C y flujo de aire para suministro de oxígeno al medio 0 l/min.

El procedimiento de calibración se realizó por duplicado después de cada esterilización del biorreactor; se hicieron dos esterilizaciones en total. Con los valores obtenidos de resistencia para cada punto de calibración, se halló la dispersión de los datos para cada pareja de curvas obteniendo los siguientes resultados:

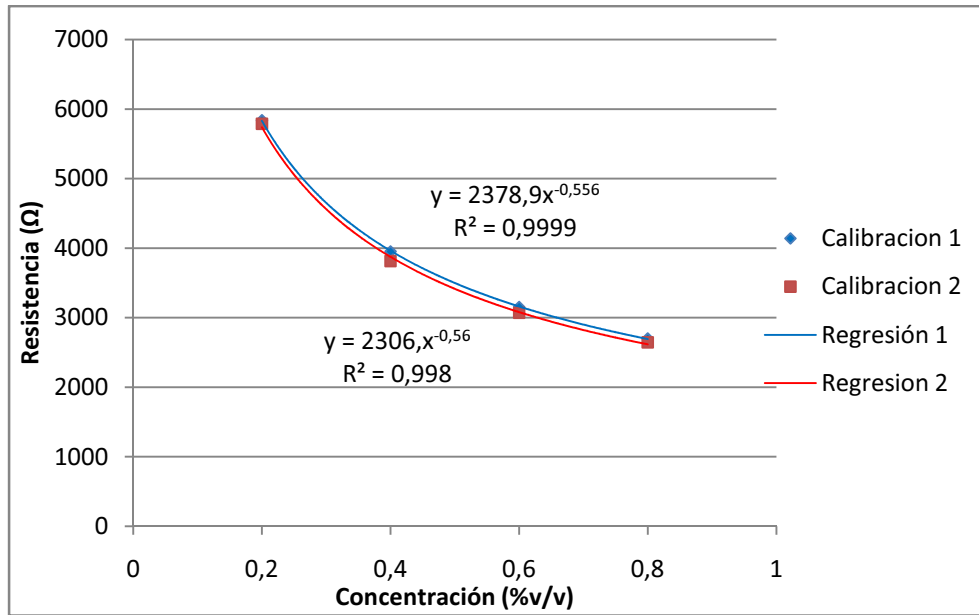


Fig. 45. Calibraciones de la sonda de pervaporación #1

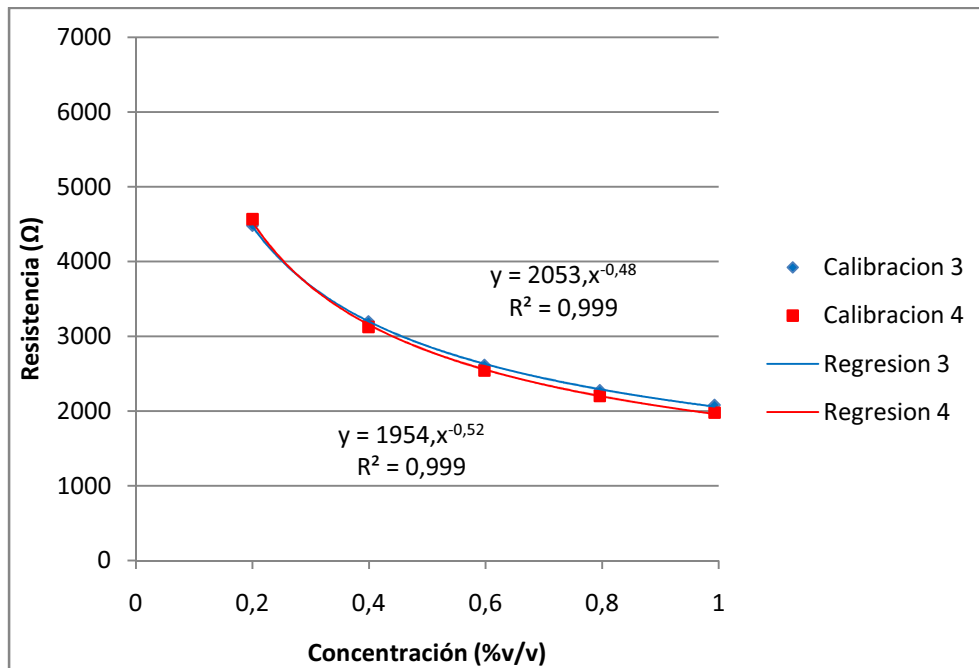


Fig. 46. Calibraciones de la sonda de pervaporación #2

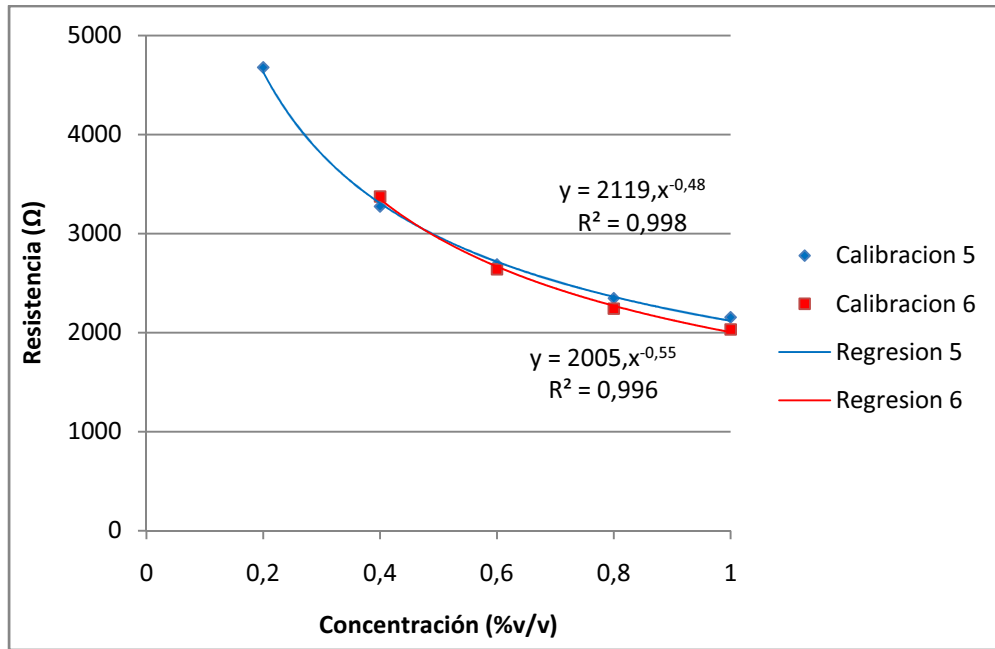


Fig. 47. Calibraciones de la sonda de pervaporación #3

<i>Concentración</i>	0.2%v/v	0.4%v/v	0.6%v/v	0.8%v/v
<i>Promedio 1</i>	5812,9 Ω	3879,5 Ω	3112,3 Ω	2672,9 Ω
<i>Desviacion estandar 1</i>	27,270	66,852	43,751	28,964
<i>Repetibilidad (%CV) 1</i>	0,469	1,723	1,406	1,084

Tabla. 4 Análisis de repetibilidad calibraciones #1

<i>Concentración</i>	0.2%v/v	0.4%v/v	0.6%v/v	0.8%v/v	1.0%v/v
<i>Promedio 2</i>	4520,9 Ω	3161,6 Ω	2579,8 Ω	2239,5 Ω	2030,2 Ω
<i>Desviacion estandar 2</i>	41,388	40,721	40,916	40,432	52,125
<i>Repetibilidad (%CV) 2</i>	0,915	1,288	1,586	1,805	2,567

Tabla. 5 Análisis de repetibilidad calibraciones #2

<b><i>Concentración</i></b>	0.4%v/v	0.6%v/v	0.8%v/v	1.0%v/v
<b><i>Promedio 3</i></b>	3325,5 Ω	2665,7 Ω	2295,4 Ω	2094,6 Ω
<b><i>Desviación estandar 3</i></b>	51,857	24,795	54,686	62,534
<b><i>Repetibilidad (%CV) 3</i></b>	1,559	0,930	2,382	2,985

Tabla. 6 Análisis de repetibilidad calibraciones #3

El promedio del análisis para las tres calibraciones se presenta a continuación:

<b><i>Promedio</i></b>					
<b><i>Concentración</i></b>	0.2%v/v	0.4%v/v	0.6%v/v	0.8%v/v	1.0%v/v
<b><i>Desviación estandar</i></b>	34,329	53,144	36,488	41,361	57,329
<b><i>Repetibilidad (%CV)</i></b>	0,692	1,524	1,307	1,757	2,776

Tabla. 7 Análisis de repetibilidad de todas las calibraciones

El análisis de repetibilidad en [6] para el rango 0 – 1%v/v indica una dispersión de los datos entre 4.9% y 7.8% frente a los resultados de dispersión obtenidos en este trabajo entre 0,69% y 2,77%. Esto demuestra los beneficios de la sonda de pervaporación como tecnología para medir concentración de metanol.

Los datos con los cuales se realizó el análisis de repetibilidad de la medición se pueden verificar en la sección 8 *Anexos*.



## 5.2 Análisis de datos de la medición de concentración

Como parte de los objetivos planteados en el proyecto, se evaluó la medición de concentración calculando su precisión, exactitud y reproducibilidad. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

### 5.2.1 Precisión y exactitud sobre un rango

Se calculó la precisión de la sonda de pervaporación sobre el rango de medición 0,200%v/v a 0,500%v/v lo cual determina su capacidad para entregar las mismas lecturas con la entrada variando en este rango. Esto es posible mediante el cálculo de la desviación estándar para una cantidad determinada de medidas. En medición se acepta la precisión con un 95% de nivel de confianza que corresponde a las lecturas contenidas en dos desviaciones estándar cuando se tiene un gran número de datos.

Se tomaron 5 muestras del cultivo real con *Pichia Pastoris* con concentraciones 0,500%, 0,300%, 0,200%, 0,200% y 0,200% según la sonda de pervaporación. Para hacer el cálculo de precisión y exactitud, las lecturas aceptadas como verdaderas provienen del análisis por cromatografía de gases de las muestras tomadas. No obstante, el método estandarizado para hacer la cromatografía de las muestras con metanol provenientes del cultivo con *Pichia Pastoris* usa una columna cromatográfica, que en el momento de hacer los análisis, resultó defectuosa por lo que fue necesario usar una distinta haciendo que el procedimiento no cumpla fielmente con los requerimientos del método estandarizado para medir concentraciones de metanol por cromatografía de gases. Adicionalmente, el procedimiento de cromatografía realizado a las muestras tomadas durante el cultivo muestra algunos componentes, al parecer de composición similar al metanol, que generan interferencia y provocan una lectura mayor a la esperada, en especial para las muestras de concentración mayores a 0,3%v/v. Esto último pudo ser causado por el uso de una columna cromatográfica no apropiada para el análisis de las muestras.

