

Desarrollo de un sensor de CO₂ y etanol para el monitoreo en procesos biológicos empleando una plataforma de código abierto

Espinoza Tapia Julio César¹, Pérez Fuentes José Mar², García Cerón Eduardo², Hernández Jiménez Miguel Sergio¹, Revah Moiseev Sergio¹, Viguera Ramírez Juan Gabriel^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana–Cuajimalpa. Departamento de Procesos y Tecnología, Av. Vasco de Quiroga 4871, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05300. México.

²Universidad Autónoma Metropolitana–Cuajimalpa. Licenciatura en Ingeniería Biológica, Av. Vasco de Quiroga 4871, Cuajimalpa de Morelos, Ciudad de México, C.P. 05300. México.

*Autor para correspondencia: jviguera@cua.uam.mx

Recibido:

01/agosto/2021

Aceptado:

12/septiembre/2021

Palabras clave:

Sensor,
bioprocesos,
biotecnología

Keywords:

Sensor,
bioprocesses,
biotechnology

RESUMEN

Existen diversos métodos para determinar la concentración de metabolitos volátiles, entre ellos se encuentra la cromatografía de gases y los sensores; y en el caso de estos últimos, se tiene la ventaja de ser económicos y de fácil adaptación a sistemas de adquisición de datos en línea. En el presente trabajo se muestra la implementación de un prototipo desarrollado con una plataforma de código abierto, dicho prototipo permite monitorear en tiempo real la concentración de CO₂ y etanol en un sistema, obteniendo resultados de manera digital. Los sensores se probaron en una cinética de fermentación llevada a cabo con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* mostrando un adecuado monitoreo del proceso en tiempo real, obteniendo una rápida medición que permite observar el estado de la fermentación. El prototipo desarrollado es una alternativa económica, para aplicaciones en el desarrollo de proyectos dirigidos a la biotecnología y bioprocesos.

ABSTRACT

There are several methods to determine the concentration of volatile metabolites, among them are gas chromatography and sensors; and in the case of the latter, they have the advantage of being inexpensive and easy to adapt to online data acquisition systems. This work shows the implementation of a prototype developed with an open source platform, this prototype allows real-time monitoring of CO₂ and ethanol concentration in a system, obtaining the results digitally. The sensors were tested in a fermentation kinetics performed with *Saccharomyces cerevisiae* yeast showing an adequate monitoring of the process in real time, obtaining a quick measurement that allows observing the state of fermentation. The developed prototype is an economical alternative for its application in the development of biotechnology and bioprocess-oriented projects.

Introducción

Dentro de los procesos químico-biológicos el poder monitorear el comportamiento de los gases generados durante un proceso tiene gran importancia, esto debido a que proporcionan información relevante en el desarrollo tecnológico, y en algunas aplicaciones o procesos son indispensables. A nivel industrial los principales sectores que presentan emisiones de gases se encuentra principalmente la industria química, farmacéutica, alimentaria, sector salud, automotriz, metalúrgica, cerámica, biotecnológica, investigación y desarrollo, por mencionar algunas.

Por tal motivo es importante contar con las herramientas y metodologías necesarias que nos permitan monitorear la concentración de la emisión de gases en tiempo real. Hoy en día algunas de las metodologías analíticas empleadas en el monitoreo de mezclas gaseosas producidas por un proceso es tener un acoplamiento a un cromatógrafo de gases que puede tener un detector de masas, UV-Vis o infrarrojo no dispersivo (NDIR) principalmente (Lundanes et al., 2014); otra de las metodologías empleadas es el contar con bombas extractoras de mediciones de gases, las cuales saturan un medidor líquido (agua) para posteriormente se analizados mediante un detector de UV-Vis, FTIR o cromatografía de gases. Otra de las metodologías es el recurrir a un burbujeador de tubo de vidrio por el cual se hace recorrer el flujo gaseoso de interés que se colecta en un fondo liquido que se saturara y posteriormente puede ser analizado por UV-Vis, FTIR o cromatografía gaseosa (Christian Gary D., 2009).

En la Figura 1 se muestra un esquema de un sistema de burbujeo básico en el cual el flujo gaseoso llega aun deposito liquido (agua), donde se satura el contenido con el flujo gaseoso y que posteriormente se podrán analizar mediante técnicas espectroscópicas o cromatográficas.

