

03072 26  
2eje.



**REOLOGÍA Y  
MEZCLADO DE CALDOS  
DE FERMENTACIÓN**



**MICELIALES DE INTERÉS INDUSTRIAL**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**Presenta**

**DAVID VELASCO RUIZ**

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del  
Colegio de Ciencias y Humanidades

Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Cuernavaca, Mor., 1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el programa de Posgrado en Biotecnología de la UACPyP-CCH / UNAM, bajo la tutoría del Dr. Enrique Galindo Fentanes.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo de: CONACyT, IFS, PNUD y la empresa FERMIC S. A. de C. V.

Buscar la excelencia es la ambición más digna del hombre tanto si esculpe mármol como si hace un pastel.

Gracias a Dios por la vida e iluminarme en todo momento.

A mi Madre y a mi Padre por todo su apoyo y comprensión, porque siempre me han ayudado a alcanzar mis metas y a ir siempre hacia adelante. Y a mis hermanos.

A mi amada esposa por su paciencia, cariño, comprensión, apoyo y sus críticas constructivas. Por ayudarme a ser mejor cada día. Gracias.

A los compañeros del grupo Dalindo-OTR por su ayuda y críticas, y momentos que de alguna manera compartimos.

Agradezco especialmente al Dr. Enrique Dalindo el haberme aceptado en su grupo de trabajo, y por su valiosa dirección, críticas y sugerencias para la realización de este trabajo.

A Alfredo Martínez por su valiosa ayuda, críticas y comentarios.

A Juan García por sus críticas y sugerencias.

El hombre no se rinde a los ángeles ni se entrega por entero a la muerte, como no sea por la flaqueza de su débil voluntad.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Índice de figuras	e
Nomenclatura	i
Resumen	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
2.1. Reología de caldos miceliales	6
2.2. Consumo de potencia en tanques agitados con fluidos viscosos	9
2.3. Mezclado de caldos miceliales o caldos simulados	12
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
3.1. Objetivo general	15
3.2. Objetivos específicos	15
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1. Caldos de fermentación	16
4.1.1. Caldos industriales	16
4.1.2. Estabilidad reológica de los caldos	16
4.1.3. Fermentaciones	17
4.2. Determinación de la biomasa y la densidad	17
4.2.1. Determinación de la biomasa	17
4.2.2. Determinación de la densidad	18
4.3. Equipo para medición de consumo de potencia e impulsores utilizados	19
4.4. Cálculo la potencia suministrada	21
4.5. Determinación del punto de cedencia $\tau_y$	23
4.6. Cálculo de los parámetros reológicos mediante el uso del dispositivo "vane"	26
4.7. Cálculo de los parámetros reológicos a partir de determinaciones en el viscosímetro Brookfield HBTDV-I con la aguja número 1	28
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
5.1. Reología evaluada mediante dos sistemas: viscosímetro Brookfield con aguja #1 y con el "vane" (lote 454)	30
5.2. Estabilidad reológica de los caldos	32

5.3.	Caldos de <i>Micromonospora purpurea</i>	38
5.3.1.	Reología	38
5.3.2.	Consumo de potencia sin aireación (impulsores duales)	41
5.3.3.	Consumo de potencia con aireación (impulsores duales)	43
5.3.4.	Conclusiones	48
5.4.	Caldos de <i>Amycolatopsis mediterranei</i>	50
5.4.1.	Reología	50
5.4.2.	Consumo de potencia sin aireación	53
5.4.2.1.	Impulsores individuales	53
5.4.2.2.	Impulsores duales	55
5.4.2.3.	Comparación entre impulsores individuales y duales	57
5.4.3.	Consumo de potencia con aireación	59
5.4.3.1.	Impulsores individuales e impulsores duales	59
5.4.4.	Conclusiones	62
6	CONCLUSIONES GENERALES	63
7	RECOMENDACIONES	65
8	LITERATURA CITADA	66
	Anexos	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Pág.
1.1 Factores que controlan la productividad en un reactor biológico	4
4.1 Dimensiones del tanque de mezclado	19
4.2 Dimensiones de los impulsores	20
4.3 Configuraciones de los impulsores	21
4.4 Dimensiones del dispositivo "vane"	24
4.5 Curva típica generada con el dispositivo "vane"	25
4.6 Dimensiones de la aguja número 1 del viscosímetro Brookfield	28
5.1 Reogramas del lote 454 de la producción de rifamicina, generados mediante el viscosímetro de aguja y con el dispositivo "vane"	31
5.2 Comportamiento de los parámetros reológicos (obtenidos con el dispositivo "vane" y con la aguja #1) con respecto al tiempo de fermentación.	31
5.3 Estabilidad reológica de los caldos de: <i>S. eritreus</i> y <i>S. aureofaciens</i> .	33
5.4 Micrograffas de <i>Streptomyces eritreus</i> en la planta al momento de la toma de la muestra y en el laboratorio 5 horas después.	34
5.5 Estabilidad reológica de los caldos de: <i>Micromonospora purpurea</i> y <i>Anycolatopsis mediterranei</i> (lote 433).	35
5.6 Micrograffas de <i>Anycolatopsis mediterranei</i> antes y después de los experimentos de mezclado	35

5.7	Estabilidad reológica de los caldos de <i>Amycolatopsis</i> . Antes y después de someterlos a 12 h de almacenamiento. Lote 435.	36
5.8	Reogramas del lote 454 de la producción de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> para 38 y 111 h de la fermentación.	37
5.9	Reogramas para los caldos de <i>Micromonospora purpurea</i> , generados a partir de datos obtenidos en el laboratorio utilizando la aguja #1.	39
5.10	Evolución de K, n, $\tau_y$ (obtenidos con el "vane") y la biomasa de los caldos de fermentación de <i>Micromonospora purpurea</i> .	39
5.11	Efecto de la concentración de biomasa sobre los parámetros reológicos n, K y sobre el punto de cedencia ( $\tau_y$ )	41
5.12	Po versus Re para caldos de <i>M. purpurea</i> de diferentes edades, para 2 turbinas Rushton y turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas 45°.	42
5.13	Gráfica de número de potencia sin aireación en función del número de Reynolds para caldos de fermentación de <i>Micromonospora purpurea</i> de diferentes edades del cultivo, para la combinación de impulsores de turbina Rushton - InterMIG	43
5.14	Gráfica de Po versus Re, generada utilizando caldos de <i>Micromonospora purpurea</i> de 27 y 147 horas de cultivo.	44
5.15	Caída de la potencia por efecto de la aireación como una función del Re y de la edad del cultivo	46
5.16	Relación $(Pg/P)_{\min}$ en función de la edad del cultivo de <i>Micromonospora purpurea</i> para tres configuraciones de impulsores.	47
5.17	Pg/P versus Re para las combinaciones de impulsores: dos turbinas Rushton y turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas a 45°	47

5.18	Efecto de la aireación sobre el consumo de potencia en caldos de fermentación de <i>Micromonospora purpurea</i> a diferentes edades del cultivo, para la combinación de impulsores de turbina Rushton - InterMIG	48
5.19	Reogramas del lote 454 de la producción de rifamicina, generados utilizando el dispositivo "vane", en el laboratorio	51
5.20	Cinética de crecimiento y parámetros reológicos ( $n$ , $K$ y $\tau_v$ ) de caldos industriales de la producción de rifamicina, lote 435, obtenidos utilizando el dispositivo "vane"	51
5.21	Efecto de la concentración de biomasa sobre los parámetros reológicos $n$ , $K$ y sobre el punto de cedencia ( $\tau_y$ )	52
5.22	Efecto de la dilución sobre la reología de los caldos de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> .	53
5.23	Po versus Re para caldos de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> de diferentes edades de cultivo	54
5.24	Po versus Re para caldos de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> de diferentes edades, utilizando 2TR y TR-TPI	56
5.25	Po versus Re para caldos de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> de diferentes edades de cultivo	57
5.26	Po versus Re, para los caldos de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> utilizando TR, 2TR y TRx2	58
5.27	Po versus Re, para $Po_{TR}$ , $Po_{TR-TPI}$ y $Po_{TR} + Po_{TPI}$ , para los caldos de <i>Amycolatopsis mediterranei</i>	59
5.28	Pg/P versus Re para muestras de caldos de <i>Amycolatopsis mediterranei</i> de 20 y 67 h, utilizando impulsores individuales	60

- 5.29 Pg/P versus Re para muestras de caldos de *Amycolatopsis mediterranei* de 20 y 67 h, utilizando impulsores duales 61
- 5.30 Relación  $(Pg/P)_{\min}$  en función de la edad del cultivo de *Amycolatopsis mediterranei* para cuatro configuraciones de impulsores. 61

## NOMENCLATURA

A	Constante (Ec. 4.14)	[ N·m·s <sup>n</sup> ]
B	Brazo de palanca	[ m ]
c	Constante dependiente de la geometría del sistema (ec. 4.13)	[ adimensional ]
C	Separación del impulsor inferior del fondo del tanque	[ m ]
Cv	Constante del viscosímetro HBTDV-I (5.7496x10 <sup>-3</sup> )	[ N·m ]
D	Diámetro del impulsor	[ m ]
D <sub>D</sub>	Diámetro del disco de la turbina Rushton	[ m ]
Dv	Diámetro del "vane"	[ m ]
F	Fuerza	[ N ]
H <sub>f</sub>	Altura del líquido	[ m ]
Hv	Altura del "vane"	[ m ]
K	Índice de consistencia de la ley de la potencia ( $\tau = K\dot{\gamma}^n$ )	[ Pa·s <sup>n</sup> ]
k <sub>s</sub>	Constante de Metzner y Otto	[ adimensional ]
Kv	Constante del "vane" (171.2x10 <sup>-6</sup> )	[ m <sup>3</sup> ]
L	Longitud efectiva de la aguja	[ m ]
La	Lectura máxima del aparato [% del torque total del equipo]	[ adimensional ]
L <sub>B</sub>	Longitud de la paleta del impulsor	[ m ]
Lectura	Lectura del viscosímetro	[ adimensional ]
Lr	Lectura residual del aparato	[ adimensional ]
M	Torque	[ N·m ]
Mm	Torque máximo (=Cv · La/100)	[ N·m ]
n	Índice de flujo de la ley de la potencia ( $\tau = K\dot{\gamma}^n$ )	[ adimensional ]
N	Velocidad del impulsor	[ s <sup>-1</sup> ]
P	Potencia	[ W ]
Pg	Potencia bajo condiciones aireadas	[ W ]
Po	Número de potencia ( $=P/(\rho \cdot N^3 \cdot D^5)$ )	[ adimensional ]
Pog	Número de potencia con aireación ( $=Pg/(\rho \cdot N^3 \cdot D^5)$ )	[ adimensional ]
R	Radio de la aguja	[ m ]
Re	Número de Reynolds para fluidos no-Newtonianos	[ adimensional ]
T	Diámetro del tanque	[ m ]
Vc	Volumen de caldo	[ mL ]
Vs	Volumen de sólidos	[ mL ]

$W_a$	Peso del agua	[ kg ]
$W_f$	Peso del fluido	[ kg ]

## LETRAS GRIEGAS

$\dot{\gamma}$	Velocidad de deformación o velocidad de cizalla	[ $s^{-1}$ ]
$\bar{\gamma}$	Velocidad de deformación promedio	[ $s^{-1}$ ]
$\eta$	Viscosidad aparente	[ Pa·s ]
$\rho$	Densidad del fluido	[ $kg \cdot m^{-3}$ ]
$\rho_a$	Densidad del agua	[ $kg \cdot m^{-3}$ ]
$\omega$	Velocidad angular	[ $s^{-1}$ ]
$\tau$	Esfuerzo de corte o esfuerzo de cizallar	[ Pa ]
$\bar{\tau}$	Esfuerzo de corte promedio	[ Pa ]
$\tau_y$	Punto de cedencia o esfuerzo de fluencia	[ Pa ]

## RESUMEN

En la industria fermentativa que utiliza microorganismos filamentosos se generan fluidos con fuertes características no-Newtonianas. La reología de los caldos de cultivo cambia drásticamente a medida que avanza el proceso de fermentación, lo que trae como consecuencia graves problemas de mezclado y de transferencia de masa.

En la literatura existen relativamente pocos reportes referentes a estudios de reología y caracterización del consumo de potencia para el mezclado, empleando caldos de fermentación industriales con microorganismos filamentosos.

En el presente estudio se reportan datos de reología y mezclado de caldos de las fermentaciones industriales para la producción de antibióticos utilizando los microorganismos filamentosos *Micromonospora purpurea* (producción de gentamicina) y *Anycolatopsis mediterranei* (producción de rifamicina). Los caldos fueron reológicamente y estructuralmente estables bajo las condiciones en que se realizaron el transporte y las determinaciones de reología y suministro de potencia. No se presentó separación de fases durante la determinación de los parámetros reológicos. Se caracterizó la reología de muestras tomadas a diferentes etapas de la fermentación utilizando un viscosímetro de turbina y uno de aguja cilíndrica. Además se evaluaron las características del consumo de potencia para el mezclado, bajo condiciones aireadas y no aireadas.

Los parámetros reológicos fueron obtenidos mediante un viscosímetro Brookfield con la aguja número 1 y utilizando un dispositivo "vane" (impulsor de 4 paletas planas) montado sobre el cabezal del viscosímetro Brookfield HBTDV-I, usado como medidor de torque. Se empleó una técnica directa para la estimación del punto de cedencia de los caldos, utilizando el dispositivo "vane".

Los estudios de potencia fueron realizados en un tanque agitado mecánicamente, con un volumen de operación de 10 litros, montado sobre un dinamómetro de cojinete neumático. Se caracterizaron combinaciones de dos impulsores, dos turbinas Rushton, turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas a 45° bombeando hacia arriba y turbina Rushton-InterMIG, así como impulsores individuales, turbina Rushton y turbina de 6 paletas inclinadas a 45°. Los experimentos se realizaron bajo condiciones aireadas (con flujos de aire que variaron desde 0.25 hasta 1.0 vvm) y no aireadas. En todos los casos se utilizaron relaciones de diámetro del impulsor a diámetro del tanque de aproximadamente 0.53.

Los caldos mostraron comportamiento pseudoplástico desde el inicio de la fermentación y puntos de cedencia a etapas más avanzadas del proceso. Los datos reológicos se ajustaron bien al modelo de la ley de la potencia (ley de Oswald-de Waele). Se observó que el índice de flujo ( $n$ ) decrece inicialmente pero luego permanece prácticamente constante ( $n \cong 0.3$  para *M. purpurea* y  $n \cong 0.1$  para *A. mediterranei*). El índice de consistencia tiende a incrementarse a medida que aumenta la edad de los cultivos (de 0.1 a 5.5 Pa·s<sup>n</sup> para *M. purpurea* y de 0.1 a 9.8 Pa·s<sup>n</sup> para *A. mediterranei*).

La concentración de biomasa influye mayormente sobre la viscosidad y el punto de cedencia, sin embargo, no es el único factor, sino que existen otros no menos importantes, como la morfología y las interacciones entre la hifas del micelio, ya que pequeñas diluciones provocaron cambios drásticos en la reología de los caldos.

Bajo condiciones no aireadas, los datos de potencia mostraron tendencias similares a las reportadas en la literatura para otro sistema viscoso y no-Newtoniano, como el constituido por los caldos reconstituidos de goma xantana, excepto en la región de  $20 < Re < 100$ , en donde los caldos miceliales muestran valores de  $P_o$  inferiores a los obtenidos con el polisacárido, debido probablemente que el punto de cedencia y la viscoelasticidad que presentan los caldos miceliales son más bajos.

Al estudiar el efecto de la aireación sobre el consumo de potencia, usando caldos de *Amycolatopsis mediterranei*, se encontró que esta tiene un efecto más drástico cuando se utilizan impulsores individuales si se compara con lo observado con impulsores duales, siendo la turbina Rushton individual la que presentó las caídas de potencia más pronunciadas. La combinación de dos turbinas Rushton mostró mayor sensibilidad a la aireación que la combinación de turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas a 45°. La turbina de 6 paletas inclinadas a 45° individual fue la que presentó menor sensibilidad a la aireación.

A medida que la viscosidad y el punto de cedencia se incrementan, a edades avanzadas del cultivo, las caídas en la potencia por efecto de la aireación son mayores (al mismo flujo de aire). Encontrándose que con caldos de *Micromonospora purpurea* el cambio en los niveles de aireación no produce efectos notables sobre la potencia consumida. No obstante, el nivel de aireación sí tiene influencia sobre el consumo de potencia cuando se utilizan caldos de *Amycolatopsis mediterranei*.

## 1. INTRODUCCIÓN

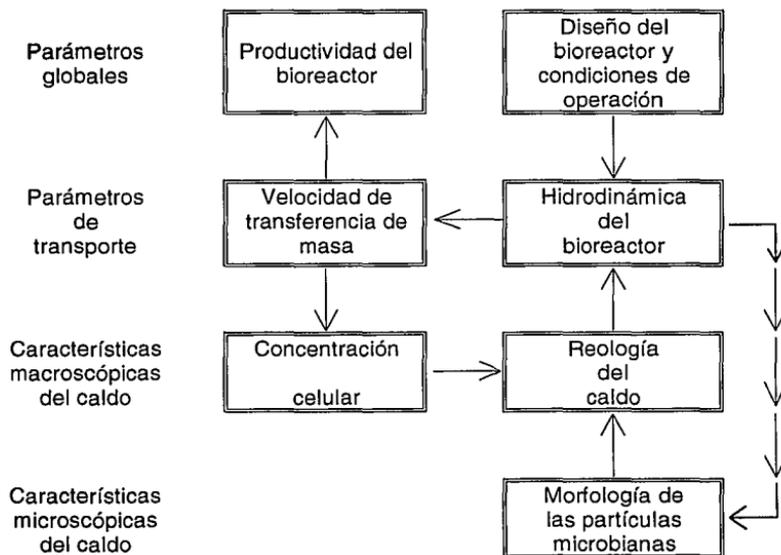
Las propiedades reológicas de los medios de cultivo tienen una fuerte influencia sobre el desempeño de un bioreactor, principalmente en sus características de transferencia de masa, transporte de momentum y de calor. Por ejemplo, a medida que se incrementa la concentración de biomasa, el coeficiente de transferencia de oxígeno decrece. Esto a su vez afecta el crecimiento, la morfología y principalmente a la formación de producto (Tuffile y Pinho, 1970; Smith y Kristiansen, 1993). En la industria de bioprocesos, los microorganismos filamentosos juegan un papel comercial importante, ya que se utilizan en la producción de varios productos, entre los que destacan las enzimas y los antibióticos. En muchos procesos fermentativos se emplean microorganismos miceliales. En dichos procesos, la reología cambia en función del tiempo de fermentación, debido principalmente al incremento de la masa celular y a los cambios morfológicos de las hifas y las interacciones de estas (Charles, 1978; Olsvik *et al.*, 1993). La determinación y el control de las propiedades reológicas de los caldos de fermentación son muy importantes ya que además afectan a las operaciones de recuperación y purificación del producto, así como la respuesta de los sensores para el monitoreo y el control de parámetros de la fermentación. Además, las características reológicas pueden ser un indicador del estado o avance del proceso fermentativo (Ghildyal *et al.*, 1987; Gavrilescu *et al.*, 1992).

Muchos de los problemas de las fermentaciones con hongos y actinomicetos provienen de la estructura morfológica del microorganismo. Existen dos tipos extremos en cultivo sumergido: la forma de aglomerados o "pellets" y la forma filamentosos libre (Thomas, 1993). En los cultivos de hongos filamentosos que crecen en forma dispersa, las interacciones miceliales tienden a producir caldos de viscosidad y pseudoplasticidad (fluidificación por cizalla) elevadas y con punto de cedencia (Ghildyal *et al.*, 1987). Por el contrario, cuando dichos microorganismos crecen formando aglomerados ("pellets") el incremento en viscosidad y pseudoplasticidad es muy bajo a elevadas concentraciones de biomasa (Smith y Kristiansen, 1993). Sin embargo, en la forma de "pellets" se presentan problemas de tipo difusional de los nutrientes hacia el interior del "pellet".

En las fermentaciones en lote, los factores que afectan la reología del caldo son el volumen de operación (a mayor volumen existen gradientes de viscosidad aparente ( $\eta$ ), es decir, que los puntos más alejados del impulsor mostrarán valores de  $\eta$  más altos), la concentración de oxígeno disuelto, la velocidad del impulsor y la velocidad de crecimiento celular (Smith y Kristiansen, 1993). Debido a que existe una interdependencia entre la morfología y el funcionamiento o desempeño del bioreactor, la caracterización de la morfología es importante paralelamente a la

caracterización fisiológica del microorganismo, así como, la realización de mejoras en el diseño y condiciones de operación de los procesos fermentativos (Thomas, 1993).

Las interrelaciones que existen entre la reología de caldo, el diseño y operación del reactor, transferencia de masa y mezclado, y sus implicaciones sobre la productividad se resumen en el esquema presentado en la figura 2.1.



**Figura 1.1.** Factores que controlan la productividad en un reactor biológico (Oolman *et al.*, 1987).

Las hifas, usualmente largas, delgadas y ramificadas forman una red tridimensional que produce caldos de fermentación altamente viscosos y pseudoplásticos. La viscosidad elevada de los caldos es un factor limitante en las fermentaciones industriales y constantemente se buscan métodos para

tratar de controlar la viscosidad (Kristiansen y Olsvik, 1993). En la industria frecuentemente se hacen diluciones para controlar la viscosidad de los caldos, pero esto sólo funciona temporalmente, ya que entre mayor es la viscosidad, este método resulta menos efectivo. Normalmente se puede abatir la viscosidad aparente de los fluidos pseudoplásticos incrementando la velocidad de agitación. Esto mejora la transferencia de oxígeno, pero a su vez conduce a un incremento de la concentración de biomasa, lo cual redundará en un aumento de la viscosidad (Kristiansen y Olsvik, 1993).

Llevando a cabo diluciones y controlando el crecimiento se pueden obtener mejoras en el proceso. Además de que, si la velocidad de crecimiento celular está determinada por la transferencia de oxígeno, las diluciones no limitan el crecimiento y los valores del índice de consistencia ( $K$ ) se incrementan. Bajo estas condiciones la viscosidad sólo es controlada durante períodos de tiempo muy cortos (Kristiansen y Olsvik, 1993). Las características morfológicas del micelio también afectan fuertemente a la viscosidad, al índice de consistencia y al punto de cedencia de los caldos de fermentación miceliales (Ghildyal *et al.*, 1987).

Finalmente existen pocos estudios en la literatura referentes a reología y mezclado de caldos de fermentación con microorganismos filamentosos. La mayoría de estos estudios se han realizado con caldos de fermentación obtenidos en el laboratorio, con micelios resuspendidos o con fluidos modelo. Además, una buena parte de dichos estudios se han realizado con microorganismos que crecen como aglomerados ("pellets"). Es de resaltar también que los estudios reportados en la literatura se refieren principalmente a un solo impulsor, generalmente con relaciones geométricas estándar.

En las fermentaciones industriales con organismos miceliales o en la producción de biopolímeros, se emplean geometrías no estándar e impulsores múltiples. Lo anterior indica claramente que existe la necesidad de realizar estudios de mezclado empleando relaciones geométricas no estándar y con impulsores únicos y duales. Adicionalmente, existen muy pocos reportes en la literatura que se refieran al estudio de la reología y el consumo de potencia en el mezclado de caldos industriales de fermentaciones miceliales. De aquí que las estrategias del presente trabajo fueron, realizar estudios de reología y caracterización del consumo de potencia de impulsores duales e individuales en caldos de fermentaciones industriales para la producción de antibióticos, utilizando un tanque de mezclado de geometría no estándar. Esto permitirá un mejor entendimiento del comportamiento de este tipo de fluidos, acerca de los cuales existe relativamente muy poca información.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Reología de caldos miceliales

En la manufactura, por vía fermentativa, de varios productos, tales como antibióticos y enzimas se emplean microorganismos miceliales. El caldo de fermentación es una suspensión de microorganismos y componentes del medio. En el caso de los micelios que crecen en forma filamentosa, se trata de partículas suspendidas, las cuales tienen una elevada relación de longitud/diámetro. El hecho de que estos organismos crezcan en forma tan dispersa genera suspensiones altamente viscosas y reológicamente complejas, aún a concentraciones de biomasa relativamente bajas (Banks, 1979; Kembrowski y Kristiansen, 1986). Cuando las propiedades reológicas del cultivo causan un decremento en la calidad del mezclado, la adición de agua estéril o medio fresco al fermentador provoca una disminución de la viscosidad y de la pseudoplasticidad, produciéndose una mejora en el mezclado. En el proceso de producción de kanamicina, una dilución del 10% puede resultar en una reducción de la viscosidad de hasta un 50 %, lo que se traduce en un incremento en el rendimiento del producto (Charles, 1978). En fermentaciones de *Nocardia lactamdurans*, agregando de 15 a 18 % de agua al bioreactor se puede abatir la viscosidad por un factor que va de 1.6 a 2.2, con lo que se obtienen incrementos en el  $k_L a$  de hasta un 50 % (Buckland *et al.*, 1987). Las diluciones producen una mejora en la reología de los caldos miceliales, pero esto sólo es temporal ya que a medida que se incrementa la viscosidad, el control de la viscosidad por dilución es menos eficiente. Las diluciones tienen cierto efecto para abatir la viscosidad de caldos de *A. niger*, sin embargo, a medida que la viscosidad o los valores del índice de consistencia son más altos el período de duración de dicho efecto es más corto (Olsvik y Kristiansen, 1992; Kristiansen y Olsvik, 1993). La reología de las suspensiones miceliales depende de parámetros tales como la forma, el tamaño, la masa, la flexibilidad de las partículas, su deformabilidad y su concentración, entre otros (Charles, 1978; Metz *et al.*, 1979).

En la gran mayoría de los caldos de fermentación que contienen microorganismos filamentosos (hongos o actinomicetos) ocurre separación de fases, en tiempos relativamente cortos. Frecuentemente se presenta también destrucción de los agregados celulares al momento de medir la viscosidad, en viscosímetros o reómetros convencionales tales como los de cono y plato, de cilindros concéntricos y los de cilindros coaxiales. Esto último a causa de que, generalmente las partículas son del mismo orden de magnitud que el ángulo del cono o que el claro existente entre los cilindros. Debido a la separación de fases y/o a la destrucción de los agregados celulares, la viscosidad es dependiente del tiempo en la mayoría de este tipo de suspensiones miceliales, siendo

mayor el efecto cuando los microorganismos crecen en forma de "pellets" (Bongenaar *et al.*, 1973; Charles, 1978; Metz *et al.*, 1979).

En la literatura existen relativamente pocos reportes referentes a la reología de caldos conteniendo micelios. Algunos de estos trabajos se han realizado empleando viscosímetros convencionales (cono y plato, cilindros concéntricos y coaxiales y de aguja). Sin embargo, es conocido que tales dispositivos no son siempre adecuados para este tipo de fluidos ya que se pueden presentar problemas de separación de fases y/o destrucción de los agregados celulares (Bongenaar *et al.*, 1973; Charles, 1978; Metz *et al.*, 1979). Con el fin de evitar estos problemas, otros autores (Björkman, 1986; Allen y Robinson, 1989; Olsvik y Kristiansen, 1992) han recurrido al uso de otras geometrías, tales como los impulsores de turbina y listón helicoidal, "vane" y reómetros de tubo.

Empleando un viscosímetro de turbina y uno de listón helicoidal y mediante el modelo de la ley de la potencia, Reuss y colaboradores (1982) reportaron datos similares a los de Kim y colaboradores (1983) para *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* que crecen en forma filamentosa. Aunque la ley de la potencia describe bien los resultados reológicos en un amplio rango de velocidades de deformación, en cierto intervalo de rapidez de deformación, los datos se ajustan bien a los modelos de Casson y al de Herschel-Bulkley que involucran al punto de cedencia (Reuss *et al.*, 1982).

Cuando *Absidia corymbifera* crece en forma de aglomerados ("pellets"), los caldos presentan comportamiento Newtoniano para concentraciones de biomasa inferiores a  $28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que a concentraciones superiores a  $28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  muestran comportamiento pseudoplástico (Kim *et al.*, 1983). En el caso de la forma filamentosa, este cultivo exhibe comportamiento pseudoplástico a concentraciones de biomasa bajas (alrededor de  $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). El índice de consistencia (K), del modelo de la ley de la potencia, tiende a aumentar de manera lineal a medida que aumenta la concentración de biomasa. Para la suspensión de "pellets", el índice de flujo (n) tiende a decrecer a concentraciones mayores de  $28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de biomasa. Mientras que para los micelios filamentosos, en el intervalo de concentraciones de biomasa analizado por Kim y colaboradores (1983), este parámetro decrece hasta cierto valor y luego permanece casi constante.

Usando un viscosímetro con impulsor helicoidal y un reómetro de tubo, Fatile (1985) y Mitard y Riba (1986) hallaron que el diámetro de las partículas y la morfología influyen en la reología de caldos de *Aspergillus niger* que crecen en forma de "pellets". Estos investigadores infirieron la

existencia de punto de cedencia a partir de sus reogramas de esfuerzo de corte *versus* velocidad de deformación.

Moo-Young *et al.* (1987) reportaron que usando un viscosímetro de cilindros concéntricos para el caldo de fermentación conteniendo el microorganismo *Chaetomium cellulolyticum*, es necesario que el espacio entre los cilindros sea suficientemente amplio (2.6 mm) para evitar que el aparato se "atasque". También reportaron que para *Neurospora sitophila*, se generan datos erróneos debido al atascamiento del viscosímetro de cilindros concéntricos, ya que este microorganismo crece formando "pellets". Por lo anterior, estos autores utilizaron un viscosímetro con impulsor de turbina para la estimación de los parámetros reológicos del caldo de *Neurospora sitophila*. Además, reportaron que los reogramas sugieren la existencia de punto de cedencia.

Usando diferentes viscosímetros, Allen y Robinson (1989) realizaron estudios con caldos de *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Streptomyces levoris*. Para la misma velocidad de deformación, dichos autores obtuvieron valores de esfuerzos de corte sensiblemente mayores con los viscosímetros de turbina que con los viscosímetros de tubo o de cilindros. También hallaron que estas suspensiones son estables, ya que aún usando viscosímetros de cilindros no presentaron problemas de separación de fases. Sus resultados sugieren la existencia de punto de cedencia en estas suspensiones.

En caldos de *Cephalosporium acremonium*, la viscosidad aparente se incrementa rápidamente hasta alcanzar su máximo valor a las 55 horas y posteriormente disminuye (Kim y Yoo 1992). La biomasa se incrementa hasta alcanzar su máximo alrededor de las 80 horas. Sin embargo, aunque la biomasa a las 85 horas es similar que la de las 55 horas, la viscosidad disminuye a la mitad. Esto indica que existen otros factores que ejercen influencia sobre la viscosidad tales como, la morfología o la ramificación del micelio, la rigidez de la hifas. Además dichos autores reportaron que la morfología influye considerablemente sobre la reología y que el índice de consistencia se incrementa de manera no lineal conforme aumenta la biomasa, siendo el incremento mucho más significativo con la forma filamentososa que con la forma de "pellets".

Gavrilescu *et al.* (1992) reportaron que en los medios de cultivo con altas concentraciones iniciales de almidón, tales como los usados para *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus*, el índice de consistencia es mayor al principio del proceso y el medio es fuertemente pseudoplástico. Pero a medida que transcurre la fermentación, los microorganismos hidrolizan el almidón y entonces el índice de consistencia decrece hasta alrededor de las 30 horas de edad del cultivo. De aquí en adelante se desarrolla una estructura de red del micelio con lo que comienza a

incrementarse la viscosidad y la pseudoplasticidad, hasta alrededor de las 60 - 80 horas. A partir de ese momento, la viscosidad decrece debido a cambios morfológicos y estructurales. También reportaron que el índice de flujo, generalmente tiene un valor por debajo de 0.5 después de las 30 horas.

## 2.2. Consumo de potencia en tanques agitados con fluidos viscosos

Para comprender mejor lo que sucede con el consumo de potencia en medios de reología compleja (como los caldos miceliales), es necesario entender que pasa en otros fluidos viscosos. Por esta razón se presenta una revisión de las publicaciones que tratan del consumo de potencia en fluidos viscosos.

En tanques mecánicamente agitados, tanto los patrones de flujo, como el mezclado están fuertemente influenciados por la reología del fluido. Al aumentar la viscosidad decrece la capacidad de bombeo de los impulsores (Margaritis y Pace, 1985) y cuando estos fluidos poseen punto de cedencia, aumenta la tendencia hacia la formación de zonas muertas (Solomon *et al.* 1981).

Oliver *et al.*, (1984) encontraron que con fluidos Boger (fluidos Boger = fluidos elásticos que presentan viscosidad constante) y utilizando una turbina Rushton se obtienen bajos números de potencia a bajas velocidades de agitación. Esto se atribuye a que existen cambios en los patrones de flujo debido a que la elasticidad inhibe a las fuerzas centrífugas. Oliver *et al.*, (1984) también observaron un incremento rápido de la potencia a números de Reynolds moderados, lo cual coincide con la aparición del efecto Weissenberg, que es el momento en el cual las fuerzas elásticas dominan a los patrones de flujo. Ellos también observaron que con fluidos de Boger de baja viscosidad y bajo condiciones aireadas se observa una caída drástica en la potencia, dando origen a un mínimo en la curva de número de potencia *versus* número de Reynolds, lo cual puede deberse a la formación de grandes cavidades de aire detrás de las paletas de la turbina Rushton.