Con las parejas de datos recopiladas se empleó el método de mínimos cuadrados para hallar una recta que se ajuste a los datos dispersos leídos por la sonda de pervaporación.

$$C_{leida} = m * C_{verdadera} + b$$

$C_{verdadera}$	$C_{leida}$
0,206%v/v	0,200%v/v
0,187%v/v	0,200%v/v
0,208%v/v	0,200%v/v
0,396%v/v	0,300%v/v
0,756%v/v	0,500%v/v

Tabla 8. Lecturas de concentración verdadera e indicada

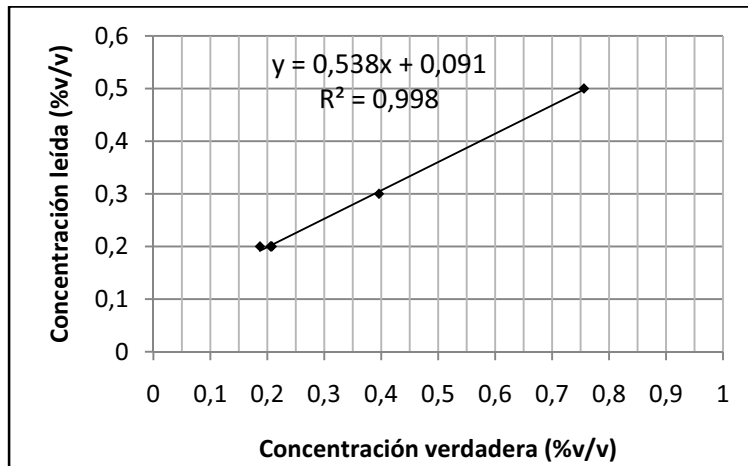


Fig. 48. Recta ajustada por mínimos cuadrados

Dado que el número de muestras es pequeño, no basta con calcular la desviación estándar de  $C_{verdadera}$  para encontrar la precisión del instrumento. Por esto se emplea la ecuación planteada por Mandel [37] que efectúa una corrección por medio de la distribución *t-student* haciendo que el intervalo de confianza sea sensible al tamaño de la muestra. La precisión está dada por:

$$S_{qi} = \pm t_{95,N-2} * S_{q0} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{N} + \frac{N(q_i - \bar{q}_i)^2}{N(\sum q_i^2 - (\sum q_i)^2)}}$$

Donde  $t_{95,N-2}$  es un valor que proviene de la distribución *t-student* para un nivel de confianza del 95% y N-2 grados de libertad,  $S_{q0}$  la desviación estándar de  $C_{Leida}$ , n el número de veces que se toma un dato, N el número de datos o tamaño de la muestra y  $q_i$  los valores verdaderos de concentración.

Para los datos obtenidos, en el rango de concentración 0,2%v/v a 0,5%v/v el valor más alto de  $S_{q_i}$  equivale a 0,026, es decir que con un nivel de confianza del 95% la precisión es igual a  $\pm 0,026\%v/v$ . Con la precisión del instrumento y hallando el valor verdadero de concentración a partir del valor leído 0,200%v/v, se obtiene una exactitud para ese punto de:

$$Acc = \frac{(C_{leida} - b)}{m} \pm S_{q_i}$$

$$Acc = \frac{(0,200 - 0,091)}{0,538} \pm 0,026\%v/v = 0,203 \pm 0,026\%v/v$$

La desviación de la medida de concentración según el fabricante es 5% del valor máximo (6.0%v/v), es decir  $\pm 0.3\%v/v$ . Dado que la estimación de la lectura verdadera para 0,200%v/v está entre 0,178%v/v y 0,228%v/v y para 0,500%v/v está entre 0,735%v/v y 0,785%v/v, se confirma que está dentro de los límites que especifica el fabricante.

## 5.2.2 Reproducibilidad

Se realizaron varios experimentos en los que se cambiaron las condiciones de operación en los rangos que se presentan durante un cultivo real para verificar que tan reproducible es la medida de concentración que entrega la sonda de pervaporación.

### 5.2.2.1 Velocidad de agitación

En el biorreactor, la variación de agitación es necesaria para mantener la concentración de oxígeno disuelto que se requiera en el medio de cultivo. A mayor agitación, las burbujas de aire que provienen del aire de suministro de oxígeno tardan más tiempo en llegar a la superficie debido a la circulación que genera la agitación y por consiguiente tienen más tiempo para transferir, a través de su superficie, el

oxígeno contenido dentro ellas. Así mismo, las burbujas de aire se rompen en burbujas más pequeñas haciendo que el área superficial para la transferencia de oxígeno sea mayor. Este parámetro en condiciones de cultivo varía entre 300rpm y 900rpm y para observar su efecto, se registró la medida de concentración de metanol con una variación de velocidad de agitación en este rango obteniendo el siguiente comportamiento:

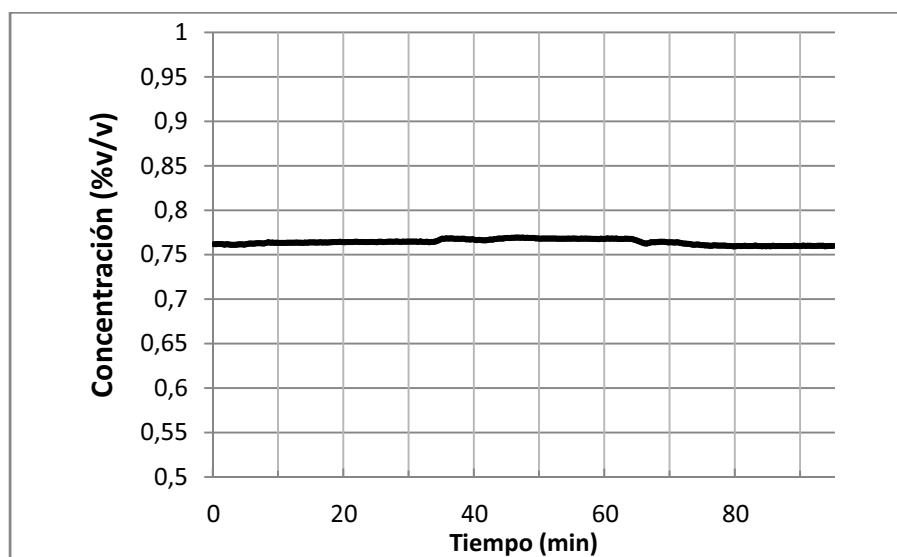


Fig. 49. Lectura de concentración ante variación de la velocidad de agitación

El experimento se inició variando la velocidad de agitación desde 0 a 452rpm, y al cabo de 30 minutos se estabilizó la medida en 0,765%v/v. En este momento se cambió la velocidad de agitación a 989rpm y transcurridos 30 minutos, la medida se estabilizó en 0,768%v/v. Finalmente la velocidad de agitación se reduce de 989rpm a 211rpm, estabilizándose la medida en 0,760%v/v. Esto evidencia la poca influencia que tiene la velocidad de agitación en la medida de concentración ya que se tiene una variación de 0,008%v/v en todo el rango de operación de la velocidad de agitación.

#### 5.2.2.2 Oxígeno disuelto y flujo de aire de suministro

Para ver el efecto que tiene el oxígeno disuelto en la medida de concentración de metanol se inyectó nitrógeno para disminuir la concentración de oxígeno disuelto (OD) y luego aire para aumentarla. Inicialmente el OD era de 99%, la lectura de

concentración de metanol 0,410%v/v y la velocidad de agitación se mantuvo siempre constante en 600rpm. En el minuto 5 del experimento se inyectó nitrógeno a una tasa de 0,8 l/min llevando el OD a 1% después de 10 minutos. En estas condiciones se observó que la lectura de concentración bajó a 0,408%.

En el minuto 30 se hizo el mismo procedimiento con las mismas condiciones de operación pero en esta ocasión inyectando aire. El resultado fue un OD final de 99% al cabo de 3 minutos. Bajo estas condiciones y pasados 30 minutos, la lectura de concentración fue 0,406%v/v.

De estos dos experimentos se puede concluir que la sonda de pervaporación no se ve afectada por variaciones en el OD ya que si este fuera el caso, al volver a aumentar el OD como se hizo en la segunda parte del experimento, la lectura de concentración de metanol debería regresar al valor inicial (0,410%). De aquí se puede concluir que la variación en la lectura de concentración de metanol se ve afectada por el flujo de gas que se inyecta al biorreactor, ya sea aire o nitrógeno.

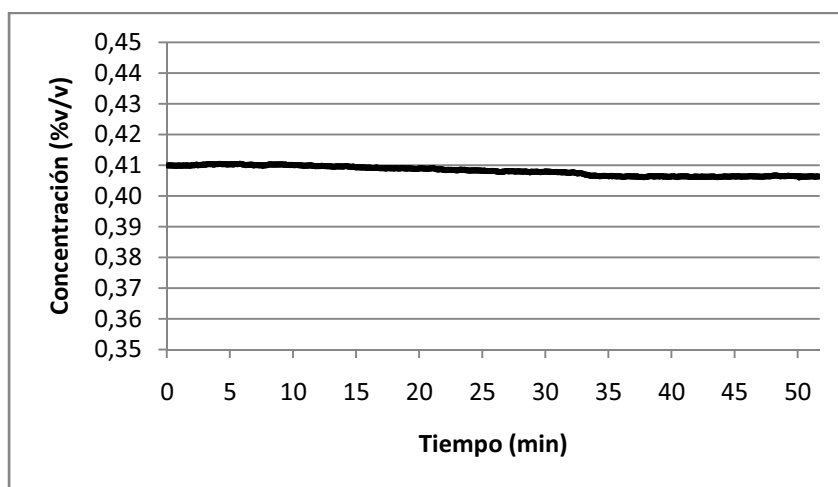


Fig. 50. Lectura de concentración ante variaciones de oxígeno disuelto en el medio

Sin embargo, con experimentos similares en los que se inyectaba aire para suministrar oxígeno al medio presente en el biorreactor se vio el mismo comportamiento en el que la lectura de concentración de metanol disminuía mientras estuviese el flujo de aire presente pero una vez este flujo cesaba, la lectura se estabilizaba. Además, una vez estable la medida de concentración de metanol, nunca

retornaba al valor inicial en el que se encontraba cuando se inyectó aire por primera vez.

Esto sugiere que no es el flujo de aire de suministro el que tiene un efecto directo sobre la sonda de pervaporación sino que el aire de suministro arrastra metanol y lo elimina por medio del escape del biorreactor haciendo que la concentración en la solución disminuya y, por consiguiente, la lectura que arroja la sonda.

### 5.2.2.3 Temperatura

Según el fabricante, la temperatura tiene un efecto marcado en la medida de concentración que arroja la sonda de pervaporación. No obstante, la temperatura en el cultivo siempre se mantiene constante (28°C) e igual a la temperatura de calibración.