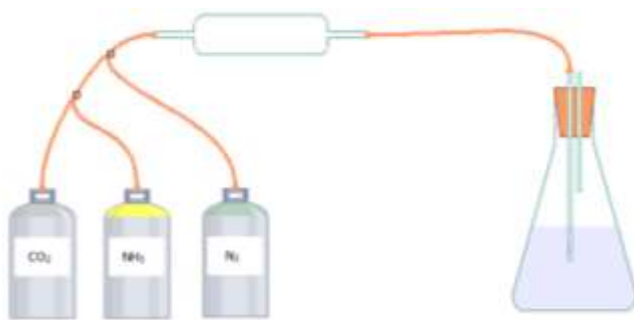


Figura 1. Esquema de un burbujeador gaseoso básico.

Durante un proceso biológico la medición en la producción de CO₂ se ha demostrado que es un indicador que refleja la viabilidad del microorganismo, así como la tasa de crecimiento microbiana de forma precisa. El CO₂ es un gas que se genera como producto del metabolismo de los microorganismos que oxidan carbohidratos como fuente de energía, el aumento en la concentración del gas puede ser directamente relacionado al aumento de la concentración de la biomasa (Müller-Auffermann et al. 2014).

El etanol es un producto resultante durante el proceso de fermentación de azúcares, es un compuesto incoloro, miscible en agua y ligeramente volátil; y su constante de Henry adimensional es de 0.000257 a 22°C y 0.00092 a 53°C, medido en aire/agua en equilibrio (Cox et al. 2001).

Actualmente existen de manera comercial diversas plataformas de desarrollo de código abierto, las cuales le permiten al usuario adecuar el hardware y software a sus propias necesidades. Así mismo, los sensores son dispositivos que transforman un fenómeno físico o químico en una señal eléctrica que es recibida y posteriormente transformada por un transductor, que permite identificar y cuantificar dicho fenómeno físico (Avenidaño y Muñoz, 2009).

En 2017 se observó una valoración en el mercado de sensores de gases cercana a los 1,950 millones de USD, y se estima que seguirá creciendo en los próximos años, esto debido a que los sistemas de adquisición de datos (DAQ) permiten la conexión de sensores a una computadora para registrar las señales en tiempo real (Laganovska et al., 2020). Por este motivo el presente trabajo se enfocó en la construcción, calibración y aplicación de un sistema para la medición en tiempo real de CO₂ y etanol en fase gas, usando una plataforma de código abierto, aplicada al monitoreo de procesos biológicos de fermentación (Burdge y Libourel, 2014).

Metodología

Para la construcción del prototipo se utilizó una tarjeta Arduino con microcontrolador Atmega 328, además un sensor electroquímico de CO₂ MG811 V2.0 (Sandbox) con carcasa de aluminio (ver Figura 2) y un sensor para etanol MQ3 (Sparkfun). La alimentación del circuito y los sensores se realizó a través de una fuente de poder de PC con salida de voltaje estable de 3.3, 5.0 y 12 V.



Figura 2. Imagen del sensor electroquímico para detección de CO₂ con carcasa de aluminio.

Para el análisis y recolección de datos se utilizó el software LABVIEW 2014 con una interface para Arduino Toolkit LIFA, a través del cual se desarrolló el programa para la conexión de los sensores. El diagrama empleado consta de un ciclo while en el cual se recibe la señal de voltaje de cada uno de los sensores a través de puerto serial de entrada (COM) a través de la entrada analógica, la señal se transforma en lecturas continuas de concentración en fase gas de CO₂ o etanol generando de forma continua una gráfica a través del tiempo, y el ciclo se repite durante el tiempo establecido por el usuario. Al iniciar cada corrida se genera automáticamente una carpeta y un archivo .dat donde se guardan los datos adquiridos, y al finalizar la corrida se muestra una gráfica con todos los datos registrados (ver Figura 3).

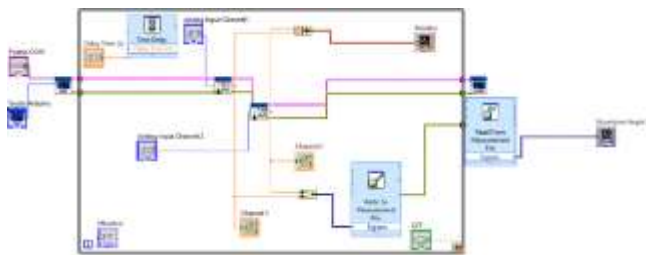


Figura 3. Diagrama de programa para conectar sensores y adquirir datos a través de entradas analógicas.

