

03072

6  
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES**

**Instituto de Biotecnología**

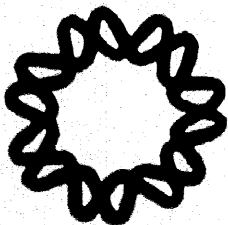
**"Efecto de la geometría del impulsor sobre el  
crecimiento, reología y producción de aromas por  
*Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido."**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

PRESENTA

**I.Q. RUBEN DARIO GODOY SILVA**



CUERNAVACA, MOR.

JULIO DE 1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos ; se realizó bajo la tutoría del Dr. Enrique Galindo Fentanes en el marco del programa de Maestría en Biotecnología de la UACPyP-CCH/UNAM.**

**Para el desarrollo de este proyecto se contó con la financiación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, proyecto 0170P-B), la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM, proyecto IN-50299), la Fundación Internacional para el desarrollo de las Ciencias (IFS, proyecto E/2548-1) y la Secretaría de Relaciones Exteriores de México a través de una beca MUTIS.**

*A ti Señor, por acompañarme en todo momento y brindarme la maravillosa oportunidad de la vida.*

*A mis padres Amalia y Rubén. Gracias por su amor, comprensión, apoyo incondicional y por cada uno de sus sabios consejos; ojalá cada resultado pueda servir en alguna medida como retribución a su esfuerzo.*

*A mis hermanos Natalia y Henry por haber crecido junto a mí, jugando entre los momentos de la vida, como lo hacemos todos, por la diversión de vivir.*

*A Claudia, mi gran amor, por su tenacidad, paciencia, cariño, comprensión y críticas constructivas. Gracias por ayudarme a cuidar y avivar cada día esa llama eterna.*

*A mis amigos Iván, Rosa Piedad, Toño (p), Betty, Alfonso, Juan, Gaby, Lolis, Anabel, Rocío, José Antonio, Celia, Laura, Francisco, Mónica, Sonia y Jairo. Gracias por su amistad, su risa motivante, sus consejos siempre adecuados y por los momentos gratísimos que hemos pasado juntos.*

Hoy recuerdo el gran desánimo y ese sentimiento de impotencia que permanentemente me envolvían en algunas etapas del desarrollo de mi proyecto. A todos aquellos que comiencen una investigación quisiera recordarles unas palabras de aliento:

*".... Todos tenemos miedo : por nuestra seguridad, por el futuro, por el mundo. Tal es la naturaleza de la imaginación humana. Y, empero, todo hombre, toda civilización, han seguido adelante al sentir que tienen la obligación de hacer lo que es preciso hacer. El compromiso personal del hombre con su destreza, el compromiso intelectual y el compromiso emocional amalgamados en uno solo, han realizado el ascenso del hombre".*

*J. Bronowski  
El ascenso del hombre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Enrique Galindo por aceptarme en su grupo de investigación, por la confianza y el apoyo que me dio para la realización de esta tesis, por sus consejos y valiosa dirección, por haberme ayudado a superar mis frecuentes ataques de desánimo y, principalmente, por su amistad**

**Al Dr. Leobardo Serrano, por sus comentarios y ayuda constante en el desarrollo de los experimentos y análisis de resultados, y por su amistad sincera.**

**Al M. en C. Gabriel Ascanio, y su equipo del Centro de Instrumentos por su colaboración en el diseño y construcción de los equipos desarrollados en el transcurso de este trabajo.**

**A la Q. I. Celia Flores, por su ayuda en la parte experimental y su paciencia para instruirme en el desarrollo de los cultivos al inicio del proyecto.**

**Al T. L. Mario Alberto Caro por su ayuda en el desarrollo de las fermentaciones y sus críticas siempre constructivas.**

**Al M. en C. Martín Patiño, por sus indicaciones para el diseño de algunos equipos.**

**Al Dr. Edmundo Brito, por sus comentarios y sugerencias sobre aspectos relacionados con reología y mezclado con impulsores helicoidales.**

**A los miembros del Jurado, por la revisión del manuscrito de tesis, por sus críticas, comentarios y enseñanzas :**

**Dr. Enrique Galindo  
Dr. Edmundo Brito  
Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez  
Dr. Rafael Vásquez  
Dr. Guillermo Gosset L.**

**A mis compañeros de los grupos EGF-OTR por su apoyo constante y las sugerencias para mejorar mi trabajo.**

## RESUMEN

El hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* destaca por su capacidad para sintetizar compuestos de aromas frutales, como la 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PP), característica de coco, y la  $\gamma$ -decalactona con aroma a durazno. Durante su crecimiento, *T. harzianum* genera caldos pseudoplásticos altamente viscosos y con presencia de zonas muertas o mal mezcladas que limitan seriamente la transferencia adecuada de nutrimentos hacia el microorganismo. Un incremento en la velocidad de agitación para tratar de solucionar los graves problemas de mezclado resultó en una disminución drástica de la viscosidad del medio debido al rompimiento de las hifas. Este rompimiento es una consecuencia de la sensibilidad del microorganismo a los esfuerzos de corte y provocó una baja sensible en la productividad del proceso. Como alternativa para abordar los problemas de mezclado en este tipo de cultivos miceliares viscosos se propuso en el presente trabajo evaluar el uso de diferentes geometrías de impulsor.

Se cultivó *Trichoderma harzianum* en fermentadores agitados de 10 L equipados con diferentes tipos de impulsor para evaluar la influencia de la geometría del impulsor en el comportamiento de los cultivos en términos de las cinéticas de crecimiento y producción de aromas por parte del microorganismo y los cambios reológicos sucedidos durante el proceso de fermentación. Los impulsores utilizados fueron series de 3 turbinas Rushton (TR), 3 InterMIG (IMIG) ó 1 impulsor helicoidal (IH3).

El impulsor IH3, equipado con un dispersor de gas particularmente eficiente, dio el máximo rendimiento en biomasa (11 g/L), el cual fue cerca del doble de la cantidad de biomasa obtenida con TR (6.1 g/L), por un efecto combinado de un mejor mezclado y una mejor transferencia de oxígeno con el IH3. Contrariamente, las TR probaron ser los mejores para la producción de aroma entre los tipos de impulsor probados, obteniéndose una concentración máxima de 197 mg/L. La concentración de aroma en los cultivos desarrollados con el IH3 fue la más baja (57 mg/L), probablemente debido a la morfología particular de este cultivo (*pelotilla*) y a una fuerte influencia negativa de mayores TOD en este caldo. Los impulsores IMIG dieron concentraciones de aroma y biomasa intermedios entre los dos extremos mencionados (131 mg/L y 8.3 g/L respectivamente). El aroma obtenido en todos los casos fue  $\gamma$ -decalactona y mostró ser un metabolito secundario, cuya producción parece estimularse cuando la tensión de oxígeno disuelto cae por debajo del 5% de saturación con aire.

Con TR e IMIG el micelio creció en forma filamentosa, con presencia de *grumos* más o menos densos. En ambos casos, los cambios morfológicos observados en el transcurso de las fermentaciones fueron muy similares.

Las diferencias obtenidas en morfología y concentración de biomasa resultaron en marcadas diferencias del comportamiento reológico de los cultivos. Mientras los cultivos con el impulsor helicoidal probaron ser de baja viscosidad, los cultivos con TR e IMIG mostraron características no-Newtonianas pseudoplásticas, que fueron ajustadas al modelo de la ley de la

potencia. El índice de flujo ( $n$ ) en estos 2 tipos de fermentaciones disminuye durante las primeras 60 horas de cultivo desde 1.0 hasta valores que oscilan entre 0.1 y 0.2 y se mantienen en ese intervalo a lo largo de todo el cultivo. El índice de consistencia ( $K$ ) creció durante las primeras etapas de los cultivos, hasta alcanzar un máximo, para decaer posteriormente. El valor del máximo y el tiempo en el cual se alcanzó fueron mayores para TR y resultaron ser dependientes del tipo de impulsor. Para TR se encontró una correlación de tipo exponencial con respecto a la biomasa ( $X$ ) de la forma  $K = K_0 X^p$ . Para los caldos con IMIG, no se pudo obtener una función similar debido a la influencia compleja de la morfología y la edad de cultivo en la reología de este tipo de cultivo, por lo que se necesitan estudios morfológicos más detallados.

El comportamiento de las fermentaciones mostró una marcada influencia del tipo de impulsor en las características de los cultivos, tanto en la morfología y reología como en las cinéticas de crecimiento y producción de aromas en cultivo sumergido. Sin embargo, la utilización del difusor sinterizado en los cultivos con IH3 no permitió definir si los efectos medidos en este tipo de cultivo son resultado de un mejor mezclado o de una mejor transferencia de oxígeno. Es probable que sea un efecto conjunto, pero se requieren más estudios para corroborar esta hipótesis. Finalmente, el uso de diferentes tipos de impulsor puede resultar en una estrategia efectiva para el control de procesos con caldos miceliares altamente viscosos aunque, como se observó, un mejor mezclado del caldo no resultó en un mejor rendimiento de aroma en el proceso.

## **INDICE GENERAL**

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	xi
<b>INDICE GENERAL</b>	xv
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	xviii
<b>INDICE DE TABLAS</b>	xxi
<b>NOMENCLATURA</b>	xxii
1. <b>INTRODUCCION</b>	1
2. <b>ANTECEDENTES</b>	7
2.1 <b>PRODUCCION DE AROMAS POR METODOS BIOLOGICOS</b>	8
2.2 <b>CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS MICELIARES</b>	12
2.2.1 <b>Morfología</b>	13
2.2.2 <b>Reología de caldos de fermentación miceliars</b>	14
2.2.2.1 <b>Nociones básicas de reología</b>	15
2.2.2.2 <b>Dispositivos de medición reológica reportados en la literatura</b>	18
2.2.2.3 <b>Modelos reológicos utilizados en caldos de fermentación miceliars</b>	24
2.3 <b>MEZCLADO Y CONSUMO DE POTENCIA DE CALDOS DE FERMENTACION EN TANQUES AGITADOS</b>	29
2.3.1 <b>Consumo de potencia</b>	29
2.3.2 <b>Impulsores utilizados para fluidos no-Newtonianos</b>	35
3. <b>OBJETIVOS</b>	47
3.1 <b>OBJETIVO GENERAL</b>	48
3.2 <b>OBJETIVOS ESPECIFICOS</b>	48
4. <b>MATERIALES Y METODOS</b>	49
4.1 <b>MICROORGANISMO</b>	51
4.2 <b>CONDICIONES DE PRECULTIVO</b>	51
4.3 <b>CONDICIONES DE CULTIVO</b>	51
4.4 <b>SISTEMAS DE FERMENTACION</b>	52



4.5	VELOCIDAD DE AGITACION	52
4.6	CONSUMO DE POTENCIA DURANTE LA FERMENTACION	55
4.7	BIOMASA	56
4.8	AROMA	57
4.9	MORFOLOGIA	63
4.10	COMPORTAMIENTO REOLOGICO DE LOS CALDOS DE CULTIVO	63
4.10.1	Sistema de medición	63
4.10.2	Fluidos de calibración	65
5.	RESULTADOS Y DISCUSION	67
5.1	CALIBRACION DEL SISTEMA HELICOIDAL IH2	68
5.1.1	Fluidos Newtonianos	68
5.1.2	Fluidos no-Newtonianos (pseudoplásticos)	75
5.1.2.1	Caracterización reológica de los fluidos no-Newtonianos	76
5.1.2.2	Caracterización del impulsor IH2 con los fluidos no-Newtonianos	88
5.1.2.2.1	El método de Metzner y Otto	89
5.1.2.2.2	El método de Rieger y Novak	97
5.1.2.2.3	Comparación de los valores de Ks resultantes	100
5.1.2.3	Comparación de la caracterización reológica con otros trabajos	102
5.1.3	Conclusiones	105
5.2.	SISTEMA DE MEDICION DE POTENCIA	106
5.2.1	Calibración estática	106
5.2.2	Evaluación del desempeño del torquímetro	108
5.2.3	Impulsor helicoidal IH3	110
5.2.4	Conclusiones	119
5.3	EFECTO DEL TIPO DE IMPULSOR SOBRE EL CRECIMIENTO, LA REOLOGIA Y LA PRODUCCION DE AROMAS POR <i>Trichoderma harzianum</i>	119
5.3.1	Efecto del tipo de impulsor sobre el crecimiento y producción de aromas por <i>T. harzianum</i>	120

5.3.2	Efecto del impulsor sobre la reología y morfología del microorganismo en cultivos de <i>T. harzianum</i>	127
5.3.3	Conclusiones	140
6.	CONCLUSIONES GENERALES	143
7.	RECOMENDACIONES	147
7.1	MODIFICACIONES POSTERIORES AL SISTEMA DE MEDICIÓN REOLOGICA	148
7.2	MODIFICACION DEL DISEÑO Y OPERACIÓN DEL BIOREACTOR	149
7.3	MODELOS BIOLÓGICOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS	150
8.	BIBLIOGRAFIA	151

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.1	Efecto de la velocidad de agitación sobre el cultivo de <i>Aspergillus awamori</i> (tomado de Morimura <i>et al.</i> , 1992).	3
1.2	Reograma de caldos de fermentación de <i>T. harzianum</i> (Flores, 1995).	5
1.3	Zonas muertas y mal mezcladas durante el cultivo de <i>T. harzianum</i> (Flores, 1995).	5
2.1	Esquemas propuestos para la ruta bioquímica de producción de 6-pentil- $\alpha$ -pirona por <i>Trichoderma</i> a partir de ácido ricinoléico (Serrano-Carreón, 1992) y de $\gamma$ -decalactona por <i>Yarrowia lipolytica</i> a partir de glucosa (Fronza <i>et al.</i> , 1993).	10
2.2	Comportamiento típico de un fluido adelgazante en un amplio intervalo de gradientes de deformación.	16
2.3	Visualización del fenómeno de deslizamiento en sistemas de medición reológica.	19
2.4	Curvas de potencia para diferentes diseños de impulsores (adaptación de Oldshue, 1983 ; Dawson, 1990 ; Tatterson, 1991 y Argüello, 1993).	31
2.5	Diferentes configuraciones de impulsores utilizados en la industria.	36
4.1	Esquema de los impulsores y su configuración en el reactor.	53
4.2	Vista general de los sistemas de fermentación (a) Fermentador Microferm (T. Rushton e InterMIG). (b) Fermentador de 14 litros (helicoidal).	54
4.3	Arreglo experimental para la calibración estática del torquímetro.	55
4.4	Calibración estática del torquímetro. Lecturas con el milivoltímetro.	57
4.5	Aparato de destilación-extracción empleado para la determinación de aroma.	58
4.6	Curvas de calibración para la cuantificación de aroma.	60
4.7	Cromatograma típico de una fermentación (Fermentación helicoidal).	62
4.8	Dimensiones de los dispositivos de medición reológica (IH2 y <i>vane</i> )	64
4.9	Dispositivos estándar de medición reológica	64
5.1	Torque leído como función de la velocidad de rotación del impulsor. Fluido B-100. Impulsor IH2. (a) Selección de los puntos a considerar para el cálculo de la constante Kp. (b) Cálculo de la constante Kp.	69
5.2	Torque leído como función de la velocidad de rotación del impulsor. Fluido B-5000. Impulsor IH2. (a) Selección de los puntos a considerar para el cálculo de la constante Kp. (b) Cálculo de la constante Kp.	70