El sistema de adquisición y procesamiento fue programado para hacer una corrección por temperatura en dado caso que se quieran hacer experimentos con la levadura *Pichia Pastoris* a diferentes temperaturas. Para hacer esta corrección se hizo un experimento en el que se varió la temperatura en pasos de 0,5°C desde 26°C hasta 30°C obteniendo la siguiente gráfica:

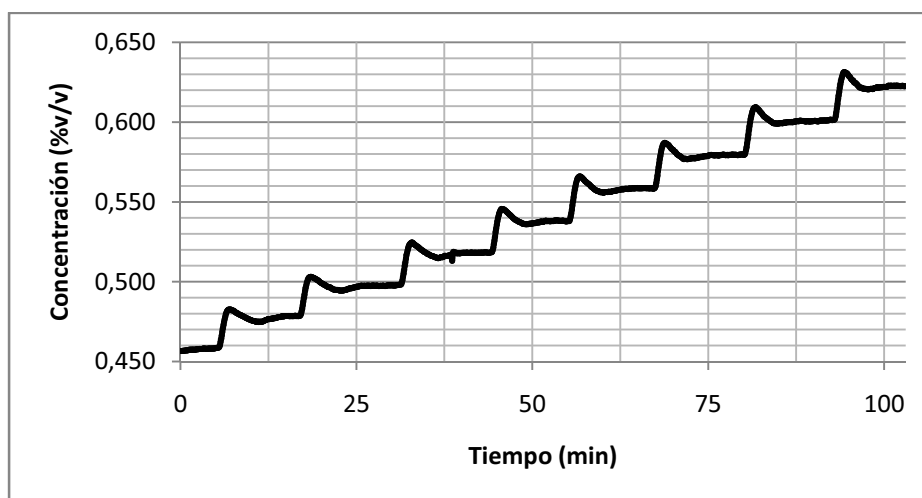


Fig. 51. Lectura de concentración ante cambios de temperatura

Según los datos obtenidos, la lectura de concentración siempre varía 0,02%v/v por cada 0,5°C, lo que hizo posible corregir en software esta desviación por temperatura.

### 5.2.3 Tiempo de respuesta

El tiempo de respuesta del sistema se halló aplicando un pulso de metanol (entrada paso) de concentración conocida y observando la señal de salida una vez se estabilizó. El resultado de la respuesta para entrada paso se muestra en la figura 52:

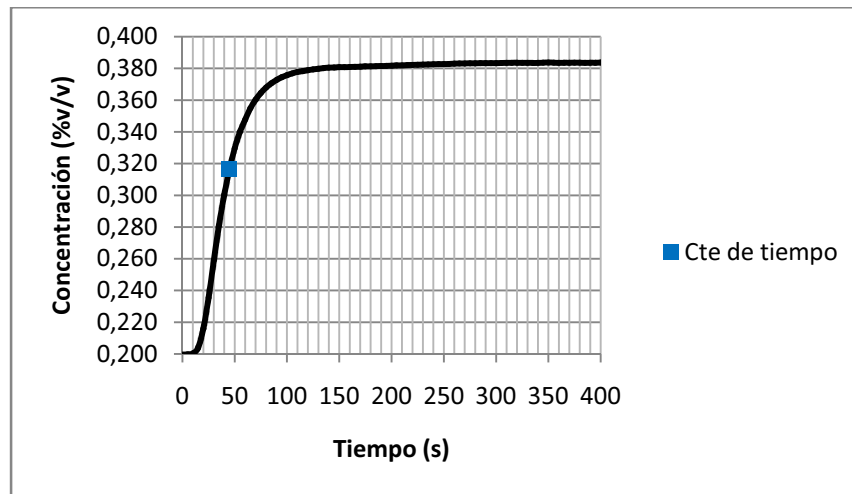


Fig. 52. Tiempo de respuesta de la sonda de pervaporación

La concentración inicial era 0,2%v/v y la lectura en estado estable 0,384%v/v. Con estos datos se procedió a calcular la constante de tiempo  $\tau$

$$A = 0,384\% \text{ v/v} - 0,2\% \text{ v/v} = 0,184\% \text{ v/v}$$

$$A(63\%) = 0,2\% \text{ v/v} + 0,184\% \text{ v/v} * 0,63 = 0,316\% \text{ v/v}$$

Como se observa en la figura 52, el valor de concentración en el 63% de amplitud de la respuesta paso se encuentra a los 45s. Finalmente el tiempo de respuesta es igual a:

$$T_r = 5\tau = 5 * 45s = 225s = 3 \text{ min } 45s$$

En pruebas posteriores se obtuvo un tiempo de respuesta entre 3 y 4 minutos, lo cual confirma los datos suministrados por el fabricante de 5 minutos como tiempo de respuesta. Este resultado es importante ya que con un tiempo de respuesta pequeño, el error de concentración de metanol respecto al *setpoint* será menor gracias a que se requiere una banda diferencial de menor valor en el control ON/OFF de concentración.

### 5.3 Funcionamiento del control de adición de metanol

Para iniciar el control de concentración de metanol primero se calculó la banda diferencial como se mencionó en la sección 4.4.3. En [6] el flujo de adición de metanol empleado durante el cultivo es 3ml/h; usando este valor se obtiene:

$$\Delta C = \frac{\frac{3,75}{60} h * \frac{3ml}{h} * 100\%}{1650ml} = 0,011\%v/v$$

El IEIM decidió hacer una estrategia de cultivo en la que inicialmente se controla la concentración de metanol a 0,9%v/v algunos minutos y luego se cambia la referencia a 0,2%v/v. En los primeros 10 minutos de inicio de adición de metanol se calibró la sonda sobre punto en 0,2%v/v, procedimiento necesario para corregir la desviación sufrida por la curva de calibración debido a la esterilización que se realiza previa al inicio del cultivo, como se mencionó en la sección 4.4.1. En seguida se activó el control y se ajustó la referencia en 0,9%v/v como se presenta en la figura 53. Con un flujo de adición de metanol de 3ml/h se observó que la lectura de concentración de metanol aumentaba de manera lenta por lo que se decidió aumentar a 20ml/h. Este comportamiento pudo ser causado porque la bomba peristáltica se calibró con la presión atmosférica como presión de salida pero dentro del biorreactor se manejan presiones hasta de 2,5 atmosferas lo que causa que el flujo real sea menor al que se obtiene de la curva de calibración. Con una referencia de 0,9%v/v, la lectura de concentración varió entre 0,887%v/v y 0,897%v/v.

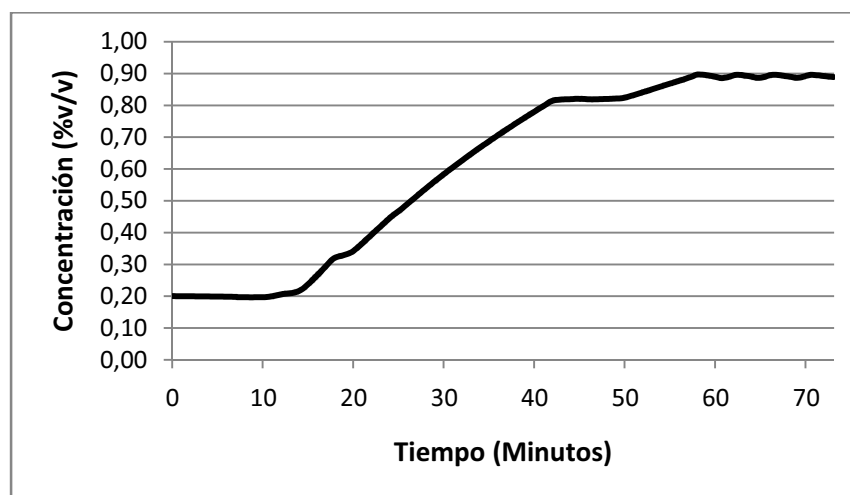


Fig. 53. Inicio de control de concentración de metanol en 0,9%v/v



Luego de 20 minutos controlando a 0,9%v/v se ajustó la referencia en 0,2%v/v. Una vez el microorganismo consumió el metanol hasta una concentración de 0,2%v/v, el control mantuvo la lectura  $\pm 0,007\%v/v$  alrededor del *set point*.

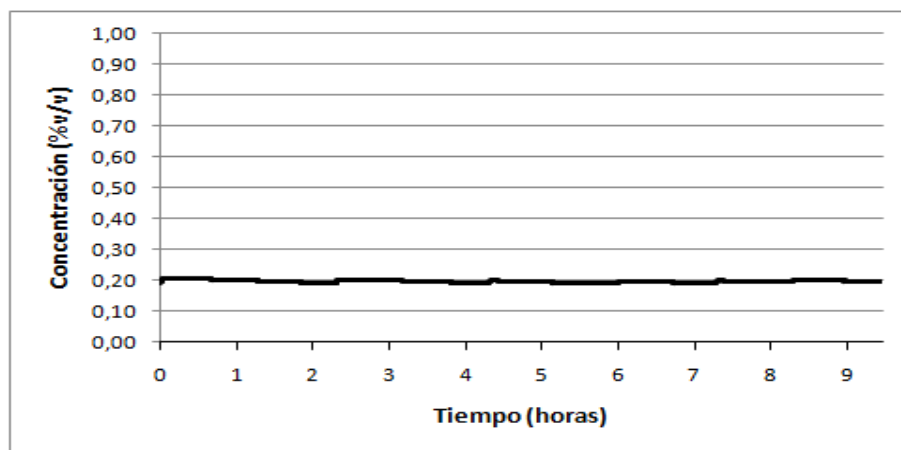


Fig. 54. Control de concentración de metanol en 0,2%v/v

En [6] se controló la concentración de metanol en 0,7%v/v y 0,8%v/v con una variación de 0,1%v/v alrededor de la referencia como se presenta en la figura 55. Se puede apreciar la mejora significativa que tuvo el sistema de medición y control implementado en el biorreactor del IEIM.

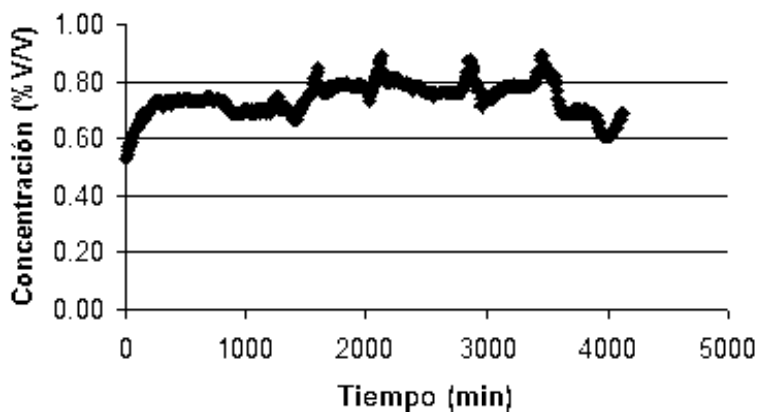


Fig. 55. Control de concentración de metanol en 0,7%v/v y 0,8%v/v [6]

## 5.4 Estudio de costos

A continuación se presenta el costo del proyecto. Allí se presenta la descripción de cada ítem con su respectivo valor. Para este proyecto se manejaron siete proveedores de países como Alemania, Estados Unidos y algunos locales.