La calibración del sensor de CO₂ MG811 se llevó a cabo empleando un equipo de medición de CO₂ (Alfa Omega Instruments) por infrarrojo no dispersivo (NDIR), para lo cual se hizo pasar una mezcla de CO₂ y aire a través de ambos sensores, y se realizó una variación en la concentración de CO₂ para observar una curva de

calibración. Posteriormente el sensor MQ3 fue calibrado mediante cromatografía de gases (CG) usando una botella con tapa de Nylamid adaptada con una válvula mininert a través de la cual se inyectaron diferentes concentraciones de etanol (ver Figura 4).



Figura 4. Sensor de etanol fase gas adaptado en tapa de Nylamid con válvula mininert.

Para la calibración mediante cromatografía de gases se utilizó un equipo Agilent 790B equipado con columna 1909IJ-413 (30 m x 322 μm x 0.25 μm); adicionalmente se trabajó con un flujo de gas acarreador de 0.4 mL/min, con temperatura de horno de 150 °C, un detector FID con Split ajustado a 130°C y se realizaron inyecciones de 250 μL con jeringa de precisión (VICI).

Todas las mediciones para la calibración de los sensores se realizaron por triplicado, y finalmente se llevó a cabo el monitoreo de una fermentación en cultivo en lote de *Saccharomyces cerevisiae*, para lo cual se disolvieron 20 g de sacarosa en 250 mL de agua purificada y se inoculó con 0.25 g de levadura de pan liofilizada, el cultivo fue incubado a 32°C en condiciones estáticas.

Resultados y discusión

El prototipo construido permite detectar y cuantificar el CO₂ y etanol en fase gas, adquiriendo de forma continua los datos a través de una interface de fácil uso para el usuario. Se logró calibrar los sensores para transformar los valores de voltaje a datos de concentración en fase gas, determinando un rango de trabajo.

El sensor MG811 mostro sensibilidad y selectividad al CO₂, con un coeficiente de variación menor al 10% en el rango de las 400 ppm (0.04%) a las 10,000 ppm (1%). En cuanto al sensor MQ3, este mostro sensibilidad al etanol, igualmente con un coeficiente de variación menor al 10% en el rango de 0 a 80 mg_{etanol}/L_{gas}, por encima de esta concentración el sensor se empieza a saturar, cerca de los 3.5 volts.

En la Figura 5 se muestra el comportamiento cinético de la producción de CO₂ del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* obtenido con el prototipo desarrollado, donde es posible observar, claramente la fase exponencial durante las primeras 20 h de cultivo, posteriormente se mantiene una fase cuasi estacionaria hasta alcanzar las 58 h, y por último se presenta fase decaimiento del cultivo, alcanzado una producción máxima de 6500 ppm de CO₂ a las 18 h. El tener información sobre el CO₂ producido en los cultivos a través del tiempo permite tener información sobre la tasa de crecimiento del microorganismo y su viabilidad, lo cual es fundamental para tener control de los bioprocesos.

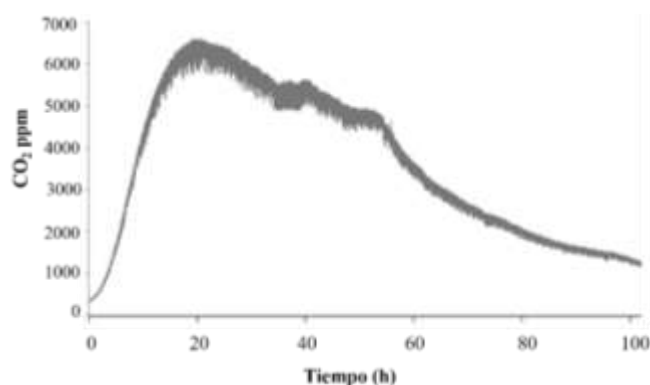


Figura 5. Concentración de CO₂ producido por *Saccharomyces cerevisiae* y monitoreado a través de tiempo.

En la Figura 6 se muestra el comportamiento cinético del etanol producido durante la fermentación de la sacarosa, el cual fue detectado en el headspace del cultivo, alcanzando hasta 120 mg_{etanol}/L_{gas}, a las 33 h. La producción de etanol pudo ser monitoreada en tiempo real a través de la medición de este compuesto en la fase gas usando el sensor MQ3.