Prud'homme y Shaqfeh (1984) reportaron que se requiere considerablemente mayor potencia para mezclar un fluido elástico que para mezclar un fluido Newtoniano (inelástico) de la misma viscosidad. Nienow y Ulbrech (1985) reportaron que con fluidos viscosos se forman cavidades de aire detrás de las paletas del impulsor, cuya forma depende de si el fluido es o no viscoelástico, del número de Froude y del número de Reynolds. Si los fluidos son Newtonianos o pseudoplásticos (ambos sin elasticidad), las formas de las cavidades son similares a las observadas en fluidos de baja viscosidad. Si el fluido es inelástico pero tiene punto de cedencia, el

comportamiento bajo las mismas condiciones de aireación es similar al observado con otros fluidos pseudoplásticos e inelásticos, con la diferencia de que una vez que se han formado las cavidades detrás de las paletas del impulsor, estas permanecen aún después de que el impulsor se ha detenido. El volumen de las cavidades de aire que permanecen pegadas en las paletas del impulsor depende de la magnitud del punto de cedencia. Este comportamiento puede ser observado en Carbopol y también ocurre con goma xantana. Cuando el líquido es elástico, las cavidades son considerablemente mayores. Nienow y Ulbrecht (1985) reportan que con turbinas Rushton las cavidades de aire se empiezan a formar a números de Froude de alrededor de 0.1. Inicialmente solo se forman en la parte superior de las paletas del impulsor y solo producen una ligera disminución en el consumo de potencia. Conforme aumenta la velocidad del impulsor se generan cavidades más grandes y estables. La capacidad de bombeo de los impulsores se ve disminuida a medida que se incrementan la viscoelasticidad, el punto de cedencia o la pseudoplasticidad.

Nienow y Elson (1988) reportaron que bajo condiciones no aireadas, en el régimen laminar, a  $Re < 30$  en el que se observa una pendiente de -1, en gráficos de  $Po$  versus  $Re$ , los valores de  $Po$  para fluidos viscoelásticos son mayores hasta en un 60 % comparados con los valores de  $Po$  de fluidos Newtonianos y fluidos pseudoplásticos inelásticos en esta zona de Reynolds. En el régimen laminar tiende a ocurrir flujo reverso con las soluciones altamente viscoelásticas, por lo que se puede suponer que se requiere de potencia extra para contrarrestar las fuerzas elásticas inducidas en un fluido viscoelástico.

Nienow y Elson (1988) también encontraron que en la región de transición  $30 \leq Re \leq 1000$ , las curvas de potencia de los fluidos pseudoplásticos inelásticos se desvían hacia abajo de la curva Newtoniana. Para  $50 < Re \leq 1000$ , los valores de  $Po$  para los fluidos viscoelásticos son considerablemente menores que los hallados para fluidos inelásticos. El máximo valor de  $Re$  al cual ocurre flujo reverso en los fluidos por ellos estudiados es 50. Es posible que una vez que las fuerzas inerciales dominan, haya una tendencia a reducir la resistencia al flujo en los fluidos inelásticos con lo que se obtiene una reducción en los valores de  $Po$ .

Comparando la potencia consumida por un fluido de Boger (jarabe de maíz con 0.05% de poli-acrilamida de  $\sim 1$  Pa-s ) con la consumida por un fluido Newtoniano (jarabe de maíz), cada uno de viscosidad constante idéntica, pero el primero altamente viscoelástico, Nienow y Elson (1988), encontraron que la relación entre el número de potencia y la viscoelasticidad, es muy compleja, ya que los valores de  $Po$  pueden ser mayores o menores en los fluidos viscoelásticos, comparados con los hallados para fluidos inelásticos, en el mismo intervalo de  $Re$ . Las

diferencias también dependen del tipo de impulsor, obteniéndose un incremento considerable de  $P_o$  con los impulsores interMIG, aún en la región de transición. La viscoelasticidad puede provocar un incremento o un decremento de la potencia consumida. Este efecto puede ser predicho hasta cierto punto, tomando en cuenta los patrones de flujo, que son dependientes de: 1) tipo de impulsor y la relación  $D/T$ , 2) las propiedades reológicas del fluido, y 3) la escala de operación (Nienow y Elson, 1988).

Nienow y Elson (1988) publicaron que la principal diferencia con la dispersión de gas en fluidos de elevada viscosidad comparados con los de viscosidad baja, son las cavidades de aire más grandes y más estables que se forman detrás de las paletas del impulsor, casi independientemente del flujo de aire. Como consecuencia, con los fluidos viscosos se presentan mayores caídas de potencia que con los fluidos de baja viscosidad, a velocidades de agitación similares. El tamaño y la estabilidad de las cavidades de aire se incrementan con la viscoelasticidad. Así, por ejemplo, en los fluidos de Boger aun cuando se interrumpa la aireación, las cavidades de aire permanecen pegadas detrás de las paletas del impulsor. Debido a la insensibilidad al nivel de aireación, la potencia consumida por el impulsor superior, en sistemas de impulsores duales, es similar a la consumida por el impulsor inferior. Por el contrario, en fluidos de baja viscosidad el impulsor inferior consume menos potencia que el superior, en condiciones aireadas.

Galindo *et al.* (1988) reportaron que para caldos simulados de goma xantana, a mayor concentración del polímero, más significativa es la caída de la potencia por efecto de la aireación. Conforme se incrementan la viscosidad, la viscoelasticidad y el punto de cedencia, disminuye el efecto de la aireación sobre los números de potencia. También reportaron que se obtienen  $(P_{o_g}/P_o)_{\min}$  más bajos entre más alta es la concentración de goma.

Torrestiana *et al.* (1991) mencionan que las curvas de potencia sin aireación, para goma xantana, en el régimen transiente ( $50 < Re < 1000$ ) presentan un valor mínimo que es considerablemente menor al encontrado en fluidos Newtonianos e inelásticos o en fluidos pseudoplásticos. Además ellos reportan que las caídas drásticas en el consumo de potencia son debidas a la formación de cavidades de aire, estables, detrás de las paletas del impulsor y que tanto el punto de cedencia como la viscoelasticidad incrementan la estabilidad de dichas cavidades.

Özcan *et al.* (1988 y 1990) reportaron que para fluidos Newtonianos viscosos, bajo condiciones aireadas, la potencia cae hasta alcanzar un mínimo, lo cual coincide con la formación de las cavidades de aire que crecen hasta alcanzar un tamaño máximo, ( $Re < 400$ ), siendo las caídas en la potencia independientes del nivel de aireación, a partir de ese número de Reynolds. A números

de Froude inferiores a 0.04 no se forman cavidades de aire o son despreciables, por lo que no existe ningún efecto de la aireación sobre el consumo de potencia en esta zona. Además, reportaron que a números de Reynolds superiores a 400 sí existe influencia del nivel de aireación sobre el consumo de potencia. También reportaron que para Reynolds superiores a 380, el consumo de potencia es más bajo cuando se opera en condiciones de flujo de aire decreciente que cuando la velocidad de aireación es creciente.

Özcan y Nienow (1991) encontraron que el consumo de potencia, bajo condiciones no gaseadas, es notablemente mayor con fluidos elásticos que con fluidos inelásticos (glicerol), cuando se utiliza una turbina Rushton, y que el efecto es mucho más drástico cuando se utilizan impulsores interMIG. Bajo condiciones aireadas se observa una caída en la potencia, la cual está determinada por la velocidad del impulsor y no por el flujo de aire suministrado, en el rango de números de Reynolds de 50-1000. También reportaron que bajo condiciones aireadas se obtienen números de potencia mayores con los fluidos elásticos, independientemente del nivel de elasticidad (estudiaron fluidos de baja elasticidad, en los que no se produce flujo reverso). Özcan y Nienow (1991), además hallaron que en fluidos viscoelásticos (comparados con fluidos inelásticos) existe un incremento en el consumo de potencia, bajo condiciones aireadas, el cual es más pronunciado con impulsores duales (2 turbinas Rushton) que con un solo impulsor. Con los impulsores interMIG se obtienen incrementos de potencia gaseada de hasta 180 % con los fluidos elásticos respecto a la potencia consumida en fluidos inelásticos.

### **2.3. Mezclado de caldos miceliales o caldos simulados**

Un hecho importante en las fermentaciones con organismos filamentosos, es la variación de las propiedades reológicas del caldo en función del tiempo de fermentación, debido principalmente al incremento de la masa celular y al cambio en la morfología de las hifas. Todo esto puede traer como consecuencia problemas en el mezclado, lo cual redundará en la generación de zonas muertas o mal mezcladas, en la formación de gradientes de concentración de nutrientes o de metabolitos y zonas con muy bajas tensiones de oxígeno. Se sabe (Tuffile y Pinho, 1970) que a medida que aumenta la viscosidad, el coeficiente de transferencia de oxígeno decrece exponencialmente.

La mayoría de los estudios de mezclado de caldos de fermentación se han llevado a cabo usando fluidos modelo. Esto se debe principalmente a la dificultad de realizar estudios de mezclado durante los procesos de fermentación, a la inestabilidad de los mismos para utilizarlos en tanques abiertos de mezclado durante un período razonable de tiempo y a la escasa disponibilidad de caldos industriales. Por ejemplo, para simular los caldos de fermentación para la producción de

biopolímeros, el uso de productos comerciales o de caldos reconstituidos es una práctica común (Galindo *et al.*, 1988; Galindo *et al.*, 1989 y Sánchez *et al.*, 1992).

El conocimiento de la energía suministrada por el sistema de agitación a fluidos de fermentación es de fundamental importancia (Calderbank y Moo-Young, 1959). Los estudios de mezclado para caldos de fermentación conteniendo organismos miceliales son muy escasos en la literatura. Es probable que esto se deba en gran parte a su baja estabilidad fuera del bioreactor y a que no es posible llevar a cabo mediciones precisas del consumo de potencia en fermentadores de laboratorio. En consecuencia, muchos investigadores han recurrido al uso de fluidos modelo (Baker *et al.*, 1988; Allen y Robinson, 1991; Cooke y Middleton, 1988) para tratar de simular el comportamiento reológico de los caldos reales. Baker *et al.* (1988) emplearon suspensiones de fibras de alginato de sodio conteniendo células inmovilizadas de *Pseudomonas putida* con el fin de simular el comportamiento de un caldo micelial de *Aspergillus foetidus*. Estos autores encontraron que ambas suspensiones presentaron comportamiento pseudoplástico. Sin embargo, reportaron que la suspensión micelial es más pseudoplástica que la suspensión de fibras de alginato. También observaron que en el intervalo de números de Reynolds de 20 a 200, los valores del número de potencia son menores para el caldo micelial que para la suspensión de fibras. Es importante resaltar que las fibras son lineales mientras que los micelios presentan ramificaciones, lo cual puede ser un factor importante que podría explicar la diferencia en el comportamiento.

Por otro lado, Cooke y Middleton (1988) realizaron estudios de mezclado empleando una suspensión de fibra de papel para simular el comportamiento reológico de un caldo de *Streptomyces avermitilis*. Al igual que Baker y colaboradores (1988), encontraron que la suspensión micelial es más adelgazante que la suspensión de fibra de papel. Estos autores reportaron que la suspensión de fibras se ajustó bien al modelo reológico de Bingham mientras que el caldo de *S. avermitilis* se ajustó mejor al modelo de la ley de la potencia.

Allen y Robinson (1991) emplearon soluciones de polímero para simular el comportamiento de caldos miceliales de *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Streptomyces levoris*. Reportaron que, en términos de consumo de potencia y en el régimen laminar, los fluidos modelo homogéneos (como las soluciones de polímeros) no pueden simular adecuadamente el comportamiento de las suspensiones miceliales. En el trabajo de Reuss (1980) se reportan conclusiones similares. Por otro lado, Allen y Robinson (1991) encontraron que, empleando un impulsor de turbina, la potencia consumida para el mezclado de los fluidos modelo (solución de polímero) es menor que la potencia consumida para el mezclado de los caldos miceliales. Se debe

resaltar que estos autores sólo analizaron el rango de números de Reynolds de la región laminar y emplearon recipientes muy pequeños (51 mm de diámetro).

De lo anterior se desprende que el uso de fluidos modelo, ya sean soluciones de polímeros o biopolímeros o suspensiones de fibras, no simulan de una manera totalmente satisfactoria las propiedades de caldos de fermentación miceliales. Nienow (1990), ha revisado el potencial de nuevos diseños de impulsores en las fermentaciones miceliales; sin embargo, la mayor parte de los estudios de caracterización de impulsores novedosos se han llevado a cabo con soluciones modelo.

En suma, es evidente que los reportes referentes a reología y mezclado de caldos con microorganismos filamentosos son muy escasos y mayormente se ha trabajado con caldos de fermentación obtenidos en el laboratorio o con micelios resuspendidos. Además, una buena parte de estos estudios se han realizado con microorganismos que crecen como aglomerados ("pellets"). Un buen número de los trabajos se han realizado con fluidos modelo. Es de resaltar también que los estudios reportados en la literatura se refieren a un solo impulsor, generalmente con relaciones geométricas estándar. Lo anterior indica claramente la necesidad de realizar estudios de mezclado empleando relaciones no estándar y con impulsores múltiples, que son las condiciones más comunes en las fermentaciones industriales con organismos miceliales o en la producción de biopolímeros. Adicionalmente existen muy pocos reportes en la literatura que se refieran al estudio de la reología y el consumo de potencia para el mezclado de caldos industriales de fermentaciones miceliales.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Evaluación del consumo de potencia para el mezclado y caracterización reológica de caldos industriales de fermentación, derivados de la producción de antibióticos por microorganismos filamentosos (actinomicetos).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- ◆ Evaluación de la reología de los caldos de fermentación en función de la edad de los cultivos.
- ◆ Evaluación del punto de cedencia de los caldos mediante una técnica basada en el uso de un dispositivo "vane", en función del tiempo de cultivo.
- ◆ Evaluación de la potencia consumida para el mezclado en un tanque agitado mecánicamente, empleando impulsores individuales e impulsores duales, con relaciones geométricas no estándar, bajo condiciones aireadas y no aireadas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Caldos de fermentación

#### 4.1.1. Caldos industriales

Para fines de investigación científica, los caldos de fermentación miceliales de origen industrial son difíciles de conseguir. Esto se debe a que existe la desconfianza por parte de las industrias de que estos sean empleados para aislar cepas. No obstante, cuando se logran obtener dichos caldos, normalmente los empresarios tienden a proporcionarlos con algún tipo de tratamiento previo para inactivar a los microorganismos. Dichos tratamientos producen cambios reológicos considerables en las muestras, por lo que ya no resultan adecuados para estudios de reología y mezclado.

En el caso del presente trabajo se contó con la ventaja de poder conseguir los caldos de fermentación sin ningún tratamiento. Los caldos fueron amablemente proporcionados por la industria FERMIC S. A. DE C. V., productora de antibióticos, la cual se encuentra ubicada en la Ciudad de México, D.F.

La industria FERMIC podía proporcionar caldos de fermentación de la producción industrial de antibióticos, tales como gentamicina, rifamicina, eritromicina, tetraciclina y oxitetraciclina los cuales son producidos por los microorganismos filamentosos *Micromonospora purpurea*, *Amycolatopsis mediterranei*, *Streptomyces eritreus*, *Streptomyces aureofaciens* y *Streptomyces rimosus*, respectivamente.

#### 4.1.2. Estabilidad reológica de los caldos

Es conocido que la gran mayoría de los caldos de fermentación miceliales son poco estables. Cuando se encuentran fuera del bioreactor, la mayoría de ellos son sensibles a la falta de oxígeno, produciéndose generalmente lisis celular. La lisis a su vez provoca cambios drásticos de las características reológicas de los fluidos. Por esto se decidió evaluar la estabilidad reológica, fuera del fermentador, de 4 de los 5 caldos disponibles.

Se muestrearon los lotes 2789 para la producción de eritromicina, 436 de elaboración de tetraciclina, 1108 y 1125 de gentamicina y de los lotes 433, 435 y 454 de rifamicina. La caracterización reológica se realizó al momento de tomar la muestra y después de ser transportados, en garrafas de 20 litros desde la planta en la Ciudad de México hasta la Ciudad de

Cuernavaca, Morelos (en un tiempo promedio de una hora y treinta minutos). Se utilizaron dichas muestras para un estudio de consumo de potencia durante aproximadamente 8 horas y se caracterizó nuevamente la reología.

Lo anterior permitió descartar los caldos de *S. eritreus* (producción de eritromicina) y *S. aureofaciens* (elaboración de tetraciclina), ya que estos sufren una lisis severa después de dos a tres horas de haberlos tomado del bioreactor, aun sin someterlos a los estudios de consumo de potencia.

Los caldos de *Micromonospora purpurea* (producción de gentamicina) y *Amycolatopsis mediterranei* (producción de rifamicina) son los que se seleccionaron para la realización del presente trabajo debido a que resultaron ser muy estables reológicamente.

### **4.1.3. Fermentaciones**

Las fermentaciones fueron llevadas a cabo por la empresa Fermic, S. A. en tanques agitados mecánicamente y con capacidad de 50 m<sup>3</sup>. Los cultivos de *M. purpurea* tienen una duración de 170-180 horas, en tanto que los de *A. mediterranei* pueden llegar a durar hasta 200 h. Durante el proceso se realizan algunas diluciones del caldo de fermentación, (agregando agua estéril a los bioreactores), con el objetivo de abatir la viscosidad del fluido. Durante la elaboración del lote 1125 de gentamicina y el 454 de rifamicina se realizaron dos diluciones a lo largo del proceso, en tanto que durante el lote 435 de rifamicina se realizaron tres diluciones. Se utilizó un medio de cultivo complejo, el cual contiene principalmente harinas y aceite de soya, con lo cual se obtiene un fluido viscoso desde el inicio del proceso. Las temperaturas de las fermentaciones son de 34° C para *M. purpurea* y de 28° C para *A. mediterranei*.

## **4.2 Determinación de la biomasa y la densidad**

### **4.2.1. Determinación de la biomasa en base húmeda**

Se llevó a cabo una estimación de la biomasa cada 24 horas determinando el porcentaje en volumen de sólidos de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. En tubos cónicos calibrados de 50 mL se colocan 40 mL de los caldos.
2. Se centrifugan durante 10 minutos a 3500 r.p.m. (2130 g).
3. El porcentaje de sólidos húmedos se determina mediante la relación:

$$\% \text{ de sólidos húmedos} = \frac{V_s}{V_c} 100 \quad (4.1)$$

donde:

$V_s$  = Volumen de sólidos húmedos [ mL ]

$V_c$  = Volumen de caldo [ mL ]

#### 4.2.2. Determinación de la densidad

La densidad de los fluidos se determinó por dos métodos:

A. Las densidades de los fluidos fueron determinadas a las temperaturas a las que se realizaron los experimentos, utilizando un picnómetro para fluidos de alta viscosidad y con una balanza analítica (Ohaus, BRAINWEIGH B5000), mediante el siguiente procedimiento:

1. Se seca el picnómetro.
2. Se llena el picnómetro con un volumen conocido de agua (a la misma temperatura que los fluidos) y se pesa.
3. Se vacfa el picnómetro, se seca muy bien y se llena (evitando que queden burbujas) con el fluido (a la temperatura deseada) cuya densidad se desea conocer y se pesa.
4. La densidad del líquido problema se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\rho_f = \frac{W_f}{W_a} \rho_a \quad (4.2)$$

Donde:

$\rho$  = Densidad del fluido [ kg·m ]

$\rho_a$  = Densidad del agua [ kg·m ]

$W_f$  = Peso del fluido [ kg ]

$W_a$  = Peso del agua [ kg ]

B. La densidad se determinó mediante un densímetro de bulbo en una probeta de 500 mL.

1. Se llena la probeta hasta un volumen de 450 mL.

2. Se sumerge el densímetro en la probeta y se hace girar ligeramente por el centro de la probeta. Cuando se estabiliza se toma la lectura en la escala del densímetro.

#### 4.3. Equipo para medición de consumo de potencia e impulsores utilizados

Las determinaciones de potencia fueron realizadas en un tanque agitado mecánicamente de 10 litros de volumen de operación, abierto a la atmósfera ( figura 4.1 ), montado sobre un dinamómetro de cojinete neumático, cuya descripción detallada ha sido reportada por Reséndiz y colaboradores (1991).

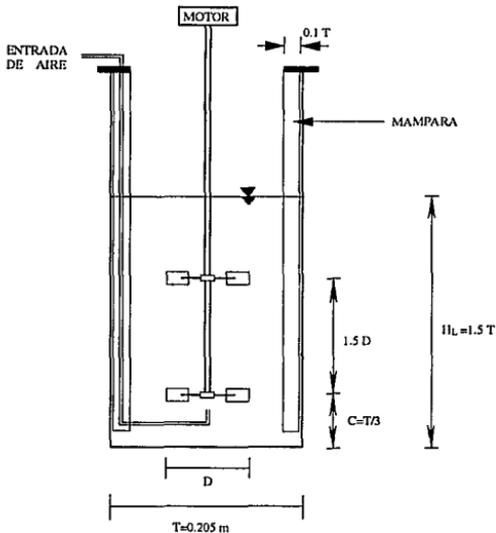


Figura 4.1. Dimensiones del tanque de mezclado

El tanque de mezclado está equipado con 4 mamparas de un décimo del diámetro del tanque. Sobre la flecha se pueden montar uno, dos o tres impulsores. La velocidad de rotación de la flecha es medida con un rotopulsador (Dynapar QUBE modelo 31/32) y un tacómetro (Dynapar modelo MAX JR Tach 1). Se usó un difusor de orificio para suministrar aire a flujos de 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 vvm (volumen de aire/volumen de líquido/minuto). La medición del flujo de aire se llevó a cabo con un medidor de flujo másico (Brooks, modelo 5876A1B1).

Con los caldos de *M. purpurea* se usaron las siguientes combinaciones con dos impulsores: dos turbinas Rushton (TR-TR), una turbina Rushton junto con una turbina de paletas inclinadas a 45° bombeando hacia arriba (TR-TPI), e impulsor interMIG bifurcado junto con una turbina Rushton (TR-IM) siendo en todos los casos la turbina Rushton el impulsor inferior porque se sabe que funciona muy bien para dispersar el aire suministrado al tanque. Con los caldos de *A. mediterranei* se utilizaron turbina Rushton, turbina de paletas inclinadas a 45°, bombeando hacia arriba y combinaciones de estos (TR-TR y TR-TPI). Se utilizaron estos impulsores por sugerencias hechas por la industria Fermic, ya que ellos han utilizado estos impulsores con buenos resultados. Las dimensiones de los impulsores se muestran en la figura 4.2 y las configuraciones de impulsores utilizados se presentan en la figura 4.3. La velocidad de agitación para el estudio de consumo de potencia se varió de 75 a 450 r.p.m. para los caldos de *M. purpurea* y de 75 a 600 r.p.m. para los caldos de *A. mediterranei*.

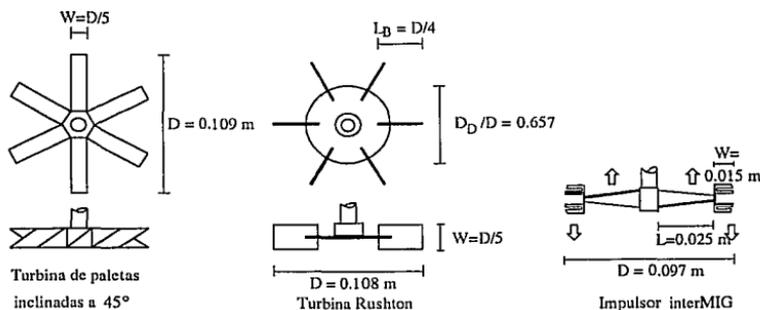
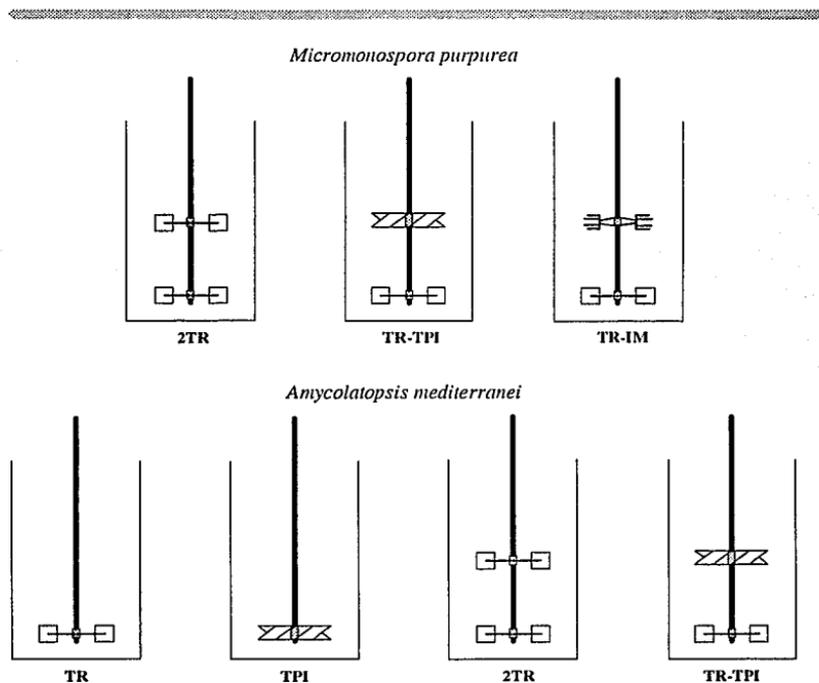


Figura 4.2. Dimensiones de los impulsores



**Figura 4.3.** Configuraciones de los impulsores

#### 4.4. Cálculo de la potencia suministrada

La determinación del consumo de potencia se llevó a cabo en base a la fuerza medida en el dinamómetro, aplicando las siguientes ecuaciones:

$$P = M \cdot \omega \quad (4.3)$$

donde:

P = potencia [ watts ]

$M$  = Torque [ N·m ]

$\omega$  = Velocidad angular [ s<sup>-1</sup> ]

$$M = F \cdot B \quad (4.4)$$

donde:

$F$  = Fuerza [ N ]

$B$  = Brazo de palanca [ m ]

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot N \quad (4.5)$$

$N$  = Velocidad del impulsor [ s<sup>-1</sup> ]

El número de potencia ( $Po$ ) y el número de Reynolds modificado están dados por las siguientes ecuaciones:

$$Po = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5} \quad (4.6)$$

donde:

$Po$  = Número de potencia [ adimensional ]

$\rho$  = Densidad del caldo [ kg·m<sup>-3</sup> ]

$D$  = Diámetro del impulsor [ m ]

$$Re = \frac{\rho \cdot D^2 \cdot N^{2-n}}{K \cdot k_s^{(n-1)}} \quad (4.7)$$

donde:

$Re$  = Número de Reynolds para fluidos no-Newtonianos [ adimensional ]

$n$  = Índice de flujo del la ley de la potencia (  $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$  ) [ adimensional ]

$K$  = Índice de consistencia del modelo de la ley de la potencia [ adimensional ]

$k_s$  = Constante de Metzner y Otto

#### 4.5. Determinación del punto de cedencia ( $\tau_y$ )

El punto de cedencia ( $\tau_y$ ) se determinó por dos técnicas directas:

##### A. Método del "vane"

Se siguió el método propuesto por Dzuy y Boger (1983) para suspensiones en el cual se utiliza un dispositivo "vane". Esta técnica fue utilizada exitosamente por Leong-Poi y Allen (1992) para la caracterización del punto de cedencia de caldos de fermentación de microorganismos miceliales (*A. niger*). El "vane" es un pequeño impulsor de paletas planas con una relación elevada de altura/diámetro ( $Hv/Dv = 1.73$ ), como se muestra en la figura 4.4. Este dispositivo, que fue construido *exprofeso*, se conectó al sistema de medición de torque de un viscosímetro Brookfield HBTDV-I.

##### Procedimiento

Se sumerge el "vane" en el recipiente que contiene la muestra y se pone a girar el motor del viscosímetro Brookfield a velocidades que van desde 0.5 hasta 20 r.p.m. Se toma la lectura de torque máximo (figura 4.5 y figura I.15 del anexo I) registrado por el aparato y se calcula  $\tau_y$  de acuerdo a la siguiente ecuación (Dzuy y Boger, 1983):

$$\tau_y = \frac{Mm}{Kv} \quad (4.8)$$

donde:

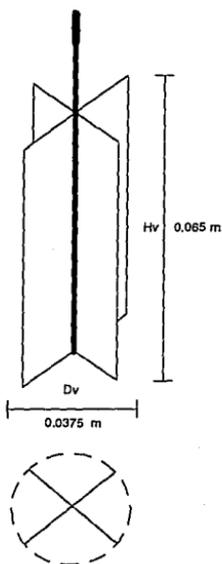
$\tau_y$  = Punto de cedencia [ Pa ]

Mm = Torque máximo (=  $Cv \cdot La/100$ ) [ N·m ]

La = Lectura máxima del aparato [% del torque total del equipo]

Cv = Constante del viscosímetro ( $5.7496 \times 10^{-3}$ ) [ N·m ]

Kv = Constante del "vane" ( $Kv = 171.2 \times 10^{-6} \text{ m}^3$ ), calculada de acuerdo a la ecuación propuesta por Dzuy y Boger (1983):



**Figura 4.4.** Dimensiones del dispositivo "vane"

$$K_v = \frac{1}{2} \pi \cdot D_v^3 \left( \frac{H_v}{D_v} + \frac{1}{3} \right) \quad (4.9)$$

donde:

$D_v$  = Diámetro del "vane"

$H_v$  = Altura del "vane"

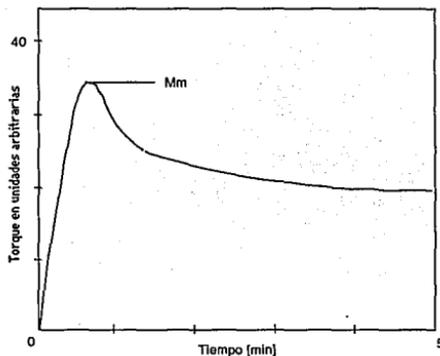


Figura 4.5. Curva típica generada con el dispositivo "vane"

## B. Método de relajación

Se utilizó un método de relajación (Hannote *et al*, 1991), el cual consiste en hacer girar la aguja del viscosímetro dentro de la muestra y, una vez que la lectura se ha estabilizado, se procede a apagar el motor del viscosímetro. Después de 5 minutos se toma la lectura residual marcada por el viscosímetro y se calcula  $\tau_y$  de la siguiente ecuación (Hannote *et al*, 1991):

$$\tau_y = \left( \frac{Lr}{100} \right) \cdot \left( \frac{Cv}{2 \cdot \pi \cdot R^2 \cdot L} \right) \quad (4.10)$$

donde:

Lr = Lectura residual del aparato [ adimensional ]

Cv = Constante del viscosímetro ( $5.7496 \times 10^{-3}$ ) [ N·m ]

R = Radio de la aguja [ m ]

L = Longitud efectiva de la aguja [ m ]

#### 4.6. Cálculo de los parámetros reológicos mediante el uso del dispositivo "vane"

Con el objeto de evitar los efectos causados por la pared del recipiente (Dzuy & Boger, 1983), el "vane" debe ser sumergido en un recipiente cilíndrico cuyo diámetro interior y profundidad deben ser de al menos el doble del diámetro y de la altura del impulsor, respectivamente.

Se utilizó la relación de Metzner y Otto (1957) para calcular la velocidad de deformación promedio generada con el dispositivo "vane":

$$\bar{\gamma} = k_s \cdot N \quad (4.11)$$

donde:

$\bar{\gamma}$  = Velocidad de deformación promedio [  $s^{-1}$  ]

$k_s$  = Constante de Metzner y Otto, calculada de acuerdo al procedimiento reportado por Boongenar *et al.* (1973):

$N$  = Velocidad del impulsor [  $s^{-1}$  ]

$$k_s = \left( \frac{2 \cdot \pi \cdot A}{c \cdot K \cdot Dv^3} \right)^{\left( \frac{1}{n-1} \right)} \quad (4.12)$$

donde:

$A$  = Constante (ver adelante)

$c$  = Constante dependiente de la geometría del sistema [ adimensional ]

$K$  = Índice de consistencia de la ley de potencia (  $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$  )

$Dv$  = Diámetro del "vane" [ m ]

para números de Reynolds menores que 10 y para un fluido Newtoniano se tiene que (Rushton *et al.*, 1950):

$$Po = \frac{c}{Re} \quad (4.13)$$

donde:

Po = Número de potencia [ adimensional ]

Re = Número de Reynolds [ adimensional ]

de un gráfico logarítmico del número de potencia (Po) *versus* número de Reynolds en régimen laminar ( $Re < 10$ ), y utilizando un fluido Newtoniano, se calcula c a partir del valor de la ordenada al origen. De acuerdo a Metzner y Otto (1957), la variable A se calcula de la siguiente relación:

$$M = A \cdot N^n \quad (4.14)$$

donde:

M = Torque (=Lectura·Cv/100) [ N·m ]

Lectura = Lectura del viscosímetro [ adimensional ]

Cv = Constante del viscosímetro ( $5.7496 \times 10^{-3}$ ) [ N·m ]

en la región de flujo laminar y con un fluido no-Newtoniano, se obtiene A mediante un análisis de regresión logarítmica de M *versus* N. Como fluido de calibración Newtoniano se usó aceite de transmisión Vecdol SAE-250 con una viscosidad de 3.7 Pa·s y densidad de  $0.9236 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$  a 25° C y como fluido no-Newtoniano se utilizaron los caldos de *Micromonospora* y de *Amycolatopsis* de diferentes edades. Los valores de n y K fueron obtenidos utilizando el viscosímetro de aguja y la ley de la potencia ( $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$ ) mediante un gráfico de  $\text{Log } \tau$  en función del  $\text{Log } \dot{\gamma}$ , donde n es la pendiente y K es el antilogaritmo de la ordenada al origen. El valor obtenido de  $k_s$  para el dispositivo "vane" fue de  $\approx 8.7$  con los dos fluidos.