ITEM	CANT	DESCRIPCIÓN	VALOR UNITARIO	VALOR EXTENDIDO	VALOR UNITARIO DDP	VALOR EXTENDIDO DDP	Con IVA
<b>Sonda de Pervaporación</b>							
1	1	Frings America Alcosens, 270mm tubing length, Custom made adapter	€ 6.860	€ 6.860	\$ 23.049.600		
2	1	Set of English documentation (Paper form)	€ 0	€ 0	\$ 0		
3	1	Spare part set (Semiconductor + Membranes)	€ 0	€ 0	\$ 0		
Total €				€ 6.860		\$ 23.049.600	\$ 23.049.600
<b>Sistema aire sintético, módulo de adquisición y accesorios</b>							
4	1	Cilindro de aluminio aire cero 1m3 Linde HiQ con válvula bronce CGA590				\$ 645.624	
5	1	Unidad de regulación inicial gases especiales con regulador doble etapa Concoa 212				\$ 1.262.552	
6	1	Suministro e instalacion tubing SS 316L 1/4" 9m				\$ 556.407	
7	1	Soporte para cilindro				\$ 78.750	
8	1	Valvula de corte tipo diafragma				\$ 273.000	
9	1	Manómetro Winters 0-100psi				\$ 140.000	
10	1	Accesorios de tubería y cables				\$ 500.000	
11	1	Entrada Análoga Universal de 24 bits NI 9219				\$ 2.788.500	
12	1	NI 9972 Strain relief kit for 6-pos spring terminal connector (qty 4)				\$ 76.050	
						\$ 6.320.883	\$ 7.332.224
<b>Controlador de flujo</b>							
13	1	Controlador de flujo Sierra C100L 0-200scm	\$ 1.920	\$ 1.920	\$ 4.608.000	\$ 4.608.000	
Total USD				\$ 1.920			
Total COP						\$ 4.608.000	\$ 4.608.000
<b>Horas de Ingeniería</b>							
14	200	Ingeniero Investigación y Desarrollo			\$ 39.000	\$ 7.800.000	
15	20	Director del Proyecto			\$ 78.000	\$ 1.560.000	
Total COP						\$ 9.360.000	\$ 9.360.000
Total COP							\$ 44.349.824

Fig. 56. Costo general del proyecto

El dinero con el cual se financió este proyecto estaba destinado inicialmente a la compra de un equipo de medición y control de concentración de metanol por un valor de \$61.000.000 (cop) para el proyecto “*Ingeniería del bioproceso para la producción de proteínas recombinantes humanas en el sistema pichia pastoris (id 003635)*”. Sin embargo, se propuso a la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad

Javeriana hacer el desarrollo local del equipo financiado por este dinero, siendo aprobada dicha solicitud.

Como se observa la figura 56 *Costo general del proyecto*, el costo del proyecto fue casi un 30% menor que el costo del equipo que se pensaba comprar a otro proveedor. Esto señala la ventaja de hacer desarrollos propios con ingeniería local.

## 6. Conclusiones

Se exploraron distintas tecnologías para realizar la medición de concentración de metanol en un biorreactor y se investigaron las ventajas y desventajas de cada una de ellas con el fin de seleccionar la más adecuada para cumplir con el objetivo planteado de obtener una medida exacta, repetible y reproducible. Esto ayudó a conocer a fondo el proceso del cultivo de la levadura *Pichia Pastoris*, el funcionamiento del biorreactor y las posibilidades que este ofrece para implementar un sistema de medición de concentración de metanol, tanto mecánicas como eléctricas y químicas. Lo anterior llevó a obtener conocimiento valioso que permitirá continuar con el desarrollo local de sistemas de medición y control para biorreactores.

Se obtuvo experiencia sobre la posibilidad de realizar mediciones de concentración de metanol en la fase líquida del medio de cultivo así como en el gas que se desprende del proceso interno del biorreactor. En la fase líquida se presenta la desventaja de tener que mantener el elemento sensor dentro del biorreactor todo el tiempo haciendo que sufra condiciones hostiles como la esterilización en donde se pueden tener temperaturas de 120°C, situación que no se presenta cuando se realiza la medición por medio del gas que sale por el escape del biorreactor. Sin embargo, en la medición en fase gaseosa también se tienen desventajas como se expuso en [6] ya que se presenta una fuerte dependencia de variables como la temperatura, el flujo y concentración de oxígeno del gas que se desprende del biorreactor, factores que son mitigados con el uso de la sonda de pervaporación. De aquí se concluye que una integración de las dos formas de medición, en líquido y en gas, puede llevar a un desempeño aún mejor del sistema de medición de concentración de metanol, sacando lo mejor de cada una de ellas y fusionándolas en un solo equipo.

El control de concentración de metanol ON/OFF implementado obtuvo buenos resultados gracias al tiempo de respuesta de la sonda de pervaporación que permite tener una banda diferencial pequeña, para este trabajo 0,01 %v/v. Es claro que este tipo de control puede ser mejorado con técnicas de control avanzado que logren manejar el comportamiento aleatorio de la levadura *Pichia Pastoris*. No obstante, todavía queda por explorar formas de adición continua de metanol que permitan adicionar flujos de metanol pequeños y acordes con los volúmenes de cultivo que se

manejan a nivel de laboratorio, en este caso hasta 1.7L, con lo cual se haría viable la implementación de una técnica de control avanzado. Esto es importante ya que a nivel de producción se puede adicionar metanol con flujos relativamente grandes debido a que la concentración no aumenta abruptamente cuando se tiene un volumen de cultivo del orden de decenas de litros. Caso contrario se tiene a nivel de laboratorio donde el volumen de cultivo es de algunos litros con lo cual la adición de metanol debe ser del orden de mililitros por hora.

## 7. Bibliografía

- [1] Córdoba H, Algecira N, Poutou RA, Barrera LA (2003). *Pichia pastoris* una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategias de fermentación. Rev. Col. Biotecnol. 5(2):73-84
- [2] Poutou RA, Córdoba H, Quevedo BE, Landázuri P, Echeverri OY, Sáenz H, Vanegas A, Acero J, González A, Herrera J, Algecira N, Caicedo L, Barrera LA (2005). Expresión de iduronato 2-sulfato sulfatasa humana recombinante (IDS<sub>hr</sub>) en *Pichia pastoris*. Univ. Scient. 10(1): 75-96
- [3] Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 45–66
- [4] Cos O, Ramón R, José Luis Montesinos J, Valero F (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review *Microbial Cell Factories* **5**:17
- [5] Guarna MM, Lesnicki, GJ, Tam BM, Robinson J, Radziminski CZ, Hasenwinkle D, Boraston A, Jervis E, Mac Gillvray RTA, Turner RFB, Kilburn DG (1997) On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **56**: 279–286
- [6] Dugand JP, Torres A (2006) Sistema de medición y control de la concentración de metanol, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ingeniería T.G. 0513
- [7] Ramon R, Feliu JX, Cos O, Montesinos JL, Berthet FX, Valero F (2004) Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, **26**: 1447-1452
- [8] Zhang W, Inan M, Meagher M (2000) Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia Pastoris* *Biotech Bioprocess Eng.*, **5**: 275-287
- [9] Katakura Y, Zhang WH, Zhang GQ, Omasa T, Kishimoto M, Goto YJ, Suga KI (1998) Effect of methanol concentration on the production of human  $\beta$ 2-glycoprotein

I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J. Ferment. Bioeng.* **86**: 482–487

[10] MC-168 Methanol Concentration Monitor and Controller For *Pichia pastoris* Fermentation User's manual. PTI Instruments,Co.

[11] Hellwig S, Emde F, Raven, NPG, Henke M, van der Logt P, Fischer R (2001) Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixedfeed fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **74**: 344–352

[12] Zhou XS, Lu J, Fan WM, Zhang YX (2002) Development of a responsive methanol sensor and its application in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol. Lett.* **24**: 643–646

[13] Disponible en: <http://www.mems-issys.com/technology.shtml>

[14] Sparks D, Smith R, Straayer M, Cripe J, Schneider R, Ansari S, Najafi N (2003) A Microfluidic System for the Measurement of Chemical Concentration and Density *Transducers*, Boston, MA, 2C2.5, p.300-303

[15] Sparks D, Riley D, Cruz V, Tran N, Chimbayo A, Najafi N, Kawaguchi K, Yasuda M (2007) Embedded mems-based concentration sensor for improved active fuel cell performance *Transducers & Eurosensors*, p.1911-1914

[16] Zhao H, Shen J, Zhang J, Wang H, Wilkinson D, Gu CE (2006) Liquid methanol concentration sensors for direct methanol fuel cells *Journal of Power Sources* **159**

[17] Crowley J, McCarthy B, Nunn NS, Harvey LM, McNeil B (2000) Monitoring a recombinant *Pichia pastoris* fed batch process using Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FT-MIRS). *Biotechnol. Lett.* **22**: 1907–1912

[18] Surribas A, Cos O, Montesinos JL, Valero F (2003) On-line monitoring of the methanol concentration in *Pichia pastoris* cultures producing an heterologous lipase by sequential injection analysis. *Biotechnol. Lett.* **25**: 1795–1800

- [19] Figaro Engineering Inc. Gas Sensor TGS2620, *Datasheet*.
- [20] L.M. Vane (2005) A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 603–629.
- [21] Disponible en :[http://www.raesystems.com/~raedocs/App\\_Tech\\_Notes/App\\_Notes/AP-000\\_PID\\_Training\\_Outline.pdf](http://www.raesystems.com/~raedocs/App_Tech_Notes/App_Notes/AP-000_PID_Training_Outline.pdf)
- [22] Sung CC, Tseng YL, Chiang YF, Chen CY (2010) Evaluation of ultrasonic sensing of methanol concentration for direct methanol fuel cell *Sensors and Actuators A: Physical* **161**: 101-107
- [23] McNair, H. M., Miller, J. M. (1998) *Basic Gas Chromatography*, 1st ed. Wiley-Interscience, p. 200
- [24] Sierra Instruments Inc. Smart-Trak® 2 Series 100 Mass Flow Meters and Controllers, Instruction manual
- [25] Miller R. (1996) *Flow Measurement Engineering Handbook*. 3 Ed. McGraw-Hill Professional; p.1168
- [26] Texas Instruments (Burr Brown) Hoja de especificaciones 4-20mA current transmitter XTR112
- [27] National Instruments, Operating instructions and specifications NI 9219 4-Channel, 24-Bit, Universal Analog Input Module
- [28] Ingham J, Dunn IJ, Heinzle E, Pienosil JE (2000) *Chemical Engineering Dynamics*, 2<sup>nd</sup> Ed. Wiley
- [29] Disponible en :[http://aportes.educ.ar/biologia/nucleo-teorico/influencia-de-las-tic/tecnologia-del-adnrecombinante/que\\_es\\_la\\_tecnologia\\_del\\_and\\_r.php](http://aportes.educ.ar/biologia/nucleo-teorico/influencia-de-las-tic/tecnologia-del-adnrecombinante/que_es_la_tecnologia_del_and_r.php)
- [30] Arnau C, Ramon R, Casas C, Valero F (2010) Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess *Enzyme and Microbial Technology* **46** : 494–500



- [31] Mayson BE, Kilburn DG, Zamost BL, Raymond CK, Lesnicki GJ (2003) Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnol Bioeng* **81**:291-298
- [32] Wagner, L.H., Matheson, N.H., Heisey, R.F. and Schneider, K. 1997 Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotech. Tech.* **11**:791-795
- [33] Cos O, Ramon R, Montesinos JL, Valero F. (2006) A simple model-based control for *Pichia pastoris* allows a more efficient heterologous protein production bioprocess. *Biotechnol Bioeng* **95**:145–54
- [34] Norma Técnica Colombiana NTC 2194 (1997) Vocabulario de términos básicos y generales en metrología.
- [35] Daniel® Liquid Turbine Flow Meter Technical Guide, April 2011
- [36] Endress+Hauser. Coriolis Mass Flow Measuring System *promass 80/83A* Technical Information
- [37] Doebelin E. (2005) *Sistemas de Medición Instrumentación Diseño y aplicación*. 5 Ed. McGraw-Hill.