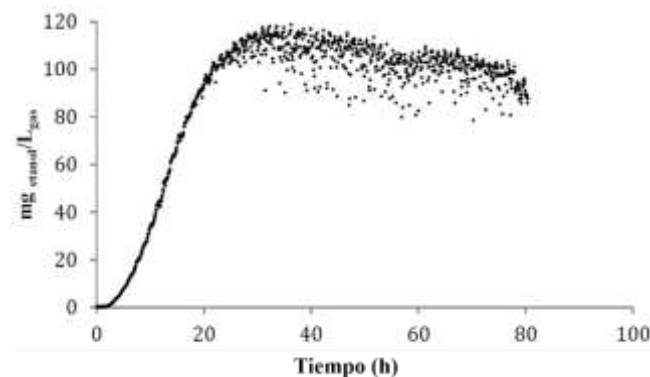


Figura 6. Concentración de etanol en fase gas producido por *Saccharomyces cerevisiae* y monitoreado a través de tiempo.

El medir metabolitos volátiles a través de sensores de compuestos en fase gas tiene como ventaja que la muestra difunde de forma continua hacia el sensor, además que no se requiere limpiar o procesar la muestra para tener una medición del compuesto de interés.

Algunas desventajas de los sensores electroquímicos es su nivel de saturación con lo cual baja la precisión de las mediciones cuando se tienen altas concentraciones del compuesto analizado. Además, que requiere de una calibración a través de técnicas analíticas avanzadas, tales como es la cromatografía de gases, a la cual no siempre se tiene fácil acceso. Sin embargo, la ventaja que da el tener mediciones en tiempo real, permite tener rápida información para controlar un bioproceso, además los perfiles de los datos obtenidos en la fase exponencial se pueden ajustar a modelos no lineales, tales como Gompertz o Logístico, a fin de estimar la tasa específica de producción de CO₂ o etanol, a fin de caracterizar los cultivos en términos cinéticos.

Conclusiones

Se logró la implementación de un prototipo desarrollado con una plataforma de código abierto, y dicho prototipo permite monitorear la concentración de CO₂ y etanol en tiempo real. Las pruebas de los sensores en cinéticas con *Saccharomyces cerevisiae* nos mostró un adecuado monitoreo del proceso, obteniendo una rápida medición que permite conocer el estado del cultivo en tiempo real, lo cual puede ser útil para monitoreo de procesos biológicos o para evaluar la viabilidad y calidad de levaduras usadas en panificación.

Una de las potenciales aplicaciones del prototipo desarrollado es el monitorear la calidad del aire de espacios cerrados, conociendo datos en tiempo real. Adicionalmente, la construcción de un sistema para la detección de concentraciones de CO₂ y etanol en fase gas basado en una plataforma de código abierto, es una alternativa económica, que puede ser utilizado por estudiantes de carreras de ciencias e ingeniería en los cuales se pueden realizar proyectos de procesos biológicos, fermentaciones, así como determinación de la actividad microbiana, a partir de biomasa lignocelulósica u otros procesos que involucren la producción de etanol.

Agradecimientos

Los autores agradecen al proyecto SEP-CONACYT No. 287615 por el financiamiento otorgado al presente trabajo.

Referencias

Avendaño G, Muñoz G.C. (2009). Sensores y Transductores Biomédicos. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Burdge David A., Libourel Igor G. L. (2014), Open Source Software to Control Bioflo Bioreactors. PLoS ONE 9(3): e92108. doi:10.1371/journal.pone.0092108

Christian Gary D. (2009), Química Analítica. Sexta Edición Mc Graw-Hill, p. 713 – 719.

Cox H. H., Sexton T., Shareefdeen Z. M., Deshusses, M. A. (2001). Thermophilic biotrickling filtration of ethanol vapors. *Environmental science & technology*, 35(12), 2612-2619.

Laganovska K., Zolotarjovs A., Vázquez M., Mc Donnell K., Liepins J., Ben-Yoav H., Karitans V., Smits Krisjanis (2020), Portable low-cost open-source wireless spectrophotometer for fast and reliable measurements. *HardwareX No. 7*, e00108.

Lundanes Elsa, Reubsæet Léon, Greibrokk Tyge (2014), Chromatography Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Müller-Auffermann, K., Silva, W., Hutzler, M., & Jacob, F. (2014). Evaluation and Development of an alternative Analysis Method for rapid Determination of Yeast Vitality. *Brew Sci*, 67, 72-80.