5.3	Curva de potencia Newtoniana para el impulsor IH2.	72
5.4	Efecto del claro de pared en el consumo de potencia para la región laminar. Predicciones de $K_p$ para el impulsor IH2. Comparación de correlaciones	74
5.5	Comportamiento reológico de soluciones de goma xantana. $T = 25^\circ\text{C}$ .	77
5.6	Comportamiento reológico de soluciones de CMC.	77
5.7	Reograma del fluido GX-1. $T = 25^\circ\text{C}$ . Dispositivo MS-0/115. (a) Ajuste a los modelos de la ley de la potencia y Carreau. (b) Ajuste a los modelos de Carreau-Yasuda, Cross-Williamson y polinomial de tercer orden.	79
5.8	Reograma del fluido GX-17. $T = 25^\circ\text{C}$ . Dispositivo MS-0/115. (a) Ajuste a los modelos de la ley de la potencia y Carreau. (b) Ajuste a los modelos de Carreau-Yasuda, Cross-Williamson y polinomial de tercer orden.	80
5.9	Reograma del fluido CMC-5. $T = 25^\circ\text{C}$ . Dispositivo MS-0/115. (a) Ajuste a los modelos de la ley de la potencia y Carreau. (b) Ajuste a los modelos de Carreau-Yasuda, Cross-Williamson y polinomial de tercer orden.	81
5.10	Reograma del fluido CMC-15. $T = 25^\circ\text{C}$ . Dispositivo MS-0/115. (a) Ajuste a los modelos de la ley de la potencia y Carreau. (b) Ajuste a los modelos de Carreau-Yasuda, Cross-Williamson y polinomial de tercer orden.	82
5.11	Variación del índice de consistencia ( $K$ ) de la ley de la potencia como función de la concentración para goma Xantana.	85
5.12	Variación del índice de flujo ( $n$ ) de la ley de la potencia como función de la concentración para goma Xantana.	85
5.13	Variación del índice de consistencia ( $K$ ) de la ley de la potencia como función de la concentración para CMC a $25^\circ\text{C}$ .	87
5.14	Variación del índice de flujo ( $n$ ) de la ley de la potencia como función de la concentración para CMC a $25^\circ\text{C}$ .	87
5.15	Potencia consumida para los diferentes fluidos no-Newtonianos como función de la velocidad de agitación. Resultados para el impulsor IH2.	89
5.16	$\gamma_{av}$ calculado como función de la velocidad de rotación. Impulsor IH2. Fluido: GX-3. (a) Escala completa. (b) Ampliación. Cálculo de la constante $K_s$ .	93
5.17	$\gamma_{av}$ calculado como función de la velocidad de rotación. Impulsor IH2. Fluido: GX-20. (a) Escala completa. (b) Ampliación. Cálculo de la constante $K_s$ .	94
5.18	$\gamma_{av}$ calculado como función de la velocidad de rotación. Impulsor IH2. Fluido: CMC-5/25. (a) Escala completa. (b) Ampliación. Cálculo de la constante $K_s$ .	95

5.19	$\gamma_{av}$ calculado como función de la velocidad de rotación. Impulsor IH2. Fluido: CMC-15/25. (a) Escala completa. (b) Ampliación. Cálculo de la constante $K_s$ .	96
5.20	Curva de consumo de potencia para los fluidos no-Newtonianos usados en este estudio. Resultados para el impulsor IH2.	98
5.21	Valores de $K_p$ como función del índice de flujo, $n$ . Impulsor IH2.	99
5.22	Comparación del $K_s$ experimental con valores reportados en la literatura.	101
5.23	Curva generalizada de consumo de potencia para los fluidos no-Newtonianos usados en este estudio. Resultados para el impulsor IH2.	103
5.24	Comparación del comportamiento típico de una medición reológica con los dispositivos de doble gap (MS-0/115) y helicoidal (IH2). Fluido GX-17.	102
5.25	Calibración estática del torquímetro. Lecturas tomadas del amplificador.	107
5.26	Calibración estática del torquímetro. Lecturas con el milivoltímetro.	107
5.27	Determinación del consumo de potencia en agua para sistemas con 3 turbinas Rushton (TR) y 3 impulsores InterMIG (IMIG), utilizando dos sistemas de medición de consumo de potencia. 1 V.V.M.	109
5.28	Curva adimensional de consumo de potencia en agua para impulsores triples (1 v.v.m.).	109
5.29	Características geométricas del impulsor helicoidal IH3.	111
5.30	Reograma de los fluidos de calibración para el impulsor IH3. Dispositivo DIN-114	112
5.31	Resultados de calibración con diferentes fluidos. Impulsor helicoidal IH3.	112
5.32	Potencia consumida por los diferentes fluidos de calibración como función de la velocidad de agitación. Resultados para el impulsor IH3.	115
5.33	Curva de potencia consumida para los diferentes fluidos de calibración. Resultados para el impulsor IH3.	115
5.34	Valores de $K_p$ como función del índice de flujo, $n$ . Impulsor IH3.	116
5.35	$\gamma_{av}$ calculado como función de la velocidad de agitación. Cálculo de la constante $K_s$ . Impulsor IH3.	116
5.36	$K_s$ como una función del índice de flujo para los fluidos utilizados. Resultados para el impulsor IH3.	118
5.37	Curva generalizada de consumo de potencia para los fluidos utilizados en este estudio. Resultados para el impulsor IH3.	118
5.38	Perfiles de biomasa de cultivos de <i>T. harzianum</i> utilizando diferentes impulsores. (a) Escala lineal. (b) Escala logarítmica.	121

5.39	Evolución de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) durante cultivos desarrollados con diferentes tipos de impulsor.	122
5.40	Perfiles de producción de aroma en los cultivos de <i>T. harzianum</i> utilizando diferentes tipos de impulsores.	122
5.41	Vista general de las características de mezclado en la fermentación de <i>T. harzianum</i> . (a) Fermentador MicroFerm (T. Rushton e InterMIG). (b) Fermentador de 14 litros (helicoidal).	125
5.42	Evolución de la morfología de <i>T. harzianum</i> en cultivo sumergido. Impulsor : 3 turbinas Rushton a 200 rpm.	128
5.43	Evolución de la morfología de <i>T. harzianum</i> en cultivo sumergido. Impulsor : 3 IMIG a 205 r.p.m.	129
5.44	Morfología de <i>T. harzianum</i> en cultivo sumergido con el impulsor helicoidal IH3. a.- 24 h de cultivo. b.- 48 h de cultivo.	131
5.45	Comportamiento reológico de caldos de cultivo de <i>T. harzianum</i> como función de la edad de cultivo. Instrumento de medición : IH2. Impulsor InterMIG.	132
5.46	Comportamiento reológico de caldos de cultivo de <i>T. harzianum</i> como función de la edad de cultivo. Instrumento de medición : IH2. Turbina Rushton.	133-134
5.47	Comportamiento reológico de caldos de cultivo de <i>T. harzianum</i> a las 72 h de cultivo. Instrumento de medición : <i>vane</i> . Impulsor IH3.	134
5.48	Evolución de la potencia entregada al cultivo por los diferentes tipos de impulsor.	136
5.49	Evolución de los parámetros de la ley de la potencia K y n, a lo largo del cultivo para dos diferentes tipos de impulsor.	137
5.50	Comportamiento de los parámetros de la ley de la potencia como función de la concentración de biomasa en cultivos desarrollados con diferentes impulsores.	138

## INDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
2.1 Algunos productos misceláneos obtenidos por cultivo sumergido de hongos.	13
2.2 Sinopsis de los modelos utilizados comúnmente para describir el comportamiento reológico de caldos de fermentación miceliares.	17
2.3 Modelos más precisos de la curva de flujo de un material pseudoplástico.	18
2.4 Sumario de datos reológicos experimentales derivados de la literatura.	26-28
2.5 Correlaciones de consumo de potencia y Ks encontradas en la literatura para impulsores helicoidales de uno y dos listones.	41-44
4.1 Condiciones de operación del cromatógrafo de gases para la determinación de aroma.	59
4.2 Propiedades físicas de los fluidos de calibración utilizados.	66
5.1 Valores calculados de Kp para los diferentes fluidos Newtonianos utilizados.	71
5.2 Correlación de datos para la curva de potencia. Impulsor IH2.	71
5.3 Comparación de valores de Kp calculados para el impulsor helicoidal IH2 para fluidos Newtonianos.	73
5.4 Exponentes de las relaciones geométricas para diferentes correlaciones de consumo de potencia para impulsores helicoidales de doble listón.	74
5.5 Parámetros del modelo de la ley de la potencia.	78
5.6 Parámetros del modelo de Cross-Williamson.	83
5.7 Parámetros del modelo de Carreau.	83
5.8 Parámetros del modelo de Carreau-Yasuda.	83
5.9 Parámetros del modelo polinomial.	84
5.10 Coeficientes de la regresión $P = b(0) \cdot N^{b(1)}$ para los fluidos pseudoplásticos utilizados en este estudio.	88
5.11 Valores de Ks obtenidos con diferentes fluidos no-Newtonianos para el dispositivo IH2.	92
5.12 Parámetros del modelo de la ley de la potencia obtenidos con los dispositivos MS-0/115 y DIN-114 y valores obtenidos de Kp para el impulsor helicoidal IH2 con los diferentes fluidos de calibración utilizados.	97
5.13 Parámetros de ajuste para los modelos de Kp(n).	99
5.14 Propiedades físicas de los fluidos de caracterización del impulsor IH2.	113
5.15 Valores obtenidos de Kp para los diferentes fluidos utilizados, como función del índice de flujo. Impulsor helicoidal IH3.	114
5.16 Características geométricas de los impulsores IH3 y HR-1B.	114
5.17 Constante Ks para el impulsor IH3 con los fluidos de calibración.	117
5.18 Valores máximos de las cinéticas de cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> .	120
5.19 Valores medidos de $k_{1a}$ durante cultivos de <i>T. harzianum</i> con diferentes tipos de impulsor.	124
5.20 Comparación reológica de caldos de cultivo de <i>T. harzianum</i> con TR a las 168 h de cultivo.	140

## NOMENCLATURA

- (área 6PP): área bajo la curva del pico de 6-pentil- $\alpha$ -pirona en el cromatograma [mV.min].
- (área e. int): área bajo la curva del pico de estándar interno en el cromatograma [mV.min].
- (área  $\gamma$ -DL): área bajo la curva del pico de  $\gamma$ -decalactona en el cromatograma [mV.min].
- b: Altura de la paleta del impulsor [m].
- b(0): Coeficiente del término independiente en una ecuación polinómica.
- b(1): Coeficiente del término de orden uno en una ecuación polinómica.
- b(2): Coeficiente del término de orden dos en una ecuación polinómica.
- b(3): Coeficiente del término de orden tres en una ecuación polinómica.
- c: Espacio libre entre el impulsor helicoidal y el recipiente [m].
- $C_f$ : Distancia del fondo del fermentador al primer impulsor [m].
- $C_i$ : Separación entre impulsores [m].
- C/N: Relación molar de carbono a nitrógeno en el medio de cultivo.
- d: Diámetro del impulsor [m].
- D: Diámetro del recipiente [m].
- $d_i$ : Diámetro de varillas de sostén del impulsor helicoidal [m].
- $d_g$ : Diámetro del grumo [m].
- e: Espesor de la lámina del impulsor [m].
- [e. int]: Concentración de estándar interno patrón preparado (usualmente 800 mg/L) [mg/L].
- [e. int]: Concentración de estándar interno en la muestra [mg/L].
- F: Fuerza aplicada por las pesas [N].
- h: Altura del impulsor [m].



## Nomenclatura

$H_i$ : Altura del impulsor helicoidal [m].

$H_L$ : Altura del líquido [m].

$H_t$ : Altura total del recipiente [m].

HMTL: Longitud total promedio de hifa [m].

IH2: Impulsor helicoidal de medición reológica.

IH3: Impulsor helicoidal para agitación de caldos en fermentadores de 10L.

IMIG: Impulsor InterMIG (Compañía Ekato).

K: Índice de Consistencia del modelo de la ley de la potencia [ $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ]

$k_L a$ : Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [ $\text{h}^{-1}$ ]

$K_p$ : Constante adimensional de potencia de mezclado ( $K_p = N_p \cdot \text{Re}$ ). Para fluidos Newtonianos depende únicamente de las características geométricas del impulsor. [-]

$K_p(n)$ : Constante adimensional de potencia de mezclado ( $K_p(n) = N_p \cdot \text{Re}_p^n$ ).

$K_s$ : Constante de proporcionalidad de Metzner y Otto [-].

$l$ : Brazo de palanca [m].

$L_c$ : Longitud adimensional (Longitud efectiva/diámetro de la hifa), [-].

$L_{\text{uch}}$ : Longitud de la unidad de crecimiento de hifa (Longitud de la hifa/número de puntas de ramificación), [m].

M: Torque desarrollado por la flecha [N.m].

$M_o$ : Torque debido a la fricción en el sello mecánico y los rodamientos [N.m].

N: Velocidad de rotación del impulsor [rps].

n: Índice de flujo del modelo de la ley de la potencia [-].

$N_s$ : Número de varillas de sostén del impulsor helicoidal [-].

$N_p$ : Número de potencia [-].

$N_h$ : Número de listones helicoidales [-].

P: Potencia entregada al fluido por el impulsor [Watts].

$r$ : Diámetro del disco de las turbinas Rushton [m].

$R$ : Rugosidad del hongo =  $(\text{perímetro del grumo})^2 \cdot (4\pi \cdot \text{área del grumo})^{-1}$  [-].

$Re$ : Número de Reynolds[-].

$Re_a$ : Número de Reynolds aparente [-].

$Re_{pl}$ : Número de Reynolds calculado con el modelo de la ley de la potencia [-].

$s$ : Paso del listón helicoidal [m].

$T$ : Temperatura del fluido [°C].

$t$ : tiempo [s].

$t_c$ : Tiempo de circulación [s].

**TOD**: Tensión de oxígeno disuelto en el cado de cultivo (% con respecto a la saturación con aire).

**TR**: Turbina Rushton.

**V**: Volumen del caldo de fermentación [m<sup>3</sup>]

$V_{e. ini}$ : Volumen de estándar interno agregado (usualmente 250uL) [L].

$V_{muestra}$ : Volumen del caldo de cultivo (usualmente 50 mL) [L].

**vane**: Dispositivo de evaluación reológica de cuatro paletas planas verticales arregladas a 90° entre sí.

**v.v.m.**: Flujo de aire equivalente a un volumen de aire por volumen de medio por minuto.

$w$ : Ancho del listón helicoidal [m].

$w$ : Ancho de la paleta del impulsor [m].