## 8. Anexos

### 8.1 Datos de calibración

Calibraciones 1

0,2% v/v		0,4%v/v		0,6%v/v		0,8%v/v	
Calibración		Calibración		Calibración		Calibración	
#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )
5839,3	5785,2	3945,2	3815,0	3154,9	3070,4	2701,4	2644,9
5839,1	5785,6	3944,2	3815,3	3154,7	3070,3	2701,4	2645,0
5839,6	5786,5	3944,2	3814,7	3154,6	3070,3	2701,5	2644,8
5840,4	5786,6	3944,4	3814,3	3154,9	3070,0	2701,6	2644,6
5840,5	5786,5	3944,9	3814,2	3155,1	3069,7	2701,3	2644,6
5839,7	5786,6	3945,0	3813,8	3155,1	3069,4	2700,9	2644,5
5839,3	5786,7	3945,1	3813,5	3154,9	3069,1	2700,8	2644,7
5839,4	5786,4	3944,8	3813,7	3155,0	3069,1	2701,0	2644,9
5839,4	5787,3	3944,6	3814,4	3155,2	3069,1	2701,1	2644,7
5839,1	5786,9	3944,2	3814,7	3155,0	3069,1	2701,0	2644,7
5813,0		3879,5		3112,3		2673,0	

Tabla 9. Valores de resistencia para calibraciones #1

Calibraciones 2

0,2% v/v		0,4%v/v		0,6%v/v		0,8%v/v		1,0%v/v	
Calibración		Calibración		Calibración		Calibración		Calibración	
#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )
4481,0	4559,6	3201,2	3126,7	2619,5	2538,9	2279,3	2201,1	2080,8	1980,9
4480,8	4559,1	3201,7	3124,8	2619,5	2539,7	2279,3	2199,2	2080,9	1980,1
4480,8	4562,4	3201,6	3121,9	2619,2	2540,2	2279,1	2198,5	2080,9	1979,2
4480,6	4563,9	3201,4	3120,4	2619,5	2540,0	2278,9	2199,5	2081,0	1979,1
4480,8	4563,9	3201,3	3119,4	2619,6	2540,2	2278,7	2200,0	2080,9	1979,0
4480,7	4563,7	3201,0	3119,0	2619,6	2540,1	2279,0	2200,7	2081,0	1979,2
4480,4	4564,3	3200,7	3119,3	2619,8	2540,5	2278,9	2201,2	2081,1	1979,5
4480,6	4563,2	3201,2	3121,2	2620,0	2540,0	2278,6	2201,4	2081,3	1979,4
4480,7	4558,0	3201,8	3122,8	2620,2	2539,3	2278,7	2200,8	2081,4	1979,0
4480,4	4554,3	3201,6	3125,0	2620,1	2540,5	2279,1	2199,2	2081,5	1979,2
4521,0		3161,7		2579,8		2239,6		2030,3	

Tabla 10 Valores de resistencia para calibraciones #2

### Calibraciones 3

0,4% v/v		0,6%v/v		0,8%v/v		1,0%v/v	
Calibración		Calibración		Calibración		Calibración	
#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )	#1 ( $\Omega$ )	#2 ( $\Omega$ )
3274,8	3376,2	2689,3	2642,0	2348,3	2242,4	2155,2	2034,0
3275,0	3375,7	2689,8	2641,8	2348,2	2242,4	2155,3	2034,0
3275,0	3375,7	2690,2	2642,1	2348,5	2242,2	2155,4	2033,8
3275,0	3376,2	2690,2	2641,9	2348,5	2242,1	2155,6	2033,8
3274,8	3376,4	2690,0	2641,6	2348,3	2242,1	2155,8	2033,9
3275,0	3376,2	2690,0	2641,5	2348,8	2242,1	2155,9	2033,8
3274,7	3375,9	2689,8	2641,5	2349,1	2242,0	2155,8	2033,6
3274,9	3375,8	2689,8	2641,6	2349,3	2241,8	2155,8	2033,3
3275,4	3376,2	2689,9	2641,2	2349,1	2242,0	2155,6	2033,5
3275,2	3376,4	2690,5	2641,0	2349,0	2242,1	2155,8	2033,8
3325,5		2665,8		2295,4		2094,7	

Tabla 11. Valores de resistencia para calibraciones #3

## 8.2 Sistema Implementado

A continuación se presentan fotografías del sistema de medición y control de concentración de metanol implementado en su totalidad.



Fig 57. Sistema de medición y control implementado

En la figura 58 se presenta el controlador industrial con sus módulos de entrada/salida, el cable de red para el intercambio de datos con el PC (no se muestra) en el cual se montó la interfaz de usuario y la alimentación de 24Vdc que proviene de la fuente industrial (izquierda).

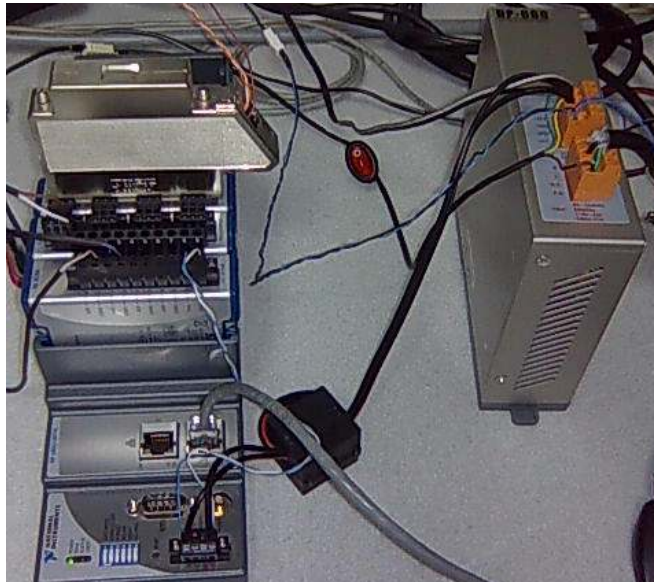


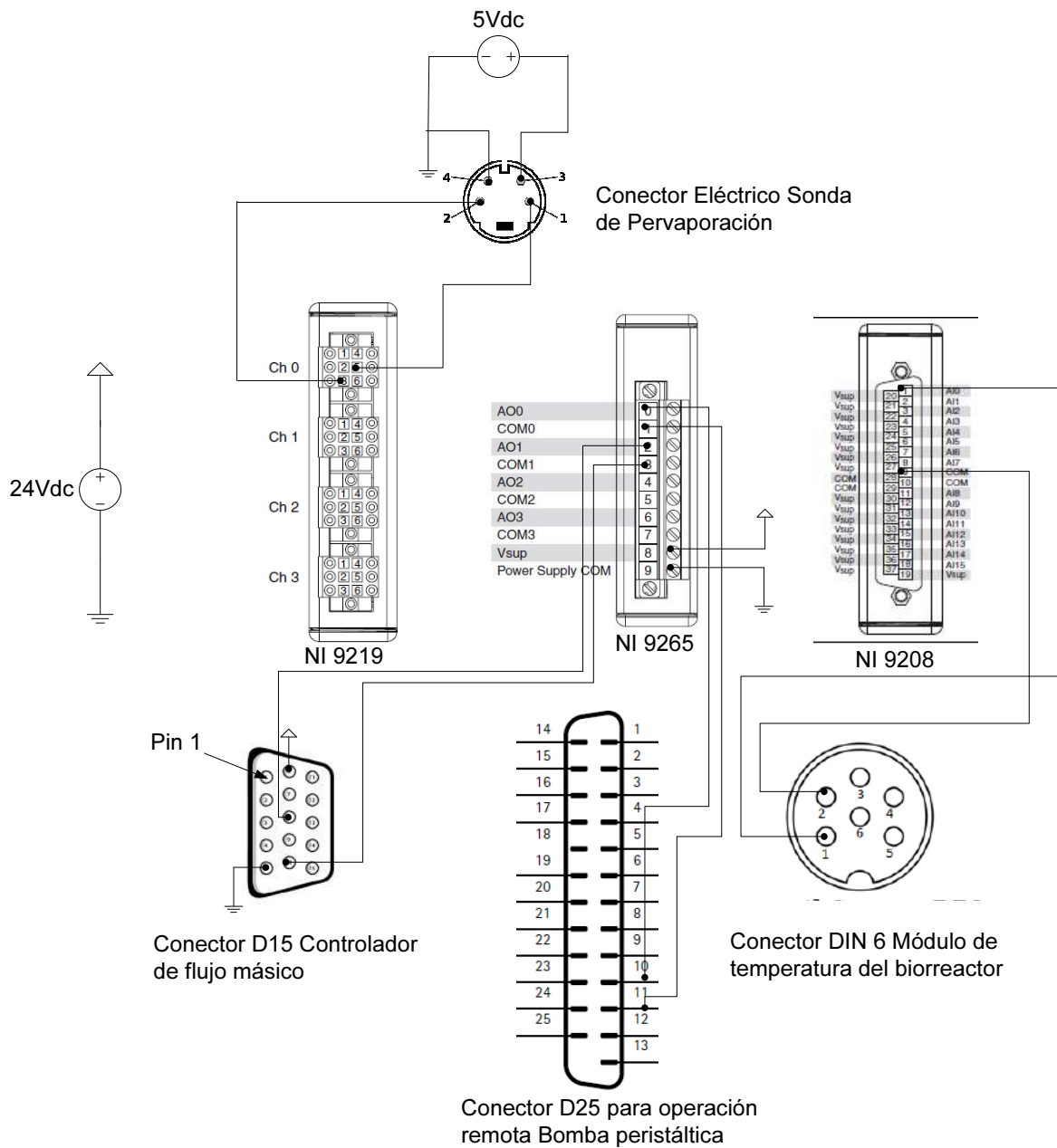
Fig 58. Sistema de adquisición y procesamiento CompactRIO y fuente de voltaje

En la figura 59 se muestra la sonda de pervaporación instalada en el puerto DN19 del biorreactor. Allí se observan las mangueras para la entrada y salida del gas de arrastre, así como la conexión de las señales eléctricas en la parte superior de la sonda.