El valor de  $\bar{\tau}$  se obtiene mediante las siguientes ecuaciones (Kemblowski y Kristiansen, 1986):

$$\bar{\tau} = \frac{2\pi \cdot k_s \cdot M}{c \cdot Dv^3} \quad (4.15)$$

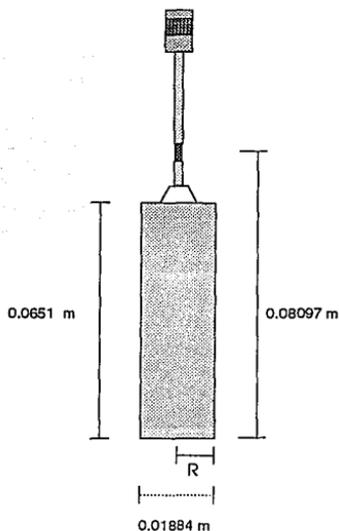
donde:

$\bar{\tau}$  = Esfuerzo cortante promedio [ Pa ]

Los datos fueron ajustados al modelo reológico de la ley de la potencia. Los parámetros reológicos se determinaron de un análisis de regresión lineal de  $\log \bar{\tau}$  *versus*  $\log \dot{\gamma}$ , donde n es la pendiente y K es el antilogaritmo de la ordenada al origen.

#### 4.7. Cálculo de los parámetros reológicos a partir de determinaciones en el viscosímetro Brookfield HBTDV-I con la aguja número 1

Las propiedades reológicas de los caldos fueron estimadas de mediciones con el viscosímetro Brookfield usando la aguja número 1 (figura 4.6), la cual tiene un longitud efectiva ( $L$ ) de 0.07493 m y un radio efectivo ( $R$ ) de 0.009421 m.



**Figura 4.6.** Dimensiones de la aguja número 1 del viscosímetro Brookfield LVT

Aunque es bien conocido que el viscosímetro Brookfield fue diseñado para fluidos Newtonianos, se puede aplicar a fluidos no-Newtonianos si se ajustan los datos al modelo de la ley de la potencia y si se considera que la aguja gira en un medio de radio semi-infinito. Para este caso, se puede calcular la velocidad de deformación en la pared del cilindro rotante (Hannote *et al*, 1991). Ajustando estadísticamente los datos primarios del Brookfield a la ley de la potencia, los

parámetros reológicos  $n$  y  $K$  se calculan mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar el esfuerzo de corte se calcula de acuerdo a (Brookfield, no fechado):

$$\tau = \left( \frac{\text{Lectura}}{100} \right) \cdot \left( \frac{Cv}{2\pi \cdot R^2 \cdot L} \right) \quad (4.16)$$

donde:

$\tau$  = Esfuerzo de corte [ Pa ]

Lectura = Lectura del viscosímetro [ adimensional ]

$Cv$  = Constante del viscosímetro ( $5.7496 \times 10^{-3}$ ) [ N·m ]

$R$  = Radio de la aguja [ m ]

$L$  = Longitud efectiva de la aguja [ m ]

el gradiente de deformación (Skelland, 1967) y la ley de la potencia están dados por:

$$\dot{\gamma} = \frac{2 \cdot \omega}{n} \quad (4.17)$$

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (4.18)$$

donde:

$\dot{\gamma}$  = Rapidez de deformación [ s ]

$\omega$  = Velocidad angular (=  $2 \cdot \tau \cdot N$ ) [  $s^{-1}$  ]

$K$  = Índice de consistencia [  $Pa \cdot s^n$  ]

$n$  = Índice de flujo [ adimensional ]

sustituyendo la ecuación 4.17 en la 4.18 y reordenando:

$$\tau = K \left( \frac{2}{n} \right)^n \cdot \omega^n \quad (4.19)$$

de un análisis de regresión logarítmica de  $\tau$  versus  $\omega$  se calcula  $n$  y  $K$ . Finalmente la viscosidad aparente es:

$$\eta = \frac{\bar{\tau}}{\bar{\dot{\gamma}}} \quad (4.20)$$

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

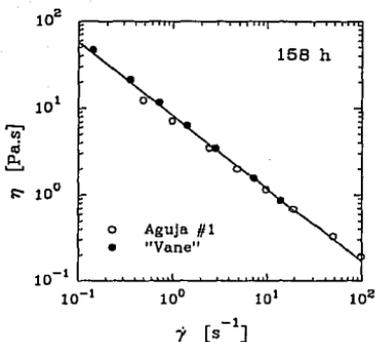
### 5.1. Reología evaluada mediante dos sistemas: viscosímetro Brookfield con aguja #1 y con el "vane" (lote 454)

Cuando se utilizan viscosímetros convencionales en la caracterización reológica de los caldos de fermentación miceliales se pueden presentar problemas de separación de fases y/o destrucción de los agregados celulares (Charles, 1978). Con el propósito de conocer si con los caldos aquí estudiados se presentaban problemas de este tipo, se decidió evaluar dos sistemas de geometrías diferentes para la caracterización reológica de los caldos, 1) viscosímetro Brookfield con un dispositivo "vane" y 2) viscosímetro Brookfield con una aguja cilíndrica.

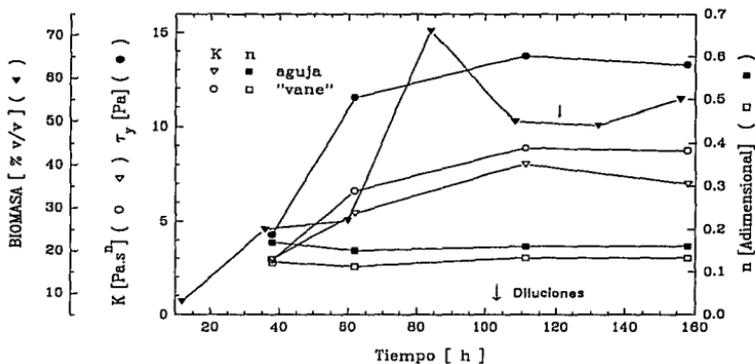
En la figura 5.1 se muestran los reogramas, para el caldo de *Amycolatopsis mediterranei* (lote 454), obtenidos mediante los dos sistemas de medición. Como se puede apreciar no existen diferencias importantes en los resultados obtenidos con ambos sistemas, ya que la viscosidad aparente obtenida a la misma velocidad de deformación es prácticamente idéntica.

Las fermentaciones no fueron totalmente reproducibles y mostraron diferencias considerables en cuanto a sus características reológicas. En teoría el medio de cultivo fue el mismo, sin embargo, las harinas que se adicionan pueden variar su composición de un lote a otro, provocando cambios en la cinética de la fermentación. En la figura 5.2 se presenta la evolución de los parámetros reológicos para el lote 454 y se puede apreciar que las curvas de  $K$  y  $\tau_y$  presentan tendencias similares a las observadas para el lote 435 (figura 5.20), sin embargo, los valores de dichos parámetros son menores en este último lote. Por otra parte, los valores del índice de flujo ( $n$ ) fueron muy similares. En este lote de fermentación únicamente se realizó una adición de agua en vista de que las viscosidades en el transcurso del proceso fueron más bajas (datos obtenidos de la empresa FERMIC, S. A.).

Los parámetros reológicos generados con el dispositivo "vane" son ligeramente diferentes a los obtenidos mediante el sistema de aguja. Como se puede ver en la figura 5.2, aún cuando las viscosidades aparentes obtenidas con ambos sistemas son prácticamente las mismas en el rango analizado, existe una ligera diferencia en la pendiente de los reogramas. Por este motivo, los valores de  $n$  obtenidos con el "vane" son ligeramente inferiores a los obtenidos usando la aguja No. 1, y los valores de  $K$  obtenidos con el "vane" fueron ligeramente mayores a los generados mediante la aguja #1.



**Figura 5.1.** Reogramas del lote 454 de la producción de rifamicina, generados mediante el viscosímetro de aguja (símbolos vacíos) y con el dispositivo "vane" (símbolos llenos).



**Figura 5.2.** Comportamiento de los parámetros reológicos obtenidos con el dispositivo "vane" y con la aguja #1 con respecto al tiempo de fermentación. Lote 454.

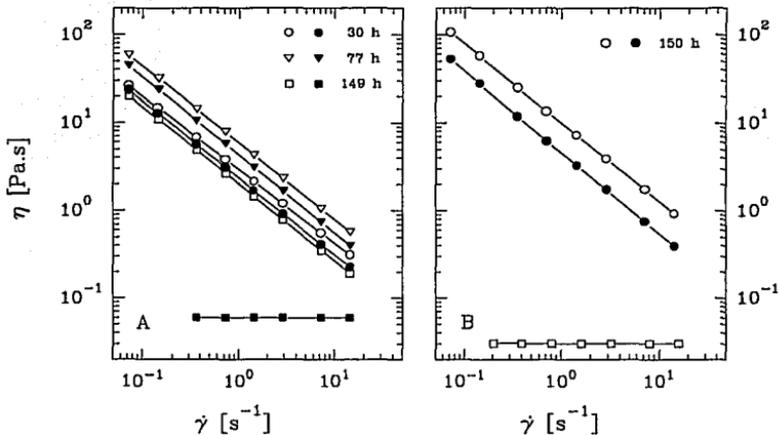
## 5.2. Estabilidad reológica de los caldos.

Uno de los principales problemas para realizar estudios de reología con caldos de fermentación miceliales es la baja estabilidad de éstos. La baja estabilidad se debe principalmente a la alta sensibilidad de algunos cultivos de microorganismos filamentosos a la falta de un nivel adecuado de oxígeno para mantener su integridad (lo cual ocurre cuando son retirados del bioreactor para evaluar su reología o realizar estudios de mezclado). Esto a su vez provoca cambios drásticos en las características reológicas de los caldos. Por tales motivos, primeramente se tomó una muestra de 4 de los 5 caldos disponibles, para evaluar su estabilidad reológica fuera del fermentador. Los cultivos evaluados fueron de *Streptomyces eritreus*, *Streptomyces aureofaciens*, *Micromonospora purpurea* y *Amycolatopsis mediterranei*.

Como se muestra en las figuras 5.3 y 5.4, los caldos de *S. eritreus* (producción de eritromicina) y *S. aureofaciens* (elaboración de tetraciclina) sufren lisis después de dos a tres horas de haberlos retirado del bioreactor, (aún sin someterlos a los estudios de consumo de potencia (las micrografías de *S. aureofaciens* son muy parecidas a las de *S. eritreus*). Cuando estos caldos fueron sometidos a experimentos de mezclado, la reología de éstos cambió totalmente, pasando de ser fluidos pseudoplásticos a ser Newtonianos con viscosidades muy bajas (15 a 50 mPa-s). Además, se observó que estos caldos son muy susceptibles de contaminarse, ya que aparecieron colonias grandes de diferentes microorganismos en la superficie del caldo (3-4 h después de retirarlos del fermentador), debido a que los antibióticos que producen no son de amplio espectro y a que los caldos de fermentación son medios de cultivo ricos. Por tales motivos, los caldos de *Streptomyces eritreus* y *Streptomyces aureofaciens* no resultaron adecuados para investigaciones de reología y mezclado.

Según informes obtenidos en la planta FERMIC, la inestabilidad de estos caldos es debida a la sensibilidad del micelio a la disminución y/o agotamiento del oxígeno disuelto. Puesto que no fue posible airearlos durante el transporte y a que se requería de la determinación de consumo de potencia sin aireación, estos caldos resultaron inadecuados para este tipo de estudios.

Por otro lado las suspensiones de *M. purpurea* fueron muy estables. No se presentó separación de fases durante el tiempo en que se llevaron a cabo las mediciones reológicas o aún dejándolas en reposo por espacios de tiempo prolongados (alrededor de 2 h o más), siendo las determinaciones reológicas muy reproducibles.



**Figura 5.3.** Estabilidad reológica de los caldos conteniendo: A) *S. eritreus* y B) *S. aureofaciens*. Los símbolos vacíos representan las determinaciones en la planta y los llenos en el laboratorio (~2 h después de la toma de la muestra). Determinación con el "vane".

Las mediciones reológicas llevadas a cabo en el laboratorio antes y después de un experimento típico de mezclado demuestran que este fluido fue muy estable, como se ilustra en la figura 5.5A.

Observaciones al microscopio (figura 5.6) indicaron que la morfología de *M. purpurea* no sufrió cambios aparentes, debido al transporte, al tiempo fuera del bioreactor o bien a los esfuerzos cortantes a que se le somete en las determinaciones de consumo de potencia. Este microorganismo no es sensible a la falta de oxígeno. Otra característica importante de mencionar es el hecho de que, aunque es un medio rico, es poco susceptible de contaminación debido a la presencia de la gentamicina, un antibiótico de amplio espectro. La excelente estabilidad de los caldos permitió el uso de una misma muestra para evaluar la reología, las características de consumo de potencia para el mezclado bajo condiciones no aireadas y a diferentes niveles de aireación usando tres combinaciones de impulsores.

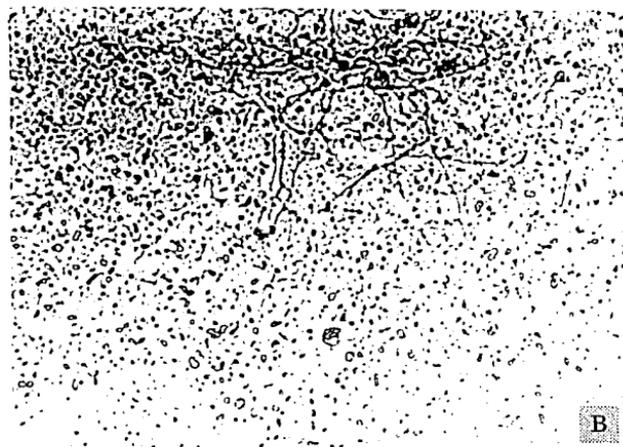
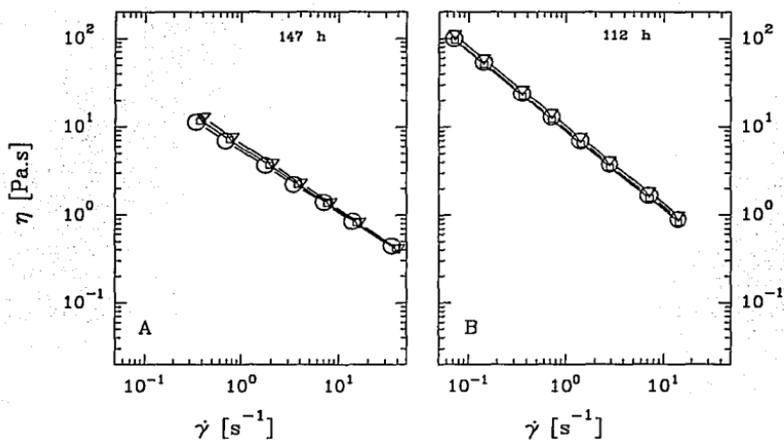
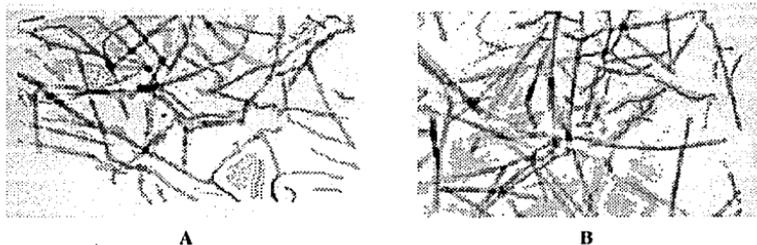


Figura 5.2. Micrografías de *Streptomyces eritreus* A) en la planta al momento de la toma de la muestra, B) en el laboratorio 5 horas después.



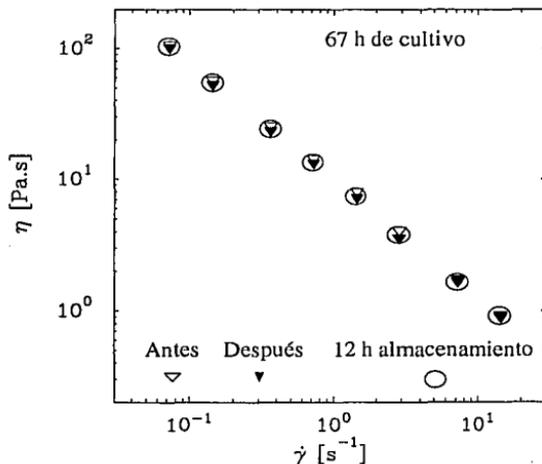
**Figura 5.5.** Estabilidad reológica de los caldos de: A) *Micromonospora purpurea* y B) *Amycolatopsis mediterranei* (lote 433). Las determinaciones fueron realizadas en: (O) la planta, (▽) el laboratorio y, (□) después de los experimentos de mezclado. Determinaciones realizadas con el dispositivo "vane".



**FIGURA 5.6.** Micrografías de *Amycolatopsis mediterranei* A) antes de los experimentos de mezclado y B) después de los experimentos de mezclado.

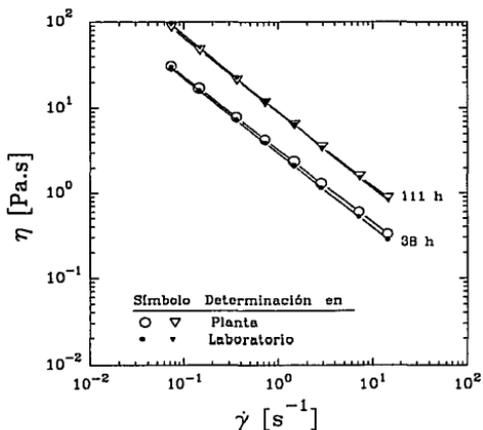
Como se muestra en la figura 5.5B y en el anexo I (Figuras I.3 y I.4) los caldos de *Amycolatopsis mediterranei* resultaron muy estables reológica y estructuralmente tanto a la falta de aireación, y agitación, así como al transporte y a los esfuerzos de corte bajo las condiciones en las que fueron realizados los experimentos de mezclado. Durante las pruebas, los caldos fueron sometidos a velocidades de deformación que variaron desde 14 hasta 115  $s^{-1}$ , durante períodos de 8-10 horas de agitación, y a cambios en la aireación que variaron desde 0.0 vvm hasta de 1.0 vvm. Las suspensiones de *A. mediterranei*, también resultaron muy estables a la sedimentación ya que no ocurrió separación de fases cuando las muestras, de edades superiores a 40 h, se dejaron en reposo por períodos de hasta 8 h. *A. mediterranei* no presentó cambios en la morfología (daños al micelio), por efecto del mezclado, que pudieran ser observados al microscopio.

Muestras de los caldos de diferentes edades fueron sometidas a almacenamiento fuera del fermentador durante 12 horas. Como se puede apreciar la figura 5.7, es evidente que esta suspensión micelial fue muy estable al almacenamiento.



**Figura 5.7.** Estabilidad reológica de los caldos de *Amycolatopsis*. Antes y después de someterlos a 12 h de almacenamiento. Lote 435.

En la figura 5.8 se pueden ver los reogramas para los caldos de *A. mediterranei* del lote 454, para determinaciones realizadas en la planta y  $\sim 8$  horas después en el laboratorio. Como se puede ver los caldos de *A. mediterranei* son estables reológicamente independientemente del lote que se analice, ya que todos los lotes estudiados en el presente trabajo mostraron una excelente estabilidad reológica y estructural.



**Figura 5.8.** Reogramas del lote 454 de *A. mediterranei* para 38 y 111 h de la fermentación. Mediciones realizadas en la planta y en el laboratorio  $\sim 8$  h después de haber tomado de la muestra.

### 5.3. Caldos de *Micromonospora purpurea*

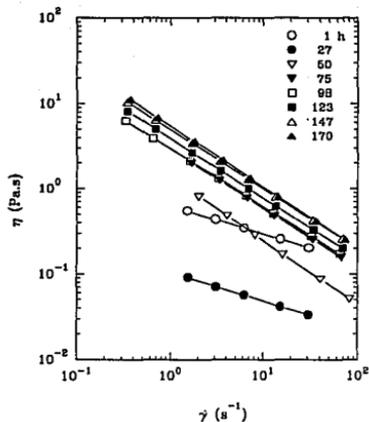
#### 5.3.1. Reología

En la figura 5.5A y en el anexo I (figuras I.1 y I.2) se muestran los reogramas obtenidos con el viscosímetro Brookfield (con el dispositivo "vane") tanto en la planta como en el laboratorio. En primer lugar, se puede apreciar que los reogramas generados a partir de las mediciones realizadas en la planta son prácticamente superponibles con los reogramas generados en el laboratorio. Lo anterior nos habla de la buena estabilidad de los caldos de *Micromonospora purpurea* al transporte, ya que las pequeñas variaciones caen dentro del rango de error del equipo de medición. Si bien se ha reportado en la literatura (Charles, 1978) que en algunas suspensiones de organismos filamentosos ocurre separación de fases, este no fue el caso.

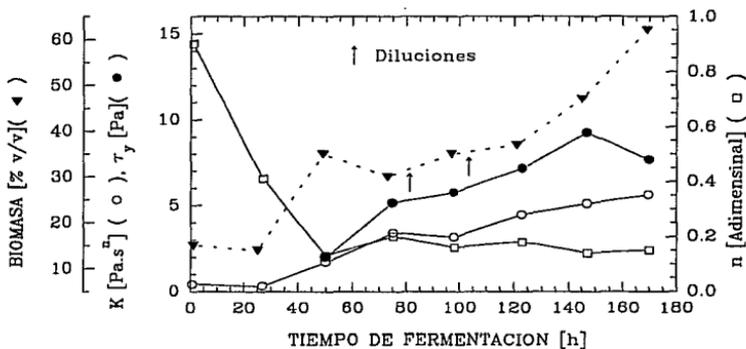
Debido al hecho de que este fluido no presenta separación de fases, dejándolo en reposo por períodos prolongados, y dado que las determinaciones duran poco tiempo, se pudieron realizar satisfactoriamente con el viscosímetro de aguja. Como se observa en la figura 5.9, los cambios más drásticos en la reología ocurren entre las 27 y las 75 horas del cultivo, presentándose poca variación de ahí en adelante.

Al inicio de la fermentación los caldos son viscosos y con cierto grado de pseudoplasticidad, lo cual seguramente es debido a que el medio de cultivo contiene harinas. Como se puede apreciar en las figuras 5.9 y 5.10, en la etapa de 1 a 27 h del proceso la viscosidad disminuye por lo que se puede inferir que las harinas están siendo hidrolizadas. Después de este período, los cambios de la reología son producidos principalmente por el incremento de la concentración de la biomasa micelial, a partir de las 27 h del cultivo.

La figura 5.10 muestra la evolución de los índices reológicos de la ley de la potencia ( $n$  y  $K$ ), determinados con el viscosímetro Brookfield, con el dispositivo "vane". En la misma figura se ilustran también los valores del punto de cedencia, cuantificado mediante la técnica de Dzuy y Boger, (1983) usando la geometría "vane" y la biomasa (% v/v), en función del tiempo de proceso. Este caldo de fermentación presentó un comportamiento pseudoplástico desde etapas tempranas de la fermentación y el punto de cedencia ( $\tau_y$ ) fue medible a partir de las 50 horas del proceso. Cabe mencionar que el punto de cedencia estuvo fuera de los límites de detección del método de relajación (Hannote *et al.*, 1991) con el viscosímetro de aguja.



**Figura 5.9.** Reogramas para los caldos de *M. purpurea*, generados a partir de datos obtenidos en el laboratorio, utilizando la aguja #1.



**Figura 5.10.** Evolución de  $K$ ,  $n$ ,  $\tau_y$  (obtenidos con el "vane") y la biomasa de los caldos de fermentación de *Micromonospora purpurea*.

Los datos reológicos de estos caldos pudieron ser representados en forma muy satisfactoria mediante el modelo de la ley de la potencia ( $\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$ ), en el rango de velocidades de deformación cubierto, con una correlación de  $-0.9893 \pm 0.01$ , para todas las edades del cultivo.

Como se puede apreciar en la figura 5.10 el índice de flujo ( $n$ ) disminuyó durante las primeras 45 horas y se mantuvo relativamente constante desde las 50 horas hasta el final del proceso ( $n \cong 0.16$ ), mientras que el índice de consistencia ( $K$ ) y el punto de cedencia ( $\tau_y$ ) se incrementaron conforme aumenta la edad del cultivo y por lo tanto aumentó la concentración de biomasa.

La biomasa tiene una influencia considerable sobre los parámetros  $K$  y  $\tau_y$ , pero como es evidente de las figuras 5.10 y 5.11 no es el único factor que afecta a tales parámetros, ya que, aun cuando en el intervalo de 50 a 70 h del proceso hubo una ligera disminución de la biomasa,  $K$  y  $\tau_y$  continuaron incrementándose. Lo anterior nos sugiere que existen otros factores que afectan a la reología de las suspensiones miceliales, tales como la morfología y las características físicas de las hifas (flexibilidad, número de ramificaciones) así como su composición. En la figura 5.11 se aprecia claramente que la concentración de biomasa influye fuertemente en el punto de cedencia. Sin embargo, el punto de cedencia es menor a 63 % v/v de biomasa que a 47 % v/v, lo que indica que hay otros factores que tienen una influencia no menos importante que la de la biomasa, quizá intervengan la flexibilidad de las hifas y las interacciones de estas entre sí.

El índice de flujo presentó una tendencia a disminuir a medida que la concentración de la biomasa se incrementó de 15 hasta 40 % v/v y después permaneció prácticamente constante aun cuando la biomasa continuó incrementándose, como se puede apreciar en la figura 5.11.

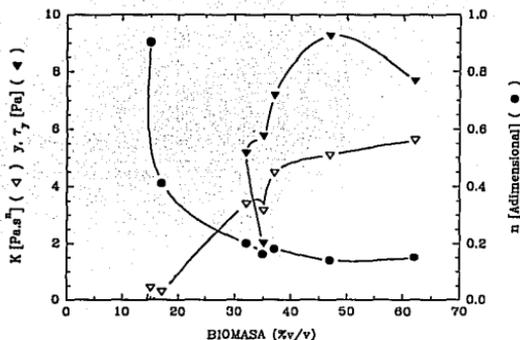


Figura 5.11. Efecto de la concentración de biomasa sobre los parámetros reológicos  $n$ ,  $K$  y sobre el punto de cedencia ( $\tau_y$ ).

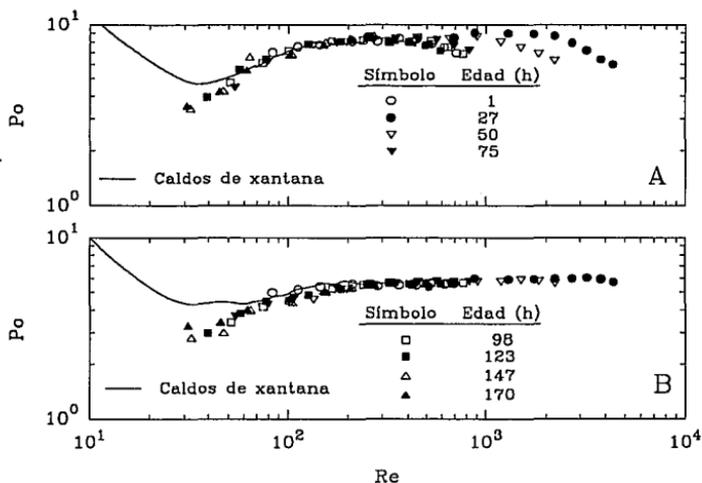
### 5.3.2. Consumo de potencia sin aireación (impulsores duales)

En las gráficas de  $P_o$  versus  $Re$  (figura 5.12) se puede apreciar que, para las dos combinaciones de impulsores, las tendencias fueron similares a las reportadas para otro sistema viscoso y no-Newtoniano como lo es el de los caldos de goma xantana. Sin embargo, en la región de números de Reynolds de 20 a 80, la gráfica para el caldo de *M. purpurea* presenta un mínimo, el cual es inferior al de la curva de potencia para el biopolímero. La diferencia observada en el valor mínimo presentado en esta región de  $Re$  se puede atribuir a efectos de viscoelasticidad. De acuerdo a lo reportado por Margaritis y Pace (1985), en el mezclado de fluidos de baja viscoelasticidad, las curvas de  $P_o$  versus  $Re$  presentan un mínimo en la región de transición que es inferior al observado en los líquidos de alta viscoelasticidad. De lo cual se desprende indirectamente que los caldos de *M. purpurea* son menos viscoelásticos que los caldos de goma xantana. Sin embargo, es necesaria la verificación experimental de esta propiedad reológica para concluir al respecto. A números de Reynolds mayores de 60 los valores del número de potencia tienden a ser muy similares.

Para la combinación de dos turbinas Rushton (figura 5.12A), entre Reynolds de 500 a 5000, se observa un caída en la potencia a las diferentes edades del cultivo. Se puede asumir que esta

caída de la potencia se debe a efectos de la aireación superficial. Sin embargo, no fue posible confirmar de manera visual la introducción de aire ya que el fluido es opaco. Las curvas tienden a desplazarse hacia la izquierda a medida que aumenta la edad del cultivo y por lo tanto se hace más viscoso. Con la combinación de turbina Rushton con turbina de paletas inclinadas no se observó esta disminución en los números de potencia (figura 5.12B). Lo anterior puede explicarse si consideramos que las turbinas Rushton transmiten mayor potencia al fluido, con lo cual producen mayor turbulencia, que las turbinas de paletas inclinadas. Además de que el patrón de flujo ascendente de la turbina de paletas inclinadas hace que sea más difícil la introducción de burbujas.

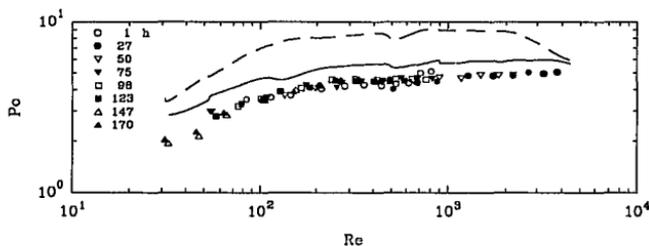
Los números de potencia fueron ligeramente menores para la combinación de impulsores de turbina Rushton-turbina de paletas inclinadas respecto a los obtenidos para dos turbinas Rushton.



**Figura 5.12.**  $Po$  versus  $Re$  para caldos de *M. purpurea* de diferentes edades, para 2 turbinas Rushton (A) y turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas  $45^\circ$  (B). La línea continua son datos de caldos de goma xantana de Sánchez *et al.*, 1992.

Otra combinación de impulsores utilizada en el presente trabajo fue la de impulsor interMIG - turbina Rushton. Cabe mencionar aquí que se utilizó una turbina Rushton con un solo impulsor interMIG (TR-IM), (aún cuando el fabricante recomienda utilizar estos últimos por parejas) debido a que en la industria que nos proporcionó los caldos de fermentación, han utilizado esta combinación de impulsores con buenos resultados.

Dado que es una configuración no convencional, no existen datos en la literatura de algo similar, por lo que aquí se presentan, por primera vez, gráficas de potencia con esta combinación de impulsores para caldos de *Micromonospora purpurea*. En la figura 5.13 se muestra un gráfico de número de potencia en función del número de Reynolds para la combinación de impulsores de TR-IM. Los números de potencia obtenidos son inferiores a los obtenidos con las otras dos combinaciones de impulsores (2TR y TR-TPI).

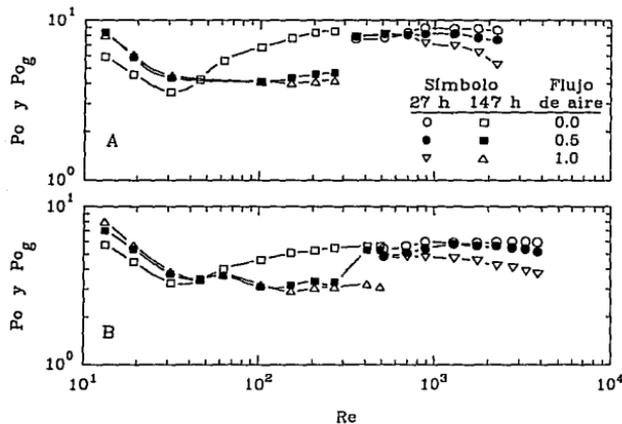


**Figura 5.13.** Gráfica de número de potencia sin aireación en función de número de Reynolds para caldos de fermentación de *Micromonospora purpurea* de diferentes edades del cultivo, para la combinación de impulsores de turbina Rushton-InterMIG.  
 — TR-TPI y - - - 2TR

### 5.3.3. Consumo de potencia con aireación (impulsores duales)

Como se ilustra en la figura 5.14, las caídas de potencia a etapas tempranas del proceso son considerablemente mayores a 1 vvm que a 0.5 vvm. Sin embargo, para altas viscosidades (hacia el final de la fermentación) no se aprecian diferencias importantes en la caída de la potencia para

diferentes niveles de aireación. Esto es válido para las dos combinaciones de impulsores y puede deberse, como ha sido descrito para fluidos transparentes (Nienow *et al.*, 1983; Nienow y Ulbretch, 1985) a que las cavidades de aire que se forman detrás de las paletas del impulsor tienden a estabilizarse a medida que se incrementa la viscosidad, el punto de cedencia del fluido.