**X**: Concentración de biomasa en el caldo de cultivo [g peso seco L<sup>-1</sup>].

### **Otros símbolos.**

$\gamma$ : Gradiente de deformación [s<sup>-1</sup>]

$\gamma_{av}$ : Gradiente de deformación promedio [s<sup>-1</sup>]

## Nomenclatura

$[\gamma\text{-DL}]_t$ : Concentración de  $\gamma$ -decalactona en la muestra [mg/L].

$\eta$ : Viscosidad del fluido [Pa.s]

$\eta_a$ : Viscosidad aparente del fluido [Pa.s].

$\eta_b$ : Viscosidad plástica del modelo de Bingham [Pa.s].

$\eta_c$ : Viscosidad plástica del modelo plástico de Casson [Pa.s].

$\eta_{\text{medio}}$ : Viscosidad del medio de cultivo [Pa.s]

$\rho$ : Densidad del fluido [ $\text{Kg.m}^{-3}$ ].

$\Delta V$ : Diferencia de voltaje del torquímetro, entre el ensayo con carga y el mismo ensayo pero sin ninguna carga [mV].

$\mu$ : Velocidad específica de crecimiento [ $\text{h}^{-1}$ ]

$\mu_{\text{max}}$ : Velocidad máxima específica de crecimiento [ $\text{h}^{-1}$ ].

$\tau$ : esfuerzo de corte [Pa].

$\tau_0$ : Punto de cedencia aparente de los modelos plásticos de Bingham y Casson [Pa].

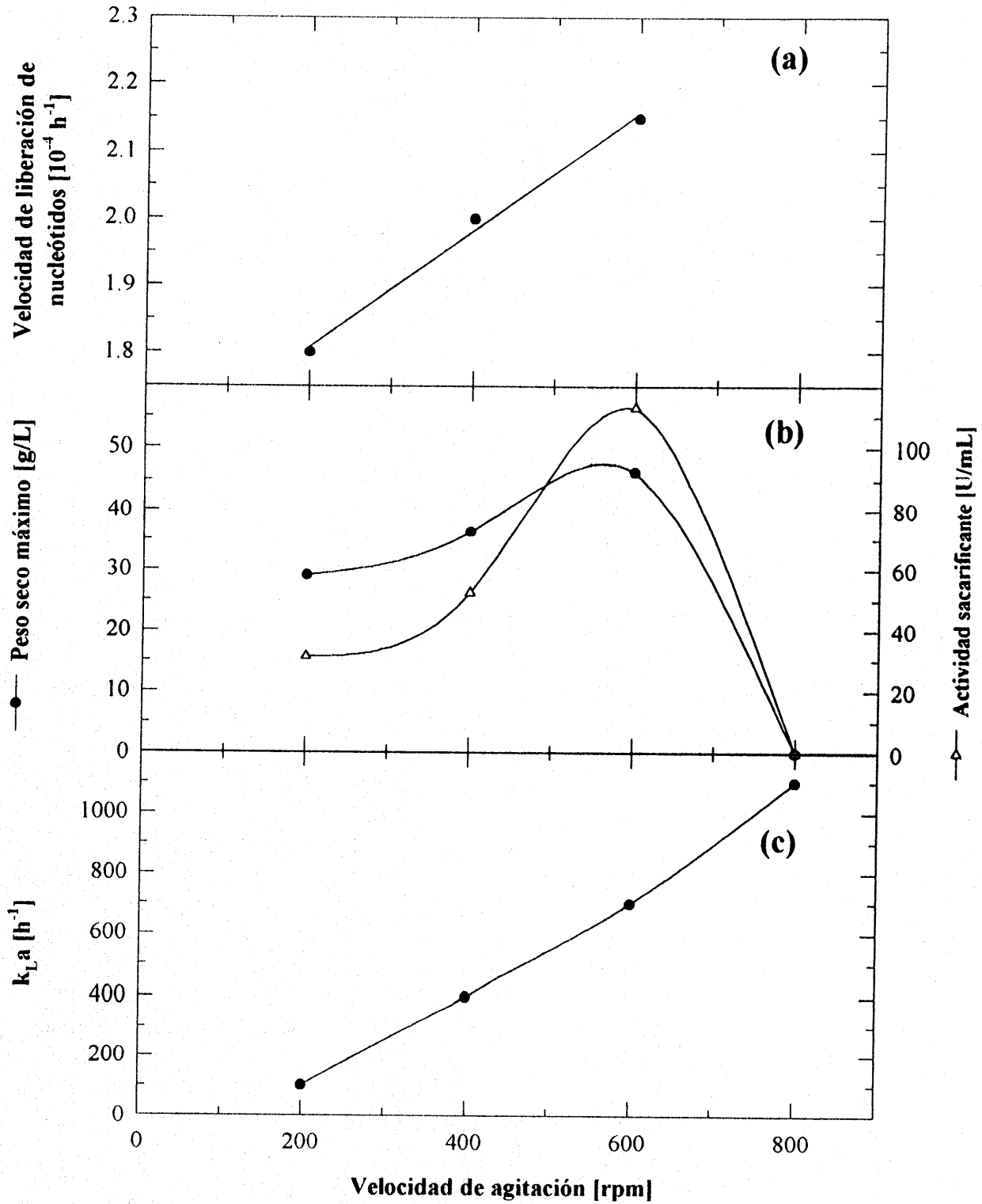
6PP: 6-pentil- $\alpha$ -pirona.

[6PP]<sub>s</sub>: Concentración de 6-pentil- $\alpha$ -pirona en la muestra [mg/L].

## 1. INTRODUCCION

Todos los procesos fermentativos y/o enzimáticos requieren en mayor o menor medida de la agitación, ya sea mecánica, hidráulica o neumática. La agitación se necesita - entre otros motivos - para lograr cierto grado de homogeneidad, mejorar la transferencia de masa (oxígeno, nutrientes, etc.), controlar la temperatura, mantener suspendidas partículas sólidas o lograr un buen contacto entre fases diferentes.

En todos los casos, la agitación genera fuerzas mecánicas que afectarán a los cultivos de diversas maneras. Sólo un adecuado entendimiento de estos efectos puede asegurar un diseño, escalamiento y operación óptimos del proceso productivo. A pesar de ello, existen relativamente pocos trabajos en la literatura que aborden de manera fundamental la búsqueda de información cuantitativa sobre la respuesta de los microorganismos a los esfuerzos mecánicos generados en el biorreactor. Hay una carencia sistemática de información de esta clase en la literatura. Aún para procesos industriales tradicionales, la información explícita sobre los efectos de la agitación en las células a menudo no está disponible. Una de las causas de esta escasez de información general estriba precisamente en la especificidad de la respuesta de cada microorganismo, pudiendo ser muy diferente entre dos cepas de la misma especie. Otra dificultad en lograr un entendimiento profundo del efecto del mezclado en bioprocesos radica en la ambigüedad al definir el concepto de **daño**, esto se debe en gran parte a que las condiciones que generen **ruptura del microorganismo o de los agregados celulares** normalmente no son las mismas que generan **efectos negativos sobre el proceso**. Considerese la producción de una enzima sacarificante por *Aspergillus awamori* (Morimura *et al.* 1992) cuyos resultados se aprecian en la **Figura 1.1**. Durante la primera fase de las curvas de actividad y peso máximos contra velocidad de agitación (**Figura 1.1**, panel **(b)**), un aumento en la velocidad de agitación incrementa la turbulencia y, por tanto, el estrés hidrodinámico que el microorganismo debe soportar (como es ilustrado por un aumento en la liberación de ácidos nucleicos desde las células hacia el medio de cultivo, panel **(a)**); a pesar de ello, el proceso mejora su productividad. Esto sucede porque al aumentar la turbulencia se mejora considerablemente la transferencia de oxígeno y nutrientes hacia el micelio (panel **(c)**). Adicionalmente, el rompimiento parcial de las *pelotillas* (*pellets*) o de los agregados miceliares disminuye la resistencia al transporte de nutrientes y oxígeno hacia las células internas. El efecto positivo combinado de una mejor transferencia y una menor resistencia al transporte sobrepasa al efecto negativo del daño celular que pueda existir, resultando en un incremento en la productividad. Equivalentemente, en el tramo descendente de la curva, por encima de 600 rpm, el efecto del daño celular supera cualquier mejora en transporte de masa y la productividad disminuye. Fenómenos similares reportados en la literatura (Reuss, 1988; Edwards *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1995; Lejeune and Baron, 1995) sugieren que **existe un umbral máximo de agitación, por encima del cual los esfuerzos mecánicos pueden afectar dramática y**



**Figura 1.1** Efecto de la velocidad de agitación sobre el cultivo de *Aspergillus awamori* (Tomado de Morimura *et al.*, 1992)

## Introducción

**negativamente la actividad y/o viabilidad de los sistemas biológicos.** A falta de una descripción general adecuada de este fenómeno, es necesario desarrollar estudios sobre la forma en que los esfuerzos mecánicos afectan el rendimiento particular de procesos fermentativos.

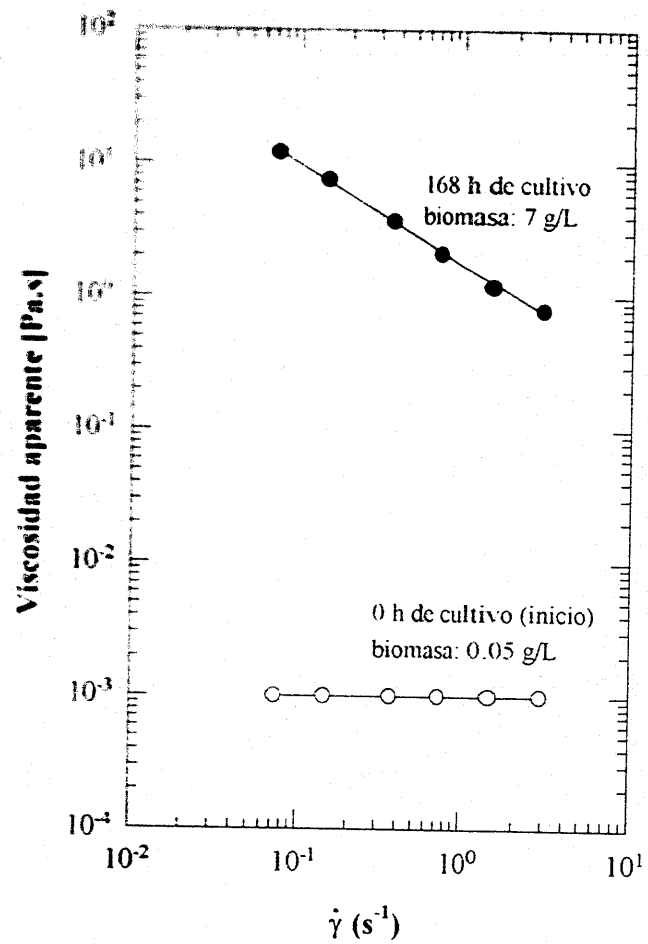
El proyecto de investigación dentro del cual se enmarca el presente trabajo tiene como meta final incrementar la productividad de fermentaciones miceliales altamente viscosas, mediante mejoras en la selección de las condiciones de agitación y en el diseño del fermentador. En este trabajo particular se busca determinar el efecto de la geometría del impulsor sobre

- a-) las propiedades reológicas de los caldos en procesos de fermentación miceliales
- b-) la productividad de los mismos y,
- c-) la morfología del microorganismo.

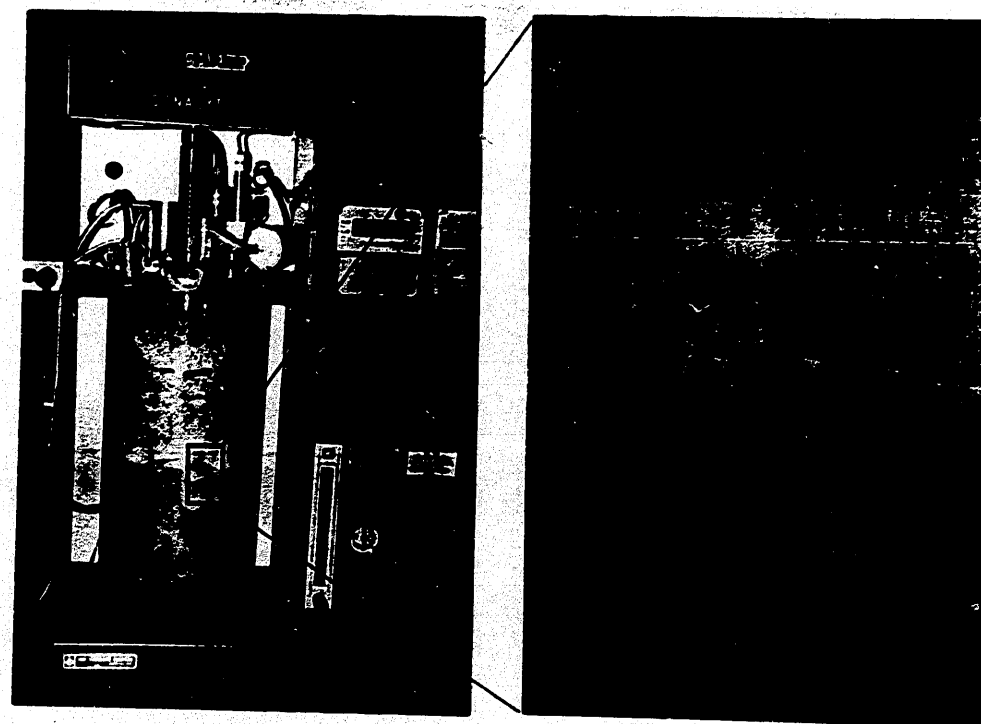
Para investigar tal efecto, se empleó como modelo el cultivo de *Trichoderma harzianum*. Este hongo filamentoso destaca por su capacidad para sintetizar compuestos de aromas frutales, como la 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PP), característica de coco, y la  $\gamma$ -decalactona con aroma a durazno. Estos aromas son productos de gran importancia comercial en las industrias alimentaria, farmacéutica, química y cosmética (Janssens *et al.*, 1992).

Durante su crecimiento, *Trichoderma harzianum* genera caldos altamente viscosos de características pseudoplásticas. El mezclado de estos caldos se hace aún más complejo debido a que el medio de cultivo está compuesto por aceite de ricino como fuente de carbono. Como se ilustra en la **Figura 1.2**, en un cultivo típico desarrollado en un fermentador de 10 litros agitado con un juego de 3 turbinas Rushton (TR), la viscosidad del caldo se incrementa notablemente desde el inicio de la fermentación, debido principalmente al crecimiento del microorganismo y a su morfología. El aumento en la viscosidad y la aparición de un punto de cedencia aparente, originan zonas muertas o mal mezcladas como las que se observan en la **Figura 1.3**. Alrededor de las 50 horas de cultivo, la transferencia de oxígeno al sistema se hace insuficiente y la tensión de oxígeno disuelto cae a niveles inferiores al 5%. En este momento cesa el crecimiento del microorganismo, pero se ve estimulada la producción del aroma (en forma exponencial), sin alcanzar un máximo aparente. Un incremento hecho en la velocidad de agitación para tratar de homogeneizar el caldo de cultivo resultó en una disminución drástica de la viscosidad del medio debido al rompimiento de las hifas. Este rompimiento es una consecuencia de la sensibilidad del microorganismo a los esfuerzos de corte y provoca una baja sensible en la productividad del proceso y por lo tanto en los rendimientos económicos del mismo.