Fig 59. Sonda de pervaporación instalada en el biorreactor

### 8.3 Circuito de conexión eléctrica



8.4 Manual de Usuario

**MEDICIÓN Y CONTROL DE CONCENTRACIÓN DE METANOL  
PARA EL BIORREACTOR BIOENGINEERING KLF 2000 3.7L**

**MANUAL DE USUARIO  
V 1.0**



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA  
BOGOTA D.C.  
2011**

## I. Principio de medición

Un gas portador (aire sintético) con un caudal fijo pasa a través de un canal cubierto con dos membranas. Si un líquido que contiene una sustancia volátil se encuentra en el lado exterior de las membranas, esta sustancia permeará a través de las membranas según su concentración en el líquido. Si el caudal del gas portador es constante habrá una concentración correspondiente en el gas portador al final del canal para la concentración de la sustancia volátil que contiene el líquido. El gas portador enriquecido en sustancias volátiles entra en contacto con un sensor de gas semiconductor que está instalado en una cámara de la sonda.

Según el principio de medición, las sustancias poco volátiles tales como el azúcar y la glicerina no son captadas por la sonda. Además, gracias al uso de la doble membrana selectiva, un gran número de sustancias orgánicas volátiles (como la mayoría de los ácidos orgánicos) tampoco provoca sobreposición **significativa** de la señal de medición del alcohol.

*Tomado de Manual de Usuario Alkosens Heinrich Frings & Co.*

## II. Procedimiento Inicial

### Pasos para iniciar la medición de concentración de metanol con la sonda de pervaporación

1. Verificar que la sonda de pervaporación esté conectada al cable eléctrico y se haya precalentado el tiempo suficiente\*.
2. Verificar que la manguera de la sonda de pervaporación para el aire sintético esté conectada a la tubería de aire sintético y el flujo de aire sintético haya estado presente el tiempo suficiente\*\*.  
El flujo de aire sintético hacia el puerto de entrada de la sonda debe ser **20scc/min** la presión de salida del regulador de presión **90psig** (6.1barg).
3. Iniciar el software de medición y control de concentración de metanol (Sección IV).

### Pre calentamiento del sensor semiconductor del alcoholes\*

Para obtener una lectura de concentración de metanol correcta y estable, el sensor semiconductor incorporado en la sonda de pervaporación debe precalentarse unos días antes determinados por el tiempo que haya estado desconectada la sonda de pervaporación del voltaje de calentamiento. Este es suministrado por el conector eléctrico ubicado en la parte superior de la sonda.

Lo ideal es mantener la sonda de pervaporación siempre conectada al voltaje de calentamiento. En caso de no ser así, el tiempo de precalentamiento será:

1. Si la sonda de pervaporación ha estado desconectada **menos de un mes**, el sensor debe ser precalentado (sonda conectada al voltaje de calentamiento) mínimo un día antes de iniciar la medición de concentración de metanol.

2. Si la sonda de pervaporación ha estado desconectada **más de un mes**, el sensor debe ser precalentado (sonda conectada al voltaje de calentamiento) **mínimo siete días antes** de iniciar la medición de concentración de metanol.

### Calibración y consumo de Aire Sintético \*\*

1. Un día antes de una **nueva calibración** o de **iniciar la medición de concentración** se debe dejar la sonda en una solución de agua y metanol al 0.2% v/v con flujo de aire sintético (Sección III).
2. Terminar el flujo de aire sintético una vez terminada la calibración.
3. Iniciar nuevamente el flujo de aire sintético 12 horas antes de la **calibración sobre punto** (12 horas antes del inicio de la inducción) y hasta la finalización del cultivo.

## III. Control de flujo de aire sintético

### Aire Sintético y Controlador de flujo

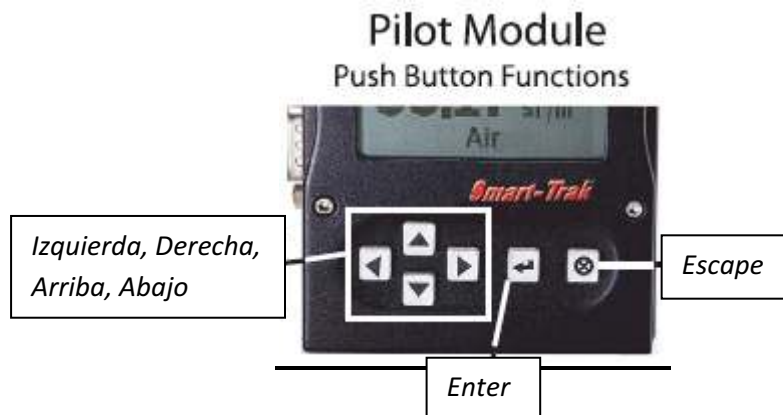


Fig. 1 Botones del controlador de flujo

Para **iniciar** el control de flujo de aire sintético:

1. Abrir la válvula del cilindro de aire sintético y la válvula de corte en la tubería de aire sintético ubicada al lado de controlador de flujo.
2. Verificar que la presión de salida del regulador de presión esté en **90psig** (6.1barg).
3. Encender el interruptor correspondiente al medidor/controlador de flujo.

**Nota: Nunca prender el controlador de flujo con un *setpoint* distinto de cero y en modo *Automatic* si las válvulas en la tubería de aire sintético se encuentran cerradas. Hacerlo puede ocasionar daños al controlador de flujo.**



4. Una vez encendido el equipo, verificar que el *setpoint* programado sea **20scc/m**. Para verificarlo presionar el botón flecha *Derecha* hasta llegar al menú *Setpoint*. Luego presionar el botón *Escape* del controlador para volver a la pantalla principal en la que se muestra el flujo de aire, es decir 20scc/m.

En caso que el setpoint programado sea 0scc/m o uno distinto de 20scc/m:

- a. Presionar el botón *Enter*. Al hacerlo se mostrará la siguiente información:

**Enter Password**  
**0000**

- b. El password del equipo por defecto es 0000. Nuevamente presionar el botón *Enter* para llegar al menú en el cual se pueden realizar cambios al controlador. Aparecerá la siguiente información con el valor actual del *setpoint*.

**Change Setpoint**  
**Value**  
**00.00 sl/m**

- c. Una vez más presionar el botón *Enter*. De inmediato el primer dígito comenzará a parpadear. Use los botones *Arriba* y *Abajo* para cambiar el valor de este dígito y los botones *Izquierda* y *Derecha* para saltar a otro un dígito y poder cambiarlo.
  - d. Una vez seleccionado el valor de *setpoint* deseado (**20scc/min**) presionar el botón *Enter*. Esto hará que el último dígito modificado deje de parpadear indicando que se actualizó el *setpoint*.
  - e. Para volver a la pantalla principal presionar el botón *Escape*.
  - f. Si se quiere confirmar el valor del *setpoint* recientemente modificado usar el botón *Derecha* hasta llegar al menú *setpoint* y verificar su valor.
  - g. Presionar varias veces el botón *Derecha* para volver a la pantalla principal o simplemente el botón *Escape*.
5. Ahora se debe verificar el estado de la válvula de control. Para hacerlo, nuevamente presionar el botón flecha *Derecha* hasta llegar al menú *Valve Position*, allí se debe leer la siguiente información.

**Valve**  
**Automatic**  
**Normal**

Si el estado muestra *Closed* o *Purge*:

- h. Presionar el botón *Enter*. Al hacerlo se mostrará la siguiente información:

**Enter Password**  
**0000**

- i. El password del equipo por defecto es 0000. Nuevamente presionar el botón *Enter* para llegar al menú en el cual se pueden realizar cambios al controlador. Aparecerá la siguiente información con el valor actual del *setpoint*.

**Change Setpoint  
Value  
00.00 sl/m**

- j. Presionar los botones *Izquierda* o *Derecha* hasta llegar al menú *Change Valve Operation*. En este menú se puede seleccionar el estado *Automatic* para controlar el flujo al valor programado en el *setpoint*; *Closed* para mantener la válvula cerrada sin importar el *setpoint* programado al controlador y *Purge* para abrir la válvula al máximo sin importar el *setpoint* programado. Estas dos últimas opciones permiten mantener encendido el controlador con un *setpoint* distinto de cero, sin que exista flujo de aire y que el equipo no sufra daños.
  - k. Presionar el botón *Enter*. Usar los botones *Arriba* o *Abajo* para cambiar entre los estados mencionados en el numeral **j**. Para este caso seleccionar *Automatic* y presionar *Enter*.
  - l. Para volver a la pantalla principal presionar el botón *Escape*.
  - m. Si se quiere confirmar el estado de la válvula recientemente modificado usar el botón *Derecha* hasta llegar al menú *Valve Position* y verificar su estado.
  - n. Presionar varias veces el botón *Derecha* para volver a la pantalla principal o simplemente el botón *Escape*.
6. Presionar el botón *Escape* para volver a la pantalla principal en la que se debe leer un valor de flujo que oscila entre 19,50scc/m y 20,50scc/m.

Para **terminar** el control de flujo de aire sintético:

1. Apagar el interruptor correspondiente al medidor/controlador de flujo
2. Cerrar las válvulas del cilindro de aire sintético y la válvula de corte en la tubería de aire sintético.

Nota: Se puede dejar el controlador de flujo encendido y sin flujo de aire sintético cambiando el estado de la válvula del controlador de flujo a *Closed*, procedimiento que se describe en los numerales h – n.

## IV. Interfaz de Usuario

### Ventana principal Interfaz de usuario

La aplicación para la medición de metanol se inicia con el ícono *MetanolApp* en la carpeta **Aplicación Metanol** del Escritorio. Se desplegará la ventana que se muestra en la figura 2 e inmediatamente comenzará a mostrar la lectura de concentración que registre la sonda de pervaporación.