**Figura 5.14.** Gráfica de  $P_o$  versus  $Re$ , generada utilizando caldos de *Micromonospora purpurea* de 27 y 147 horas de cultivo. A) dos turbinas Rushton y B) turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas a  $45^\circ$ .

En la figura 5.14B, en el rango de Reynolds de 300-500 y para la curva con 0.5 vvm de aireación, se observó un incremento en los valores de  $P_{o_g}$ . Este incremento ha sido observado en caldos conteniendo biopolímeros y se sabe que se debe a la estructura de las cavidades de aire que se forman detrás de las paletas de los impulsores. Cuando los impulsores giran lentamente no se forman cavidades de aire detrás de las paletas del impulsor y a medida que la velocidad del impulsor se incrementa, aumenta el tamaño de las cavidades (y disminuye el consumo de potencia) hasta llegar a un tamaño máximo (punto mínimo en la curva de potencia) pero al seguir incrementando la velocidad de agitación las bolsas de aire comienzan a fraccionarse y entonces la potencia consumida tiende a aumentarse (Nienow *et al.*, 1983 y Nienow and Ulbretch, 1985).

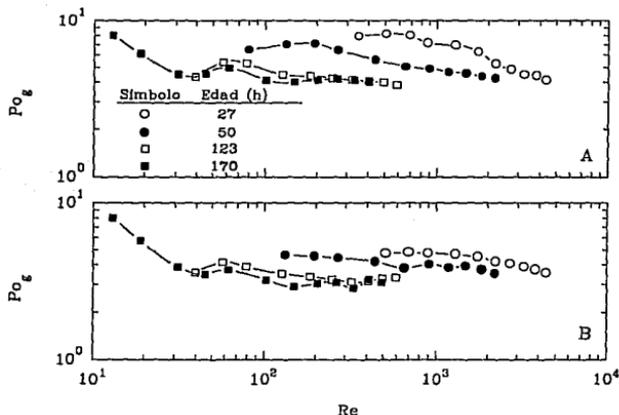
En la región laminar ( $Re < 40$ ) se observó que los valores de  $Po_g$  estaban por debajo de los valores de  $Po$ . Esto probablemente pueda deberse a que a velocidades de agitación muy bajas el aire suministrado no es dispersado y pasa a través del fluido en forma de burbujas muy grandes, las cuales muy probablemente ejercen presión sobre los impulsores, con lo cual se genera un aumento en los valores del número de potencia.

En la figura 5.15 se observa claramente que las disminuciones del número de potencia a un mismo flujo de aire son marcadamente mayores para las etapas más avanzadas que para las etapas tempranas o de baja viscosidad. Comparando los resultados del presente trabajo con los reportados en la literatura (Sánchez *et al.*, 1992) para caldos de goma xantana (para las mismas combinaciones de impulsores) se observa que bajo condiciones aireadas y a viscosidades aparentes similares, las caídas de potencia observadas para el caldo micelial son menores que las observadas para caldos de goma xantana. Esto pudiera deberse a que el caldo micelial es menos viscoelástico que las soluciones de goma xantana. Adicionalmente, los caldos miceliales presentan puntos de cedencia sensiblemente menores que los medidos en caldos de goma xantana. Dadas estas características se puede inferir que los caldos de *Micromonospora purpurea* tienden a estabilizar las cavidades de aire detrás de las paletas de los impulsores en menor grado que los caldos de goma xantana y, en consecuencia, los valores de  $(Pg/P)_{min}$  son mayores que los encontrados en los caldos del polisacárido. Para el micelio se encontró que  $Pg/P_{min}(2TR) \cong 0.49$  y  $Pg/P_{min}(TR-TPI) \cong 0.51$  (figura 5.16) mientras que para xantana se reportan valores mínimos de 0.44 y 0.43 respectivamente. Para concentraciones de goma más elevadas se alcanzan mínimos de hasta 0.17 y 0.12 (Sánchez *et al.*, 1992) para las mismas combinaciones de impulsores.

En la figura 5.17 se presenta una comparación de las dos combinaciones de impulsores a una misma velocidad de aireación (1 vvm) para caldos de baja y alta viscosidad. Las caídas de potencia (en términos relativos) son ligeramente mayores para las combinaciones de dos turbinas Rushton que para las combinaciones de turbina de paletas inclinadas con turbina Rushton. Probablemente, en el impulsor de turbina Rushton tiendan a formarse cavidades de aire mayores y más estables detrás de las paletas y no así en la turbina de paletas inclinadas, lo cual podría explicar el hecho de que las caídas de potencia sean mayores para las turbinas Rushton.

Como se puede ver en la figura 5.18, con la combinación de impulsores TR-IM, el nivel de aireación tiene un efecto muy importante sobre el consumo de potencia a edades de los caldos inferiores a 75 horas. Sin embargo, a etapas posteriores, el nivel de aireación tiene poco efecto sobre el consumo de potencia, es decir, que cuando las viscosidades son altas un flujo pequeño de

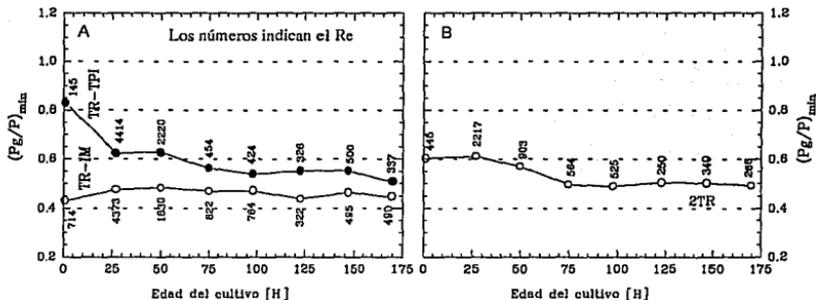
aire produce una caída importante en el consumo de potencia. Un flujo aun mayor de aire produce muy poco cambio en la caída de la potencia. En el anexo I pueden verse algunas gráficas adicionales de  $P_g/P$  en función del número de Reynolds.



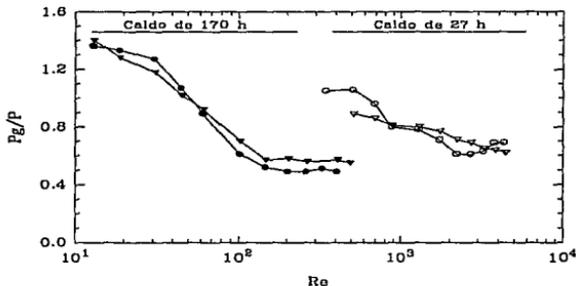
**Figura 5.15.** Caída de la potencia por efecto de la aireación como una función del  $Re$  y de la edad del cultivo. A) 2 turbinas Rushton y B) turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas a  $45^\circ$ . Velocidad de aireación: 1 vvm.

Comparando los tres sistemas de impulsores, se puede apreciar en la figura 5.16 que la aireación tiene un efecto mayor con la combinación de impulsores de TR-IM. Además se observa que, utilizando la combinación de impulsores de TR-IM, las caídas en la potencia para cualquier edad del cultivo es prácticamente la misma, es decir, que esta combinación no es sensible a los cambios en la viscosidad, como se observa con las otras dos combinaciones de impulsores. El hecho de que la viscosidad y el nivel de aireación no tengan efecto sobre el consumo de potencia cuando se utiliza la combinación de impulsores TR-IM, proporciona al proceso flexibilidad, de tal manera que se pueden suministrar diferentes flujos de aire a los fermentadores sin que por ello se presenten cambios en el consumo de potencia. Es decir, se pueden administrar flujos de aire adecuado a cada etapa de la fermentación dependiendo de la viscosidad de los caldos para mantener los niveles de oxígeno disuelto.

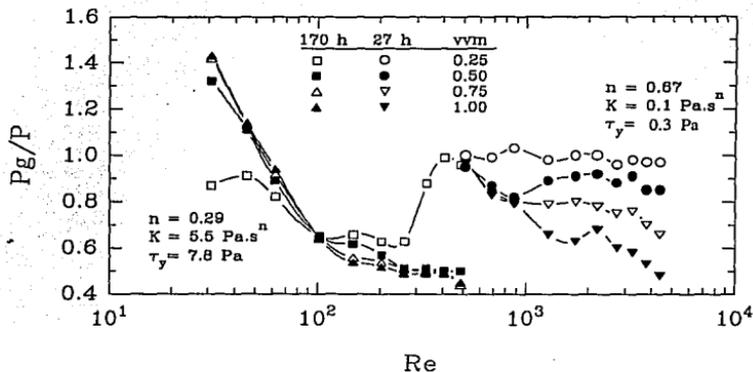
Como lo indica la figura 5.16 la combinación de TR-TPI fue la que presentó la menor caída de la potencia por efecto de la aireación. Con las combinaciones TR-TPI y 2TR se observó que la viscosidad tiene efecto importante sobre el consumo de potencia.



**Figura 5.16.** Relación  $(Pg/P)_{min}$  en función de la edad del cultivo de *Micromonospora purpurea* para tres configuraciones de impulsores. Velocidad de aireación: 1 vvm.



**Figura 5.17.**  $Pg/P$  versus  $Re$  para las dos combinaciones de impulsores. (○ ●) dos turbinas Rushton y (▽ ▼) turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas a 45°. Tiempo de fermentación en (h): (○ ▽) 27 y (● ▼) 170. Aireación: 1.0 vvm



**Figura 5.18.** Efecto de la aireación sobre el consumo de potencia en caldos de fermentación de *Micromonospora purpurea* a diferentes edades del cultivo. Para la combinación de impulsores de turbina Rushton-InterMIG.

### 5.3.4. CONCLUSIONES

En las determinaciones de los parámetros reológicos mediante los dos sistemas, tanto en los valores del índice de flujo, como en los valores del índice de consistencia se obtuvieron diferencias de alrededor de 10 - 15 %. Dichas diferencias bien podrían ser atribuidas al error humano o del equipo durante las determinaciones o quizá se deba principalmente a que ambos sistemas generan patrones de flujo muy diferentes. Además, cada sistema tiene sus propias suposiciones teóricas. En general, ambos sistemas arrojan resultados congruentes que son además muy reproducibles.

El dispositivo "vane" tiene la ventaja de que puede ser utilizado también con suspensiones que no presenten muy buena estabilidad, es decir, en aquellas que ocurra separación de fases.

Los caldos industriales de *Micromonospora purpurea*, presentaron muy buena estabilidad reológica y estructural al esfuerzo de corte y al almacenamiento, así como a la falta de un nivel adecuado de oxígeno. Además, fueron poco susceptibles de contaminación cuando se extrajeron

del bioreactor. Por estas características resultaron ser muy adecuados para realizar estudios de reología y de mezclado.

Los caldos de *M. purpurea* mostraron características de pseudoplasticidad desde el inicio de las fermentaciones y, a partir de las 50 horas de cultivo, fue posible la cuantificación del punto de cedencia mediante una técnica directa.

Se reportaron por primera vez resultados de estudios de mezclado para caldos industriales de *Micromonospora purpurea* empleando impulsores duales en tanques de geometría no "estándar".

Las tendencias en las curvas de potencia no aireadas son similares a las tendencias reportadas para otros caldos reológicamente complejos como los de la fermentación de goma xantana. Sin embargo, en la región de  $30 < Re < 60$  se obtuvieron valores de  $P_0$  menores a los reportados para caldos simulados de goma xantana, debido probablemente a que los caldos miceliales presentan menores puntos de cedencia y probablemente menor viscoelasticidad.

Se observó que, al igual que para otros fluidos reológicamente complejos, el nivel de aireación solo tiene efectos significativos sobre el consumo de potencia para el mezclado a bajas concentraciones de biomasa (*i.e.* baja viscosidad y puntos de cedencia pequeños, a etapas tempranas de la fermentación), ya que a concentraciones de biomasa elevadas (*i.e.* alta viscosidad, a etapas avanzadas del proceso) no se observaron caídas de potencia significativas a los diferentes flujos de aire.

## 5.4. Caldos de *amycolatopsis mediterranei*

### 5.4.1. Reología

Los caldos mostraron características no-Newtonianas y viscosidades altas desde el inicio de la fermentación, debido a la presencia de harinas en el medio de cultivo. Los caldos presentaron punto de cedencia que fue medible desde las 20 h de edad de los cultivos. Como se puede ver en la figura 5.19, los cambios más notables en la reología de los caldos ocurrieron durante la fase exponencial de crecimiento del micelio (durante las primeras 70 horas de la fermentación). A partir de las 70 h hasta el final del proceso ocurrieron muy pocas variaciones en la reología de los caldos. Se observó un ligero efecto Weissenberg (ascensión del fluido por la flecha que soporta a los impulsores) cuando se agitaron caldos de 45 h en adelante, a velocidades de agitación superiores a  $5 \text{ s}^{-1}$ . Debe hacerse notar que en este caso la superficie del fluido no presentaba movimiento alguno. Cuando se usaron impulsores duales no se observó este efecto, posiblemente debido a que la caverna (zona bien mezclada, alrededor del impulsor) formada alrededor del impulsor superior, alcanzó la superficie del fluido. Utilizando las combinaciones de impulsores se observó movimiento en la superficie del fluido y se formaron pequeños vórtices a velocidades superiores a  $6 \text{ s}^{-1}$ . Bajo estas circunstancias no fue posible observar si ocurría o no ascensión del fluido por la flecha.

En la figura 5.20 se muestra la evolución de los parámetros reológicos de los caldos de cultivo obtenidos a lo largo de la fermentación. El índice de consistencia (K) y el punto de cedencia ( $\tau_y$ ) presentaron tendencias similares a las de la cinética de crecimiento celular (figura 5.20). El valor máximo de  $\tau_y$  fue de 15 Pa y el de K de  $9.8 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ . El índice de flujo (n) disminuyó, durante las primeras 45 h, hasta  $\approx 0.1$  y se mantuvo prácticamente constante durante el resto de la fermentación. Como se muestra en la figura 5.21, la concentración de biomasa es la principal causante del incremento de la viscosidad y de la naturaleza pseudoplástica de los caldos miceliales; si bien no es el único factor que contribuye a esto. Se observó que de los valores de K y  $\tau_y$  son menores a las 140 h del cultivo comparados con los valores que estos parámetros presentaron a las 65 h, aún cuando la concentración de biomasa es mayor a las 140 h. Lo cual sugiere que además de la concentración de biomasa existen otros factores que afectan a estos parámetros.

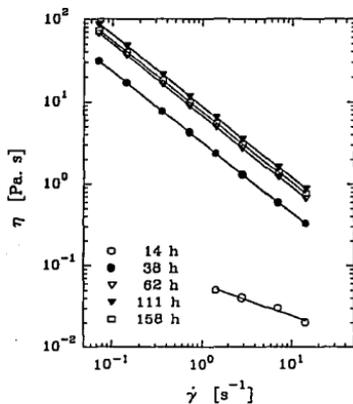


Figura 5.19. Reogramas del lote 454 de la producción de rifamicina, generados utilizando el dispositivo "vane", en el laboratorio.

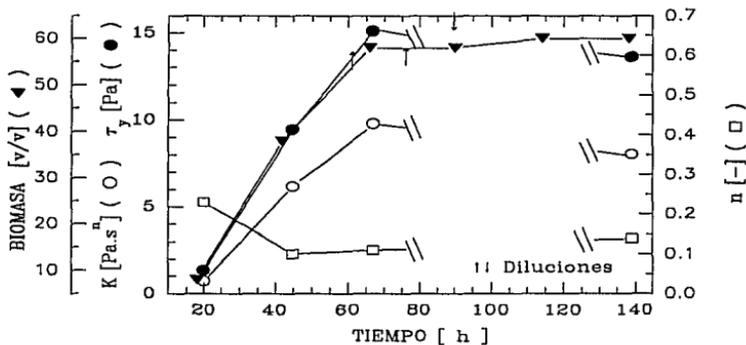
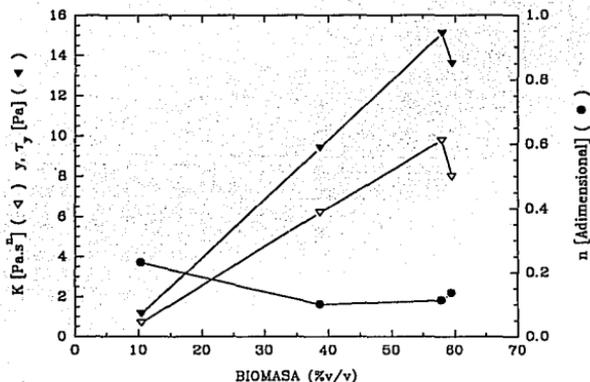


Figura 5.20. Cinética de crecimiento y parámetros reológicos ( $n$ ,  $K$  y  $\tau_y$ ) de caldos industriales de la producción de rifamicina, lote 435, obtenidos utilizando el dispositivo "vane"

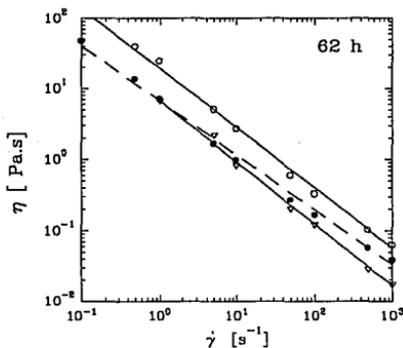


**Figura 5.21.** Efecto de la concentración de biomasa sobre los parámetros reológicos  $n$ ,  $K$  y sobre el punto de cedencia ( $\tau_y$ ).

Se realizaron adiciones de agua al bioreactor a las 75, 95 y 113 h de la fermentación, con el fin de abatir la viscosidad y mejorar las condiciones de mezclado. A pesar de las diluciones realizadas, la biomasa es mayor a las 140 h comparada con la existente a las 65 h. Sin embargo, los datos reológicos sugieren que el agua agregada al fermentador provocó cambios en las características físicas de las hifas, probablemente en la rigidez de estas. Esto se desprende, por un lado, del hecho de que la morfología no sufrió cambios evidentes (al menos en las preparaciones observadas al microscopio óptico) y por el otro, a que una mayor concentración de biomasa (aún con las diluciones) mostró viscosidades menores que aquellas observadas para edades tempranas (*i.e.* menores de 65 h). Una posible causa adicional podría ser debida a que las diluciones causaron una disminución en la tonicidad del medio, lo cual pudo afectar las características físicas del micelio y estas a su vez, afectar la reología.

En la figura 5.22 se muestran los reogramas para el caldo de 62 horas. También se muestran los reogramas para diferentes diluciones que se realizaron con el objeto de ver el efecto de la concentración de biomasa sobre los parámetros reológicos. Como puede observarse, una dilución de alrededor del 15% genera una disminución de la viscosidad de los caldos de alrededor de 50-60%. Sin embargo, diluciones más grandes no generan mayores diferencias en la viscosidad, ya

que diluciones de hasta 55-60% producen disminuciones de viscosidad de entre 60 y 70 %. Esto es importante desde el punto de vista del proceso ya que mediante una dilución relativamente pequeña se puede abatir mucho la viscosidad mejorando las condiciones de mezclado y por consiguiente se obtiene un incremento en el  $k_L a$  del bioreactor. Las velocidades de deformación de la figura 5.22 no son consistentes, debido a que ocurrió una descalibración del equipo (Reómetro Contraves Rheomat 120) estas están desfasadas. Por este motivo estos reogramas no deberán compararse con los obtenidos con otros equipos.



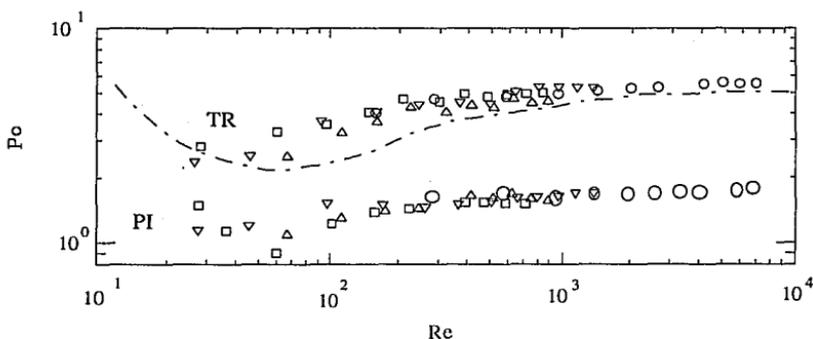
**Figura 5.22.** Efecto de la dilución sobre la reología de los caldos de *Amycolatopsis mediterranei*. Los porcentajes de dilución son: (○) caldo sin diluir, (●) 15% y (▽) 57%. Las concentraciones de biomasa dadas en %v/v son: (○) 35, (●) 30 y (▽) 15.

## 5.4.2. Consumo de potencia sin aireación

### 5.4.2.1. Impulsores individuales

En la figura 5.23 se muestra la relación  $Po$  versus  $Re$  para una turbina Rushton y para una turbina de 6 paletas inclinadas utilizando caldos de *A. mediterranei*, y para comparación se presentan datos de la literatura para soluciones de goma xantana (usando una turbina Rushton, Galindo *et al.*, 1988). La curva de  $Po$  versus  $Re$  para los caldos de *A. mediterranei* muestran una tendencia similar a datos de la literatura de caldos simulados de goma xantana empleando una

turbina Rushton. De acuerdo lo tratado en la sección 5.3.2, figura 5.12, los caldos reconstituidos de goma xantana son más viscoelásticos que los caldos miceliales, puesto que el mínimo observado en el régimen transiente es mayor para goma xantana que para el caldo micelial. Sin embargo, en la figura 5.23 se observa lo contrario, ya que en la región de  $50 < Re < 500$  los valores de  $Po$  encontrados para las soluciones de goma xantana son inferiores a los encontrados para los caldos de *Amycolatopsis*. Esto muy probablemente se deba a que los datos de goma xantana mostrados en la figura 5.23, son de concentraciones elevadas y es un caldo reconstituido, sin ningún tratamiento, además de que la escala del tanque de mezclado utilizados en el presente trabajo son iguales al del equipo usado por Sánchez *et al.*, (1992). Por otro lado, los datos de Galindo *et al.*, (1988), fueron obtenidos con un producto comercial y con concentraciones mas bajas, además de que el equipo utilizado en el presente estudio es de menor escala que el usado por Galindo *et al.*, (1988). Por estas razones es muy probable que los caldos de *Amycolatopsis mediterranei* sean más viscoelásticos.



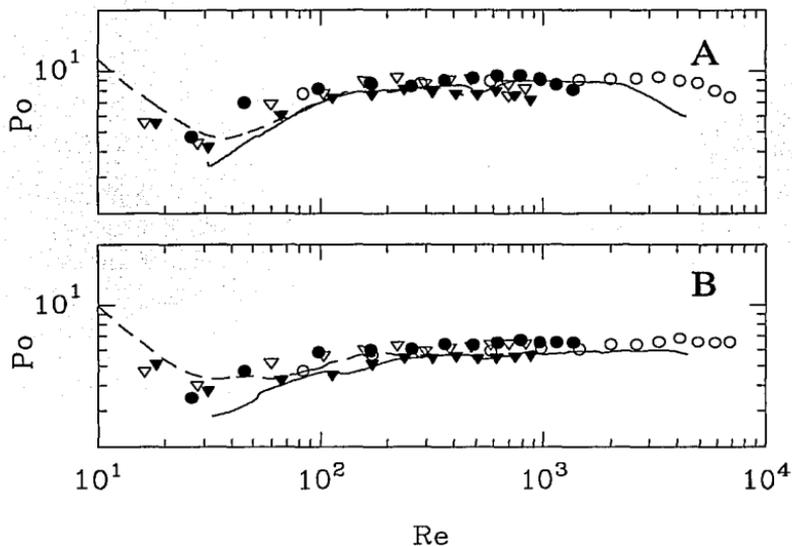
**Figura 5.23.**  $Po$  versus  $Re$  para caldos de *Amycolatopsis mediterranei* de diferentes edades de cultivo (h): (○) 20, (▽) 45, (□) 67 y (△) 139. - - Soluciones de goma xantana (Galindo *et al.*, 1988).

### 5.4.2.2. Impulsores duales

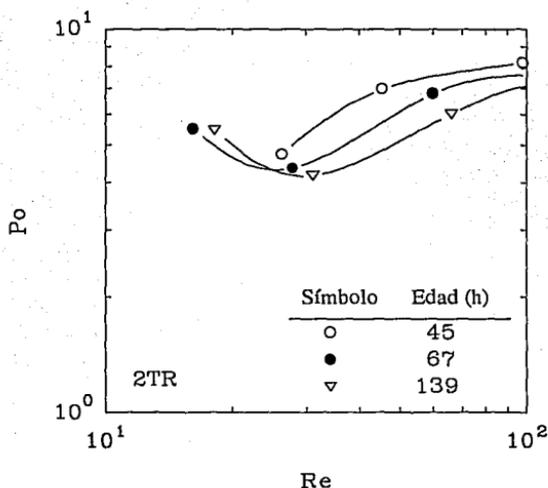
Como se puede apreciar en la figura 5.24, utilizando impulsores duales, las curvas de número de potencia sin aireación en función del número de Reynolds, para los caldos de *Amycolaptosis mediterranei*, presentaron tendencias similares a las observadas en los caldos de *Micromonospora purpurea*, o en caldos reconstituidos de exopolisacáridos como la goma xantana (Sánchez, *et al.*, 1992). Lo anterior es aplicable en la mayor parte del intervalo de Reynolds analizado, con excepción de la zona de  $20 < Re < 100$ , donde se observó un mínimo que se encuentra ligeramente debajo del encontrado en caldos de goma xantana y por arriba del hallado en caldos de *M. purpurea*, para ambas combinaciones de impulsores (TR y TPI). Aunque no se cuenta con datos de viscoelasticidad, por el hecho de que los caldos de *Amycolaptosis* presentaron efecto Weissenberg, por la magnitud de  $Po_{\min}$  encontrado en el régimen transiente, puede inferirse que los caldos de *A. mediterranei* son más viscoelásticos que los caldos de *M. purpurea*, pero menos viscoelásticos que los caldos de goma xantana (Margaritis y Pace, 1985).

Se observó una disminución de los valores de  $Po$  a  $Re$  elevados, lo cual indica la presencia de aireación superficial a velocidades de agitación elevadas (>450 r.p.m.) cuando se utilizaron dos turbinas Rushton.

Como se muestra en la figura 5.25, las curvas de potencia generadas para caldos conteniendo *A. mediterranei* de diferentes edades y utilizando dos turbinas Rushton mostraron diferencias importantes entre sí en la zona de  $20 < Re < 100$ . Esta diferencia en los valores de  $Po$  en esta zona de  $Re$  de acuerdo a Margaritis y Pace, (1985) podría ser atribuida a cambios en la viscoelasticidad de los caldos de fermentación.



**Figura 5.24.**  $Po$  versus  $Re$ . A) 2TR y B) TR-TPI. Símbolos, caldos de *Amycolatopsis mediterranei* de diferentes edades (h): (○) 20, (●) 45, (▽) 67, (▼) 139, — *Micromonospora purpurea* (figura 5.12) y - - goma xantana (Sánchez *et al.*, 1992)



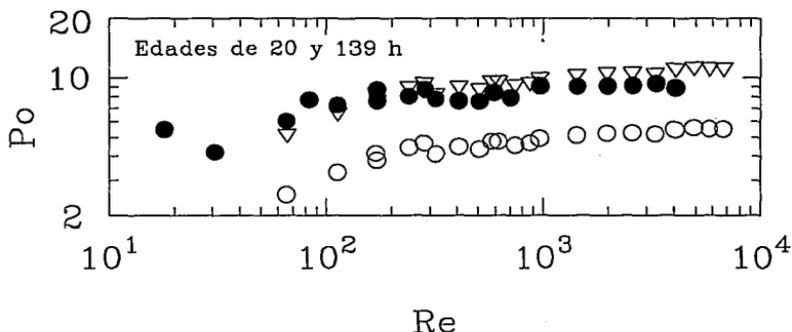
**Figura 5.25.**  $Po$  versus  $Re$  para caldos de *Amycolatopsis mediterranei* de diferentes edades de cultivo.

### 5.4.2.3. Comparación entre impulsores individuales y duales

En la figura 5.26 se presentan los datos de  $Po$  versus  $Re$  para los caldos de la producción industrial de rifamicina, utilizando una y dos turbinas Rushton junto con los valores de  $Po$  para una turbina Rushton multiplicados por dos. En la figura 5.27 se presentan los datos de  $Po$  vs  $Re$  para la combinación turbina Rushton-turbina de 6 paletas inclinadas, junto con los datos obtenidos sumando los valores de  $Po_{(TR)}$  con los valores de  $Po_{(TPI)}$ .

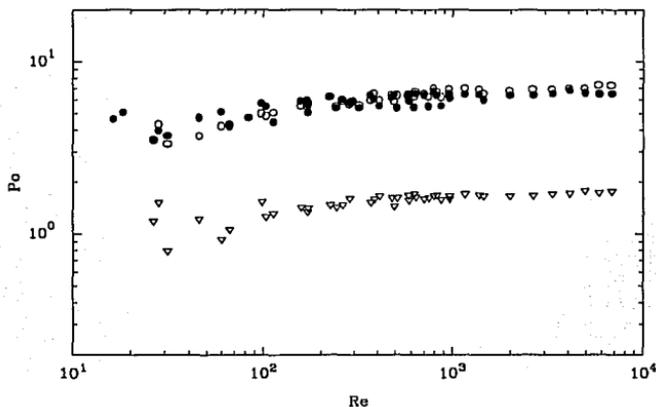
Se observó que a números de Reynolds inferiores a 300, los números de potencia para 2 turbinas Rushton son aproximadamente el doble del valor de  $Po$  para una turbina Rushton (figura 5.26). Sin embargo, a  $Re > 300$ , los valores experimentales de  $Po$  para 2TR son inferiores a los calculados multiplicando por dos el valor experimental obtenido con una turbina Rushton. Ello

puede deberse a que a estos valores de Reynolds ocurre interacción entre las cavernas y patrones de flujo formados alrededor de cada impulsor, o a la presencia de aireación superficial con los impulsores duales. No se observó presencia de aireación superficial cuando se usaron impulsores individuales.



**Figura 5.26.**  $Po$  versus  $Re$ , para (○) TR, (●) 2TR y (▽) TRx2, para los caldos de *Amycolatopsis mediterranei*.

A números de Reynolds inferiores a 800, los valores de  $Po$  para la combinación de impulsores TR-TPI, son similares a la suma de los valores de  $Po_{TR} + Po_{TPI}$ . Sin embargo, a  $Re > 800$ , la suma de los valores de  $Po$  de los impulsores individuales es mayor que el valor de  $Po$  para la combinación TR-TPI. Esto puede deberse a que a  $Re > 800$  las cavernas formadas al rededor de cada impulsor cuando se usan por parejas interactúan, provocando que los valores de  $Po$  sean menores que cuando no hay interacciones entre estas (figura 5.27).



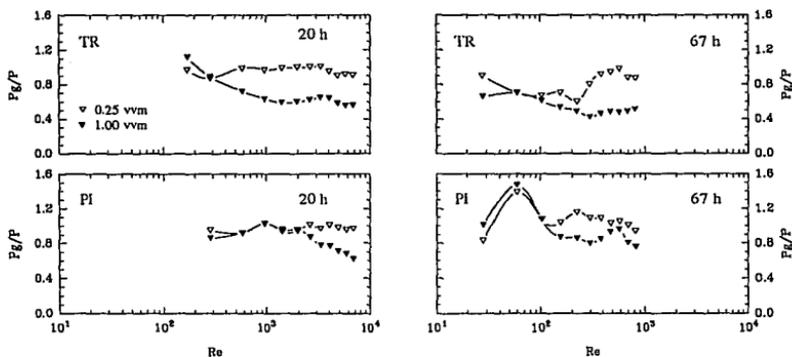
**Figura 5.27.**  $P_o$  versus  $Re$ , para ( $\nabla$ )  $P_{oTPI}$ , ( $\bullet$ )  $P_{oTR-TPI}$  y ( $\circ$ )  $P_{oTR} + P_{oTPI}$ , para los caldos de *Amycolatopsis mediterranei*.