Con base en las observaciones previas, es razonable suponer que la hidrodinámica desarrollada en el reactor juega un papel clave en la productividad de este tipo de cultivos, tanto por el daño directo de los esfuerzos mecánicos sobre el microorganismo, como por la **variación en las velocidades de transferencia de oxígeno y nutrimentos que ocurren como consecuencia de los cambios drásticos en la reología del caldo.** El transporte de materia en **las zonas muertas se realiza principalmente por difusión molecular a una velocidad órdenes**



**Figura 1.2** Reograma de caldos de fermentación de *T. harzianum* (Tomado de Flóres, 1995).



**Figura 1.3** Zonas muertas y mal mezcladas durante cultivos de *T. harzianum* (Tomado de Flóres, 1995).

## Introducción

de magnitud menor que la existente en procesos de transporte convectivo. Como resultado, la producción de aromas en dichas zonas decrece de manera importante por limitaciones de sustrato. Siguiendo el razonamiento, un incremento en la homogeneidad del caldo debería elevar la productividad del cultivo. Sin embargo, un aumento en la velocidad de agitación para lograr una mejor homogeneidad resultó en una baja adicional de la productividad probablemente debido a daños en la estructura del micelio, como es indicado por la disminución de la viscosidad del cultivo. Esta aparente contradicción es consistente con lo expuesto en párrafos anteriores si se asume que se superó el umbral máximo de agitación soportado por el microorganismo. Por lo tanto, se hace necesario la búsqueda de alternativas al incremento en la velocidad de agitación para reducir la presencia de zonas muertas o mal mezcladas en el bioreactor.

Una alternativa para abordar el problema de la homogeneidad en cultivos miceliares viscosos es el uso de diferentes tipos de agitadores. Como es lógico, no hay un tipo de impulsor universal que sea óptimo para todas las aplicaciones. Durante muchos años la industria adoptó la turbina Rushton como el estándar de uso, debido muy probablemente a sus excelentes características de dispersión de gas (Nienow, 1990). Sin embargo, la TR no es ideal para mezclar caldos viscosos de características no-Newtonianas, principalmente porque no promueve un buen mezclado en todo el volumen del fermentador, y por la caída en la potencia que es capaz de suministrar al fluido en condiciones aireadas. Como se expondrá en el siguiente capítulo, otros tipos de impulsor han sido evaluados en términos de sus capacidades de mezclado y transferencia de oxígeno en cultivos viscosos, pero en pocos de ellos se ha medido experimentalmente la potencia suministrada al caldo, de manera que no es fácil sacar conclusiones a partir de sus resultados. Adicionalmente, no existen reportes previos de la influencia de los efectos de el mezclado en la producción de aromas. Durante el desarrollo de este trabajo se estudiará la influencia de tres configuraciones de impulsores en el comportamiento biológico del cultivo de *Trichoderma harzianum* para la producción de aromas frutales. Los impulsores helicoidal e InterMIG se seleccionaron con base en sus menores números de potencia ( $N_p$ ) y tiempos de mezclado comparados con los de la tradicional turbina Rushton (Nienow, 1990; Brito-De la Fuente *et al.*, 1990). El comportamiento de las fermentaciones se evaluará en términos de variables biológicas (evolución de las concentraciones de biomasa y aroma durante el cultivo) y de variables físicas del cultivo (comportamiento reológico y potencia suministrada al caldo). Los resultados obtenidos a partir de tales fermentaciones proveerán información valiosa sobre la influencia del mezclado sobre la producción de aromas por *T. harzianum*.

Actualmente otro estudiante de maestría en el laboratorio realiza un estudio paralelo sobre el efecto de la tensión de oxígeno disuelto en el cultivo, la cual también es afectada por los cambios realizados en la geometría del impulsor. Se espera que dicho estudio provea información que permita evaluar con criterios más precisos los efectos hidrodinámicos y de transferencia de materia, permitiendo alcanzar la meta de incrementar la productividad de este tipo de fermentaciones miceliares, altamente viscosas, a través de un diseño más racional del proceso.



## 2. ANTECEDENTES

Este capítulo está dividido en 3 secciones. En la primera se analiza la producción de aromas por medio de sistemas biológicos. En la sección 2.2 se señalan algunos aspectos importantes sobre cultivos de hongos en reactores agitados. Finalmente, en la sección 2.3 se describen los resultados de algunos trabajos en los que se ha evaluado el uso de diversos sistemas de agitación sobre el comportamiento de diferentes microorganismos en cultivo sumergido, así como la susceptibilidad del microorganismo a los daños por esfuerzos mecánicos.

### 2.1 PRODUCCION DE AROMAS POR METODOS BIOLOGICOS

Tanto las sustancias de aroma (o sencillamente aromas) como las fragancias son compuestos orgánicos volátiles, de un fuerte olor característico y usualmente agradable. Ambos tipos de compuestos son mensajeros químicos que tienen como receptores las células olfatorias en la nariz y, en menor extensión, las papilas gustativas en la lengua. El que un producto particular sea llamado fragancia o aroma depende de su uso. Las fragancias son usadas en perfumes y como tales se aspiran. Los aromas son una parte integral del sabor de un alimento y normalmente se ingieren. Por este motivo, los aromas están sujetos a la aplicación de normas mucho más rigurosas.

Hasta la fecha, la producción de aromas ha seguido dos vías tradicionales: extracción de fuentes naturales, o síntesis química. Los procesos químicos generalmente sufren de ciertos inconvenientes, como la formación de mezclas racémicas indeseables (puesto que generalmente solo uno de los isómeros es el aroma deseado), las condiciones extremas (por ejemplo, presión, temperatura, uso de solventes, etc.) necesarias en algunos procesos y la creciente aversión del consumidor hacia productos químicos adicionados en alimentos. Por otro lado, la extracción de aceites esenciales y otros aromas a partir de fuentes naturales (plantas y animales) se ha encarecido debido a la extremadamente baja concentración de los componentes activos y a la creciente dificultad de encontrar las fuentes. Como alternativa, se han desarrollado tres grandes grupos de procesos para la producción de aromas por vía biotecnológica: procesos microbiológicos, enzimáticos y cultivo de tejidos vegetales. De los tres métodos de producción, los métodos microbiológicos (fermentación) parecen ser los más prometedores, permitiendo la obtención de moléculas de aroma a partir de nutrimentos sencillos como azúcares y aminoácidos.

La producción de aromas por microorganismos vía fermentativa ha sido reportada desde hace más de 70 años. Ya en 1923, Omelianski (citado por Janssens *et al.*, 1992) publicó una revisión de los aromas que, hasta esa época, se sabía eran producidos por microorganismos. Para el lector interesado, se recomienda la revisión de Janssens *et al.* (1992), en la cual se cita una lista de microorganismos productores de aromas a la que, indudablemente, habrá numerosas

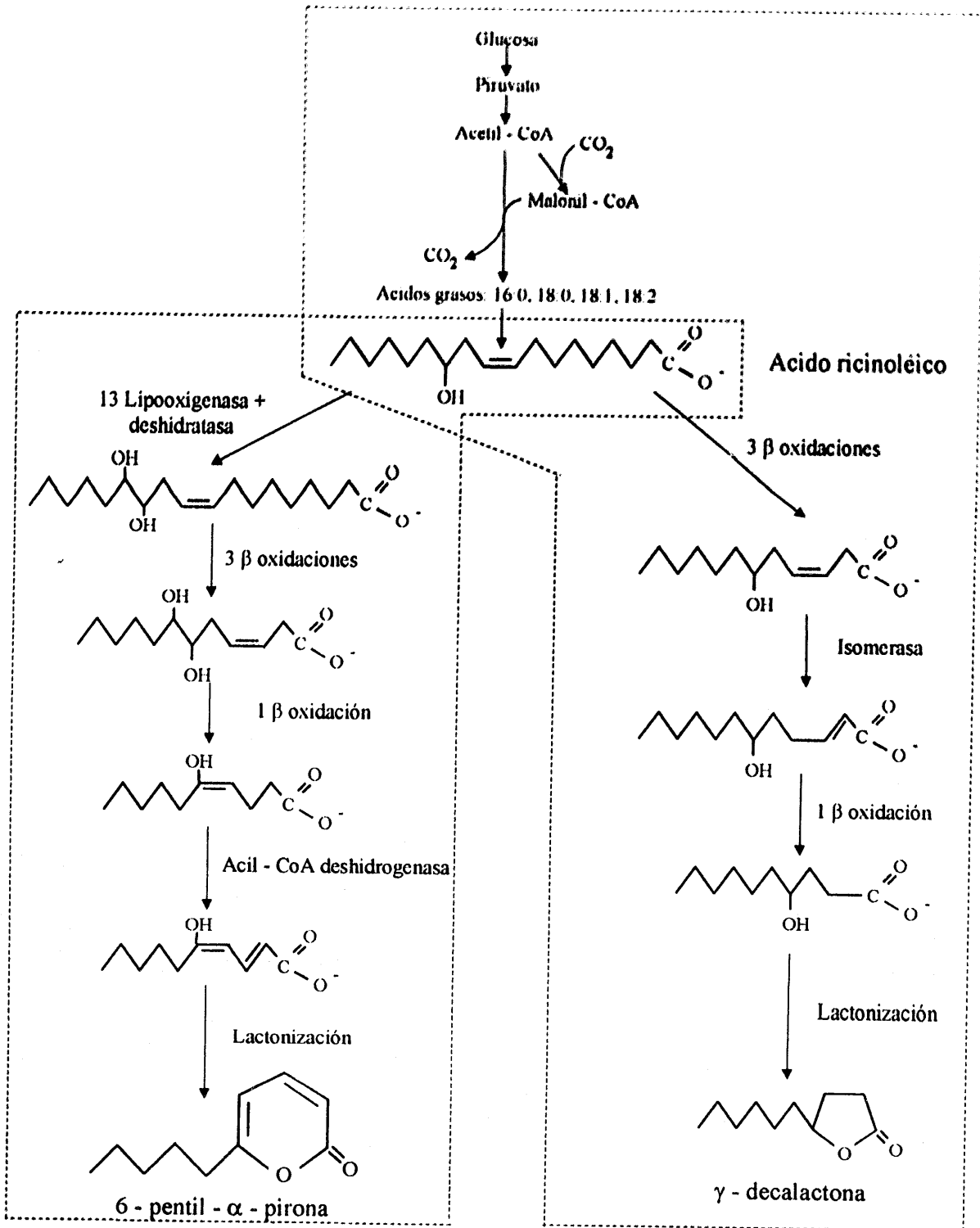
adiciones en el futuro. Dentro de los tipos de microorganismos utilizados en fermentación figuran bacterias, levaduras, algas, hongos, actinomicetos y células de animales y plantas superiores. Se ha reportado la producción de ácidos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, lactonas, pirazinas y terpenos (Janssens *et al.*, 1992), principalmente bajo la figura de patentes, por lo que mucha de la información de proceso no es conocida.

Uno de los grupos de moléculas de aroma que mayor aplicación tienen como aditivo en la industria de alimentos es el de las lactonas. Este tipo de moléculas son ésteres de un ácido carboxílico, formado por esterificación intramolecular de ácidos carboxílicos hidroxilados o halogenados, con la eliminación de agua. Las lactonas han sido aisladas de los principales grupos de alimentos. Una revisión hecha por Maga (1976) muestra que las lactonas se encuentran presentes en alimentos tan variados como carnes y vinos, pasando por frutas y productos lácteos. Su clasificación se basa en el tamaño del ciclo lactónico, siendo las de 4 ( $\gamma$ -lactonas) y 5 ( $\delta$ -lactonas) carbonos en el ciclo, las más importantes organolépticamente.

La producción de lactonas por microorganismos se lleva a cabo por dos vías principales : a partir de ácidos grasos o a partir de aminoácidos ; los lípidos son, sin embargo, la fuente primaria de lactonas en la naturaleza. El mecanismo básico (ver **Figura 2.1**) consiste en una serie de  $\beta$ -oxidaciones sucesivas de hidroxiácidos o de su precursor lipídico (normalmente un ácido graso insaturado, o un cetoácido; Welsh *et al.*, 1989), hasta obtener un carbono hidroxilado en la posición C<sub>4</sub> ó C<sub>5</sub>; posteriormente, el ciclo se cierra mediante una intra-esterificación (lactonización) entre el grupo carboxilo y el grupo hidroxilo de la misma molécula.

Diversos autores han encontrado que la producción de aromas durante cultivos de diferentes microorganismos está influenciada por las condiciones ambientales existentes en el reactor. Tahara *et al.* (1973) cultivaron la levadura *Sporobolomyces odorus* en matraces agitados y evaluaron la producción de aromas para combinaciones de diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, fructuosa y manitol) y nitrógeno (polipeptona, asparagina, glutamina, alanina, nitrato de sodio, sulfato de amonio). Sus resultados mostraron que la producción de las moléculas estuvo asociada al crecimiento. La fuente de nitrógeno mostró una influencia marcada sobre la producción de aroma, siendo la polipeptona la que presentó mejores resultados para  $\gamma$ -decalactona. El mayor rendimiento de  $\gamma$ -decalactona (4.5 mg/L) se obtuvo cuando se utilizó una combinación de manitol y polipeptona, mientras que se consiguió el mejor rendimiento de cis-6-dodecen-4-olido con un medio a base de fructuosa y alanina. Lee and Chou (1994), utilizando el mismo sistema experimental, investigaron el efecto de la adición de sales sódicas de ácidos grasos y aceite de ricino sobre la producción de  $\gamma$ -decalactona y cis-6-dodecen-4-olido. Los resultados indican que la adición de sales sódicas de ácidos grasos disminuyeron importantemente el crecimiento del microorganismo así como la producción de  $\gamma$ -decalactona, probablemente por un efecto de los ácidos sobre la membrana celular. La producción del cis-6-dodecen-4-olido no fue afectada. Por contraste, la adición del aceite de ricino incrementó la producción de  $\gamma$ -decalactona y desvió la producción de otros aromas hacia

Antecedentes



**Figura 2.1** Esquemas propuestos para la ruta bioquímica de producción de 6 - pentil -  $\alpha$  - pirona por *Trichoderma* a partir de ácido ricinoléico (-----, Serrano-Carreón, 1992) y de  $\gamma$  - decalactona por *Yarrowia lipolytica* a partir de glucosa (-----, Fronza *et al.*, 1993).

dicho compuesto. La magnitud de esta diferencia fue una función del tiempo de fermentación, siendo mayor en las etapas tempranas del cultivo.