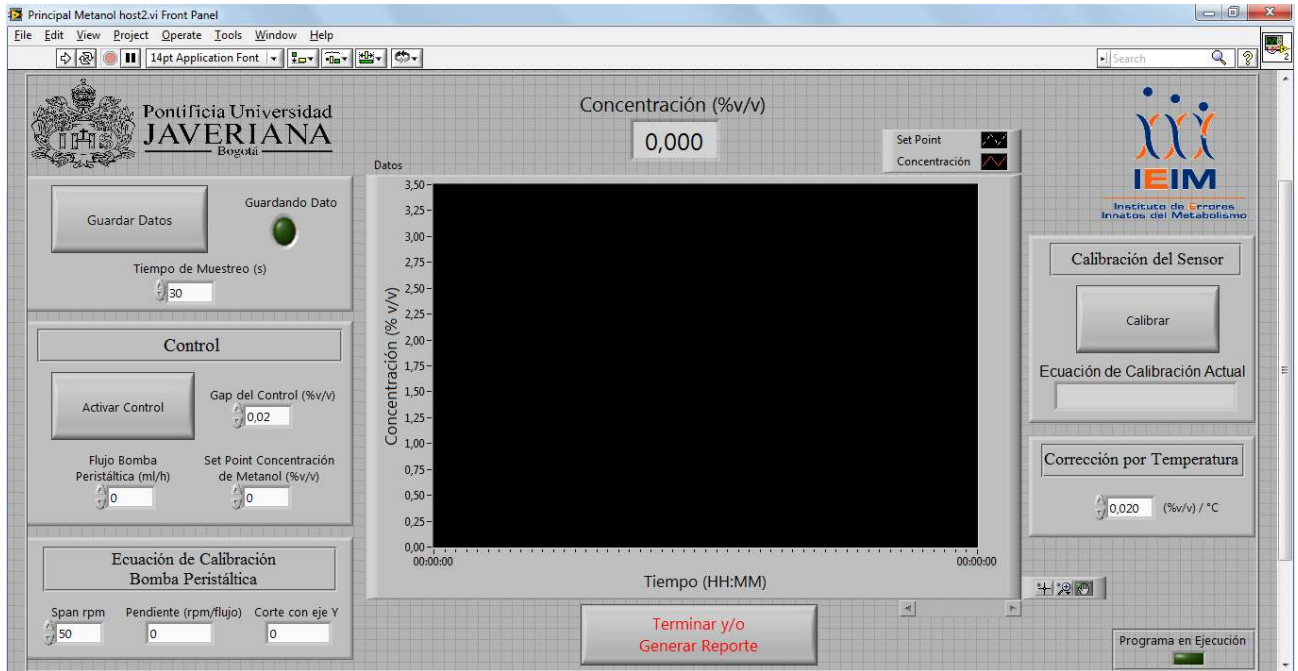


Fig. 2 Ventana principal de la interfaz de usuario

En esta ventana se tienen los controles para el manejo de los reportes, el control de concentración de metanol, los datos de calibración de la bomba peristáltica y para el inicio de la calibración de la sonda.

Toda la información ingresada a la interfaz la última vez que se corrió la aplicación se mantendrá cuando esta se inicie nuevamente. Los botones siempre iniciaran en su estado desactivado.

## Visualización de los datos en la gráfica Concentración vs Tiempo

Los controles para el manejo de la forma en que se presenta la información en la gráfica de concentración respecto al tiempo se encuentran en la parte inferior derecha de la ventana principal de la interfaz de usuario.

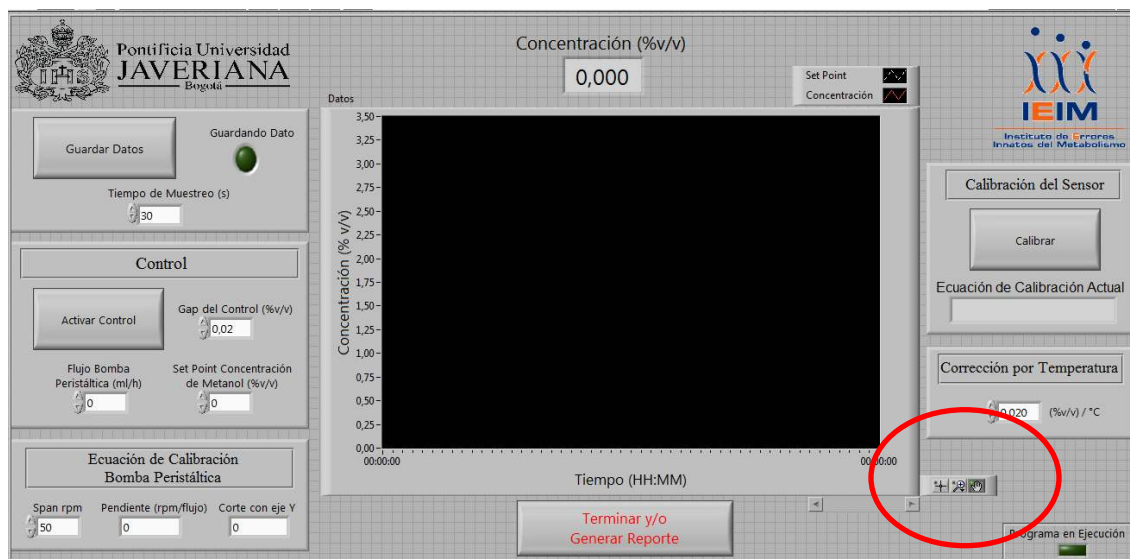


Fig. 3 Pantalla principal de la interfaz de usuario

Haciendo *Click* sobre el símbolo de la lupa se despliegan 6 controles como se observa en la figura 4. Los controles de la parte superior permiten hacer acercamiento sobre una zona específica de la gráfica, aumentar la resolución de la escala en el eje X (Tiempo) y aumentar la resolución de la escala en el eje Y (Concentración) respectivamente. Los controles de la parte inferior permiten visualizar la totalidad del área del gráfico con la mayor resolución posible, hacer un acercamiento y alejar la vista respectivamente.

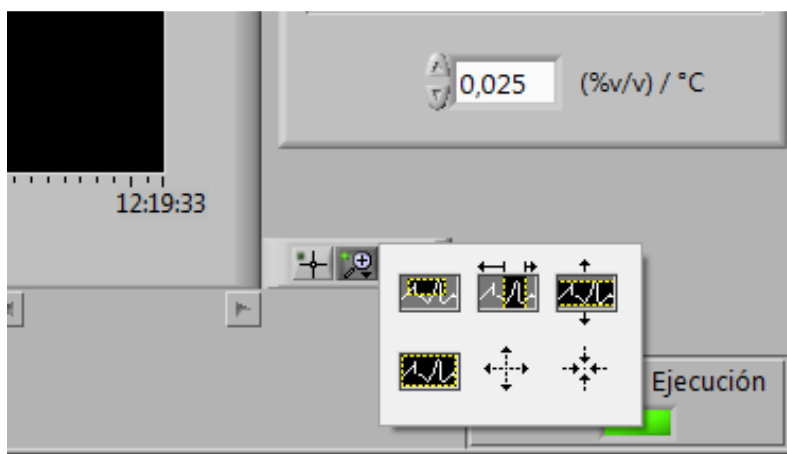


Fig. 4 Controles para el área del gráfico

El gráfico tiene la posibilidad de ajustar automáticamente la visualización de la escala en los ejes X y Y. Esto se logra haciendo *Click derecho* sobre el gráfico y activando las opciones *AutoScale X* para el eje X y *AutoScale Y* para el eje Y como se presenta en la figura 5.

Si se activa la opción *AutoScale X*, los controles de la figura 4 que correspondan al eje X para acercar y alejar quedarán desactivados. Lo mismo ocurre para los controles del eje Y si se activa *AutoScale Y*.

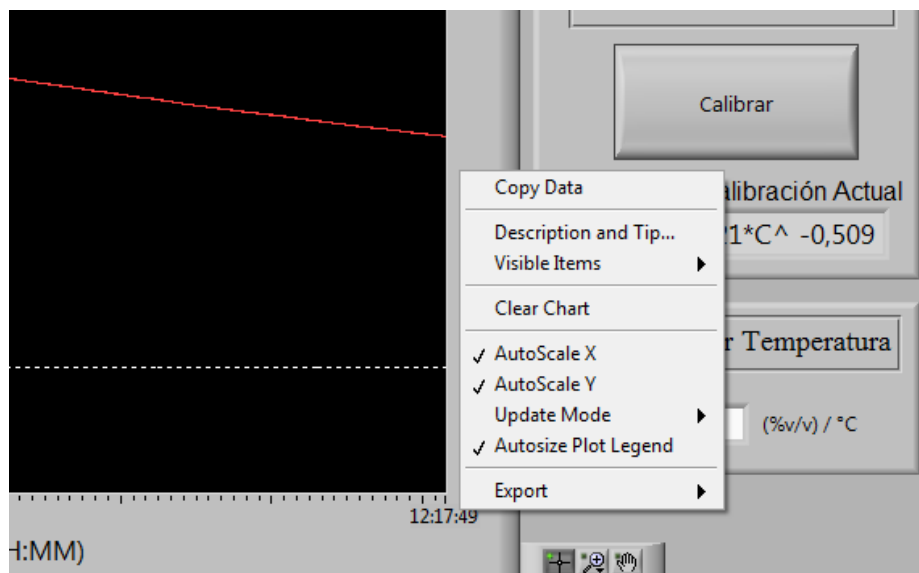


Fig. 5 Ajuste automático de escala para los ejes X y Y

## Reportes

La aplicación permite generar un archivo en Excel con los datos de concentración de metanol, la fecha y hora, el *setpoint* y la temperatura de cultivo.

Para iniciar el almacenamiento de estos datos se debe hacer *click* sobre el botón *Guardar Datos* e ingresar el tiempo de muestreo en segundos.



Fig. 6 Botón Guardar Datos en estado activado

El botón guardar datos se oscurece y ahora muestra el texto *Terminar Guardar Datos*.

En cualquier momento se puede cambiar el tiempo de muestreo, así como terminar y volver a iniciar el almacenamiento de los datos (hacer esto no borrará los datos almacenados previamente).

Una vez termine el monitoreo de la concentración de metanol, se debe oprimir el botón *Terminar y/o Generar reporte* para terminar la aplicación y generar el archivo Excel con la información almacenada. El sistema mostrará una ventana en la cual el usuario selecciona el nombre del archivo y la ubicación donde desea guardarlo.

Una vez guardado el archivo Excel, se puede cerrar la ventana de la aplicación como cualquier otra ventana de Windows presionando el botón cerrar marcado con una X en la parte superior izquierda de la ventana.

**Nota: Siempre se debe terminar la aplicación con el botón *Terminar y/o Generar reporte*. No hacerlo ocasiona que no se genere el archivo Excel con el reporte.**

### Control de concentración

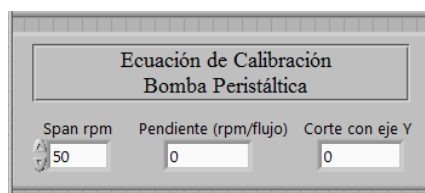
Para el control ON/OFF de concentración de metanol se deben ingresar los datos de *set point*, banda diferencial o *Gap* y el flujo de metanol que debe entregar la bomba peristáltica. Esta última debe ser encendida con el interruptor que tiene en la parte posterior. El control se activará presionando el botón *Activar control* lo cual genera que la bomba peristáltica entregue el flujo ingresado en *Flujo bomba peristáltica (ml/h)* cada vez que la lectura de concentración de metanol sea menor al *set point* menos el *Gap*.