### 5.4.3. Consumo de potencia con aireación

#### 5.4.3.1. Impulsores individuales e impulsores duales

En las figuras 5.28 y 5.29 se presentan los valores de  $P_g/P$  en función del  $Re$ , para muestras de caldo de *Amycolatopsis mediterranei* de 20 y 67 h de edad. Entre más alta es la viscosidad de los caldos de fermentación y mayores los valores del punto de cedencia (a edades más avanzadas de la fermentación) mayores son las caídas de la potencia por efecto de la aireación. La turbina de paletas inclinadas con caldos de baja viscosidad no mostró sensibilidad a la aireación cuando el flujo de aire fue de 0.25 vvm y cuando el flujo fue de 1.0 vvm solo mostró cierta sensibilidad a Reynolds superiores a 1000. Este impulsor mostró poca sensibilidad al flujo de aire con caldos de edades avanzadas (67 h en adelante). La baja sensibilidad presentada por este impulsor se debe a que bombea hacia arriba, motivo por el cual no se estabilizan fácilmente las cavidades de aire detrás de sus paletas, aun cuando la viscosidad y el punto de cedencia sean elevados. La turbina Rushton presentó caídas en la potencia más pronunciadas por efecto de la aireación, siendo mayores las caídas de la potencia a viscosidades altas, lo cual se debe a que por su geometría las

cavidades de aire que se forman detrás de las paletas son más grandes y más estables. Las combinaciones de impulsores resultaron menos sensibles a la aireación que la turbina Rushton sola, siendo la combinación de 2TR ligeramente más sensible que la combinación TR-TPI. El hecho de que las combinaciones presenten caídas de potencia menores que los impulsores individuales se debe a que cuando se utiliza más de un impulsor, el impulsor inferior actúa como un dispersor de aire, lo cual hace que consuma menos potencia y el impulsor o los impulsores superiores ven menos flujo de aire por lo cual consumen mayor potencia, por lo tanto cuando se utiliza un solo impulsor este recibe toda la descarga de aire y por lo tanto la potencia cae más. El hecho de que a mayores edades del cultivo se incremente la caída de la potencia por efecto de la aireación es debido a que aumenta la estabilidad de las cavidades de aire (Nienow *et al.*, 1983; Nienow y Ulbrecht, (1985) formadas detrás de las paletas de los impulsores por efecto del incremento de la viscosidad y del punto de cedencia.

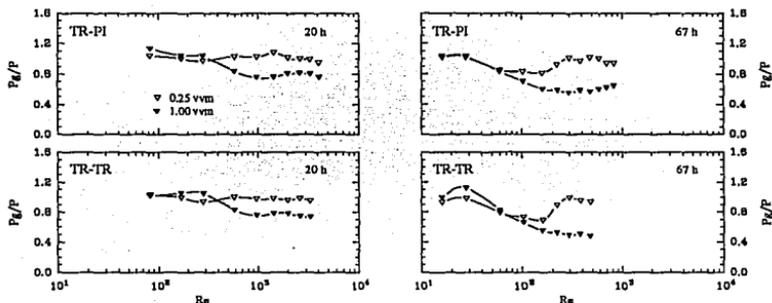


**Figura 5.28.**  $P_g/P$  versus  $Re$  para muestras de caldos de *Amycolatopsis mediterranei* de 20 y 67 h, utilizando impulsores individuales.

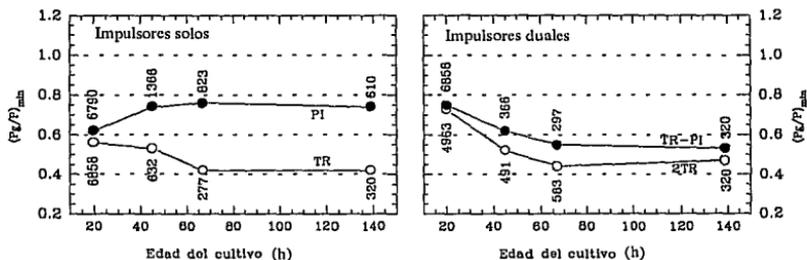
La figura 5.30 presenta un resumen de los niveles máximos de caída de potencia (*i.e.*  $(P_g/P)_{\min}$ ) en función de la edad del cultivo y del tipo y/o configuración de impulsores.

Las caídas en la potencia por efecto de la aireación fueron mayores con la turbina Rushton respecto a las observadas con las combinaciones y con la turbina de paletas inclinadas. Siendo

los valores de  $(Pg/P)_{\min TR}=0.42$ ,  $(Pg/P)_{\min 2TR}=0.47$ ,  $(Pg/P)_{\min TR-TP1}=0.55$  y  $(Pg/P)_{\min TP1}=0.65$ .



**Figura 5.29.**  $Pg/P$  versus  $Re$  para muestras de caldos de *Amycolatopsis mediterranei* de 20 y 67 h, utilizando impulsos duales.



**Figura 5.30.** Relación  $(Pg/P)_{\min}$  en función de la edad del cultivo de *Amycolatopsis mediterranei* para cuatro configuraciones de impulsores. Los números indican el  $Re$ .  $Qg=1.0$  vvm.

### 5.3.5. Conclusiones

Por su excelente estabilidad reológica y estructural, tanto al almacenamiento, al estrés mecánico y a la falta de un nivel adecuado de oxígeno, los caldos de *A. mediterranei* resultaron ser apropiados para realizar estudios de reología y de mezclado fuera del fermentador.

Los impulsores duales presentaron menos sensibilidad a la aireación, en tanto que los impulsores individuales presentaron caídas más pronunciadas en la potencia consumida.

Los caldos presentaron punto de cedencia a partir de las 20 h. La presencia del efecto Weissenberg sugiere la existencia de viscoelasticidad a edades del cultivo de 45 h en adelante.

Con los caldos de *Amycolatopsis mediterranei*, el flujo de aire tiene un efecto importante sobre el consumo de potencia a lo largo de la fermentación. Tanto a viscosidades bajas como a viscosidades altas, el nivel de aireación produce una caída considerable de la potencia consumida, siendo más importante el efecto cuando se utilizó la turbina Rushton (individual) y menos notable para la turbina de 6 paletas inclinadas a 45°. Los impulsores duales presentaron menos sensibilidad a la aireación que la turbina Rushton pero mayor sensibilidad que el impulsor de turbina de paletas inclinadas.

Aunque la biomasa es un factor que contribuye importantemente a la reología de los caldos miceliales, no es el único a considerar, ya que como se vio en la figura 5.22, una dilución mucho mayor no redundó en un abatimiento notable de la viscosidad. Probablemente existen otros factores no menos importantes que contribuyan a la reología de los caldos, como son la morfología, la rigidez de las hifas y las interacciones existentes entre éstas.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

- ◆ Se emplearon exitosamente caldos de las fermentaciones para la producción industrial de los antibióticos gentamicina y rifamicina en estudios de reología y mezclado fuera del fermentador, utilizando impulsores duales e individuales con relaciones geométricas no estándar.
- ◆ Por su excelente estabilidad reológica y estructural a los esfuerzos cortantes, al almacenamiento, a los niveles bajos de oxígeno, además de ser muy poco susceptibles de contaminación, los caldos de las fermentaciones industriales conteniendo los microorganismos filamentosos *Micromonospora purpurea* o *Amycolatopsis mediterranei* resultan muy adecuados para realizar este tipo de estudios. Otra característica importante de los caldos fue la estabilidad de las suspensiones, es decir, no presentaron separación de fases, aún con tiempos de reposo prolongados.
- ◆ Dado que los caldos de los microorganismos *Streptomyces eritreus* y *Streptomyces aureofaciens* se contaminan fácilmente y además sufren lisis total poco tiempo después de ser retirados del fermentador (debido a su alta sensibilidad a la falta de un nivel adecuado de oxígeno) aún sin haberlos sometidos a los estudios de mezclado, no son recomendables para estudios en los que se requiera realizar experimentos fuera del bioreactor.
- ◆ Se comprobó que los caldos miceliales estudiados son altamente pseudoplásticos desde el inicio de las fermentaciones, que presentan punto de cedencia a etapas más avanzadas del proceso fermentativo y por los resultados obtenidos se infiere la existencia de viscoelasticidad en los caldos.
- ◆ Los datos reológicos se ajustaron bien al modelo de la ley de la potencia (Ostwald de Waele) con correlaciones ( $r$ ) de  $0.9610 \leq r \leq 0.9996$ . Los parámetros reológicos obtenidos con el dispositivo "vane" resultaron similares a los calculados mediante el sistema de aguja.
- ◆ La técnica del "vane" es un método directo, consistente y efectivo para la determinación del punto de cedencia en suspensiones de microorganismos filamentosos y es especialmente adecuado cuando los fluidos presentan problemas de separación de fases.
- ◆ En general para todos los caldos analizados, el índice de flujo ( $n$ ) decrece al inicio del proceso y más tarde tiende a permanecer constante en valores cercanos a 0.1.

- ◆ El índice de consistencia (K) se incrementa a medida que aumenta la concentración de biomasa, presentando una tendencia similar a la de las cinéticas de crecimiento de los microorganismos.
- ◆ Se comprobó la existencia de punto de cedencia en los caldos analizados. Este parámetro se midió exitosamente mediante una técnica directa que utiliza un pequeño impulsor de cuatro paletas planas "vane". Las tendencias de  $\tau_y$ , observadas a lo largo de las fermentaciones, son similares a las del índice de consistencia.
- ◆ Se observó efecto Weissenberg en algunos de los caldos de *Amycolatopsis mediterranei* (lote 435), lo cual sugiere que estos caldos presentan viscoelasticidad, lo cual es reforzado por el comportamiento observado en las curvas de potencia en la región de  $20 < Re < 100$ . En esta región (régimen transiente) las curvas de potencia presentan un mínimo variable que es dependiente de la viscoelasticidad.
- ◆ La potencia consumida por un solo impulsor es similar a la potencia consumida por cada impulsor de los sistemas duales en condiciones no aireadas a  $Re$  inferiores a 1000, pero por arriba de este valor los impulsores duales consumen menor potencia que la suma de los impulsores utilizados individualmente. Esto se debe seguramente a que cuando se utilizan las combinaciones existen interacciones entre las cavernas formadas alrededor de cada impulsor.
- ◆ Se encontró que las curvas de potencia bajo condiciones no aireadas presentan tendencias similares a las encontradas en caldos de biopolímeros como la goma xantana, excepto en el régimen transiente, en el cual los valores de  $P_o$  para los caldos miceliales fueron inferiores. Esto nos muestra que cuando se utilizan fluidos modelo, estos no simulan completamente las propiedades de los caldos reales.
- ◆ Se observó que bajo condiciones aireadas, los cambios en el flujo de aire solo tienen efectos importantes sobre el consumo de potencia a viscosidades bajas, para los caldos de *Micromonospora* pero no a viscosidades altas. Por el contrario, con los caldos de *Amycolatopsis* el nivel de aireación sí tiene un efecto importante sobre el consumo de potencia a las diferentes viscosidades de los caldos.

## 7. RECOMENDACIONES

Para la realización de futuros trabajos de reología y/o mezclado de caldos de fermentación miceliales es conveniente cuantificar la viscoelasticidad de los caldos.

Realizar los estudios de mezclado ampliando el rango de Reynolds u operando el equipo a velocidades de deformación similares a las que se presentan en los fermentadores de escala industrial, para lo cual es conveniente cambiar la celda de carga del dinamómetro por una más sensible y que mida fuerzas en un rango más amplio.

Estudiar minuciosamente el efecto de las diluciones sobre la reología, analizando con más detalle los cambios morfológicos de las hifas o los cambios en la rigidez de estas así como los probables cambios en la tonicidad del medio.

Variar la separación de los impulsores para establecer la distancia más adecuada para la cual se tenga un mejor aprovechamiento de la potencia suministrada. Así como, estudiar otros tipos de impulsores más adecuados para sistemas viscosos o no-Newtonianos.

En el caso de los caldos miceliales que sufren lisis cuando son retirados del fermentador, sería conveniente probar sistemas de determinación de la reología que puedan ser montados en línea y utilizar sistemas que puedan medir directamente el torque que actúa sobre la flecha.

Utilizar el dispositivo "vane" con un medidor de torque que permita trabajar en un rango más amplio de rapidez de deformación, de tal manera que las determinaciones reológicas se realicen a velocidades de deformación similares a las que experimentan los impulsores en un reactor bioquímico.

Implementar un sistema de adquisición y análisis de datos que realice los cálculos necesarios y que proporcione la información para poder tomar acciones que conlleven a una mejor implementación y planeación de futuros experimentos. De tal manera que el análisis de resultados se podría hacer paralelamente a los experimentos, si bien no de manera total, por lo menos si de manera parcial. Además, esto ayudaría a eliminar el posible error humano.

## 8. LITERATURA CITADA

- Allen, D. G. and Robinson, C. W. (1989) "Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths", **Chem. Eng. Sci.** **45**(1): 37-48.
- Allen, D. G. and Robinson, C. W. (1991) "The prediction of transport parameters in filamentous fermentation broths based on results obtained in pseudoplastic polymer solutions", **Can. J. Chem. Eng.** **69**: 498-505.
- Baker, M. R., Emery, A. N. and Nienow, A. W. (1988) "Mass transfer and power characteristics of a simulated filamentous fermentation broth exhibiting biological activity", **2nd Int. Conf. on Bioreactor Fluid Dynamics**. R. King.(Ed.). BHRA, Cranfield; pp. 79-93.
- Banks, G. T. (1979) "Aeration of mould and *Streptomyces* culture fluids", **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology** **1**: 73-109.
- Björkman, U. (1986) "Properties and principles of mycelial flow: experiments with a tube rheometer", **Biotechnol. Bioeng.** **39**: 114-129
- Buckland, B. C., Gbewonyo, K., DiMasi, D., Hunt, G. Westerfield, G. and Nienow, A. W. (1987) "Improved performance in viscous mycelial fermentations by agitator retrofitting", **Biotechnol. Bioeng.** **31**: 737-742.
- Bongenaar, J.J.T.M., Kossen, N.W.F., Metz, B., y Meijboom, F.W. (1973) "A method for characterizing the rheological properties of viscous fermentation broths", **Biotechnol. Bioeng.** **15**: 201-206.
- Brookfield Engineering Laboratories, Inc. "More solutions to sticky problems: a guide to getting more from your Brookfield viscometer", Technical brochure (no fechado).
- Calderbank, P. H. and Moo-Young, M. B. (1959) "The prediction of power consumption in the agitation of non-Newtonian fluids", **Trans. Instn. Chem. Engrs.** **37**: 26-33.
- Charles, M. (1978) "Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures", **Adv. Biochem. Eng.** **8**: 1-62.

- Cooke, M. and Middleton, J. C. (1988) "Mixing and mass transfer in filamentous fermentations", **2nd Int. Conf. on Bioreactor Fluid Dynamics**. R. King.(Ed.), BHRA, Cranfield; pp. 37-63.
- Dzuy, N. Q. and Boger, D. V. (1983) "Yield stress measurement for concentrated suspensions", **J. Rheology** **27**(4): 321-349.
- Fatle, I. A. (1985) "Rheological characteristics of suspensions of *A. niger*: correlation of rheological parameters with microbial concentration and shape of the mycelial aggregate", **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **21**: 60-64.
- Galindo, E., Nienow, A. W. and Badham, R. S. (1988) "Mixing of simulated xanthan gum broths", **2nd Int. Conf. on Bioreactor Fluid Dynamics**. R. King.(Ed.). BHRA, Cranfield; pp. 65-78.
- Galindo, E., Torrestiana, B. and García-Rejón, A. (1989) "Rheological characterization of xanthan fermentation broths and their reconstituted solutions", **Bioprocess Eng.** **4**: 113-118.
- Gavrilescu, M., Román, R. V. and Efimov, V. (1992) "Rheological behavior of some antibiotic biosynthesis liquids", **Acta Biotechnol.** **12**(5): 383-396.
- Ghildyal, N.P., Thakur, M.S., Srikanta, S., Jaleel, S.A., Propulla, S.G., Prasad, M.S. Devi, P.N. and Lonsane, B.K. (1987) "Rheological studies on *Streptomyces fradiae* ScF-5 in submerged fermentation", **J. Chem. Tech. Biotechnol.** **38**: 221-234.
- Hannote, M., Flores, F., Torres, L. and Galindo, E. (1991) "Apparent yield stress estimation in xanthan gum solutions and fermentation broths using a low-cost viscometer", **Chem. Eng. J.** **45**: B49-B45.
- Kemblowski, Z. and Kristiansen, B. (1986) "Rheometry of fermentation liquids", **Biotechnol. Bioeng.** **28**: 1474-1483.
- Kim, J. H., Lebeault, J. M. and Reuss M. (1983) "Comparative study on rheological properties of mycelial broth in filamentous and pelleted forms", **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** **18**: 11-16.

- Kim, E. Y. and Yoo, Y. J. (1992) "Analysis of broth rheology with cell morphology in *Cephalosporium* fermentation", **Biotech. Techniques** 6(6): 501-506.
- Kristiansen, B. and Olsvik, E. S. (1993) "Rheology of filamentous fermentation broths", **J. Chem. Tech. Biotechnol.** 53: 207-209
- Leong-Poi, L. and Allen, D. G. (1992) "Direct measurement of the yield stress of filamentous fermentation broths with the rotating vane technique", **Biotechnol. Bioeng.** 40: 403-412.
- Margaritis, A. and Pace, G. W. (1985) "Microbial polysaccharides", In: **Comprehensive Biotechnology**, M. Moo-Young (Ed.) Pergamon Press Vol. 3, Cap. 49: 1005-1044.
- Metz, B., Kossen, N. W. F. and van Suijdam, J. C. (1979) "The rheology of mould suspensions", **Adv. Biochem. Eng.** 11: 103-156.
- Metzner, A. B. and Otto, R. E. (1957) "Agitation of non-Newtonian fluids", **A.I.Ch.E. J.**, 3: 3-10.
- Mitard, A. and Riba, J. P. (1986) "Rheological properties of *A. niger* pellet suspensions", **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 25: 245-249.
- Moo-Young, M., Harlad, B., Allen, D. G., Burell, R. and Kawase Y. (1987). "Oxygen transfer of mycelial fermentation broths in an airlift fermentor", **Biotechnol. Bioeng.** 30: 746-753.
- Nienow, A. W., and Elson, T.P. (1988) "Aspecte of mixing in rheologically complex fluids", **Chem. Eng. Res. Des.** 66: 5-15.
- Nienow, A. W., Wisdom, D. J., Solomon, J., Machon, V. and Vlack, J. (1983) "The effect of rheological complexities on power consumption in an aerated, agitated vessel", **Chem. Eng. Commun.** 19: 273-293.
- Nienow, A. W. and Ulbrecht J. J. (1985) "Gas-liquid mixing and mass transfer in high viscosity liquids", In: **Mixing of liquids by mechanical agitation. Chap. 6.** J. J. Ulbrecht and G. K. Patterson, N. Y. (Eds), Gordon and Breach, pp. 203-237.
- Nienow, A. W. (1990) "Agitators for mycelial fermentations", **Trends Biotechnol.** 8: 224-233.

- Oliver, D. R., Nienow, A. W., Mltson, R. J. and Terry, K. (1984) "Power consumption in the mixing of Boger fluids", **Chem. Eng. Res. Des.** **62**: 123-127.
- Oolman, T., Walitza, E. and Chmiel, H. (1987) "Transport phenomena in gas-sparged bioreactor" **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **506**: 583-589.
- Olsvik, E. and Kristiansen, B. (1992) "On-line rheological measurements and control in fungal fermentations", **Biotechnol. Bioeng.** **40**: 375-387.
- Olsvik, E., Tucke, K.G., Thomas, C.R. and Kristiansen, B. (1993) "Correlation of *Aspergillus niger* broths rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates", **Biotechnol. Bioeng.** **42**:1046-1052.
- Özcan, N. G., Decloux, M. and Bruxelmane, M. (1988) "Power characteristics of agitated and aerated viscous fluids" In: **Procc. 6th European Conference on Mixing**, Pavia, Italy, 361-367
- Özcan, N. G., Decloux, M. and Bruxelmane, M. (1990) "Effect of viscosity on cavity formation and power characteristics of an agitated aerated Newtonian fluid", **Trans. Inst. Chem. Eng.** **68(A)**: 63-68.
- Özcan, N. G. and Nienow, A. W. (1991) "Viscoelastic effects on power consumption and cavity formation in mechanically agitated vessels" , In: **Procc. 7th European Congress on Mixing**, Brugge, Belgium, p. 359-366.
- Prud'homme, R. K. and Shaqfeh, E. (1984) "Effect of elasticity on mixing torque requirements for Rushton turbine impellers", **AIChE J.** **30(1)**: 485-486.
- Reséndiz, R., Martínez, A. Ascanio, G. and E. Galindo (1991) "A new pneumatic bearing dynamometer for power-input measurement in stirred tanks", **Chem. Eng. Technol.** **14**: 105-108.
- Reuss, M. (1980) "Power consumption and gas-liquid mass transfer in stirred tank fermenters with Newtonian and non-Newtonian fermentation fluids", In: **Conf. Chem. Eng.**, Lodz, Polen, Matrialy Konferencyjne, Szesc II, 382-389.

- Reuss, M., Debus, D. and Zoll, G. (1982) "Rheological properties of fermentation fluids", **Chem. Eng.** **381**: 233-236.
- Rushton, J. H., Costich, E. W. and Everett, H. J. (1956) "Power characteristics of mixing impellers, Part I". **Chem. Eng. Prog.**, **46**(8): 395-404.
- Rieger, F. and Novák, V. (1974) "Power consumption for agitating viscoelastic liquids in the viscous regime", **Trans. Instn. Chem. Engrs.** **52**: 285-286.
- Sánchez, A., Martínez, A., Torres, L. and Galindo, E. (1992) "Power consumption of three impeller combinations in mixing xanthan fermentation broths", **Process Biochem.** **27**: 351-365.
- Skelland (1967), en: Charles, M. (1978) "Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures", **Adv. Biochem. Eng.** **8**: 1-62.
- Smith, J. and Kristiansen, B. (1993) "Recent developments in fungal bioprocessing", **J. Chem. Tech. Biotechnol.** **56**: 203-204.
- Solomon, J., Elson, T. P., Nienow, A. W. and Pace, G. W. (1981) "Cavern sizes in agitated fluids with a yield stress", **Chem. Eng. Commun.** **11**: 143-164.
- Thomas, C.R. (1993) "Image analysis of filamentous fermentation broths", **J. Chem. Tech. Biotechnol.** **56**: 204-207.
- Torrestiana, B., Galindo, E., Xue-Ming, Z. and Nienow, A. W., (1991) "In fermenter power measurement during a xanthan gum fermentation compared with non-fermentative studies", **Trans. Instn. Chem. E.**, **69**: 149-155.
- Tuffile, C. M., and Pinho F. (1970) "Determination of oxygen-transfer coefficients in viscous *Streptomyces* fermentations", **Biotechnol. Bioeng.** **12**: 849-871

# ANEXOS

## ÍNDICE DE ANEXOS

No.		Pág.
	Índice de figuras de los anexos	ii
I	Reogramas y gráficas de potencia complementarios para los caldos de <i>Micromonospora purpurea</i> y <i>Amycolatopsis mediterranei</i> para diferentes edades de los cultivos	iv
II	Ejemplo del cálculo de k y n utilizando el viscosímetro Brookfield con el dispositivo "vane" y con la aguja #1	xix
III	Velasco, D., Martínez, A., Torres, L.G. and Galindo, E. (1993) "Rheology and dual impeller mixing of an industrial fermentation broth containing <i>Micromonospora purpurea</i> " In: <b>Proc. 3rd Int. Conf. Bioreactor Fluids Dynamics</b> , A.W. Nienow (Ed.), BHR Group Limited, Cranfield, p. 101-116.	xxv
IV	David Velasco, Alfredo Martínez and Enrique Galindo. "Hydrodynamics of industrial fermentations: rheology and power drawn in rifamycin production", <b>AIChE Symposium series</b> (en prensa).	xlii

## ÍNDICE DE FIGURAS DEL ANEXO I

No.		Pág.
I.1	Reogramas para caldos de <i>M. purpurea</i> generados a partir de datos obtenidos en: la planta y el laboratorio, con el dispositivo "vane". Edades de 1 a 75 h	v
I.2	Reogramas para caldos de <i>M. purpurea</i> generados a partir de datos obtenidos en: la planta y el laboratorio con el dispositivo "vane". Edades de 98 a 170 h	vi
I.3	Reogramas para caldos de <i>A. mediterranei</i> generados a partir de datos obtenidos en: la planta y el laboratorio con el dispositivo "vane". Edades de 20 a 139 h	vii
I.4	Reogramas para caldos de <i>A. mediterranei</i> (lote 454) generados a partir de datos obtenidos en: la planta y el laboratorio con el dispositivo "vane". Edades de 20 a 158 h	viii
I.5	Relación Pg/P en función del Re para caldos de <i>M. purpurea</i> (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo. Utilizando la combinación de impulsores 2TR	ix
I.6	Relación Pg/P en función del Re para caldos de <i>M. purpurea</i> (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo. Utilizando la combinación de impulsores 2TR	x
I.7	Relación Pg/P en función de Re para caldos de <i>M. purpurea</i> (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo. Usando la combinación de impulsores TR-TPI	xi
I.8	Relación Pg/P en función de Re para caldos de <i>M. purpurea</i> (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo. Usando la combinación de impulsores TR-TPI	xii
I.9	Relación Pg/P en función de Re para caldos de <i>M. purpurea</i> (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo. Usando la combinación de impulsores TR-IM	xiii

- I.10 Relación Pg/P en función de Re para caldos de *M. purpurea* (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo. Usando la combinación de impulsores TR-IM xiv
- I.11 Relación Pg/P en función de Re para caldos de *A. mediterranei* (lote 435) a diferentes niveles de aireación para 20 h del cultivo. Utilizando los impulsores: TPI, TR, 2TR y TR-TPI xv
- I.12 Relación Pg/P en función de Re para caldos de *A. mediterranei* (lote 435) a diferentes niveles de aireación para 45 h del cultivo. Utilizando los impulsores: TPI, TR, 2TR y TR-TPI xvi
- I.13 Relación Pg/P en función de Re para caldos de *A. mediterranei* (lote 435) a diferentes niveles de aireación para 67 h del cultivo. Utilizando los impulsores: TPI, TR, 2TR y TR-TPI xvii
- I.14 Relación Pg/P en función de Re para caldos de *A. mediterranei* (lote 435) a diferentes niveles de aireación para 139 h del cultivo. Utilizando los impulsores: TPI, TR, 2TR y TR-TPI xviii
- I.15 Curvas para determinar el torque máximo mediante el dispositivo "vane" generadas mediante un graficador conectado al viscosímetro Brookfield xxiii
- II.1 Gráfica para obtener los valores de n y K, utilizando el dispositivo "vane" xxi
- II.2 Gráfica para obtener los valores de n y K, utilizando la aguja #1 xxiii

## **Anexo I**

**Reogramas y gráficas de potencia complementarios para los caldos de *Micromonospora purpurea* y *Amycolatopsis mediterranei* para diferentes edades de los cultivos**

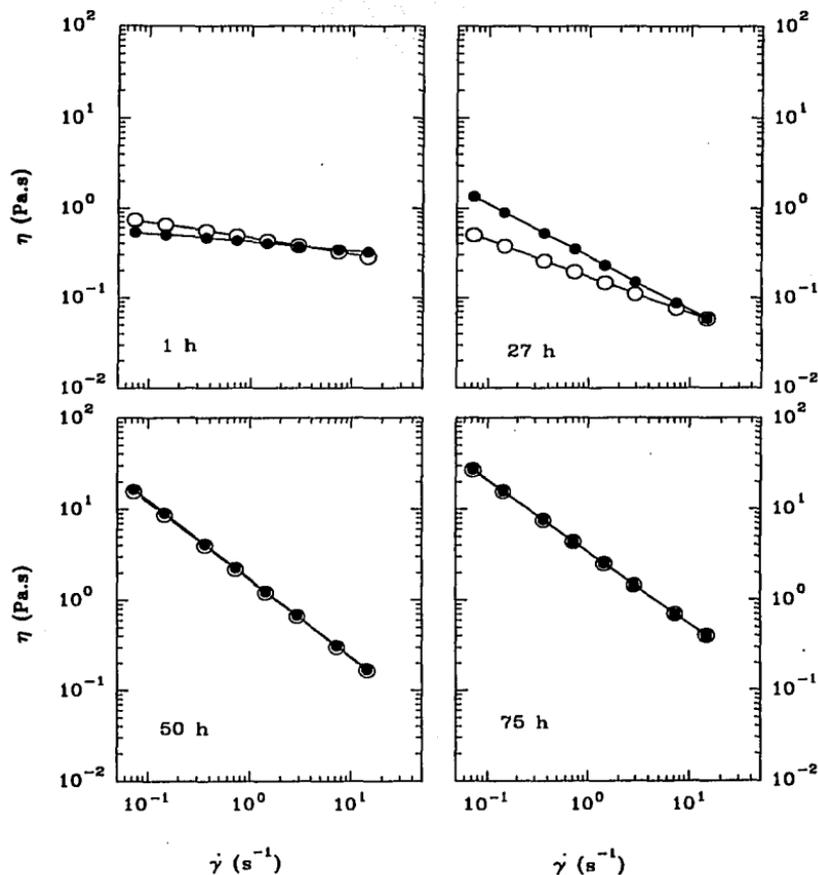
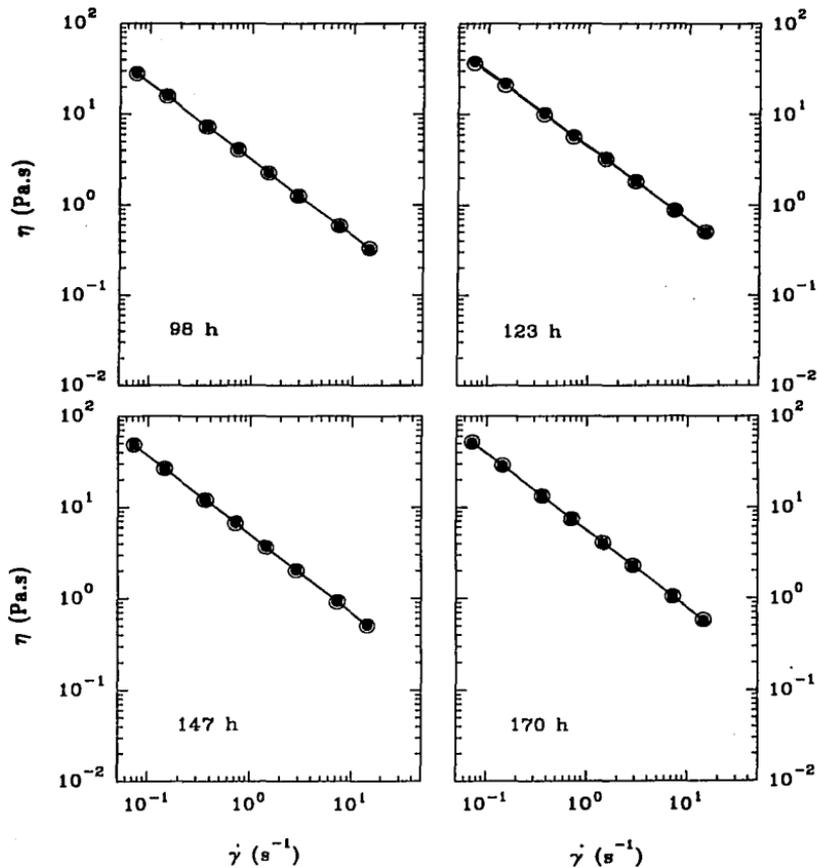
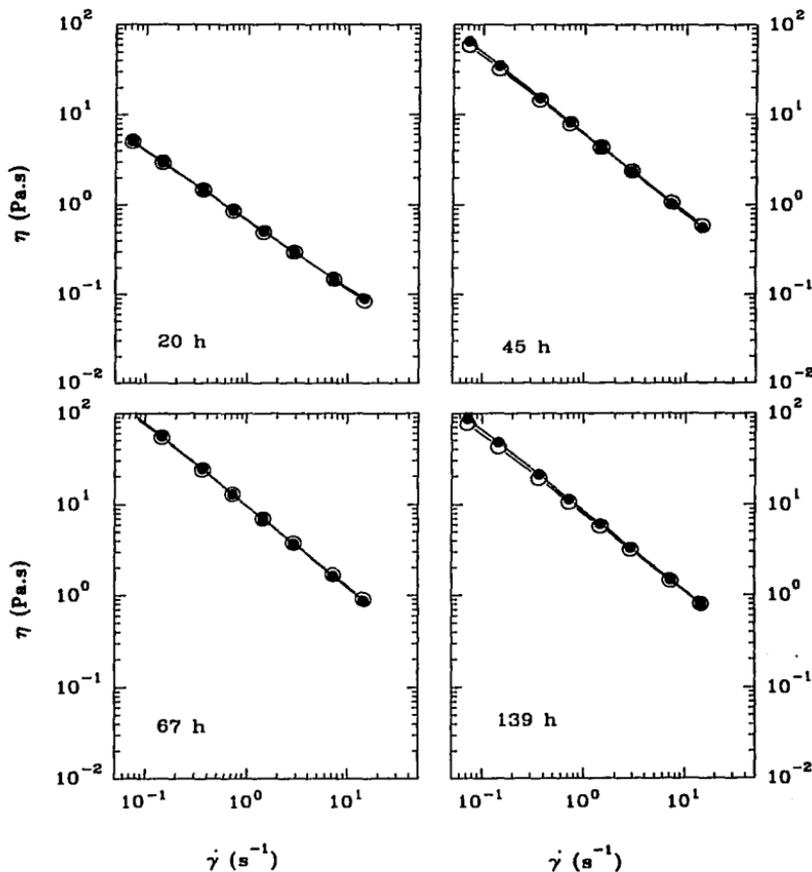


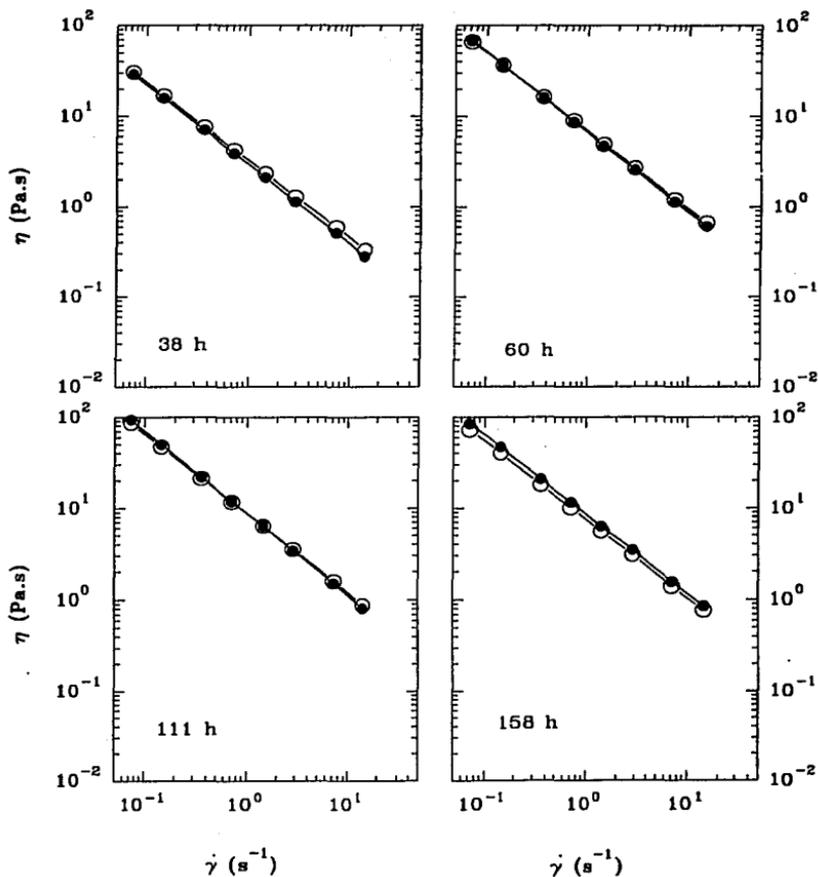
Figura I.1. Reogramas para caldos de *M. purpurea* generados a partir de datos obtenidos en: ( $\circ$ ) la planta y ( $\bullet$ ) el laboratorio, con el dispositivo "vane". Edades de 1 a 75 h.