Welsh *et al.* (1989) reportaron que *Sporobolomyces odorus* en un medio a base de glucosa y peptona produjo una menor cantidad de  $\gamma$ -decalactona en matraces agitados que en un bioreactor agitado, manteniendo la tensión de oxígeno disuelto a 35% de saturación. Sin embargo, no se menciona si el efecto fue debido a la mayor TOD o a los efectos de una mejor homogeneidad del cultivo. Lee *et al.* (1995), por su parte, encontraron que aunque se apreció un mayor crecimiento de *Sporobolomyces odorus* a 2 vvm, se obtuvo un mayor rendimiento de  $\gamma$ -decalactona a 1 vvm; este último fue, sin embargo, el doble del obtenido sin ninguna aireación del cultivo. El pH ácido (pH<4) parece favorecer la formación de  $\gamma$ -decalactona. Se señala que, el dejar el pH sin control (tiende a bajar durante el desarrollo del cultivo), permitió la obtención de la máxima cantidad de aroma en el proceso, fenómeno asociado probablemente a que bajos pH promueven una mayor ciclización de la molécula a partir de su precursor (proceso de lactonización, ver **Figura 2.1**).

Raymond *et al.*, (1990) estudiaron la influencia de la temperatura, la velocidad de agitación y el pH sobre la producción de aromas por bacterias *Pseudomonas fragi* cultivadas en matraz. Se encontró que mientras la temperatura no afecta sensiblemente el crecimiento celular (entre 15 y 25°C), la producción de aromas sí se ve influenciada fuertemente por la temperatura y por la velocidad de agitación. Las concentraciones más altas de los aromas principales (etil-alcanoatos) se obtuvieron a pH 6.5, 11°C y 150 rpm, mientras la condición de agitación óptima para el crecimiento fue de 200 rpm. En un reporte posterior, Raymond *et al.*, (1991) evaluaron el efecto de la suplementación con ácidos grasos C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub> de un medio de cultivo a base de suero de leche. Los resultados mostraron incrementos de hasta 1500 veces la concentración de los principales moléculas de aroma, aunque hubo un descenso en el crecimiento, probablemente asociado a una inhibición por los ácidos grasos.

Hanssen *et al.* (1992) reportaron que la optimización de las condiciones de fermentación les permitió incrementar la producción de 6-pentil- $\alpha$ -pirona (6PP) desde 35 mg/L hasta 1 g/L en un cultivo con *Trichoderma sp*, aunque no se especifican las características de la optimización.

Serrano-Carreón *et al.* (1992) evaluaron la biosíntesis de 6PP por *T. harzianum* en dos medios diferentes. Aunque el microorganismo creció mejor en un medio con relación C/N = 13, los mejores rendimientos de 6PP fueron obtenidos en medios deficientes en nitrógeno con relación C/N = 60. La adición de diferentes ésteres metílicos de ácidos grasos demostró que únicamente el ricinoleato de metilo estimuló la producción de 6PP. De acuerdo con los autores, la 6PP parece acumularse primero en las células y luego es excretado, dando la impresión de ser un metabolito secundario. Adicionalmente, los autores demostraron que a 100 mg/L de 6PP se inhibe el crecimiento posterior del microorganismo. Flores (1995) evaluó la influencia del medio de cultivo del inóculo en la producción de aromas por *Trichoderma harzianum* en biorreactores agitados de 10 litros. El inóculo desarrollado en medio de cultivo rico, basado en

extracto de malta y glucosa, mostró un incremento significativo de la concentración de aroma comparado con el cultivo cuyo inóculo se desarrolló en un medio simple limitado en nitrógeno ( $C/N = 60$ ); el efecto del medio de producción, basado en aceite de ricino, fue marcado: el aroma producido cambió de 6PP, obtenida cuando se usa glucosa, a  $\gamma$ -decalactona. En el mismo trabajo se evaluó el efecto de otras variables: un incremento de la velocidad de agitación de 200 a 300 rpm causó una evidente lisis de las hifas. Contrario a lo encontrado por Lee *et al.* (1995), el control del pH en 5.6 permitió obtener una concentración de aroma más alta (el doble) con respecto a cultivos en que no se controló el pH.

De los párrafos anteriores es posible apreciar que una buena cantidad de los trabajos reportados en la literatura se han desarrollado en matraces agitados, por lo que es difícil sacar deducciones del comportamiento de las diferentes variables en tales sistemas. A nivel industrial, los aspectos tecnológicos de la mayoría de procesos se encuentran protegido por patentes (ver Flores, 1995), debido a los grandes beneficios que puede reportar (por ejemplo, mientras la 4-decalactona producida por vía química cuesta 150 USD/Kg, la misma sustancia tiene un costo de 6000 USD/Kg si es obtenida de fuentes naturales; Janssens *et al.*, 1992). Entre las variables más estudiadas para la producción de lactonas se encuentran el pH y la composición del medio de cultivo. Mucho menos caracterizado se encuentra el efecto de la agitación y la TOD, debido a que la mayoría de procesos utilizados (incluyendo las patentes) involucran microorganismos no filamentosos, sin problemas severos de reología o mezclado. En el caso de la TOD parece haber un efecto marcado sobre la producción de aromas en un rango limitado de concentraciones. Considerando que el mercado mundial de aromas y fragancias estimado para 1990 fue de 6.000 millones de dólares (Cheetham, 1993), que los aromas constituyen el 25% de los aditivos alimenticios utilizados a nivel mundial (Raymond *et al.*, 1990) y la creciente tendencia del público consumidor a solicitar productos "naturales", el desarrollo de trabajos en este sentido resulta justificado.

## 2.2 CARACTERISTICAS DE LOS CULTIVOS MICELIARES

Un gran número de procesos industriales económicamente importantes utilizan hongos (**Tabla 2.1**). Exceptuando a los hongos comestibles, comúnmente cultivados en substratos sólidos, la mayoría de los procesos son desarrollados en cultivos sumergidos en tanques agitados y aireados (Metz, *et al.*, 1979).

En este tipo de cultivos se generan caldos heterogéneos (3 fases: substrato líquido, hongo sólido y aire gaseoso) de características particulares. Entre ellas destacan morfología múltiple y comportamiento reológico complejo. La reología y morfología de los caldos miceliar afectan el mezclado, la transferencia de oxígeno, nutrimentos y calor, y las operaciones de separación posteriores al reactor y son importantes parámetros en el desarrollo y control de tales procesos.

**Tabla 2.1.** Algunos productos misceláneos obtenidos por cultivo sumergido de hongos

Organismo productor	Producto
<i>Aspergillus niger</i>	Acido cítrico, ácido gluconico, celulasa, $\alpha$ -amilasa, pectinasa, amiloglucosidasa y lactasa
<i>Aspergillus terreus</i>	Acido itacónico
<i>Aspergillus sp.</i>	Acido málico
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina G
<i>Penicillium notatum</i>	Penicilina G
<i>Gibberella fujikoroii</i>	Giberellinas
<i>Trichoderma sp</i>	Celulasa
<i>Rhizopus sp</i>	Amiloglucosidasa y ácido fumárico
<i>Aspergillus flavus oryzae</i>	$\alpha$ -amilasa
<i>Aspergillus foetidus</i>	Amiloglucosidasa y lactasa
<i>Aspergillus amawori</i>	Amiloglucosidasa
<i>Beauveria bassiana</i>	Insecticidas biológicos
<i>Metarrhizium anisopliae</i>	Insecticidas biológicos
<i>Acrostalagmus aphidus</i>	Insecticidas biológicos
<i>Sclerotium glucanum</i>	Glucano
<i>Schizophyllum commune</i>	Glucano
<i>Chepalosporium sp</i>	Cefalosporinas
<i>Streptomyces sp</i>	Estreptomycinas

### 2.2.1 Morfología

En cultivo sumergido, los hongos presentan varias formas posibles de crecimiento (Solomons, 1980) : desde células discretas, pequeñas, muy semejantes a células de levadura, pasando por la forma de *pelotillas (pellets)* y *grumos (clumps)*, hasta la forma filamentosa. Cada morfología puede ser caracterizada por multitud de diferentes parámetros tales como : diámetro y longitud promedios de la hifa, número de ramificaciones y longitud total, para micelio disperso, así como área, perímetro, rugosidad, etc., para agregados del hongo (Metz *et al.*, 1979 ; Packer and Thomas, 1990). La morfología presente en un cultivo es una función del microorganismo como tal y su información genética (Braun and Vecht-Lifshitz, 1991), el método y concentración de inóculo utilizado (Smith and Calam, 1980 ; Vecht-Lifshitz *et al.*, 1990 ; Tucker and Thomas, 1992), el medio de cultivo empleado (Metz and Kossen, 1977; Vecht-Lifshitz *et al.*, 1990) y las condiciones ambientales del cultivo, tales como el tipo de fermentador (Hotop *et al.*, 1993 ; Berovic *et al.*, 1993 ; Tucker and Thomas, 1994), velocidad de agitación (Metz and Kossen, 1977 ; Mitard and Riba, 1988), temperatura, pH (Metz and Kossen, 1977 ; Lejeune *et al.*, 1995), tensión de oxígeno disuelto, etc.

El crecimiento en forma filamentosa se caracteriza porque el hongo presenta hifas, usualmente ramificadas, de longitud entre 50 y 500  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 2 a 10  $\mu\text{m}$ . Este tipo de morfología origina la formación de una red tridimensional que, junto con una alta concentración de biomasa en el reactor ( $X > 10 \text{ g/L}$ ), hacen que el caldo de cultivo presente un

comportamiento reológico no-Newtoniano pseudoplástico. Este comportamiento se caracteriza por viscosidades muy bajas en las regiones de alto gradiente de deformación (cerca del impulsor) y zonas de muy alta viscosidad (sin movimiento aparente) en las regiones cercanas a las paredes del tanque. Esto origina serios problemas de homogeneidad y transferencia de materia, resultando en un pobre control de las condiciones del reactor y baja productividad en el proceso. En la forma agregada (*pelotillas*) el micelio se desarrolla en forma de agregados esféricos compactos conformados por una red de hifas entrecruzadas. Estos agregados tienen diámetros del orden de los milímetros. El radio de las *pelotillas* está dado por un equilibrio entre el aumento de tamaño debido al crecimiento del microorganismo y el consiguiente incremento en los problemas de transferencia de masa, tanto de oxígeno como de nutrientes hacia las células más internas de la *pelotilla*, además de la mayor sensibilidad a la fragmentación en las cercanías del impulsor, todo lo cual limita el crecimiento de la *pelotilla*. Las suspensiones de *pelotillas* usualmente son menos viscosas que las suspensiones de la forma filamentosa, por lo que los problemas de mezclado en este tipo de cultivos son mucho menos severos.

En la mayoría de los cultivos, una u otra forma de crecimiento está presente predominantemente (Packer and Thomas, 1990 ; Olsvik *et al.*, 1993) y las consecuencias bioquímicas de ello son profundas : la presencia de una u otra morfología en los cultivos genera patrones de comportamiento hidrodinámico muy diferentes, afectando la reología, los fenómenos de transferencia de oxígeno, la velocidad de crecimiento y la concentración celular máxima en el reactor. La capacidad de producción de algunos metabolitos también varía dependiendo de la morfología ; por ejemplo, un incremento de casi dos órdenes de magnitud se observó en la velocidad de producción y concentración final de poligalacturonidasa generada por *A. niger* entre el micelio disperso y el micelio en forma de *pelotilla*. Incrementos similares fueron observados en la síntesis de  $\alpha$ -galactosidasa por *pelotillas* de *Mortierella vinaceae* (Braun and Vecht-Lifshitz, 1991). Tal fenómeno podría estar asociado con las limitaciones difusionales en las *pelotillas*, aunque esta afirmación no ha sido formalmente demostrada.

### 2.2.2 Reología de caldos de fermentación miceliales

Las características reológicas de los caldos de fermentación son el producto de dos aportes: el aporte del medio de cultivo y el correspondiente al microorganismo. En cultivos de hongos filamentosos, se ha reportado que las propiedades reológicas del caldo son producto principalmente del micelio ya que, al filtrar el caldo, el filtrado obtenido tiene características Newtonianas de baja viscosidad (Solomons, 1980 ; Björkman, 1987-b ; Warren *et al.*, 1995). La única excepción importante a este hecho ocurre cuando el medio de cultivo contiene altas concentraciones de sólidos no disueltos o de sustancias de elevado peso molecular, como harinas (Charles, 1978; Solomons, 1980; Velasco, 1994) o polisacáridos (Reeslev *et al.*, 1995). El tamaño efectivo, la forma, concentración y distribución de tamaños de las partículas miceliales afectan la cantidad de energía disipada a través de las interacciones partícula-líquido. De esta manera, las propiedades reológicas de los caldos de fermentación miceliales normalmente serán determinadas por la concentración y características morfológicas del micelio.

### 2.2.2.1 Nociones básicas de reología

La *reología* es la ciencia de la *deformación* de la materia. La *deformación* es el proceso durante el cual cambian las posiciones relativas de las partes de un cuerpo. Puede ser dividida en dos tipos generales: (1) deformación reversible espontáneamente, denominada *elasticidad* y (2) deformación irreversible, llamada *flujo*. El trabajo utilizado en deformar un cuerpo perfectamente elástico es recuperado cuando el cuerpo recupera su forma original, mientras que el trabajo utilizado en generar flujo es disipado como calor, y no es mecánicamente recuperable, por lo que a menudo es denominado *flujo viscoso*.

Desde el punto de vista de la reología, las propiedades mecánicas de todos los cuerpos materiales pueden describirse en términos de contribuciones elásticas, viscosas o inerciales (es decir, un término que involucra la aceleración). Este último término es tratado por la física clásica, por lo que no se describe aquí. Por otro lado, la deformación elástica usualmente es expresada en términos de una deformación relativa. La deformación viscosa es expresada en términos de la *velocidad de cizallamiento* (o *gradiente de deformación*, como se le llamará en adelante). El *cizallamiento* es un importante tipo de deformación en reología, y puede ser considerado como un proceso en el cual placas paralelas infinitesimalmente delgadas se deslizan unas sobre otras de manera similar a como lo hacen las cartas de una baraja. El cizallamiento es un caso especial de *deformación laminar*, en el cual las laminas son planas. Sin embargo, la deformación laminar puede encontrarse en otras geometrías, por ejemplo, en forma de cilindros concéntricos que se deslizan en forma concéntrica o telescópica. El *gradiente de deformación*, es el cambio en la velocidad de flujo con una distancia medida en ángulo recto a la dirección de flujo. Esto es, el cociente entre la velocidad relativa entre dos placas que se deslizan entre si y la separación existente entre dichas placas.

Para producir flujo o deformación elástica, debe aplicarse un *esfuerzo*. El esfuerzo es definido como una fuerza por unidad de área. Tal fuerza puede aplicarse perpendicularmente (esfuerzo tensil, o presión), tangencialmente (esfuerzo cortante), o en cualquier otro ángulo respecto a la superficie del cuerpo deformado.