El control se puede activar o desactivar en cualquier momento.

Nota: Se observó durante el cultivo realizado el 8/11/11 que los datos óptimos de flujo de metanol y *Gap* son 20ml/h y 0,005% v/v respectivamente.

### Ecuación de calibración bomba peristáltica

Esta sección permite ingresar los datos de la curva de calibración de la bomba peristáltica. En el control numérico *span rpm* se ingresa el valor máximo de rpm al cual la bomba peristáltica está programada, generalmente 50rpm.



Span rpm	Pendiente (rpm/flujo)	Corte con eje Y
50	0	0

Fig. 7 Controles numéricos para la bomba peristáltica

### Corrección por Temperatura

Dado que la lectura de la sonda se ve afectada por cambios en la temperatura del medio de cultivo, el sistema debe hacer una corrección para mitigar este efecto cuando se realicen

experimentos en los que se varíe la temperatura y para esto tiene el control numérico *Corrección por Temperatura*.

Antes de iniciar un cultivo con estas características se debe hacer la corrección de la siguiente manera:

1. Tener en el biorreactor una solución con determinada concentración de metanol (Ej: 0,2% v/v)
2. Registrar el valor de concentración leído por el sistema.
3. Variar la temperatura en 1°C
4. Empezar a variar el valor (generalmente entre 0,010 y 0,050) de la corrección por temperatura hasta que la lectura de concentración sea igual a la registrada en el paso 2.

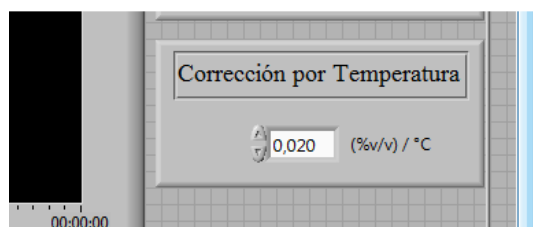


Fig. 8 Control numérico de corrección por temperatura

## Calibración

El sistema tiene una rutina de calibración de la sonda de pervaporación que se inicia presionando el botón *Calibrar* de la ventana principal. Inmediatamente aparece la ventana de la figura 8.

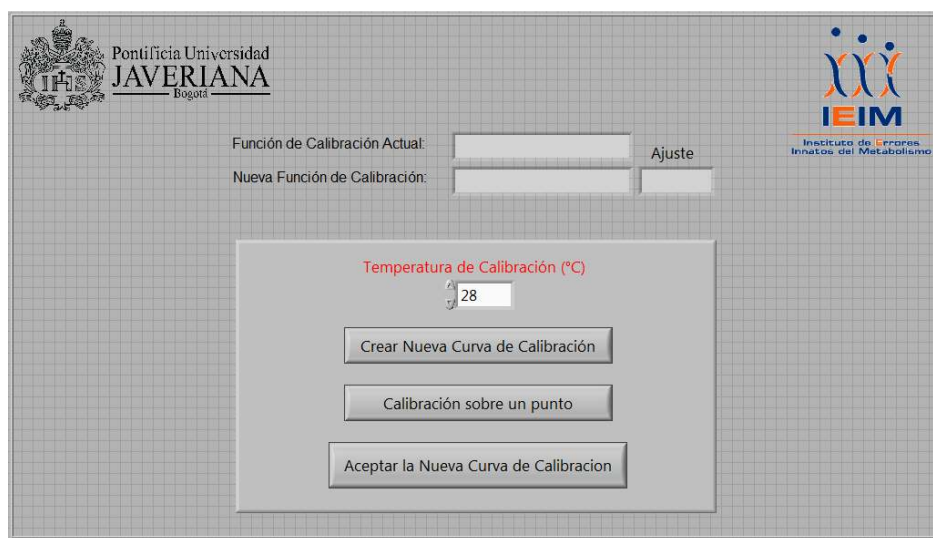


Fig. 9 Interfaz de Calibración

Esta ventana permite seleccionar dos tipos de calibración:

La primera permite crear una nueva curva de calibración de hasta 5 puntos que se iniciará presionando el botón *Crear Nueva curva de calibración*. Aparecerá la siguiente ventana:

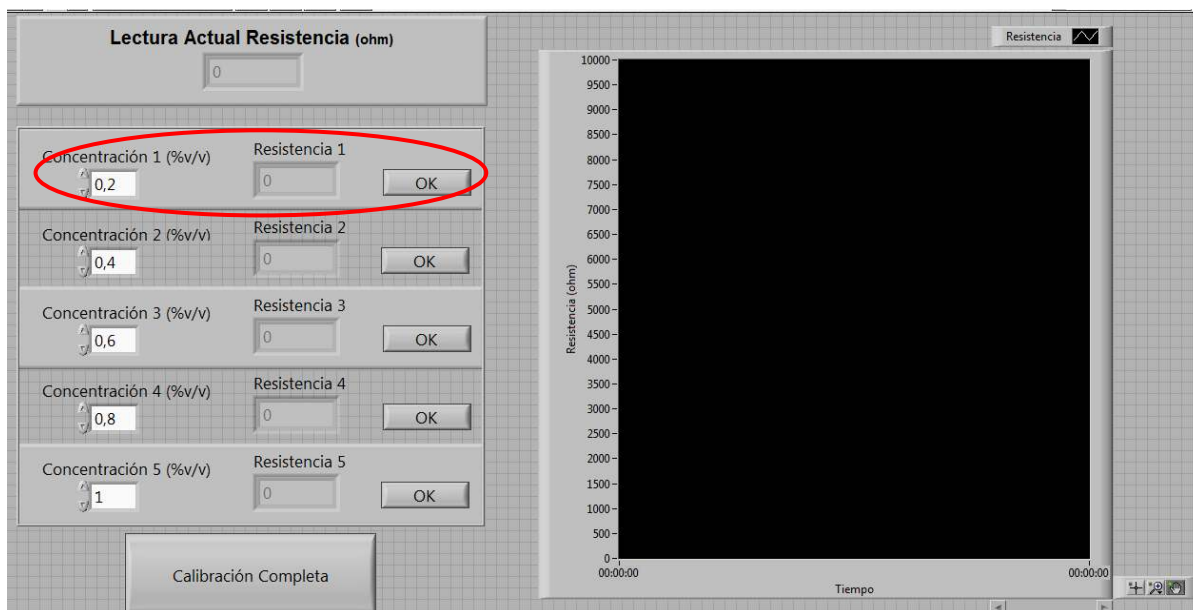


Fig. 10 Ventana para realizar una nueva curva de calibración

En esta rutina se pueden usar la cantidad de puntos de calibración que el usuario desee.

Para obtener cada uno de los puntos de calibración:

1. Agregar al volumen de agua presente en el biorreactor, la cantidad de metanol necesaria para obtener el valor de concentración deseado.
2. El valor de concentración debe ser ingresado en uno de los controles numéricos *Concentración x (%v/v)*.
3. Una vez la medida de resistencia se establezca se debe presionar su respectivo botón OK para guardar el dato de resistencia.
4. Repetir los pasos 1,2 y 3 para cada uno de los puntos de calibración.
5. Cuando se tenga el número de puntos de calibración deseado, se debe presionar el botón *Calibración Completa* para que el equipo obtenga la curva de calibración que mejor se ajusta a las parejas de datos.

Nuevamente aparecerá la ventana de la figura 8 (Interfaz de Calibración) y ahora presentará además de la función de la curva de calibración actual, la curva de calibración nueva y el coeficiente de determinación de dicha curva. Luego presionar *Aceptar la Nueva Curva de Calibración* para volver a la ventana principal de la aplicación.



El segundo tipo de calibración es la *Calibración sobre un punto* **que se debe realizar en cada cultivo**; su ventana se presenta en la figura 10. Para mostrar la ventana calibración sobre punto se debe presionar el botón *Calibrar* de la interfaz principal y a continuación el botón *Calibración sobre un punto* de la interfaz de calibración.

Esta rutina se generó debido a que la curva de calibración sufre un corrimiento debido a la esterilización efectuada al biorreactor pero basta con un solo punto de calibración para hacer la corrección a toda la curva de calibración.

Para realizar la calibración sobre punto:

1. En la fase de inducción o transición de glicerol a metanol, se debe agregar la cantidad de metanol que genere una concentración igual al **valor en el que se controlará la concentración de metanol durante el cultivo** o en el **valor medio del rango en el cual se medirá la concentración de metanol**. Este valor se debe ingresar en el control numérico denominado *Concentración en el cultivo*.
2. Una vez la medida de resistencia se estabilice (entre 5 y 10 minutos) se presiona OK para registrar este nuevo valor.
3. A continuación se presiona el botón *Ajustar* para que el software automáticamente haga la comparación de los valores de resistencia, antes y después de esterilizar, para un mismo valor de concentración y realice el ajuste de la curva de calibración.

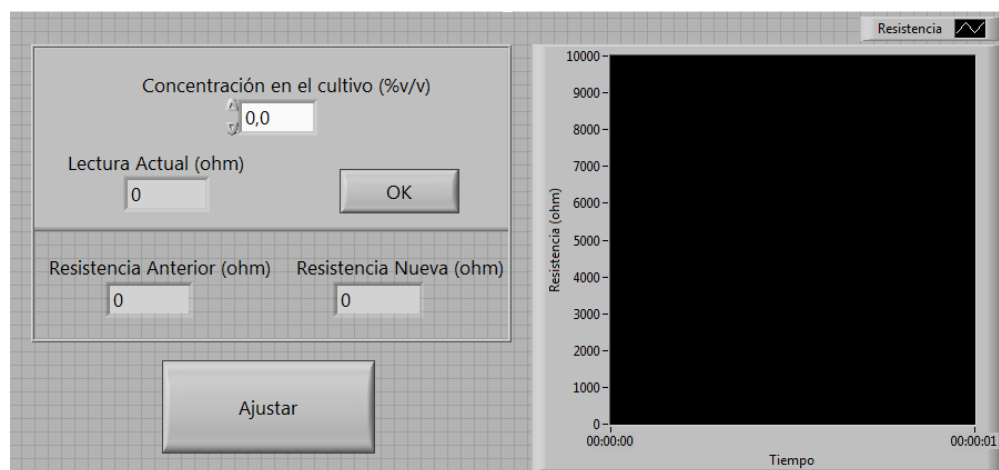


Fig. 11 Ventana de calibración sobre un punto

Nuevamente aparecerá la ventana de la figura 8 (Interfaz de Calibración) y ahora presentará además de la función de la curva de calibración actual, la curva de calibración nueva y el coeficiente de determinación de dicha curva. Luego presionar *Aceptar la Nueva Curva de Calibración* para volver a la ventana principal de la aplicación.