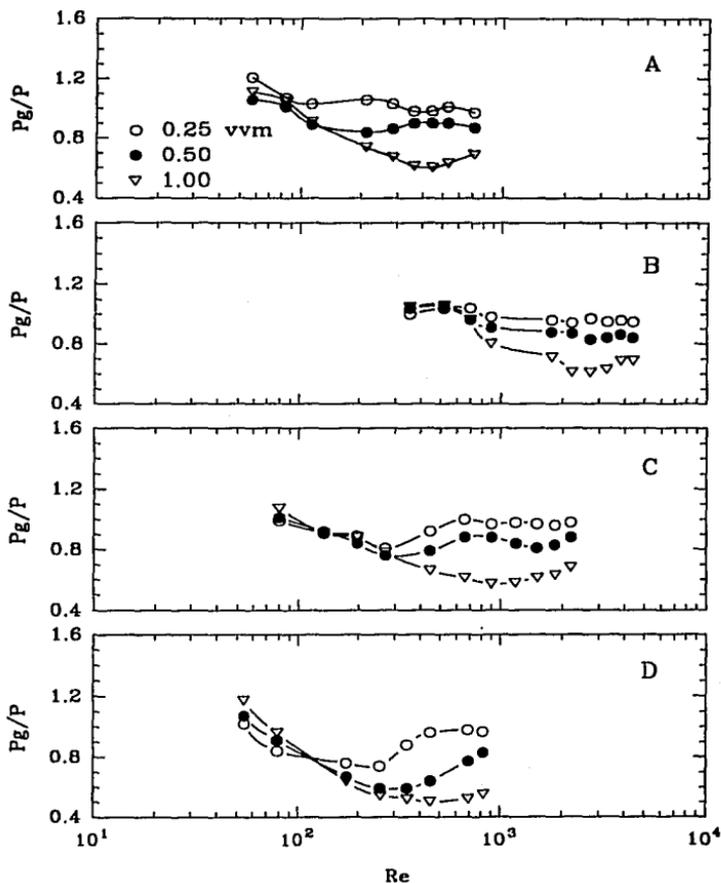
**Figura I.2.** Reogramas para caldos de *M. purpurea* generados a partir de datos obtenidos en: (○) la planta y (●) el laboratorio con el dispositivo "vane". Edades de 98 a 170 h.



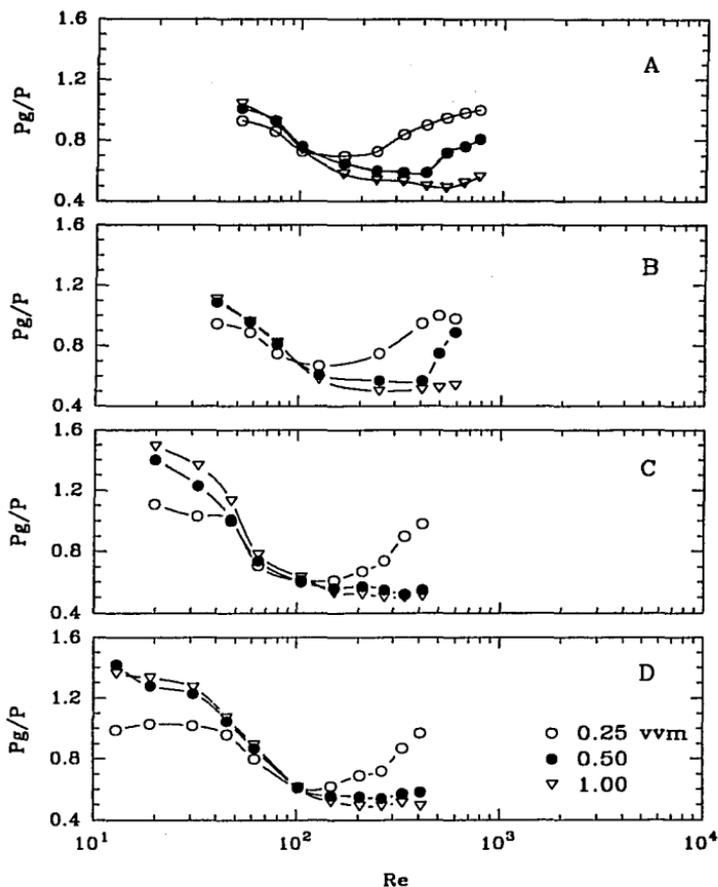
**Figura 1.3.** Reogramas para caldos de *A. mediterranei* generados a partir de datos obtenidos en: (○) la planta y (●) el laboratorio con el dispositivo "vane". Edades de 20 a 139 h.



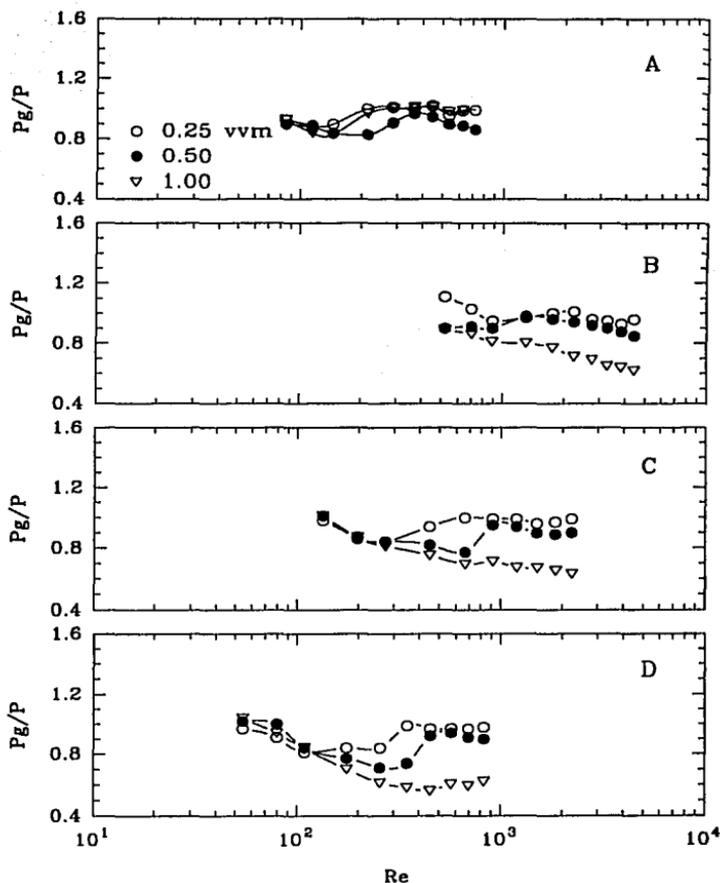
**Figura I.4.** Reogramas para caldos de *A. mediterranei* (lote 454) generados a partir de datos obtenidos en: (○) la planta y (●) el laboratorio con el dispositivo "vane". Edades de 20 a 158 h.



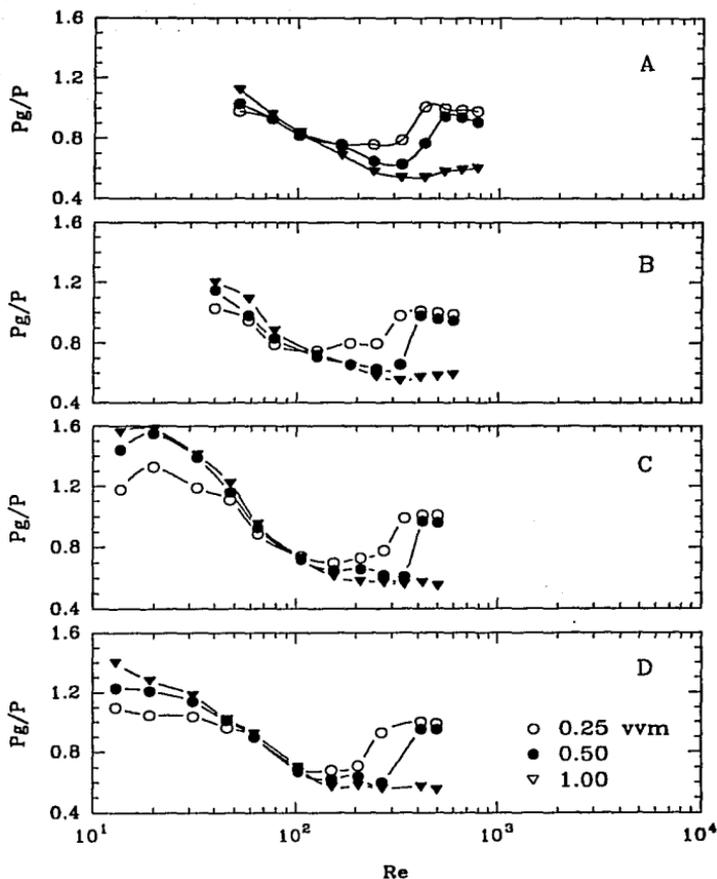
**Figura 1.5.** Relación  $Pg/P$  en función del  $Re$  para caldos de *M. purpurea* (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo en h: A) 1, B) 27, C) 50 y D) 75. Utilizando la combinación de impulsores 2TR.



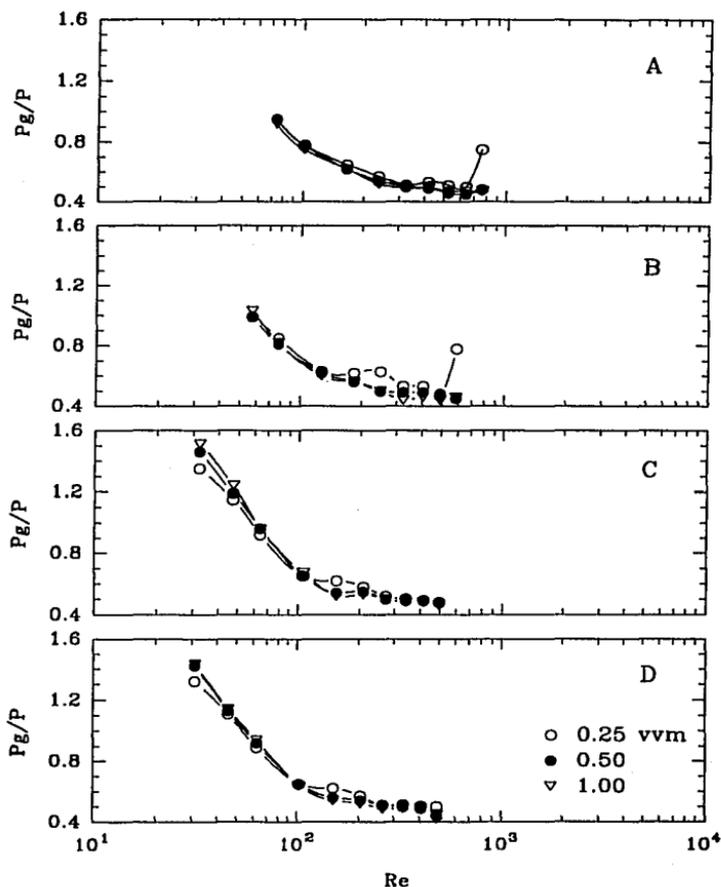
**Figura I.6.** Relación  $P_g/P$  en función del  $Re$  para caldos de *M. purpurea* (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo en h: A) 98, B) 123, C) 147 y D) 170. Utilizando la combinación de impulsores 2TR.



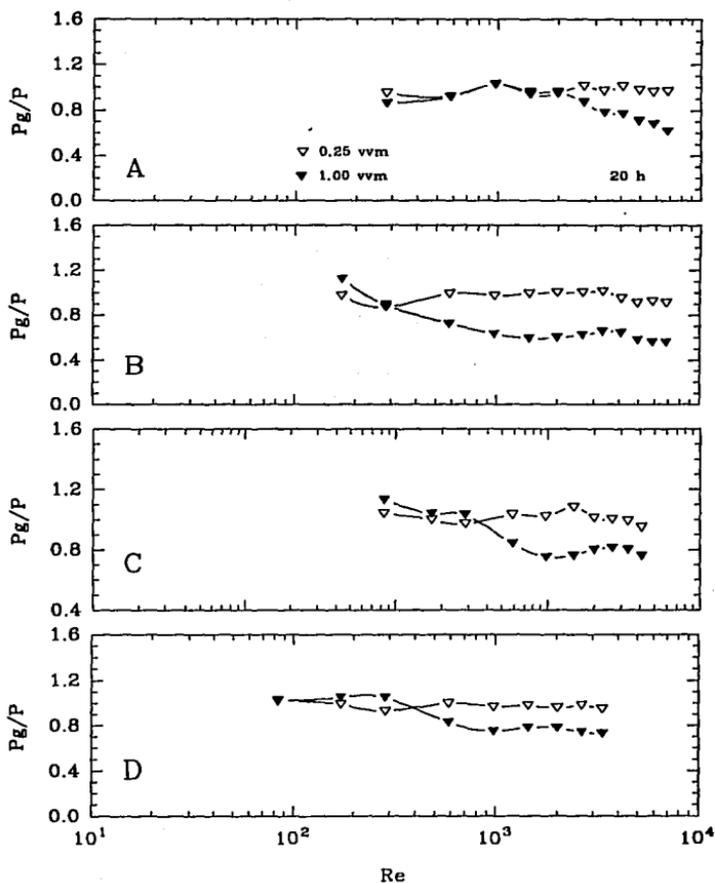
**Figura 1.7.** Relación  $P_g/P$  en función de  $Re$  para caldos de *M. purpurea* (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo en h: A) 1, B) 27, C) 50 y D) 75. Usando la combinación de impulsores TR-TPI.



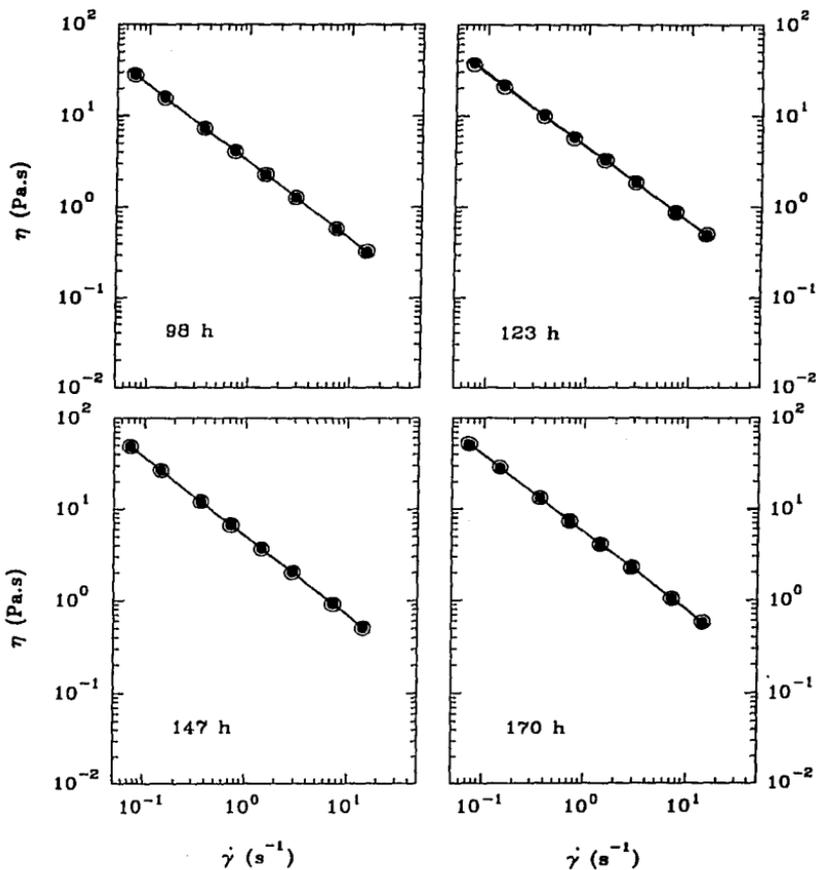
**Figura 1.8.** Relación  $P_g/P$  en función de  $Re$  para caldos de *M. purpurea* (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo en h: A) 98, B) 123, C) 147 y D) 170. Usando la combinación de impulsores TR-TPI.



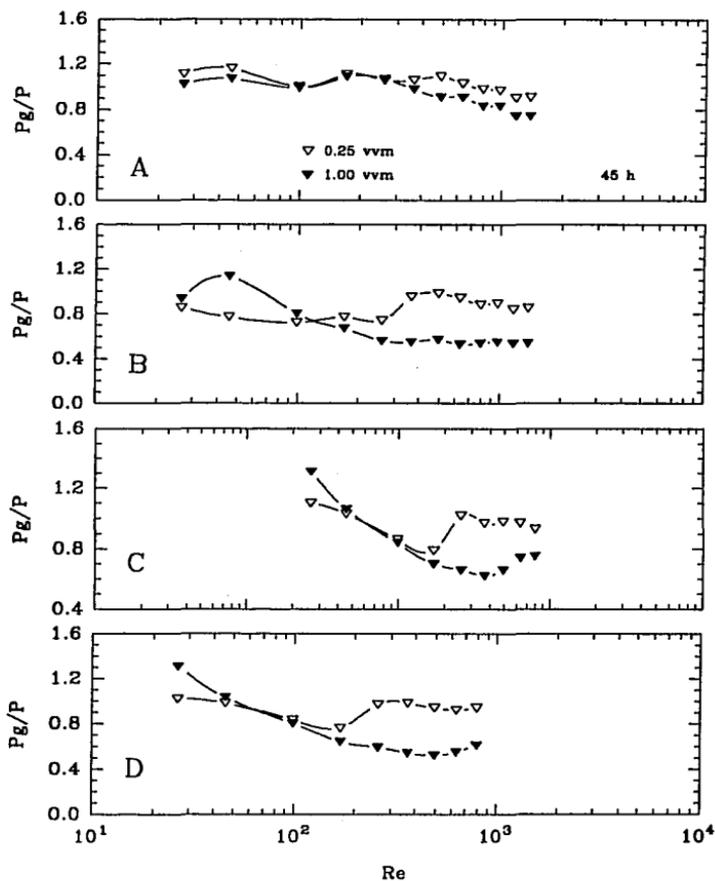
**Figura 1.9.** Relación  $P_g/P$  en función de  $Re$  para caldos de *M. purpurea* (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo en h: A) 1, B) 27, C) 50 y D) 75. Usando la combinación de impulsores TR-IM.



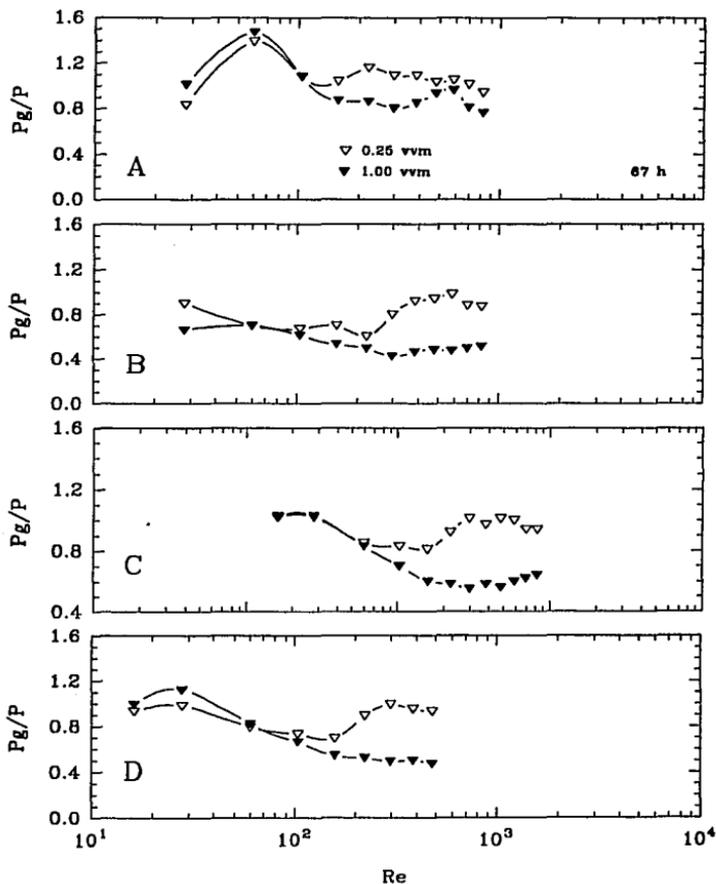
**Figura 1.10.** Relación Pg/P en función de Re para caldos de *M. purpurea* (lote 1125) a diferentes niveles de aireación y diferentes edades del cultivo en h: A) 98, B) 123, C) 147 y D) 170. Usando la combinación de impulsores TR-IM.



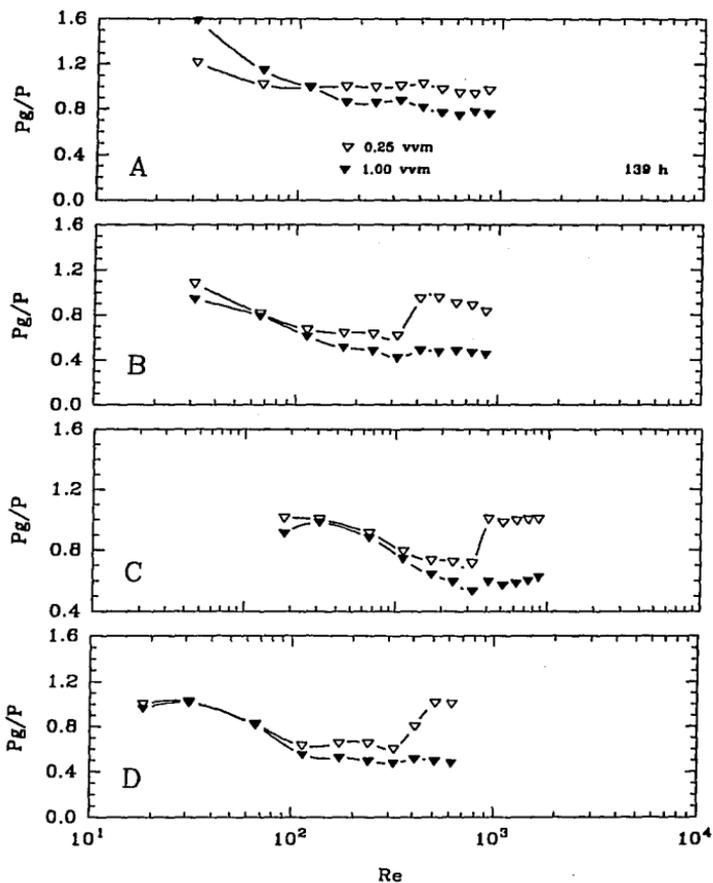
**Figura I.11.** Relación  $Pg/P$  en función de  $Re$  para caldos de *A. mediterranei* (lote 435) a diferentes niveles de aireación para 20 h del cultivo. A) TPI, B) TR, C) 2TR y D) TR-TPI.



**Figura I.12.** Relación  $P_g/P$  en función de  $Re$  para caldos de *A. mediterranei* (lote 435) a diferentes niveles de aireación para 45 h del cultivo. A) TPI, B) TR, C) 2TR y D) TR-TPI.



**Figura 1.13.** Relación  $P_g/P$  en función de  $Re$  para caldos de *A. mediterranei* (lote 435) a diferentes niveles de aireación para 67 h del cultivo. A) TPI, B) TR, C) 2TR y D) TR-TPI.



**Figura I.14.** Relación  $P_g/P$  en función de  $Re$  para caldos de *A. mediterranei* (lote 435) a diferentes niveles de aireación para 139 h del cultivo. A) TPI, B) TR, C) 2TR y D) TR-TPI.

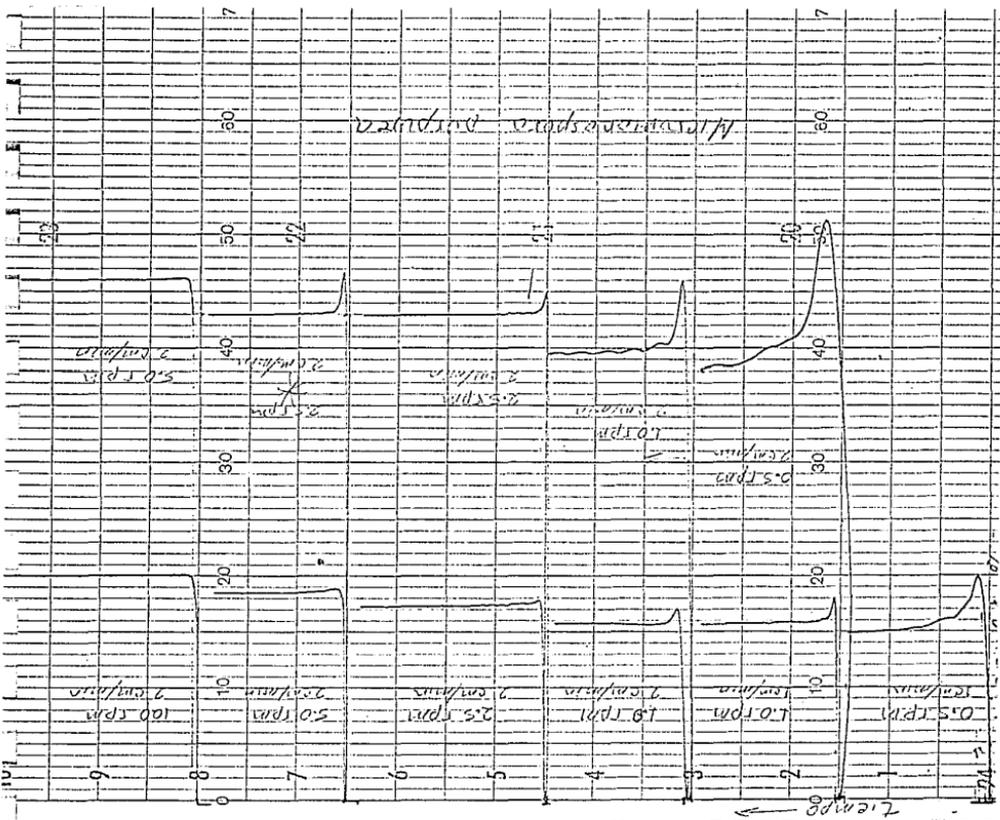


Figura 1.15. Curvas para determinar el torque máximo mediante el dispositivo "vane" generadas mediante un graficador conectado al viscosímetro Brookfield.

## **Anexo II**

**Ejemplo del cálculo de  $k$  y  $n$  utilizando el viscosímetro Brookfield con el dispositivo "vane" y con la aguja #1**

## ANEXO II. EJEMPLO DEL CÁLCULO DE K Y n UTILIZANDO EL VISCOSÍMETRO BROOKFIELD CON EL DISPOSITIVO "VANE" Y CON LA AGUJA #1

### A. Ejemplo del cálculo utilizando el dispositivo "vane"

El dispositivo "vane" tiene las siguientes constantes:

$$\begin{aligned} K_s &= 8.7 \\ c &= 224 \\ Dv &= 0.0375 \text{ m} \\ Cv &= 5.7496 \times 10^{-3} \end{aligned}$$

Para realizar los cálculos se utilizarán los siguientes datos:

Dato No.	N (s <sup>-1</sup> )	Lectura
1	0.0083	9.0
2	0.0167	9.5
3	0.0417	9.8
4	0.0833	11.3
5	0.1667	11.8
6	0.3333	13.4
7	0.8333	16.7
8	1.6667	19.1

Mediante la ecuación 4.11 calcularemos  $\bar{\gamma}$ : ( $\bar{\gamma}=k_s \cdot N$ ), mediante la ecuación 4.15 obtendremos

$$\bar{\tau}: \left( \bar{\tau} = \frac{2\pi \cdot k_s \cdot M}{c \cdot Dv^3} \right), \text{ y el torque es } M = \text{Lectura} \cdot Cv / 100.$$

$$\bar{\gamma}_1 = 8.7 \cdot 0.0083 = 0.0725$$

$$\bar{\gamma}_2 = 8.7 \cdot 0.0167 = 0.14500$$

$$\bar{\gamma}_3 = 8.7 \cdot 0.0417 = 0.3625$$

$$\bar{\gamma}_4 = 8.7 \cdot 0.0833 = 0.725$$

$$\bar{\gamma}_5 = 8.7 \cdot 0.1667 = 1.450$$

$$\bar{\gamma}_6 = 8.7 \cdot 0.3333 = 2.90$$

$$\bar{\gamma}_7 = 8.7 \cdot 0.8333 = 7.25$$

$$\bar{\gamma}_8 = 8.7 \cdot 1.6667 = 14.50$$

$$\bar{\tau} = (2 \cdot 3.1416 \cdot 8.7 \cdot 9.0 \cdot 5.7496 \times 10^{-3}) / (224 \cdot 100 \cdot 0.0375^3) = 2.3946$$

$$\bar{\tau} = (0.2661) \cdot 9.5 = 2.5300$$

Se repite el cálculo sustituyendo el 9.5 por las otras lecturas del equipo... hasta obtener los valores mostrados en la tabla siguiente:

Dato No.	$\bar{\gamma}$	$\bar{\tau}$
1	0.0725	2.395
2	0.1450	2.530
3	0.3625	2.610
4	0.7250	3.007
5	1.4500	3.140
6	2.9000	3.565
7	7.2500	4.443
8	14.5000	5.082

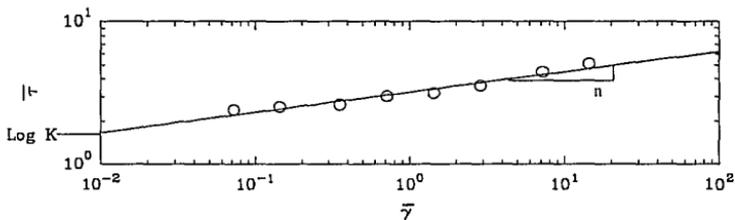
Aplicando la ley de la potencia:  $\tau = K \cdot \bar{\gamma}^n$  y mediante el uso de logaritmo, tenemos que:

$$\text{Log}(K \cdot \bar{\gamma}^n)$$

Rearreglando:

$\text{Log } \bar{\tau} = \text{Log } K + n \cdot \text{Log } \bar{\gamma}$  que es la ecuación de una línea recta. Graficando  $\text{Log } \bar{\tau}$  en función de  $\text{Log } \bar{\gamma}$  se obtiene una línea recta cuya pendiente es  $n$  y el antilogaritmo de la ordenada al origen es  $K$  como se ve en la figura II.1.