La reología, en términos cuantitativos, involucra las relaciones esfuerzo-deformación-tiempo y la influencia sobre dichas relaciones de factores tales como la temperatura. Una de las relaciones esfuerzo-deformación más importantes en un fluido es la viscosidad, la cual puede interpretarse como la resistencia que un material opone cuando se intenta deformarlo. En términos estrictos, la viscosidad es el cociente entre el esfuerzo de corte ( $\tau$ ) aplicado sobre un fluido y el gradiente de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) generado en el mismo:

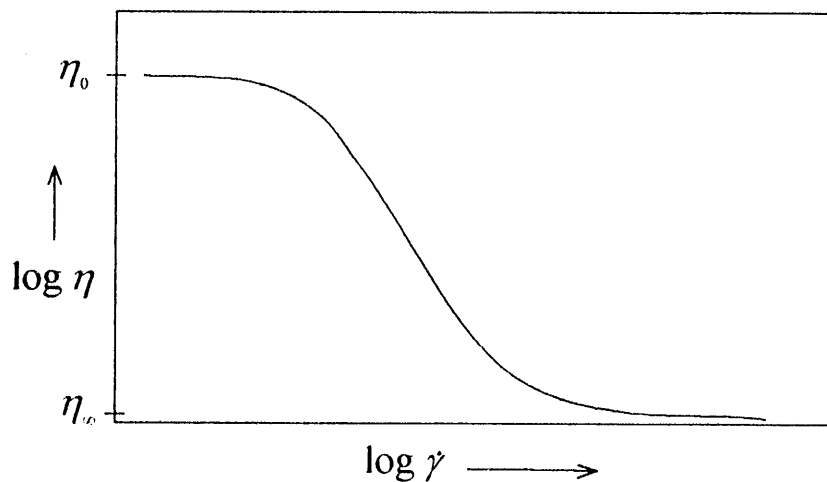
$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{Ec. (2.1)}$$

En forma general, los fluidos pueden clasificarse en dos grandes grupos de acuerdo con el comportamiento de la viscosidad Newtonianos y no-Newtonianos. Los fluidos *Newtonianos*



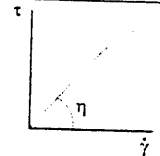
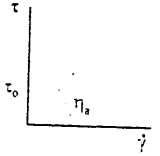
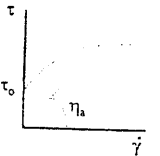
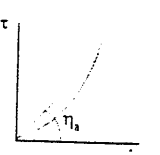
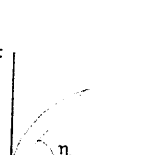
son aquellos que presentan una viscosidad constante como función del gradiente de deformación. Aquellos fluidos en que la viscosidad varíe con el gradiente de deformación son denominados *no-Newtonianos*. Un resumen de algunos ejemplos típicos de fluidos no-Newtonianos se presenta en la **Tabla 2.2**. En estos fluidos, la viscosidad definida de acuerdo con la **ecuación 2.1** no tiene un significado físico preciso debido a que su valor es variable dependiendo de las condiciones con que se mida. Por este motivo, al valor obtenido se denomina *viscosidad aparente*, y representa la viscosidad de un líquido Newtoniano que exhibe la misma resistencia al flujo al gradiente de deformación seleccionado.

Muchos caldos de fermentación micelar exhiben un comportamiento adelgazante al corte a valores intermedios del gradiente de deformación. Este tipo de fluido se denomina pseudoplástico y ha sido modelado adecuadamente con el modelo de la ley de la potencia (**Tabla 2.2**). Se caracteriza porque la viscosidad aparente disminuye con un aumento del gradiente de deformación. Sin embargo, un cuidadoso análisis de esta clase de fluidos ha indicado que el modelo de la ley de la potencia falla en ajustar los datos a través de un intervalo amplio de gradientes de deformación. A muy bajos y muy altos gradientes de deformación, se pueden apreciar comportamientos Newtonianos y las viscosidades en estos dos extremos puede llegar a ser varios órdenes de magnitud diferente. La función logarítmica parece ajustar la parte de la curva existente entre dos porciones límites de viscosidad constante, como es mostrado en la **Figura 2.2**. La viscosidad de la porción recta de la curva a bajos gradientes de deformación se denomina  $\eta_0$  (viscosidad a gradiente de deformación cero), mientras la viscosidad límite de para altos gradientes de deformación se denomina  $\eta_\infty$  (viscosidad a gradiente de deformación infinito). Dado que serán empleados en etapas posteriores de este trabajo, algunos modelos que ajustan este tipo de comportamiento son mostrados en la **Tabla 2.3**.



**Figura 2.2** Comportamiento típico de un fluido adelgazante en un amplio intervalo de gradientes de deformación.

**Tabla 2.2** Sinopsis de los modelos utilizados comúnmente para describir el comportamiento reológico de caldos de fermentación miceliares.

Modelo	Reograma	Ecuación Constitutiva	Viscosidad aparente	Comentarios y algunos ejemplos
Newtoniano		$\tau = \eta \dot{\gamma}$	$\eta_a = \eta$ Constante	Medios de cultivo, soluciones de bajo peso molecular. Es un caso particular de la ley de la potencia para $n = 1$ . Comportamiento normal para caldos de bacterias, levaduras y esporas (Reuss <i>et al.</i> , 1982). Caldos de <i>S. griseus</i> y <i>S. noursei</i> en algún período del cultivo (Deindoerfer and West, citados por Charles, 1978).
No-Newtoniano Plástico Bingham		$\tau = \tau_0 + \eta_B \dot{\gamma}$	$\eta_a = \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} + \eta_B$	La viscosidad disminuye con incrementos en el gradiente de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) una vez que el punto de cedencia ( $\tau_0$ ) ha sido sobrepasado. Caldos de <i>A. niger</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>S. levoris</i> (Charles 1978; Allen and Robinson, 1990).
No-Newtoniano Plástico Casson		$(\tau)^{1/2} = (\tau_0)^{1/2} + \eta_C (\dot{\gamma})^{1/2}$	$\eta_a = \left[ \left( \frac{\tau_0}{\dot{\gamma}} \right)^{1/2} + \eta_C \right]^2$	La viscosidad disminuye con incrementos en el gradiente de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) una vez que el punto de cedencia ( $\tau_0$ ) ha sido sobrepasado. Ajusta mejor que el modelo de la ley de la potencia a bajos $\dot{\gamma}$ . Caldos de <i>P. chrysogenum</i> (Bongenaar <i>et al.</i> , 1973; Reuss <i>et al.</i> , 1982; Liu and Yu, 1993) y <i>T. Reesei</i> (Marten <i>et al.</i> , 1996)
No-Newtoniano Dilatante (Ley de la potencia)		$\tau = K \dot{\gamma}^n$ $n > 1$	$\eta_a = K \dot{\gamma}^{n-1}$	La viscosidad aumenta con incrementos en el gradiente de deformación ( $\dot{\gamma}$ ). Generalmente dispersiones de aceites y partículas sólidas en agua. Soluciones acuosas de almidón de maíz ("Maizena").
No-Newtoniano Pseudoplástico (Ley de la potencia)		$\tau = K \dot{\gamma}^n$ $n < 1$	$\eta_a = K \dot{\gamma}^{n-1}$	La viscosidad disminuye con incrementos en el gradiente de deformación ( $\dot{\gamma}$ ). Falla en predecir valores límite máximo y mínimo de viscosidad, así como punto de cedencia aparente. Los parámetros $K$ y $n$ son válidos solo en un rango limitado de gradientes de deformación. <i>A. niger</i> (Reuss <i>et al.</i> , 1982; Fatile, 1985; Olsvik <i>et al.</i> , 1993), <i>P. chrysogenum</i> (Reuss <i>et al.</i> , 1982).

**Tabla 2.3** Modelos más precisos de la curva de flujo de un material pseudoplástico.

Modelo	Ecuación	Descripción
Carreau-Yasuda	$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 - \eta_\infty} = \left[ 1 + (\lambda \dot{\gamma})^a \right]^{(n-1)/a}$	$\eta_0$ : Viscosidad a gradiente de deformación cero. $\dot{\gamma}$ : Gradiente de deformación.
Carreau	$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 - \eta_\infty} = \left[ 1 + (\lambda \dot{\gamma})^2 \right]^{(n-1)/2}$	$\eta_\infty$ : Viscosidad a gradiente de deformación infinito. $\lambda$ : Constante de tiempo
Cross-Williamson	$\frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 - \eta_\infty} = \left[ 1 + (\lambda \dot{\gamma})^a \right]^{-1}$	$n$ : exponente de la ley de la potencia $a$ : parámetro adimensional

Otro importante fenómeno conectado con el flujo es la existencia de un punto de cedencia aparente. Este fenómeno ha sido descrito comúnmente en caldos de fermentación, por lo que será comentado brevemente. Ciertos materiales, los cuales fluyen a altos esfuerzos de corte, no fluirán en absoluto (o por lo menos de una forma detectable) si el esfuerzo de corte es reducido por debajo de un cierto valor denominado punto de cedencia aparente. Un ejemplo muy conocido de este tipo de comportamiento es el flujo de la crema dental o dentífrico. Una vez que el punto de cedencia aparente ha sido excedido, la pendiente de la curva esfuerzo de corte-gradiente de deformación puede ser constante o no, originando comportamientos descritos por modelos tales como los de Casson y Bingham, descritos en la **Tabla 2.2**.

#### 2.2.2.2 Dispositivos de medición reológica reportados en la literatura

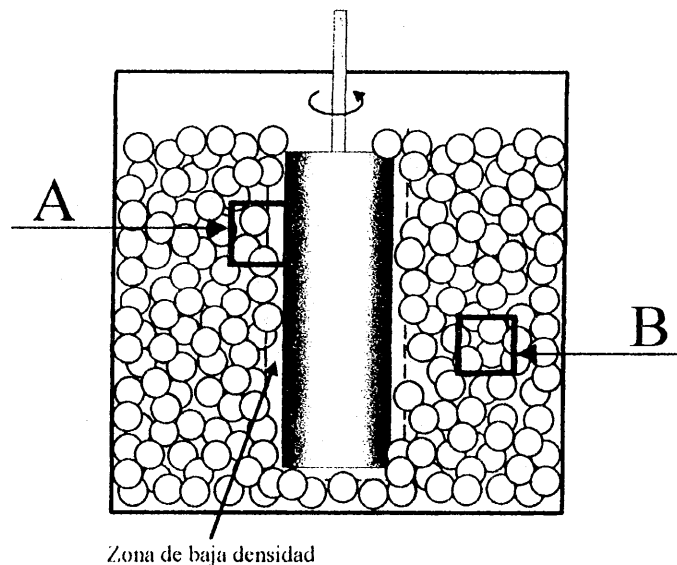
Para la medición de propiedades reológicas de caldos de fermentación miceliar se han utilizado una gran diversidad de técnicas e instrumentos, pero ninguno de ellos es completamente adecuado para todos los caldos ni en todas las circunstancias por lo que su uso estará limitado por las características particulares de cada caldo.

Una cantidad relativamente alta de mediciones de viscosidad de suspensiones miceliar han sido obtenidas empleando viscosímetros estándar de cilindros concéntricos (Allen and Robinson, 1990 ; Pedersen *et al.*, 1993 ; Gavrilesco *et al.*, 1992 ; Berovic *et al.*, 1993 ; Liu and Yu, 1993 ; Warren *et al.*, 1995). Debido a las características heterogéneas del caldo de cultivo, el uso de estos dispositivos está asociado con una serie de problemas de carácter operativo, difíciles de eliminar. Moo-Young *et al.* (1987) reportaron problemas de atascamiento utilizando caldos de *Chaetomium cellulolyticum* y *Neurospora sitophila*. El atascamiento se genera porque el espacio entre los cilindros es menor que el tamaño del agregado miceliar, dificultando el movimiento relativo de los cilindros, los cuales, al girar, detectan lecturas erróneas (anormalmente altas) y, posteriormente, se presenta un fenómeno de ruptura del agregado, causando un cambio de las propiedades reológicas que se quieren medir. Una ampliación de la distancia entre cilindros es suficiente para resolver el problema pero pone en entredicho las

suposiciones geométricas hechas para el cálculo de la viscosidad, haciendo menos precisa la medición.

Pedersen *et al.* (1993) reportaron la medición de propiedades reológicas de caldos de fermentación de *Penicillium chrysogenum*. Los autores señalan problemas de sedimentación a bajas velocidades de rotación (aunque fueron eliminadas haciendo mediciones con un valor creciente de  $\gamma$ ). La sedimentación se presenta por la diferencia de densidades existente entre el hongo y el medio de cultivo; esta diferencia es particular para cada medio y para cada microorganismo, por lo que no es posible prever si la sedimentación será un efecto importante. Para estudiar los efectos de la sedimentación sobre la medición de propiedades reológicas, Metz *et al.* (1979) resuspendieron *Penicillium chrysogenum* tanto en agua como en una solución de glicerol en agua con una densidad similar a la del hongo ( $\rho \approx 1060 \text{ kg/m}^3$ ). A  $0.45 \text{ s}^{-1}$  no se detectaron efectos de sedimentación en la solución con glicerol durante un lapso de 300 s, al contrario de lo que pasó en agua, en donde el torque se redujo al 25% del valor detectado en el instante inicial en el mismo lapso.

Un problema frecuentemente mencionado durante la medición de propiedades reológicas de caldos de fermentación miceliares con cilindros en rotación, es el fenómeno de deslizamiento. Considérese una suspensión de partículas idealmente esféricas en un medio líquido; al moverse el líquido, el roce entre las paredes de las partículas ocasiona una pérdida adicional de energía que se traduce en un aumento de la viscosidad efectiva de la suspensión. Es claro de la **Figura 2.3** que, respecto al elemento giratorio, ningún centro de partícula podrá estar a una distancia menor que 1 radio de dicha partícula, creándose una zona (elemento A) inmediatamente adyacente a la superficie giratoria con una menor densidad de partículas y, por tanto, viscosidad efectiva menor que la existente en el seno de la suspensión (elemento B).



**Figura 2.3** Visualización del fenómeno de deslizamiento en sistemas de medición reológica.

Otro dispositivo utilizado para determinación de propiedades reológicas es el viscosímetro de aguja Brookfield. De acuerdo con el principio de medición, este dispositivo simula un cilindro rotando en un medio infinito. Por tanto, es necesario asegurarse que el recipiente contenedor de la muestra sea suficientemente grande como para eliminar posibles efectos generados por las paredes. Para este tipo de viscosímetro, Bongenaar *et al.* (1973) y Charles (1978) reportaron problemas en las mediciones, ocasionados por deslizamiento y sedimentación. Estos efectos fueron más pronunciados a mayores gradientes de deformación.

Un tercer dispositivo estándar de medición empleado comúnmente para fluidos no-Newtonianos es el de cono y plato. Sin embargo, su uso ha sido muy restringido para evaluación de caldos de fermentación miceliares debido a que la pequeña distancia existente entre el cono y el plato, ocasiona atascamiento.

Como resultado de las anteriores consideraciones, puede concluirse que, a pesar de su uso reiterado, existe en la literatura evidencia muy fuerte de que el uso de sistemas viscométricos rotatorios estándar, tanto de cilindros como de cono y plato, son de valor limitado por la profunda influencia de separación de fases en las propiedades de flujo de caldos miceliares.

Como alternativas al uso de los sistemas mencionados, se han propuestos diferentes tipos de sistemas de medición reológica. Entre ellos destacan el viscosímetro de tubo y el viscosímetro de impulsor.

En el viscosímetro de tubo, la muestra se hace pasar a través de una cierta longitud de un tubo de diámetro conocido y se mide la caída de presión de la suspensión en su paso por el tubo. Para tomar lecturas a diferentes gradientes de deformación, simplemente la muestra se hace pasar a diferentes velocidades de flujo. El cálculo del gradiente de deformación y la viscosidad se realiza de una manera relativamente sencilla. El campo de flujo en este tipo de viscosímetro es menos homogéneo que en un viscosímetro de cilindros concéntricos, pero mucho menos complejo que en un viscosímetro de impulsor. Adicionalmente, el viscosímetro de tubo es más estable que el de impulsor a altos gradientes de deformación, puesto que no existen inestabilidades centrífugas.

En su reporte, Björkman (1987-a) describe el desarrollo de un sistema de viscosímetro de tubo en línea, para medir propiedades de flujo en fluidos de fermentación. El sistema utilizó un mecanismo de bombeo que generó un flujo a pulsos. Esta variabilidad en las mediciones generó una variabilidad equivalente en los datos que no pudo ser eliminada, impidiendo determinar si hubo o no efectos de deslizamiento con los fluidos de calibración. A pesar de ello, el autor señala que la calibración indica que el reómetro de tubo trabaja en una forma adecuada para realizar mediciones reológicas. Björkman (1987-b) aplicó el anterior sistema de tubo para medir la reología de caldos de cultivo de *Penicillium chrysogenum* y comparó los resultados con los obtenidos mediante un dispositivo de cilindros concéntricos. Los resultados para los diferentes mecanismos estuvieron en buen acuerdo y fueron consistentes con teorías no-Newtonianas generalizadas, aunque el fenómeno de deslizamiento se observó constantemente. Blakebrough *et al.* (1978) realizaron mediciones reológicas de caldos de *Aspergillus niger* utilizando viscosímetros de tubo. Los autores señalan que las propiedades reológicas

encontradas corresponden realmente a las medidas en la pared del tubo y resultan diferentes a las medidas con dispositivos de impulsor. Fatile (1985) utilizó sin problemas aparentes un viscosímetro de tubo montado en un fermentador *air-lift* para medir las propiedades reológicas de caldos de fermentación de *Aspergillus niger* como función de la forma y concentración del micelio en el caldo.

Por otra parte, el uso de impulsores (en lugar de cilindros) como elemento móvil de los viscosímetros, fue propuesto para evitar los fenómenos causados por la separación de las fases de las suspensiones miceliales. Sin embargo, el uso de tales impulsores obliga a cuatro consideraciones básicas adicionales durante las mediciones reológicas:

a-) Existe en la literatura evidencia contradictoria sobre la capacidad de los sistemas de impulsor para eliminar realmente los efectos de separación de fases en cultivos filamentosos. Bongenaar *et al.*, (1973) y Roels *et al.*, (1974) propusieron el uso de una turbina Rushton estándar para medir las propiedades reológicas de caldos de fermentación de *Penicillium chrysogenum* a diferentes edades de cultivo. Los autores concluyen que el sistema es útil para determinar las propiedades reológicas de caldos de fermentación viscosos y que los valores de K pueden ser determinados con una precisión del 25%, eliminándose los problemas de separación de fases y sedimentación. Kembrowski y Kristiansen (1986) reportaron el uso de dos tamaños diferentes de sistemas de 6 paletas planas de elevada relación altura/diámetro para medir propiedades reológicas de *Aureobasidium pullulans* y señalan que este dispositivo elimina todos los problemas operacionales asociados con la aplicación de reómetros rotacionales para suspensiones no-homogéneas y que el análisis de los datos da resultados sensibles e internamente consistentes. Velasco (1994) utilizó un dispositivo *vane* - consistente en cuatro paletas de elevada relación altura/ancho, montadas en ángulo recto entre sí - para desarrollar mediciones reológicas en caldos de *Amocolatopsis mediterranei* y *Micromonospora purpurea*.y apunta que tales caldos presentaron una excelente estabilidad reológica con respecto al tiempo y no hubo problemas por separación de fases en sus determinaciones. Marten *et al.*, (1996) caracterizaron el comportamiento reológico de suspensiones de *Trichoderma reesei*, utilizando un dispositivo *vane*. Los autores reportan que no se observaron problemas de sedimentación, por cuanto el orden de las pruebas no afectó el resultado.

Por contraste, Metz *et al.* (1979) utilizaron 5 sistemas diferentes de turbina para realizar mediciones reológicas de *Penicillium chrysogenum*, y encontraron que aunque el sistema de turbina fue propuesto para evitar la sedimentación del hongo, este fenómeno se presentó de hecho durante todas sus mediciones. Kim *et al.* (1983) utilizando un dispositivo helicoidal para determinar la viscosidad de caldos de cultivo de *Absidia corymbifera* en forma de *pelotilla*, detectó el fenómeno de sedimentación cuando el patrón de flujo era descendente, por lo que recomendó realizar mediciones reológicas sólo con flujo ascendente.

Como se aprecia, las evidencias de un mejor comportamiento de los dispositivos de impulsor en cuanto a la separación de fases son contradictorias y parece estar asociado con las características particulares de cada caldo.

b-) Los sistemas de impulsor no permiten la medición de las propiedades reológicas intrínsecas de las suspensiones ya que los patrones de flujo no son perfectamente definidos (como si lo es en el caso de los sistemas de cilindros concéntricos, cono y plato o viscosímetro de tubo). Por este motivo, aunque son muy útiles por su reproducibilidad y consistencia internas, las mediciones obtenidas *son relativas al instrumento de medición empleado* y no son perfectamente comparables con otros dispositivos. Para efectos de comparación, normalmente se realiza una calibración, que conlleva a la determinación de una constante  $K_s$  particular para el sistema de medición (ver sección 2.3.1 y **ecuación 2.12** para definición de la constante  $K_s$ ). Aunque en muchos trabajos se señala que el valor ajustado experimentalmente para  $K_s$  es una constante que depende únicamente de la geometría del impulsor (Bongenaar *et al.*, 1973; Roels *et al.*, 1974; Blakebrough *et al.*, 1978; Kim *et al.* 1983; Kemblowski y Kristiansen, 1986; Velasco, 1994; Marten *et al.*, 1996), otros reportes señalan – aparentemente con razón, a juzgar por un análisis de los reportes inmediatamente antes señalados – que el valor de  $K_s$  es una función tanto de la geometría del impulsor como de las propiedades reológicas del fluido en evaluación, y que la obtención de un valor constante de  $K_s$  se deriva de una pobre caracterización del impulsor, resultante del muy reducido conjunto de fluidos de calibración ensayados (Allen y Robison, 1990 , 1991; Carrillo *et al.*, 1991; ).

c-) Desafortunadamente, la calibración de los dispositivos de impulsor se realiza con fluidos homogéneos (fluidos newtonianos, soluciones de polímeros, etc.), por lo que los resultados para suspensiones no homogéneas están sujetos a incertidumbre, puesto que los sólidos originan una variación importante difícilmente cuantificable en los patrones de flujo.

d-) Adicionalmente a los fenómenos ya discutidos, siempre queda el problema de determinar *cuál* impulsor es el más adecuado para realizar las determinaciones reológicas en un caso dado. Aunque, en principio, cualquier geometría imaginable es válida, es preferible utilizar aquel tipo de impulsor que genere mayores gradientes de deformación en la región laminar de flujo. Esto se debe a que los modelos de viscosidad ajustados son válidos únicamente dentro del intervalo de gradientes de deformación del instrumento y con flujo laminar. Entre mayor sea dicho intervalo, menor es el error cometido durante la extrapolación a los gradientes de deformación observados durante la fermentación. Al respecto, Reuss *et al.* (1982) evaluaron las propiedades reológicas de caldos de fermentación de *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger* utilizando dos viscosímetros de impulsor helicoidal y uno con una turbina Rushton. Las viscosidades aparentes obtenidas con el impulsor de turbina son mayores que las obtenidas con los impulsores helicoidales, mientras que el intervalo de gradientes de deformación es mucho mayor con el impulsor helicoidal. Kim *et al.* (1983) utilizaron un dispositivo helicoidal para determinar la viscosidad de caldos de cultivo de *Absidia corymbifera* en forma filamentosa y de *pelotilla*. El intervalo de  $Re$  laminar fue un orden de magnitud mayor que el encontrado con un impulsor de turbina por Metz (1976 ; reportado por Kim *et al.*, 1983) implicando que el impulsor helicoidal ofrece un intervalo relativamente amplio de gradientes de deformación y buen mezclado en la región de flujo laminar. Allen y Robison (1990 , 1991) evaluaron el uso de tres tipos diferentes de viscosímetros para medición de las propiedades reológicas de soluciones pseudoplásticas de polímeros y de caldos de fermentación de *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* y *Streptomyces levoris*. Se emplearon dos viscosímetros de impulsor con turbinas

Rushton y un impulsor helicoidal. El impulsor helicoidal permitió hacer mediciones en flujo laminar en un rango de gradientes de deformación mucho más amplio ( $\dot{\gamma} < 150 \text{ s}^{-1}$ ) que el de el impulsor de turbina ( $\dot{\gamma} < 40 \text{ s}^{-1}$ ), por lo que puede considerarse más versátil para mediciones reológicas en caldos miceliarios.

Recientemente se han desarrollado nuevos sistemas de medición reológica para determinación de viscosidad en línea de caldos de fermentación. Picque and Corrieu (1988) utilizaron un sensor de barra vibratoria, cuyo principio de medición se basa en el amortiguamiento de la vibración de una varilla debido a la viscosidad del caldo. Entre más viscoso sea el caldo, mayor será el amortiguamiento, medido como una menor amplitud en el movimiento de la varilla. El mismo principio de medición fue utilizado por Reeslev *et al.* (1995) para medir la viscosidad de caldos de fermentación de *Aureobasidium pullulans*. En este caso, la lectura para suspensiones densas de micelio no fue estable, probablemente asociado a sedimentación del micelio u orientación del mismo en el campo de flujo. Los autores concluyen que el sistema no debe ser utilizado para caracterización reológica de fluidos no-Newtonianos dado que el gradiente de deformación no puede ser definido con certeza ni puede ser variado en forma sistemática.

Endo *et al.* (1990) utilizaron un celda de cristal de cuarzo piezoeléctrica para monitorear, en línea, la viscosidad de caldos de fermentación no-Newtonianos de dextrana obtenida con *Leuconostoc mesenteroides*. Los autores no pudieron encontrar una relación lineal entre los datos de viscosidad del sensor y los datos obtenidos con un viscosímetro rotacional. En forma similar al sistema anterior, este dispositivo no puede emplearse para obtener una curva reológica puesto que solo puede trabajar a una frecuencia.

En los párrafos anteriores se han considerado diferentes tipos de sistemas viscométricos aplicados a caldos de fermentación miceliarios y se han señalado sus ventajas y desventajas particulares. Estas consideraciones se utilizaron para la selección del sistema de medición reológico utilizado en el presente trabajo.

Los problemas de separación de fases asociados con los dispositivos estándar rotatorios indican que no son los más adecuados para realizar mediciones reológicas en los caldos miceliarios de este trabajo, por lo que fueron descartados a pesar de su disponibilidad en el laboratorio.

El reómetro de tubo es recomendado en varios trabajos como uno de los más idóneos para tal tipo de mediciones ; sin embargo, su uso está asociado con una serie de problemas operativos : la construcción del sistema puede resultar costosa ; se requieren grandes diámetros y longitudes para eliminar los problemas de deslizamiento e inhomogeneidad de flujo. Este hecho, junto con la necesidad de variar el gradiente de deformación mediante variaciones en el flujo que circula por la tubería, implican el uso de grandes volúmenes para la medición (usualmente todo el caldo de cultivo a nivel de banco) y de una bomba para su recirculación, lo que requiere un sistema de mantenimiento de esterilidad muy eficiente. El uso de la bomba puede afectar las características reológicas del caldo de fermentación debido a una alteración de las propiedades morfológicas del microorganismo por los esfuerzos mecánicos generados por la bomba. Este último efecto, junto con la suspensión de la aireación durante el tiempo de medición, pueden



generar alteraciones en el desarrollo normal del cultivo. Por estos motivos, su construcción y uso fueron descartados.

Los viscosímetros de impulsor parecen eliminar en forma más o menos adecuada los problemas de separación de fases presentes en otros tipos de viscosímetros, pero presentan la desventaja de ser sistemas relativos y, por tanto, su uso está sujeto a una calibración con fluidos homogéneos que puede ser criticada severamente. Sin embargo, sus resultados son consistentes internamente y su construcción es muy sencilla y económica, por lo que se decidió el uso de este tipo de dispositivos. En el laboratorio se disponía de un sistema *vane*, desarrollado para trabajos anteriores con caldos miceliales (Velasco, 1994). Sin embargo, su aplicación en caldos de *Trichoderma harzianum* estuvo asociado con problemas de reproducibilidad y sedimentación micelias (Flores, 1995), además de necesitar grandes volúmenes de caldo para cada determinación (600 mL). Si se toma en cuenta que el fermentador es de 10 L de volumen útil, solo es posible la determinación reológica en 2 ó 3 muestras sin afectar excesivamente el comportamiento de la fermentación, limitando la información que se puede obtener del cultivo. Como factor adicional, en la caracterización del dispositivo *vane*, Velasco (1994) utilizó un sólo valor de  $K_s$ , derivado probablemente de una caracterización incompleta del impulsor y, por ello, el uso del *vane* implicaba necesariamente una nueva caracterización del mismo. Por estos motivos, se decidió la construcción y calibración de un sistema helicoidal para estudiar el comportamiento reológico de los caldos de fermentación, con la ventaja que según la literatura permite un mayor intervalo de gradientes de deformación en flujo laminar. Desafortunadamente, algunos problemas demoraron la utilización del dispositivo helicoidal, por lo que el dispositivo *vane* fue empleado en algunos estudios reológicos, como se indicará convenientemente en el capítulo 5.

### 2.2.2.3 Modelos reológicos utilizados en caldos de fermentación miceliales.

Clásicamente las características reológicas de suspensiones miceliales han sido descritas por medio de modelos simples de 2 parámetros (ver **Tabla 2.2**). Estos modelos asumen que las características del fluido son independientes del tiempo en la escala de duración de las mediciones. En la mayoría de caldos, esta condición se cumple en forma más o menos ajustada, aunque hay reportes (Velasco, 1994) que señalan una alta inestabilidad reológica de caldos de cultivo miceliales debido a lisis celular por agotamiento del oxígeno disuelto en el caldo durante el lapso entre la toma de muestras y el desarrollo de la medición.