En el presente ejemplo, los valores de  $n$  y  $K$  son 0.143 y 3.223 respectivamente



**Figura II.1.** Gráfica que nos ayuda a obtener el valor de  $n$  y  $K$ , utilizando el dispositivo "vane".

**B. Ejemplo del cálculo utilizando la aguja #1**

La aguja #1 tiene las siguientes constantes:

$$R = 0.009421 \text{ m}$$

$$L = 0.07493 \text{ m}$$

$$C_v = 5.7496 \times 10^{-3}$$

Los datos a procesar son los siguientes:

Dato No.	N (s <sup>-1</sup> )	Lectura
1	0.0083	2.0
2	0.0167	2.0
3	0.0417	2.2
4	0.0833	3.3
5	0.1667	3.6
6	0.3333	4.1
7	0.8333	5.5
8	1.6667	6.0

Utilizando la ecuación 4.16:

$$\tau = \left( \frac{\text{Lectura}}{100} \right) \cdot \left( \frac{C_v}{2\pi \cdot R^2 \cdot L} \right),$$

la ecuación 4.19:

$$\tau = K \left( \frac{2}{n} \right)^n \cdot \omega^n$$

y la ecuación 4.5:

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot N$$

Aplicando logaritmos a la ecuación 4.19, tenemos:

$$\text{Log } \tau = \text{Log} (K(2/n)^n \cdot \omega^n)$$

y reordenando se obtiene:

$$\text{Log } \tau = \text{Log} (K(2/n)^n) + n \cdot \text{Log } \omega$$

la cual es la ecuación de una línea recta.

Se calcula  $\tau$  sustituyendo valores en la ecuación 4.16:

$$\tau_1 = (2.0 * 0.0057496) / (100 * 2 * 3.1416 * 0.009421^2 * 0.07493) = 2.752 \text{ N/m}^2$$

se repite el cálculo para los demás datos (el único valor que cambia es el de la lectura del equipo, ya que todo lo demás es una constante:

$$\tau = 1.376 * \text{Lectura}$$

$$\tau_3 = 1.376 * 2.2 = 3.027 \text{ N/m}^2$$

El otro parámetro a calcular es  $\omega$ .

$$\omega = 2 * \pi * N$$

$$\omega = 6.2832 * N$$

$$\omega_1 = 6.2832 * 0.0083 = 0.05236 \text{ s}^{-1}$$

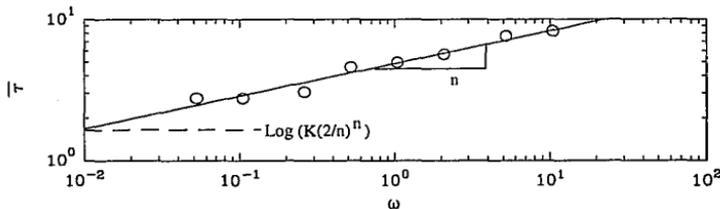
$$\omega_2 = 6.2832 * 0.0167 = 0.10472 \text{ s}^{-1}$$

este mismo cálculo se repite para todos los datos hasta completar la tabla de abajo.

Dato No.	$\tau$	$\omega$
1	2.752	0.05236
2	2.752	0.10472
3	3.027	0.26180
4	4.541	0.52360
5	4.953	1.04720
6	5.641	2.09439
7	7.568	5.23599
8	8.256	10.47193

Haciendo una gráfica de  $\text{Log } \tau$  en función de  $\text{Log } \omega$ , se obtiene una línea recta cuya pendiente es  $n$  y de la ordenada al origen que es  $\text{Log } (K(2/n)^n)$ , se obtiene el valor de  $K$ , como se muestra en la figura II.2.

En este ejemplo los valores de  $n$  y  $K$  son 0.23 y 2.96 respectivamente.



**Figura II.2.** Gráfica que nos ayuda a obtener el valor de  $n$  y  $K$ , utilizando la aguja #1.

### ANEXO III

Velasco, D., Martínez, A., Torres, L.G. and Galindo, E. (1993) "Rheology and dual impeller mixing of an industrial fermentation broth containing *Micromonospora purpurea*" In: **Proc. 3rd Int. Conf. Bioreactor Fluids Dynamics**, A.W. Nienow (Ed.), BHR Group Limited, Cranfield, p. 101-116.

3RD INTERNATIONAL CONFERENCE ON  
**Bioreactor and  
Bioprocess Fluid Dynamics**

*Edited by A W Nienow*

---

**BHR Group Conference Series  
Publication No. 5**

---

Papers presented at the *3rd International Conference on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics*, organized and sponsored by BHR Group Limited, and held in Cambridge, UK, on 14-16 September 1993



**Mechanical Engineering Publications Limited  
LONDON**

# RHEOLOGY AND DUAL IMPELLER MIXING OF AN INDUSTRIAL FERMENTATION BROTH CONTAINING *Micromonospora purpurea*.

David Velasco, Alfredo Martínez, Luis G. Torres  
and Enrique Galindo

Depto. de Bioingeniería  
Instituto de Biotecnología  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Mor., 62271, México.

## Abstract

Fermentation broths containing filamentous microorganisms show strong non-Newtonian characteristics. The broth becomes highly viscous and pseudoplastic as fermentation evolves. In this study, an industrial fermentation broth containing *Micromonospora purpurea* was used. The broth was provided by a local gentamycin manufacturer. Power consumption studies were performed in a 0.01 m<sup>3</sup> stirred tank mounted on a pneumatic bearing dynamometer. Two impeller combinations were used: two Rushton turbines (R+R) and a Rushton turbine together with a six 45° pitched-blades turbine pumping upwards (R+P), the latter as the upper impeller. Both combinations had a D/T ratio of about 0.53. The rheological data obtained with a Brookfield (spindle) viscometer were in agreement with results from a turbine (vane) impeller system. No phase separation occurred during the rheological measurements. This broth exhibited pseudoplastic behaviour from the early stages of the fermentation and showed yield stress towards the end of the culture. The broth's rheology data fitted well the power law model ( $\tau = K\dot{\gamma}^n$ ). The flow behaviour index (n) dropped at the beginning of culture (40 h) and remained relatively constant ( $n \approx 0.28$ ) later on. The consistence index (K) was higher as fermentation evolved (from 0.1 to 5.5 Pa.s<sup>n</sup>). Plots of  $P_o$ ,  $P_{og}$ , and  $P_g/P$  versus  $Re$  were made at various culture ages. Non-gassed data in the turbulent regime were in good agreement with those reported in the literature for xanthan gum broths. In the transition regime ( $30 < Re < 70$ ) lower  $P_o$  values were observed if compared with those for xanthan broths. For high viscosity broths there were no important differences in the power drop due to aeration under several aeration rates for both impeller combinations. The power drop was more drastic for (R+R) than for (R+P). Under gassed conditions (with a similar apparent viscosity), the power drop observed in mycelial broths was less drastic ( $P_g/P_{ain(R+R)} \approx 0.49$  and  $P_g/P_{ain(R+P)} \approx 0.51$ ) than those found in xanthan gum broths. This likely occurs because the mycelial broth has a yield stress considerably lower than that of the xanthan gum broths. Viscoelasticity can also be playing a role.

## INTRODUCTION

Several secondary metabolism products such as antibiotics and enzymes are manufactured by fermentation processes involving mycellal microorganisms. Moulds which grow in filamentous form consist of solid particles having a high length/diameter ratio and branching. This morphology results in highly viscous and rheologically complex suspensions, even at low biomass concentrations. Mycellal fermentations show pronounced changes in broth rheology as the fermentation evolves. This is due to changes in biomass concentration and changes in hyphae morphology. There is a good<sup>1-10</sup> number of papers reporting rheological data of mycellal broths. Some of these publications have addressed the problems of rheological characterization of mycellal broths and a range of techniques have been used. For those broths showing phase separation and aggregates destruction, conventional rheological techniques such as the use<sup>3,11</sup> of cone and plate or concentric cylinders are not suitable. Alternatively, impellers of various geometries (turbine<sup>1</sup>, helicoidal<sup>5</sup>, vane<sup>9</sup>) and pipe rheometers<sup>10,12,13</sup> have been successfully used. Recently, Gavrilescu et al<sup>4</sup> have published a comprehensive set of rheological data for a number of antibiotic fermentation broths.

High viscosity and the non-Newtonian nature of the broth leads to mixing problems associated with the appearance of bad mixed or dead zones causing substrate gradients within the reactor and oxygen starvation. The non-Newtonian flow behaviour is very important in determining the performance of bioreactors; nevertheless, there is relatively few information on this matter, particularly on mixing studies. Furthermore, because of the difficulty in performing mixing and rheological studies during actual fermentations, the instability of some of such broths, and the limited availability of real industrial broths, most of the mixing studies have been conducted by using model fluids that simulate some of their rheological properties rather than with actual broths.

Mixing studies where mycellal fermentation broths have been used are very limited in the literature. Taguchi and Miyamoto<sup>15</sup> reported power data for a broth containing *Endomyces*. There are works<sup>16-18</sup> using model fluids and/or "simulated broths". Cooke et al<sup>16</sup> have reported a mixing study using a variety of impeller geometries in a simulated broth prepared with paper fibre suspensions. Baker et al<sup>17</sup> used alginate fibers containing immobilized cells of *Pseudomonas putida* in order to simulate the behaviour of a mycellal broth of *Aspergillus foetidus*. The fibers simulated the hyphae morphology while the bacteria acted as the oxygen sink. These authors found that both systems were pseudoplastic, although the mycellal suspension was more shear-thinning than the fibers system. At Reynolds between 50 and 100, ungassed power numbers were lower and for Reynolds between 400 and 700, power numbers were higher for the mycellal broth, if compared with the fibers suspension.

Allen and Robinson<sup>18</sup> employed polymer solutions in order to simulate the rheological behaviour of three mycelial broths containing *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Streptomyces levoris*. In terms of power consumption and in the laminar regime, they found that the homogeneous fluids (polymer solutions) can not properly simulate the behaviour of mycelial suspensions. Similar conclusions have been drawn in the work of Reuss<sup>19</sup>. Allen and Robinson<sup>18</sup> also found that using a turbine impeller, the power consumption for mixing the model fluids is lower than that required to mix the mycelial broths. Unfortunately, these authors only studied the laminar regime and used only small tanks (0.0051 m in diameter). It is evident that model fluids (either made with polymers or with fibers suspensions) do not simulate, in a satisfactory way, the rheological properties of actual mycelial fermentation broths.

Nienow<sup>20</sup> has revised the potential of new impeller designs in mycelial fermentations; nevertheless, most of the published reports about the characterization of novel impellers, have been carried out with model fluids.

Reports on rheology of actual industrial broths and about mixing of filamentous organism fermentation broths are relatively few. Most of the works reported in the literature have been conducted with fermentation broths obtained in laboratory-level fermenters or with mycelial cells centrifuged and resuspended. Furthermore, the limited work on mixing mycelial or mycelial-like systems has been mostly conducted using single impellers and using tanks of standard geometric dimensions.

Therefore, the aims of this work were, on the one hand, to study the rheology of an industrial fermentation broth containing the organism *Micromonospora purpurea*, which is used for the industrial production of gentamycin, and, on the other hand, to study the power characteristics of dual impellers combinations in mixing these broths in a variety of conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Fermentation broths

Industrial fermentation broths containing *Micromonospora purpurea* were used. These are currently produced in the industrial fermentation for gentamycin manufacture. The broths (without any treatment) were kindly provided by Fermic S.A. de C.V. (México City), a local antibiotic producer.

The industrial fermentations were carried out in stirred fermentors of up to 50 m<sup>3</sup> in capacity. The culture lasts about 180 h. During the process, the broth is diluted with sterile water in order to decrease the viscosity. The culture medium is a complex one, containing flours and soybean oil, therefore the broth is relatively viscous even from

the beginning of the process. About  $0.02 \text{ m}^3$  of broths of several ages were drawn from the fermentor and transported to the mixing laboratory in about 1.5 h.

The biomass was measured every 24-30 h by centrifugation at  $58 \text{ s}^{-1}$  during 10 min in conical graduated and calibrated tubes. Biomass was expressed as percentage in volume.

### Rheology

Broths rheology was measured by two different systems, both mounted in the torque meter head of a Brookfield HBTDV-I viscometer. One of the systems was the Brookfield spindle No. 1 and the other was a vane. All measurements were carried out at  $34^\circ\text{C}$ , the temperature at which the fermentation is conducted. In order to assess the stability of the broths (in terms of their rheology) measurements were performed immediately after withdrawing the samples from the fermentor and before and after the mixing experiments (about 3 and 10 h respectively from the sample withdrawal). The Ostwald de Wale model ("power law",  $\tau = K\dot{\gamma}^n$ ) was used, as it fitted the data very well.

#### Measurements with the spindle

Brookfield spindle No. 1 (length: 0.07493 m; radius: 0.009421 m) was used. Although the Brookfield system was designed for Newtonian fluids, it is possible to get reliable data with non-Newtonian fluids if some assumptions are made and some conditions are satisfied. By assuming that the fluid's rheology follows the power law model (which is the case) and considering that the spindle rotates in a semi-infinite medium<sup>21</sup>, it is possible to calculate the shear rate at the spindle wall (the only place where the shear rate is defined)<sup>3,21</sup>. By statistically fitting the raw Brookfield data to the power law,  $n$  and  $K$  can be calculated. This procedure has been successfully used with xanthan gum broths<sup>22</sup>.

#### Measurements with the vane

The vane was, as suggested by Dzuy and Boger<sup>23</sup> and Yoshimura et al.<sup>24</sup> (and tested with shear thinning fluids), a small impeller of 4 blades having a height/diameter ratio of 1.73 (diameter: 0.0375 m, height: 0.065 m). In order to avoid reservoir wall-effects, the vane should be immersed into a cylindrical vessel whose internal diameter and depth are at least twice the diameter and the height of the impeller, respectively.

Metzner and Otto<sup>25</sup> approach was used to calculate the average shear rate generated by the vane ( $\dot{\gamma}_{av} = k N$ ).  $k$  was calculated according to the method developed by Bongaenaar et al.<sup>1</sup> and described by Kemblowski and Kristiansen. Previously, a Newtonian fluid (transmission oil Veedol SAE-250) was used for calibration. A  $k$

value of 8.7 was obtained for the vane device.  $\tau_{av}$  and  $\dot{\gamma}_{av}$  values were calculated as described before<sup>1,9</sup> and then were fitted to the power law from which n and K values were computed.

#### Yield stress

The yield stress ( $\tau_y$ ) was measured by the method proposed by Dzuy and Boger<sup>23</sup> using the vane geometry. The vane, fitted to the Brookfield viscometer, should be immersed in the vessel containing the sample and then the instrument is turned on. The yield stress is then calculated from the maximum torque reading, according to the procedure described by Dzuy and Boger<sup>23</sup>. This technique has been successfully used for the characterization<sup>26</sup> of the "static" yield stress of filamentous fermentation broths. For comparison purposes, a previously described<sup>27</sup> relaxing technique, using the spindle No. 1 of a Brookfield viscometer, was used. This latter technique has been successfully used to characterize apparent yield stress in xanthan broths<sup>22, 27</sup>.

#### Power draw

Power draw measurements were conducted in an accurate pneumatic air-bearing described elsewhere<sup>28</sup>, over which a 0.01 m<sup>3</sup> tank was mounted (figure 1). Power was estimated from torque and stirring speed measurements.

Two impeller combinations were used: two Rushton turbines (R+R) and one Rushton turbine (bottom) together with a 45° pitched blade turbine (upper), pumping upwards (R+P). Dimensions of the impellers and those of the tank as well as the position of the impellers are shown in figure 1. Agitation speeds ranged from 1.25 to 7.5 s<sup>-1</sup> as measured by an accurate contact tachometer (Dynapar, Jr series). Air flow rates (0.25 - 1.0 vvm) were measured by a mass flow meter (Brooks, 58761B1).

The Metzner and Otto<sup>25</sup> approach ( $\dot{\gamma}_{av} = k_s N$ ) was used in order to calculate average shear rates in the tank. A typical  $k_s$  value of 11.5 was assumed.

Power number (Po) and Reynolds number for pseudoplastic fluids (Re) are defined as follows:

$$Po = \frac{P}{\rho N^3 D^5}$$

$$Re = \frac{\rho D^2 N^{2-n}}{K k_s^{n-1}}$$

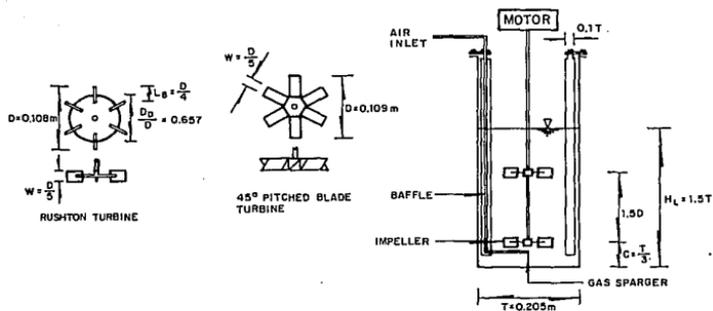


Figure 1. Diagram and dimensions of the mixing tank and impellers.

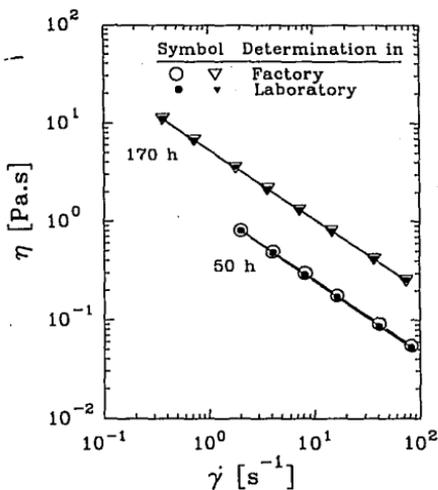


Figure 2. Rheogram of viscosity versus shear rate. Measurements carried out in the factory (open symbols) and in the laboratory (closed symbols) with the spindle.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Stability of the fermentation broth

Figure 2 shows that broth rheology is rather stable. The rheological properties measured in the factory, after transportation to the laboratory and after mixing experiments practically did not change. The rheology of this mycelial broth does not seem to be affected by oxygen starvation and shear effects during the experimentation period. Observations under the microscope showed that no apparent damage occurred to the mycelium due to broth transportation and due to the shear rates applied during mixing experiments. In addition, although the broth is very rich in nutrients, the presence of gentamycin (a broad spectrum antibiotic) avoids microbial contamination. This high rheological and microbiological stability allowed us to carry out mixing experiments under controlled conditions.

### Rheology

Figure 3 shows typical rheograms obtained from measurements performed with the spindle and vane geometries. Firstly, it should be pointed out that the rheograms obtained with the two systems are rather similar. This agreement can be explained in part by the fact that no phase separation occurred in reasonable periods of time. As determined visually in a probete, only after 24 h a phase separation of about 3 % occurred. Disagreements in broth's rheology measured with spindle and turbine geometries have been reported<sup>3</sup> for broths having a high sedimentation velocity.

Figure 4 shows the evolution of the power law indexes and the yield stress (this last by the vane method) during fermentation. The evolution of the mycelial biomass is also included in the figure. The broth showed a shear-thinning behaviour even from the beginning of the culture, which can be ascribed to the suspended solids of the flours.

A slight decrease in viscosity and no change in pseudoplasticity were observed during the first 24 h of culture. This was coincident with the mycelium lag phase. This behaviour can be due to a decrease in flour content by hydrolysis and further assimilation by the microorganisms.

After the first 24 h, the mycelium grew exponentially. This caused the broth to increase its viscosity ( $K$  increased from 0.1 to 5.5 Pa s<sup>n</sup>). A drastic drop in  $n$  was observed after 24 h of culture and this index remained practically constant ( $\approx 0.28$ ) hereinafter. A measurable yield stress was obtained only after 50 h of culture if using the vane method<sup>23</sup>. The relaxation technique previously reported<sup>27</sup> as suitable for xanthan broths gave very low readings, which can be within the experimental error. Clearly, *Micromonospora* broths have considerably lower yield stress if compared with xanthan broths of similar

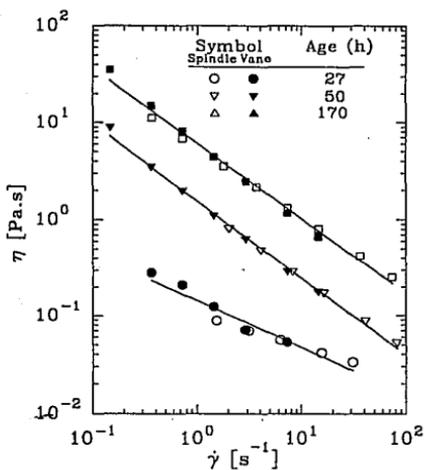


Figure 3. Broth rheograms of *Micromonospora purpurea* at different fermentation ages.

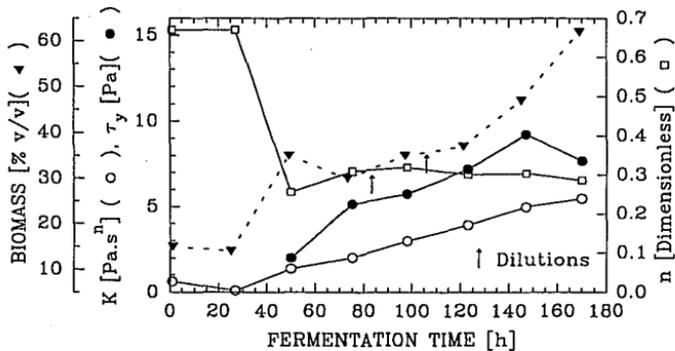


Figure 4. Evolution of  $K$ ,  $n$  (obtained with de spindle),  $\tau_y$  and mycelial biomass of *Micromonospora purpurea* fermentation broths.

viscosity. This is the first time that gentamycin broths rheology is reported. However, the rheograms of the *Micromonospora* broths (figure 3) showed the same range of viscosities to those reported by Gavrilescu *et al*<sup>14</sup> for other antibiotics fermentation broths.

#### Un aerated power

Figure 5 shows  $P_o$  versus  $Re$  plots for the two impeller combinations when mixing the mycelial broths under non-aerated conditions. For comparison purposes, data from the literature<sup>22</sup> for a different non-Newtonian fluid (xanthan broths) but using identical impeller combinations and tank geometry, are shown. Due to the lower viscosities of the mycelial broth, no data could be obtained in the laminar regime. In the transition regime, the mycelial broths showed a minimum, ( $Re \approx 20-60$ ) which was lower than the minimum observed for xanthan broths. At  $Re$  higher than 60, power numbers are rather similar for both the mycelial and the biopolymer broths. Although no conclusive explanation can be given for this minimum, it is possible to speculate that this behaviour could be associated to the level of viscoelasticity of the fluids. As reported before<sup>29,31</sup>, fluids of low viscoelasticity show lower  $P_o$  values (in that  $Re$  range) than fluids of high viscoelasticity. Unfortunately, no viscoelasticity data are available for mycelial broths.

For the combination of two Rushton turbines (figure 5A), a drop in the power number was observed between  $Re$  of 500 and 5,000. The higher the viscosity, the lower the  $Re$  at which the drop in power begins. It is expectable that this drop in  $P_o$  is caused by surface aeration but because of the broth turbidity, no visual confirmation could be done. This drop in  $P_o$  at  $Re > 500$  was not observed in the combination Rushton-45° pitched turbine pumping upwards (figure 5B). The combination (R+P) draws less power than the combination (R+R); therefore, it is likely that surface aeration occurs before in the (R+R) than the (R+P) combination in the same  $Re$  range.

In the turbulent regime (*i.e.*  $Re > 200$ ) and before surface aeration occurs,  $P_o$  of the two Rushtons was 1.6 times the  $P_o$  for a single Rushton. Similar results have been reported by Hudcova *et al*<sup>30</sup> for low viscosity Newtonian fluids.

#### Aerated power

As shown in figure 6A the power drop due to aeration for the two Rushtons at early stages of the fermentation is considerably higher at 1 vvm if compared to 0.5 vvm. However, for high viscosity broths (towards the end of the fermentation) no important effect on the power drop was due to the level of aeration. As it has been established<sup>31,32</sup> for other rheological complex fluids, this can be due to the size of the air-cavities formed behind the impeller blades. These cavities tend to be more stable as the viscosity of the fluid is higher<sup>31,32</sup>.

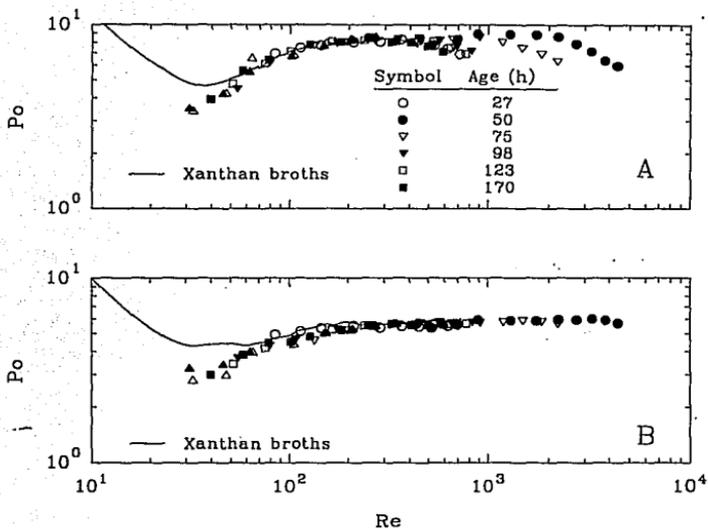


Figure 5.  $Po$  vs  $Re$  for *M. purpurea* broth of different fermentation ages for two Rushton turbines (A) and Rushton turbine-45 pitched blades turbine. Continuous line are data for xanthan broths from reference 22.

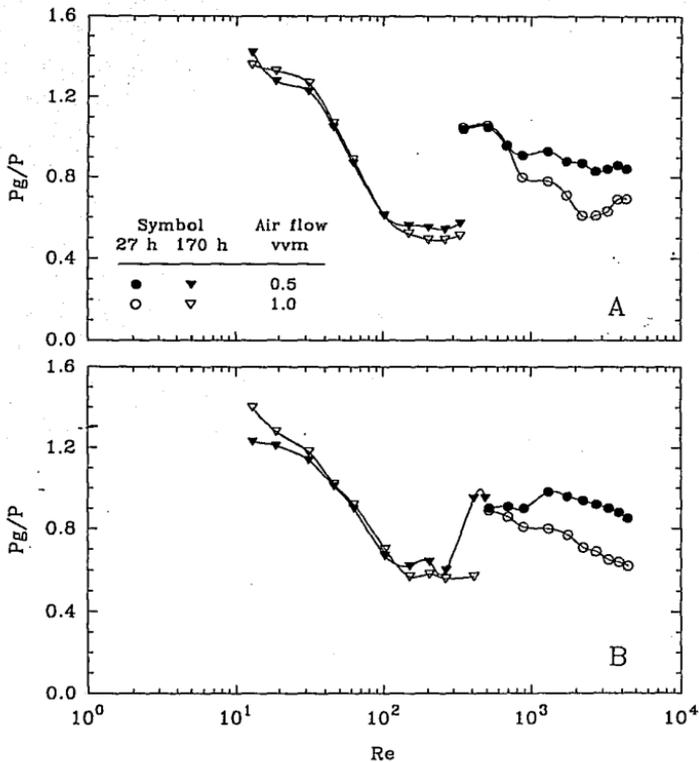


Figure 8. Power drop due to aeration as a function of  $Re$  and aeration rate for low and high viscosity broths and for dual impeller combinations. (A) two Rushtons, (B) Rushton-45 pitched blades turbine.

Figure 6B shows the data for the combination (R+P). The behaviour is similar to that for the two Rushtons; i.e. the higher the viscosity, the lower the effect of the aeration rate. However, no clear minimum in  $P_g/P$  was observed for the Reynolds tested for the low viscosity broths. However, an increase in the  $P_g/P$  ratio was observed for the high viscosity broth at the highest stirring speeds but at the lowest air flow rate tested. Different flow patterns and air-cavities structure can account for the differences in the  $P_g/P$  versus  $Re$  plots for the two impeller combinations.

Figure 7 shows the evolution of the  $P_g/P$  ratio as a function of  $Re$  and broth age under an air flow rate of 1 vvm, for both impeller combinations. The power drop is higher as the fermentation turns more viscous. If these values of  $(P_g/P)_{min}$  are compared with those of similar viscosity during a xanthan fermentation<sup>22</sup>, it follows that less pronounced drops in power occur in the mycelial broth. For the two Rushtons,  $(P_g/P)_{min}$  was 0.49 for the mycelial broth whereas for the xanthan broth this ratio was 0.44<sup>22</sup>. For the Rushton-45° inclined turbine combination  $(P_g/P)_{min}$  was 0.51 for the mycelial broth and 0.43 for the xanthan broth. At higher xanthan concentrations  $(P_g/P)_{min}$  was as low as 0.17 for (R+R) and 0.12 for (R+P)<sup>22</sup>. The less drastic drop in power due to aeration observed in mycelial broths as compared to xanthan broths can be very likely associated with lower levels of viscoelasticity and lower yield stress values. These characteristics likely tend to create smaller air-cavities (if compared with other viscous systems) behind the impellers.

Comparing figures 7A and 7B in terms of the  $P_g/P$  ratios for the two impeller combinations (at 1 vvm) it follows that the power drop was more drastic for the combination (R+R) than that for (R+P). Larger air-cavities are likely to occur in this combination leading to the observed phenomenon.

#### CONCLUSIONS

Due to its high rheological and microbiological stability, the broth of *Micromonospora purpurea* was especially suitable for conducting mixing experiments in the laboratory with an actual, industrial fermentation broth. Although this is the first report documenting the rheology of a gentamycin broth, the rheological data were within the range reported for other mycelial broths.

Unaerated power curves for dual impeller combinations and using this broth were reported for the first time. The data showed the same trend as those obtained for other rheologically complex broths such as xanthan gum broths. Nevertheless,  $P_o$  of the mycelial broth turned out to be lower for  $30 < Re < 60$ . This could probably be associated with a low level of viscoelasticity and to lower yield stress values.

For this mycelial broth, it was confirmed that, as it has been reported for other highly viscous, non-Newtonian broths (such as xanthan

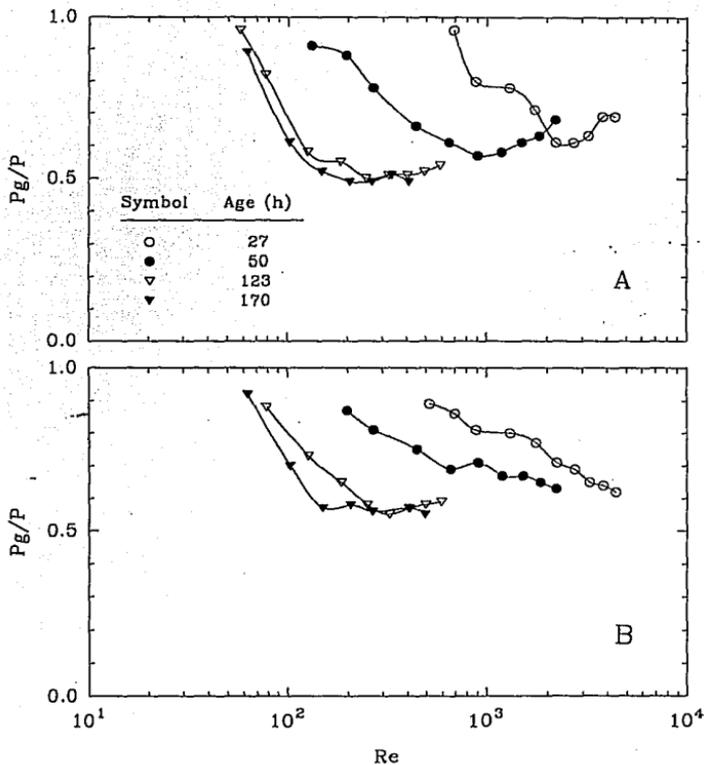


Figure 7. Power drop due to aeration as a function of  $Re$  and broth's age for two impeller combinations. (A) two Rushton turbines, (B) Rushton-45 pitched 6 blades turbine. Aeration rate: 1 vvm.

broths), the aeration level only affects significantly  $P_o$  at low viscosities (i.e. at the beginning of the culture).

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank very specially Dr. E. Tisselli (Fermic, S. A. de C. V.) for kindly having provided the fermentation broths and for his encouragement for the development of this work. D. Velasco acknowledges with thanks the M. Phil. scholarship granted by CONACyT. This work was financed in part by the International Foundation for Science (grant G/1395).

#### NOMENCLATURE

C	impeller clearance (m)
D	impeller diameter (m)
D	turbine disc diameter (m)
$H^D$	liquid height (m)
$K^L$	consistency index of the power law ( $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ )
k	Meitzner and Otto constant (-)
$L^S$	blade impeller length (m)
$N^D$	impeller speed ( $\text{s}^{-1}$ )
n	flow behaviour index of the power law (-)
P	power (W)
$P_g$	power under gassed conditions (W)
$P_o$	power number ( $=P/\rho N^3 D^5$ ) (-)
$P_o$	power number for aerated conditions ( $=P_g/\rho N^3 D^5$ ) (-)
$Q^g$	volumetric air flow rate ( $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ ).
Re	Reynolds number for non-Newtonian fluids ( $\rho D^2 N^{2-n} / K k^{n-1}$ ) (-)
T	tank diameter (m)
vvm	volume of air per volume of liquid per minute ( $\text{m}^3 \text{s}^{-1} \text{m}^{-3}$ )
W	blade impeller wide (m)

#### Greek symbols

$\dot{\gamma}$	shear rate ( $\text{s}^{-1}$ )
$\dot{\gamma}^{av}$	average shear rate ( $\text{s}^{-1}$ )
$\eta^{av}$	apparent viscosity ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ )
$\rho$	fluid density ( $\text{kg m}^{-3}$ )
$\tau$	shear stress (Pa)
$\tau^{av}$	average shear stress (Pa)
$\tau_y$	yield stress (Pa)

## REFERENCES

1. Bongenaar, J. J. T. M., Kossen, N. W. F., Metz, B. and Meijboom, F. W. (1973). A method for characterizing the rheological properties of viscous fermentation broths. *Biotechnol. Bioeng.* 15:201-206.
2. Roels, J. A., van den Berg, J. and Voncken, R. M. (1974). The rheology of mycelial broths. *Biotechnol. Bioeng.* 16:181-208.
3. Charles, M. (1978). Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures. *Adv. Biochem. Eng.* 8:1-62.
4. Mets, B., Kossen, N.W.F. and van Suljdam, J.C. (1979). The rheology of mould suspensions. *Adv. Biochem. Eng.* 11:103-156.
5. Reuss, M., Debus, D. and Zoll, G. (1982). Rheological properties of fermentation fluids. *Chem. Eng.* 381: 233-236.
6. Kim, J. H., Lebeault, J.M. and Reuss, M. (1983). Comparative study on rheological properties of mycelial broth in filamentous and pelleted forms. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18:11-16.
7. Fatile, I. A. (1985). Rheological characteristics of suspensions of *Aspergillus niger*: correlation of rheological parameters with microbial concentration and shape of the mycelial aggregate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21:60-64.
8. Mitard, A. and Riba, J.P. (1986). Rheological properties of *A. niger* pellet suspensions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25:245-249.
9. Kemblowski, Z. and Kristiansen, B. (1986). Rheometry of fermentation liquids. *Biotechnol. Bioeng.* 28:1474-1483.
10. Allen, D. G. and Robinson, C. (1989). Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. *Chem. Eng. Sci.* 45(1):37-48.
11. Moo-Young, M., Halard, B., Allen, D. G., Burrell, R. and Kawase, Y. (1987). Oxygen transfer to mycelial fermentation broths in an airlift fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 30:746-753.
12. Björkman, U. (1987) Properties and principles of mycelial flow: experiments with a tube rheometer. *Biotechnol. Bioeng.* 39: 114-129.
13. Olsvik, E.S. and Kristiansen, B. (1992) On line rheological measurements and control in fungal fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 375-387.
14. Gavrilescu, M., Roman, R.V. and Efimov, V. (1992). Rheological behaviour of some antibiotic biosynthesis liquids. *Acta Biotechnol.* 12 (5): 383-396.
15. Taguchi, H. and Miyamoto, S. (1966). Power requirement in non-Newtonian fermentation broth. *Biotechnol. Bioeng.* 8: 43-54.
16. Cooke, M., Middleton, J.C. and Bush, J.R. (1988). Mixing and mass transfer in filamentous fermentations. In: 2nd Int. Conf. on Bioreactor Fluid Dynamics. R. King.(Ed.). BHRA, Cranfield; pp. 37-63.
17. Baker, M. R., Emery, A.N. and Nienow, A.W. (1988). Mass transfer and power characteristics of a simulated filamentous fermentation broth exhibiting biological activity. In: 2nd Int. Conf. on Bioreactor Fluid Dynamics. R. King.(Ed.). BHRA, Cranfield; pp. 79-93.
18. Allen, D. G. and Robinson, C.W. (1991). The prediction of transport parameters in filamentous fermentation broths based on results

- obtained in pseudoplastic polymer solutions. *Can. J. Chem. Eng.*, 69:498-505.
19. Reuss, M. (1980). Power consumption and gas-liquid mass transfer in stirred tank fermenters with Newtonian and non-Newtonian fermentation fluids. In: *Conf. Chem. Eng., Lodz, Polen, Matyrialy Konferencyjne, Szesc II*, 382-389.
  20. Nienow, A.W. (1990) Agitators for mycellial fermentations. *Trends Biotechnol.* 8: 224-233.
  21. Whorlow, R.W., *Rotational viscometers*. In: *Rheological Techniques*, John Wiley, New York, 1980, pp. 113-191.
  22. Sánchez, A., Martínez, A., Torres, L. and Galindo E. (1992). Power consumption of three impeller combinations in mixing xanthan fermentation broths. *Process Biochem.* 27: 351-365.
  23. Dzuy, N. Q. and Boger, D.V. (1983). Yield stress measurement for concentrated suspensions. *J. Rheol.* 27(4): 321-349.
  24. Yoshimura, A. S., Prud'homme, R.K., Princen, H.M. and Kiss, A.D. (1987). A comparison of techniques for measuring yield stresses. *J. Rheol.* 31(8):699-710.
  25. Metzner, A. B. and Otto, R.E. (1957). Agitation of non-Newtonian fluids. *A.I.Ch.E. J.* 3(1):3-9.
  26. Leong-Poi, L. and Allen, D.G. (1992). Direct measurement of the yield stress of filamentous fermentation broths with the rotating vane technique. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 403-412.
  27. Hamote, M., Flores, F., Torres, L. and Galindo, E. (1991). Apparent yield stress estimation in xanthan gum solutions and fermentation broths using a low-cost viscometer. *Chem. Eng. J.* 45:B49-B56.
  28. Reséndiz, R., Martínez, A., Ascanio, G. and Galindo, E. (1991). A new pneumatic bearing dynamometer for power input measurement in stirred tanks. *Chem. Eng. Technol.* 14:105-108.
  29. Margaritis, A. and Pace, G.W. (1985). Microbial polysaccharides. In: *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3, Moo-Young, M. (Ed.), Pergamon Press, Oxford pp. 1005-1041.
  30. Hudcova, V., Machon, V. and Nienow, A.W. (1989). Gas liquid dispersion with dual Rushton turbine impellers. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 617-628.
  31. Nienow, A. W., Wisdom, D.J., Solomon, J., Machon, V. and Vlcek, J. (1983). The effect of rheological complexities on power consumption in an aerated, agitated vessel. *Chem. Eng. Commun.* 19:273-293.
  32. Nienow, A. W. and Ulbretch, J. J. (1985). Gas-liquid mixing and mass transfer in high viscosity liquids. In: *Mixing of liquids by mechanical agitation*. Cap. 6. J. J. Ulbretch and G. K. Patterson, (Eds), Gordon and Breach, New York, pp. 203-237.

## **ANEXO IV**

**David Velasco, Alfredo Martínez and Enrique Galindo.**  
**"Hydrodynamics of industrial fermentations: rheology and power  
drawn in rifamycin production", *AIChE Symposium series* (en  
prensa).**



NORTH CAROLINA AGRICULTURAL AND TECHNICAL  
STATE UNIVERSITY  
GREENSBORO 27411

Department of  
CHEMICAL ENGINEERING

TELEPHONE (910) 334-7564  
FAX (910) 334-7904

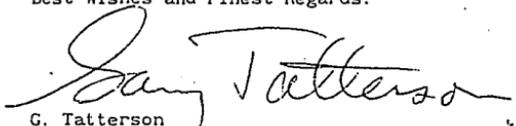
1/10/1994

Dear Colleague,

I am pleased to inform you that your paper, "Hidroynamics of industrial fermentations: rheology and power drawn in ryfamycin production" has been accepted for publication in the Proceedings of the AIChE/NAMF 1993 Symposium: Industrial Mixing Technology: Chemical and Biological Applications.

Please follow enclosed instructions.

Best Wishes and Finest Regards.

  
G. Tatterson

Some minor corrections!

# HYDRODYNAMICS OF INDUSTRIAL FERMENTATIONS: RHEOLOGY AND POWER DRAWN IN RIFAMYCIN PRODUCTION

David Velasco, Alfredo Martínez and Enrique Galindo\*

Depto. de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología,  
Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Post. 510-3,  
Cuernavaca, Mor., 62271, México.

## ABSTRACT

*Rheological data and power consumption studies involving actual industrial fermentation broths are very scarce in the literature. In this work, industrial fermentation broths containing *Amycolatopsis mediterranei*, provided by a local rifamycin manufacturer, were rheologically characterized and power consumption studies were conducted.*

*Rheology evaluation was performed with a vane viscometer. Single impellers (Rushton and 45° pitched-blades turbines) and combinations of them were assessed using broths of various ages under gassed and ungassed conditions. Power drawn was measured by an accurate air-bearing dynamometer on which a 0.01 m (working volume) tank was mounted. The broth was rheologically stable under the experimental conditions. During the exponential growth of the mycelium (first 70 h of culture) a drastic increase in viscosity was observed and the broth became more shear thinning. Power law constants reached a maximum of  $9.8 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$  for  $K$  and a minimum of 0.1 for  $n$ . Except for  $20 < Re < 100$ , un aerated power curves were similar to those obtained with the same impeller system but using other mycelial broths and reconstituted xanthan broths. The power drop due to aeration was more drastic for the single impellers than for the combinations. The single Rushton turbine showed the most pronounced drop. The higher the viscosity of the broth, the higher the drop in power due to aeration.*

\*Corresponding author

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Antibiotic and enzyme production are fermentation processes involving mycelial microorganisms. These broths show strong non-Newtonian characteristics and undergo drastic changes in broth rheology as culture evolves. Broth's rheology changes mainly due to biomass accumulation but also due to morphological changes of the hyphae.

Mycelial broths become highly viscous and shear thinning as fermentation takes place and, as a consequence, mixing problems can occur as evidenced by the presence of dead zones in the fermentor, the existence of gradients in chemical or physicochemical parameters and oxygen limitation.

The knowledge of the energy drawn to the fermentor by agitation is of fundamental importance as, to a great extent, the bioreactor productivity depends on it [1]. Studies regarding rheology and mixing of actual industrial fermentation broths are very limited in the literature (see a survey in reference [2]). This situation is due to a number of reasons, including the low rheological stability of the broths outside the fermentor, the lack of availability of industrial broths for researchers and the difficulty of

measuring accurately the power drawn in bench and pilot fermentors. Therefore, a number of investigators have used model fluids [3-5] in order to simulate the rheological properties of mycelial broths. However, these solutions do not simulate all the properties of an industrial broth. The majority of the reports available in the literature are works performed with fermentations broths obtained from the culture of collection strains in bench or pilot fermentors. In some cases, the broths have been prepared with resuspended biomass. This may differ from actual broths using complex media and industrial strains.

At the other hand, most of the reports in the literature deal with single impeller configurations and using standard geometrical relationships (*i.e.* liquid height equal to tank diameter). In industry, non-standard geometries (*i.e.* tall tanks) and multiple impellers are a current practice. The use of combinations of impeller types in the same shaft is also common. Under these conditions, the number and position of impellers cause flow patterns very different to those observed with single impellers. The complex interactions of gas dispersion and flow patterns make difficult the prediction of power drawn from data obtained in standard tanks equipped with a single impeller.

The aims of this work were, on the one hand, the rheological characterization of industrial fermentation broths obtained from the production of rifamycin by *Amycolatopsis mediterranei*. On the other hand, the power drawn characteristics of dual impellers were studied in a non-standard tank.

## MATERIALS AND METHODS

### Fermentations

The broths were obtained from the culture of an industrial strain of *Amycolatopsis mediterranei*. The culture was conducted in 50 m stirred tank fermentors at Fermic, S. A. de C.V. (Mexico City). The rifamycin fermentation lasts approximately 200 h. The culture medium was a complex one containing soybean flour and soybean oil. Fermentation was controlled at 28°C. Samples of approximately 0.020 m<sup>3</sup> were withdrawn at different stages of the fermentation and they were taken to our laboratory in about two hours.

### Biomass

The mycelial biomass was estimated as the percentage in volume (wet basis) by centrifuging the broth in calibrated 50 mL conical tubes during 10 minutes at 2130 g.

### Rheology

The rheological characterization and the yield stress estimation were carried out with a "vane" device attached to the torque meter of a Brookfield viscometer, as described before [2]. All measurements were conducted at 28°C. In order to fit the data, the Ostwald de Wale model ("power law") was used:

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

and the apparent viscosity as:

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

The average shear rate generated by the vane was calculated according to the concept of Metzner and Otto [6] ( $\dot{\gamma}_{av} = k_s \cdot N$ ). The constant  $k_s$  was calculated according to the procedure reported by Bongenaar *et al* [2] and as it has been detailed by Kembrowski and Kristiansen [8]. Previously, a Newtonian fluid (transmission oil SAE-250) was used to calibrate the system and  $k_s=8.7$  was worked out for the vane device.

The yield stress was measured by the procedure reported by Dzuy and Boger [9], which has been used successfully in mycelial broths [2,10].

### Power drawn

Power drawn measurements were carried out in a tank (figure 1) of 0.010 m<sup>3</sup> working volume mounted on an air-bearing dynamometer (described in detail by Reséndiz *et al*, [11]) under aerated and non-aerated conditions. Power drawn was worked out from torque and stirring speed measurements. An accurate contact tachometer (Dynapar, Jr series) was used to measure stirring speed. Air flow rate was measured by a mass flow meter (Brooks, 58761B1). Power number (Po) and modified Reynolds number (Re) for fluids obeying the power law are defined as follows:

$$Po = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5}$$

$$Re = \frac{\rho \cdot D^2 \cdot N^{2-n}}{K \cdot k_s^{(n-1)}}$$

### Impellers

Single and dual impellers were used. Rushton turbine and 45° pitched blades turbine (pumping upwards) (PBT) were used (figure 2) separately and in dual combinations. Two Rushton turbines and a Rushton turbine together with a PBT placed 1.5 D from each other were assessed. The Rushton turbine was the bottom impeller.

The concept of Metzner and Otto [6] was used in order to calculate the average shear rate in the tank and, in turn, to calculate the apparent

viscosity of the process.  $k_S$  was taken as 11.5 for single impellers as this value is typical in the literature. For the impeller combinations,  $k_S$  was taken as 11.0, according to the experimental data of Sánchez *et al* [12].

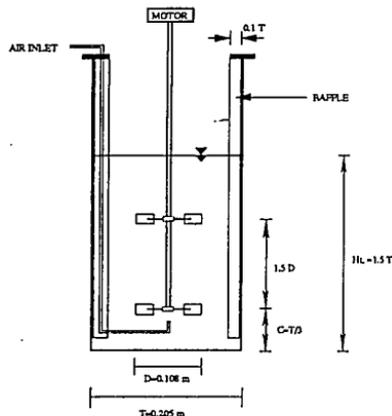


Figure 1. Dimensions of the mixing tank.

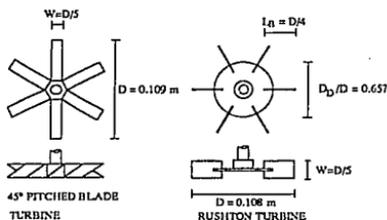


Figure 2. Dimensions of the impellers used.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Broth rheological stability

One of the main problems in conducting rheological studies of mycelial broths is their low stability. This is due to the high sensitivity that some cultures have over oxygen tension (which changes when the samples are withdrawn and/or transported away from the fermentor). In a preliminary work, the rheological stability of a number of industrial antibiotic fermentations broths was evaluated. *Streptomyces cretensis* [13], *Streptomyces rimosus* [13], *Streptomyces aureofaciens* [13], *Micromonospora purpurea* [2] and *Amycolatopsis mediterranei* broths were assessed. Among them, only the cultures of *M. purpurea* and *A. mediterranei* showed good stability in order to conduct rheological and mixing studies outside the fermentor. The other cultures exhibited pronounced and rapid lysis after withdrawn from the fermentor, and, therefore, their rheological properties changed drastically, making practically impossible to carry out reliable experiments in the rheometer and in the mixing tank.

*Amycolatopsis mediterranei* broths were rheologically very stable (figure 3) in terms of oxygen starvation, agitation shear stress as well as transport conditions and handling during mixing experiments. During the tests, the broths were subjected to shear rates ranging from 14 to 115  $s^{-1}$  during periods of 8 to 10 hours. Aeration rates tested were up to 1.0 vvm. In addition, the morphology of the microorganisms did not show evident changes as seen under the microscope. *A. mediterranei* broths were also very stable in terms of biomass settling. No phase separation occurred when samples of broths of 40 h or older were left undisturbed for up to 10 h.

### Rheology

Figure 4 summarizes the evolution of the rheological parameters of broths as a function of culture age. The broths were viscous and non-Newtonian since the beginning of the process because the broth contained suspended solids from soybean flour. During the exponential growth phase of the mycelium (first 70 of cultivation), drastic rheological changes were

observed. Under stirring speeds above  $5 \text{ s}^{-1}$ , a slight Weissenberg effect (fluid climbing the shaft) was evident for broths of ages of 45 h or more (fluid surface did not show any observable movement except for the climbing of the shaft). This effect was not observed when dual impellers were used, possibly because the well mixed region or "cavern" reached the fluid surface.

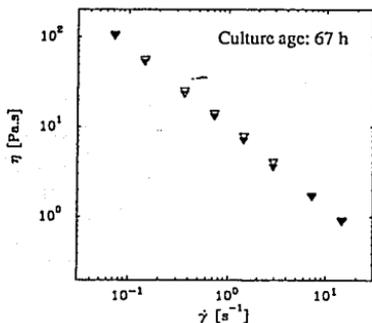


Figure 3. Rheological stability of the broths containing *A. mediterranei*. Before (○) and after (▼) stirring ( $\dot{\gamma}_{av} \cong 14$  to  $115 \text{ s}^{-1}$ ) during 8 to 10 h.

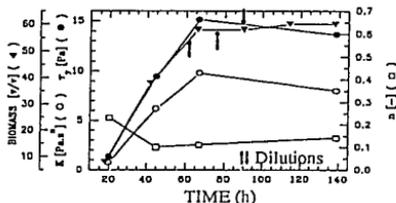


Figure 4. Evolution of the biomass and the rheological parameters ( $K$ ,  $n$  and  $\tau_y$ ) of an industrial fermentation for the production of rifamycin (batch 435).

The broths exhibited measurable yield stress from early stages of the culture. Consistency index ( $K$ ) and the yield stress ( $\tau_y$ ) showed similar trends and associated with biomass growth (figure 4).  $\tau_y$  reached a maximum value of 15 Pa and  $K$  went up to  $9.8 \text{ Pa.s}^n$ . The flow behavior index ( $n$ ) dropped to a value of about 0.1 in the first 40 h of culture and remained practically constant thereafter. A slight decrease in  $K$  and  $\tau_y$  was observed between 65 and 140 h of fermentation although the biomass content slightly increased. During this period, three water additions were conducted in the industrial fermentor in order to improve oxygen transfer. However, the rheological data suggest that the biomass underwent changes in its physical characteristics (likely, hyphae rigidity). This fact can be drawn, on the one hand, because the mycelium did not suffer evident morphological changes (at least in the preparations viewed under the optical microscope) and, on the other hand, because a higher biomass concentration (even after the dilutions) showed lower viscosities if compared with those observed at earlier fermentation ages (i.e. 65 h of fermentation time). An additional cause could be due to a decrease in the broth tonicity (caused in turn by the dilution with sterile water) which could have affected the physical properties of the mycelium, and thus the broth rheology.

#### Unaerated power drawn

Single impellers: Figure 5 shows power curves for a single Rushton turbine and a single PBT using broths of *A. mediterranei* as the test fluid. In the same figure, data obtained in a larger tank ( $T = 0.56$ ) using a single Rushton turbine and xanthan solutions [14] are also included for comparison. The power curve of the single Rushton turbine mixing *A. mediterranei* broths showed a similar trend if compared with the data obtained using xanthan broths. However, for  $50 < \text{Re} < 500$ ,  $\text{Po}$  values found with xanthan broths were lower than those found using *A. mediterranei* broths. That differences in the  $\text{Po}$  can be ascribable to the difference in the scale tested and also to likely different viscoelasticity levels of either fluids.

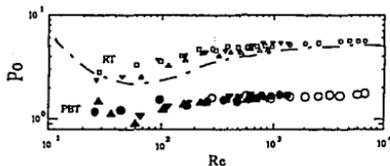


Figure 5. Power curve for broths containing *Amycolatopsis mediterranei* of different culture ages (h): 20 (○), 45 (●), 67 (△) and 139 (▲). Dotted line represents data of xanthan solutions (reference [14]).

The power curve of the single pitched blades turbine showed some scatter in the transition regime, depending on the broth's culture age. For  $Re$  above 100, the  $Po$  for this impeller was practically independent of  $Re$ , with an average value of about 1.6.

**Dual impellers:** As shown in figure 6, when using dual impellers, un aerated power curves for the broths of *A. mediterranei* showed similar trends and values as those reported for other industrial mycelial broths [2] or reconstituted xanthan broths [12] using the same impeller combinations. Nevertheless, important differences in  $Po$  were observed for  $Re$  between 20 and 100 for both impellers configurations. The minimum value of  $Po$  found for the *A. mediterranei* broths was slightly lower than that found for *M. purpurea* broths but higher than the  $Po$  exhibited by xanthan broths. As reported by Margaritis and Pace [15] the differences in  $Po$  in the transition regime could be due to differences in viscoelasticity. Although no viscoelasticity data was available, the fact that the *Amycolatopsis* broths exhibited Weissenberg effect and because of the magnitude of the  $Po$  found in the transition region, it can be inferred that these broths were more viscoelastic than the one of *Micromonospora* but less viscoelastic than those of xanthan gum broths.

A decrease in  $Po$  was observed at high  $Re$  ( $N > 7.5 s^{-1}$ ), which is an indication of the presence of superficial aeration.

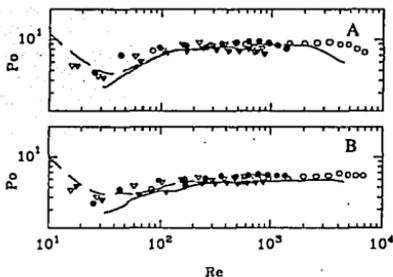


Figure 6. Power curves of A) two Rushton turbines and B) Rushton turbine and PBT. Symbols represent data obtained with *A. mediterranei* broths of different fermentation ages (h): 20 (○), 45 (●), 67 (△) and 139 (▲). (—) data from reference [2] (*Micromonospora purpurea*), (---) data from reference [12] (xanthan broths).

As shown in figure 7, the power curves of the dual Rushton obtained with broths containing *A. mediterranei* of different fermentation ages showed important differences among them, particularly in the region of  $20 < Re < 100$ . As explained before, these differences could be attributed to different levels of viscoelasticity [15] of these broths, although the yield stress could also be playing a role.

#### Comparison of single and dual impellers

Figure 8 shows the power curves for industrial broths using single and dual Rushton turbines. The calculated values of dual impellers from data obtained with one impeller (i.e.  $Po$  for single Rushton multiplied by two) are also shown in figure 8. For  $Re < 300$ ,  $Po$  for two Rushton were very similar to the calculated values from  $Po$  of a single Rushton. However, for  $Re > 300$ , the  $Po$  experimental values of the dual combination were lower than the calculated ones. This means that, at that  $Re$ , an important interaction occurs between the flow patterns of both impellers. Although superficial aeration occurred (see figure 6) those data were not included for comparison, as no

surface aeration was detected when working with the single impellers.

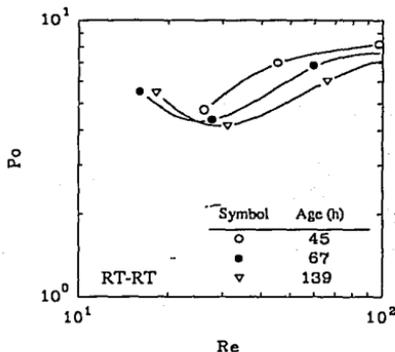


Figure 7.  $P_o$  versus  $Re$  for the dual Rushton turbines mixing *A. mediterranei* broths of different fermentation ages.

#### Aerated power drawn

Figures 9 and 10 show the ratio of aerated to unaerated power as a function of the Reynolds number for broths of 20 and 67 h of age. As the viscosity and the yield stress were higher as fermentation progress, higher power drops were observed due to aeration. The  $P_g/P$  ratio of the PBT mixing low viscosity (*i.e.* 20 h) broths only exhibited sensitivity to aeration for  $Re$  higher than 1000. It has been shown [16,17] that aeration causes a drastic drop in the power drawn to viscous fluids because the presence of air-filled cavities behind the impeller blades. As viscosity (and yield stress) is higher, these cavities are larger and more stable leading to a more pronounced drop in power as fermentation evolves.

Figure 11 shows a summary of the minimum values of  $P_g/P$  as a function of culture age and the type and/or impeller configuration. Power drop due to aeration was more drastic with the single Rushton turbine than for the dual combinations

and the single PBT. ( $P_g/P$ ) were as follows: RT (0.42), PBT (0.65), RT+RT (0.47), RT + PBT (0.55).

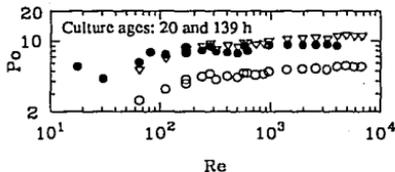


Figure 8. Power curves for (○) Rushton turbine, (●) dual Rushton turbines mixing broths of *A. mediterranei*. (▽) represent the calculation of  $P_o$  for dual impellers from single impeller data (*i.e.*  $2P_o$ ).

#### CONCLUSIONS

Due to its excellent rheological stability (in terms of storage, mechanical stress and lack of oxygen), the broths of *A. mediterranei* turned out to be suitable for conducting studies on rheology and mixing outside the fermentor.

Single impellers (and especially the Rushton turbine) exhibited the most pronounced drop in the  $P_g/P$  ratio. Dual impellers showed lower sensitivity to the power drop due to aeration.

The broths exhibited yield stress and the presence of the Weissenberg effect suggests that the broths (of 45 h and more) are viscoelastic.

Air flow rate had an important effect over the power drawn throughout the fermentation. Broths of low and high viscosities showed considerable drop in power due to the aeration level. This effect was the most drastic for the Rushton turbine and the weakest for the PBT. Power drop of the dual impellers showed less sensitivity to aeration than the Rushton turbine but higher if compared with the PBT.

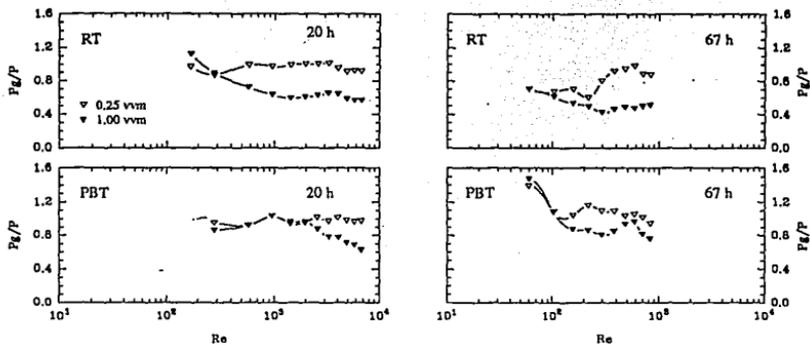


Figure 9.  $P_g/P$  as a function of  $Re$  for broths containing *A. mediterranei* of different ages (20 and 67 h) using single impellers.

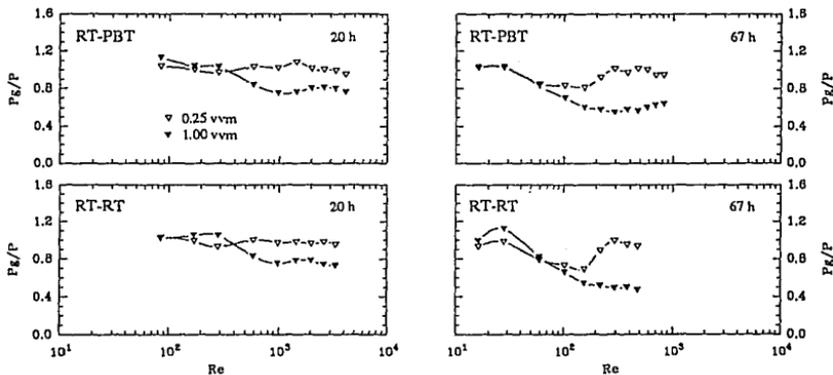


Figure 10.  $P_g/P$  as a function of  $Re$  for broths containing *A. mediterranei* of different ages (20 and 67 h) using dual impellers.

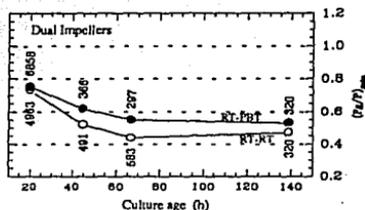
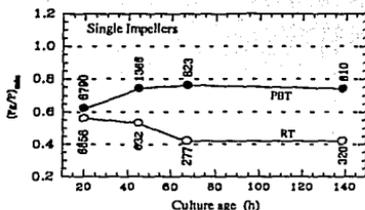


Figure 11.  $(P/P)_{\min}$  as a function of culture age (*A. mediterranei* fermentation) for four impeller configurations. Numbers indicate  $Re$ .  $Q = 1.0$  vvm

### NOMENCLATURE

C	Impeller clearance (m)
D	Impeller diameter (m)
$D_D$	Impeller disk diameter (m)
H	Liquid height (m)
K	Consistency index (Pa.s)
$k_s$	Metzner and Otto constant (-)
$L_B$	Impeller blade length (m)
n	Flow behavior index (-)
N	Impeller speed (s)
P	Power (W)
PBT	45° pitched blade turbine
$P_o$	Power number (-)
Q	Air flow rate (vvm)
Re	Modified Reynolds number (-)
RT	Rushton turbine
T	Tank diameter (m)
vvm	Volume of air per volume of liquid per minute
W	Impeller blade width (m)

### Greek letters

$\dot{\gamma}$	Shear rate (s)
$\dot{\gamma}_{av}$	Average shear rate (s)
$\eta$	Apparent viscosity (Pa.s)
$\rho$	Fluid density ( $kg \cdot m^{-3}$ )
$\tau$	Shear stress (Pa)
$\tau_y$	Yield stress (Pa)

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank very especially Dr. Eugenio Tisselli, from FERMIC S. A. for providing the broths and for his encouragement for the development of this

work. D. Velasco acknowledges CONACyT for an M. Phil scholarship.

This project was financed in part by the International Foundation for Science (grant E/1395) and by the Program of the United Nations for Development (grant PNUD Mex 93019).

### LITERATURE CITED

- Calderbank, P.H. and M.B. Moo-Young, *Trans. Instn. Chem. Engrs.* 37, 26 (1959).
- Velasco, D., A. Martínez, L.G. Torres and E. Galindo, "Rheology and dual impeller mixing of an industrial fermentation broth containing *Micromonospora purpurea*" In: *Proc. 3rd Int. Conf. Bioreactor Fluids Dynamics*, A.W. Nienow (Ed.), BHR Group Limited, Cranfield, p. 101 (1993).
- Baker, A., N. Emery and A.W. Nienow, "Mass transfer and power characteristics of a simulated filamentous fermentation broth exhibiting biological activity" In: *Proc. 2nd Int. Conf. on Bioreactor Fluid Dynamics*, R. King (Ed.), BHRA, Cranfield; p. 79 (1988).
- Cooke, M., J.C. Middleton and J.R. Bush, "Mixing and mass transfer in filamentous fermentations" In: *Proc. 2nd Int. Conf. on Bioreactor Fluid Dynamics*, R. King (Ed.), BHRA, Cranfield; p. 37 (1988).
- Allen, D.G. and C.W. Robinson, *Can. J. Chem. Eng.*, 69, 498 (1991).

(Eds), Gordon and Breach, pp. 203, New York (1985).

6. Metzner, A.B. and R.E. Otto, A.I.Ch.E. J. 3, 3 (1957).
7. Bongenaar, J.J.T.M., N.W.F. Kossen, B. Metz, and F.W. Meijboom, Biotechnol. Bioeng. 15, 201 (1973).
8. Kemblowski, Z. and B. Kristiansen, Biotechnol. Bioeng. 28, 1474 (1986).
9. Dzuy, N.Q. and D.V. Boger, J. Rheol. 27, 321 (1983).
10. Leong-Poi, L. and D.G. Allen, Biotechnol. Bioeng. 40, 403 (1992).
11. Reséndiz, R., A. Martínez, G. Ascanio and E. Galindo, Chem. Eng. Technol. 14, 105 (1991).
12. Sánchez, A., A. Martínez, L. Torres and E. Galindo, Process Biochem. 27, 351 (1992).
13. Velasco, D. "Reología y mezclado de caldos de fermentaciones industriales conteniendo microorganismos filamentosos", M.Phil thesis, National University of Mexico (Biotechnology Program), Cuernavaca (1993).
14. Galindo, E., A.W. Nienow and R.S. Badham. "Mixing of simulated xanthan gum broths". In: *Proc. 2nd Int. Conf. on Bioreactor Fluid Dynamics*. R. King (Ed.). BHRA, Cranfield, pp. 65 (1988).
15. Margaritis, A. and G.W. Pace. "Microbial polysaccharides", In: *Comprehensive Biotechnology*, M. Moo-Young (Ed.) Pergamon Press Vol. 3, Cap. 49, p. 1005-1041 (1985).
16. Nienow, A.W., D.J. Wisdom, J. Solomon, V. Machon and J. Vlcek, Chem. Eng. Commun. 19: 273 (1983).
17. Nienow, A.W. and J.J. Ulbrecht. "Gas-liquid mixing and mass transfer in high viscosity liquids", In: *Mixing of liquids by mechanical agitation*. J.J. Ulbrecht and G.K. Patterson,