Otros comportamientos reológicos reportados para caldos de cultivo miceliales incluyen el punto de cedencia aparente (Bongenaar et al., 1973; Charles, 1978; Allen and Robinson, 1990; Marten et al., 1996), fenómenos típicamente viscoelásticos como el efecto Weissenberg (Velasco, 1994) o características similares a un gel a bajas deformaciones (Marten et al., 1996).

Como se busca establecer las características reológicas de caldos de *Trichoderma*, no es intención de este trabajo realizar un extenso análisis de la reología de caldos miceliales, sino establecer antecedentes de la manera como han sido expresadas dichas propiedades para otros

tipos de caldos de cultivo miceliares. La **Tabla 2.4** presenta un resumen de datos experimentales de reología de caldos miceliares obtenidos mediante una revisión de la literatura, clasificados a partir de los modelos presentados en la **Tabla 2.2**. Como puede verse, una cantidad apreciable de los datos reportados prefieren el uso de la ley de la potencia, seguido por el modelo de Casson. Como señalan Reuss *et al.* (1982), los diferentes modelos pueden ajustar los datos de una manera prácticamente idéntica en un intervalo limitado de gradientes de deformación. Por este motivo, el uso de una u otra ecuación muchas veces es motivado por intereses personales del investigador o facilidad de manejo. El hecho de que la ley de la potencia sea más extensamente utilizada se debe, quizás, a que una gran cantidad de correlaciones de transferencia de masa y calor utilizan este modelo, lo cual es a su vez originado porque la mayoría de estas correlaciones se derivan de experimentos con fluidos modelo, normalmente soluciones de polímeros que generalmente se adaptan muy bien a la ley de la potencia. A conocimiento del autor, el único trabajo realizado en reología de caldos de *Trichoderma* utilizó el modelo de Casson (Marten *et al.*, 1996). No obstante, en el presente trabajo se decidió el uso de la ley de la potencia para caracterizar el comportamiento reológico de caldos de fermentación micelar de *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido.

Como es posible apreciar en la **Tabla 2.4**, la reología de suspensiones miceliares depende - entre otros parámetros - de la morfología, la concentración de biomasa, la flexibilidad y deformabilidad de las partículas (normalmente dependiente de la edad del cultivo) y su tamaño (Blanch and Bhavaraju, 1976 ; Charles, 1978 ; Metz *et al.*, 1979). El crecimiento de un hongo en forma filamentosa origina la formación de una red tridimensional que estructura el fluido, y puede darle características no-Newtonianas altamente viscosas a los caldos de fermentación, aún a concentraciones de biomasa relativamente bajas (Solomons, 1980). Por otro lado, la reología derivada del crecimiento en forma de *pelotillas* no ha sido descrita convenientemente por ninguna ecuación general. Se ha intentado modelar la reología de *pelotillas* en forma similar a la de partículas esféricas suspendidas en un medio líquido. Metz *et al.* (1979) señalan una influencia exponencial de la biomasa en la viscosidad, pero el exponente varía ampliamente dependiendo del microorganismo ; además concluyen que el uso de relaciones para suspensiones de otras partículas no es aplicable a las suspensiones de *pelotillas*. Kim *et al.* (1983) señalan comportamiento Newtoniano a bajas concentraciones de biomasa y pseudoplástico a altas concentraciones, mientras que Charles (1978) menciona un comportamiento tipo Casson, también con influencia de la concentración de biomasa.

Lo anterior sugiere que los estudios reológicos deben estar asociados con estudios cinéticos y morfológicos del microorganismo. Sin embargo, ningún esfuerzo fue realizado en este trabajo para correlacionar las características morfológicas y reológicas del caldo. Una estudiante de posdoctorado en nuestro laboratorio trabaja actualmente en la caracterización morfológica de *T. harzianum* por medio de análisis de imágenes; se espera que esta metodología pueda servir de complemento a las determinaciones reológicas desarrolladas durante el presente trabajo.

**Tabla 2.4** Sumario de datos reológicos experimentales de caldos miceliarios derivados de la literatura.

Modelo	Organismo	Referencia	Comentarios
Newtoniano	<i>S. noursei</i>	Deindoerfer and West, citados por Charles, 1978	El resultado es inesperado. Charles (1978) señala sus sospechas sobre algún error, probablemente la medición de viscosidades a $\gamma = 0$ .
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Reuss <i>et al.</i> , 1982	El incremento en viscosidad es dependiente de la concentración de levadura y de la presión osmótica.
Pseudoplástico	<i>Endomycopsis sp.</i>	Taguchi and Miyamoto, 1966, citados por Charles, 1978	$0.3 \leq n \leq 0.9$
	<i>P. chrysogenum</i>	Blanch and Bhavaraju, 1976	
	<i>A. niger</i>	Blakebrough <i>et al.</i> , 1978	K y n son función de la biomasa y de la velocidad de crecimiento, aunque ninguna correlación fue desarrollada.
	<i>P. chrysogenum</i> <i>A. niger</i>	Reuss <i>et al.</i> , 1982	Para <i>P. chrysogenum</i> : $K = f(X)$ ; $n \approx$ independiente de X. para <i>A. niger</i> : $K = 0.03 \cdot X^{-2.48}$ ; $n \propto \frac{1}{X}$
	<i>A. pullulans</i>	Kemblowski and Kristiansen, 1986	K, n son función de la edad del cultivo.
	<i>A. niger</i>	Olsvik and Kristiansen, 1992	K, n simultáneamente dependientes de la velocidad de crecimiento, la tensión de oxígeno disuelto y la concentración de biomasa.
	<i>P. chrysogenum</i> <i>P. griseofulvum</i> , <i>S. flavus</i> <i>S. aureofaciens</i> <i>S. erithreus</i> , <i>S. griseus</i> <i>S. noursei</i> , <i>S. rimosus</i> <i>N. mediterraneai</i> .	Gavrilescu <i>et al.</i> , 1992	K, n funciones del microorganismo, la edad del cultivo y las condiciones del cultivo.
	<i>A. niger</i>	Olsvik <i>et al.</i> , 1993	K, $n = f$ (Rugosidad (R), % <i>grumos</i> , Compactitud, $\mu$ , X, TOD). Los efectos más importantes fueron los de X y R : $K = -0.95 + 0.0021 \cdot R \cdot X^{1.7}$
	<i>S. erythraea</i> <i>A. roseorufa</i> , <i>S. rimosus</i>	Warren <i>et al.</i> , 1995	K se incrementó con un incremento en la biomasa, mientras que el valor de n permaneció aproximadamente constante. La influencia de la morfología, expresada como longitud principal de la hifa, no es clara.

**Tabla 2.4** Sumario de datos reológicos experimentales de caldos miceliares derivados de la literatura (Continuación).

Modelo	Organismo	Referencia	Comentarios
Pseudoplástico	<i>Absidia corymbifera</i>	Kim <i>et al.</i> , 1983	Suspensiones de <i>pelotillas</i> son Newtonianas hasta 28 g/L. Para $X > 28$ g/L las suspensiones son pseudoplásticas. Las suspensiones filamentosas siempre son pseudoplásticas. $n$ es función compleja de $X$ y de la morfología ; $K = A \cdot X^b$ , con : $K_{micelio} \gg K_{pelotilla}$ $b_{pelotilla} > b_{micelio}$ $A_{pelotilla} \ll A_{micelio}$
	<i>A. niger</i>	Fatile, 1985	$K \cdot n = \alpha \cdot X^\beta \cdot d_p^\sigma$
	<i>A. niger</i> , <i>S. levoris</i> <i>P. chrysogenum</i>	Allen and Robinson, 1990	$K = \alpha \cdot X^\beta$ , con $\alpha$ , $\beta$ dependiendo del microorganismo.
	<i>A. niger</i>	Berovic <i>et al.</i> , 1993	Se evaluó el efecto del tipo de reactor (agitado vs columna). Hay cambios en la morfología de las <i>pelotillas</i> . $K$ es función de la biomasa y de las condiciones de operación.
	<i>P. chrysogenum</i>	Pedersen <i>et al.</i> , 1993	$K$ es función exponencial de la biomasa ; $n$ permanece prácticamente constante entre 0.4 y 0.5
	<i>M. purpurea</i> <i>A. mediterranei</i>	Velasco, 1994	$K$ es función de la biomasa ; $n$ permanece constante. Se señala, sin embargo, la determinación de punto de cedencia aparente que también es función de la biomasa.
Casson	<i>P. chrysogenum</i>	Boongenaar <i>et al.</i> , 1973 Roels <i>et al.</i> , 1974	$\eta_c$ y $\tau_o$ se incrementan con el tiempo de reacción y la concentración celular de acuerdo con : $\eta_c = \eta_{medio}^{0.5} (1 + C_1 \sqrt{\delta_1 X})$ $\tau_o = \delta_1 X^{2.5}$ en donde $\delta_1$ es un factor morfológico .
	<i>S. griseus</i>	Richards, citado por Charles, 1978.	
	<i>P. chrysogenum</i>	Charles, 1978	$\tau_o = 1.67 \cdot 10^{-4} X^{2.5} (L_c^*)^{0.8}$ $\eta_c = 5.454 X^{1.0} (L_{uch})^{0.6}$ Suspensión filamentosa.

Tabla 2.4 Sumario de datos reológicos experimentales de caldos miceliarios derivados de la literatura (Continuación).

Modelo	Organismo	Referencia	Comentarios
Casson	<i>P. chrysogenum</i> <i>Sporotrichum</i> <i>pulverulentum</i>	Charles, 1978	Hay influencia de la concentración de biomasa, pero no se encontró una correlación. Suspensión de <i>pelotillas</i>
	<i>P. chrysogenum</i> <i>A. niger</i>	Reuss <i>et al.</i> , 1982	Los resultados con Casson ajustan tan bien como la ley de potencia o el modelo de Herschel and Bulkley.
	<i>A. niger</i> <i>S. levoris</i> <i>P. chrysogenum</i> ,	Allen and Robinson, 1990	$\eta_c, \tau_o = \alpha \cdot X^\beta$ , con $\alpha, \beta$ dependiendo del microorganismo.
	<i>P. chrysogenum</i>	Liu and Yu, 1993	$\tau_o = f(\text{biomasa, morfología})$ ; diferentes parámetros morfológicos mostraron excelente correlación entre sí.
	<i>T. reesei</i>	Marten <i>et al.</i> , 1996	$\eta_c$ y $\tau_o$ variaron con la concentración celular y la morfología en forma bimodal compleja, dependiendo del sustrato, del suministro de oxígeno y de la velocidad de agitación. Los autores presentan datos de mediciones reológicas oscilatorias, presentando características de gel a bajas deformaciones.
Bingham	<i>A. niger</i>	Solomons and Weston, citados por Charles, 1978	$\eta_B = 2.65 \log X$
	<i>P. chrysogenum</i>	Deindoerfer and Gaden, citados por Charles, 1978	$\eta_B$ y $\tau_o$ variaron directamente con la concentración celular y/o el tiempo de fermentación.
	<i>C. hellebori</i>	Deindoerfer and West, citados por Charles, 1978	Comportamiento Bingham al inicio y final de la fermentación
	<i>S. griseus</i>	Deindoerfer and West, citados por Charles, 1978	Comportamiento Bingham al inicio de la fermentación; posteriormente Newtoniano.
	<i>P. chrysogenum</i>	Charles, 1978	
	<i>A. niger, P. chrysogenum, S. levoris</i>	Allen and Robinson, 1990	$\eta_B, \tau_o = \alpha \cdot X^\beta$ , con $\alpha, \beta$ dependiendo del microorganismo.

## 2.3 MEZCLADO Y CONSUMO DE POTENCIA DE CALDOS DE FERMENTACIÓN EN TANQUES AGITADOS

El diseño de prácticamente todo tipo de biorreactor contempla la adición de energía al caldo de fermentación en forma de agitación, ya sea mecánica, neumática o hidráulica, con el fin de brindar una homogeneidad satisfactoria y promover los fenómenos de transferencia de materia y energía a velocidades tales que no afecten las características cinéticas intrínsecas del cultivo. Estas características son, a su vez, fuertemente dependientes de la hidrodinámica existente en el seno del reactor. En general, el estado hidrodinámico que experimenta el cultivo varía como función tanto del tiempo de cultivo como de la ubicación espacial en el interior del recipiente. La magnitud de la variación depende, principalmente, de las características reológicas del cultivo. En el caso de cultivos miceliares, la transformación desde un fluido Newtoniano de baja viscosidad (al inicio del cultivo) hasta una suspensión de características no-Newtonianas de alta viscosidad, fuertemente pseudoplástica y con presencia de punto de cedencia aparente, lleva a una disminución notable de la homogeneidad y a la aparición de zonas muertas o mal mezcladas. En estas zonas sin movimiento, las limitaciones en la transferencia de materia y calor traen como resultado un pobre desempeño de la fermentación, caracterizado por bajos rendimientos y productividades. Para contender con esta situación, la única manera de controlar la hidrodinámica del reactor consiste en variar las condiciones de agitación; en el caso de sistemas agitados mecánicamente, el control se logra a través de cambios en la velocidad de agitación o en el tipo de impulsor utilizado. Aunque no existe un procedimiento o algoritmo que permita la selección de un tipo de impulsor o una velocidad óptimos para un proceso particular (siendo necesario una evaluación experimental en cada caso), el estudio del efecto del mezclado en fermentaciones de características reológicas similares puede proveer un mejor entendimiento de los fenómenos hidrodinámicos que pueden existir en el reactor y servir de base para una selección más racional de las características geométricas de sistemas de mezclado para el presente trabajo.

### 2.3.1 Consumo de potencia<sup>†</sup>

El término consumo de potencia indica la energía por unidad de tiempo que el impulsor logra transferir hacia el fluido. Es una de las variables de fermentación más importantes, ya que de ella dependen los tiempos de mezclado, los coeficientes de transferencia de masa y calor, y la velocidad de algunas reacciones químicas. Pese a ello, su determinación normalmente necesita de evaluación experimental, ya que depende de muchos parámetros de proceso como las características reológicas del fluido que se esté agitando (Newtoniano, no-Newtoniano), las condiciones de operación (aireación o no, flujo laminar o turbulento) y las características geométricas del tanque (tipo y dimensiones del impulsor, número de deflectores, posiciones relativas de los elementos del tanque, etc.).

---

<sup>†</sup> La nomenclatura utilizada en esta y otras secciones se encuentra convenientemente descrita en la sección correspondiente, en las páginas iniciales de este reporte.

Con fines básicamente de escalamiento, la dependencia de la potencia entregada al caldo de fermentación como función de las variables mencionadas comúnmente ha sido expresada a través de correlaciones semi-empíricas. Usualmente, los resultados de estudios de consumo de potencia se presentan en términos de dos grupos adimensionales: el número de potencia y el número de Reynolds. El número de potencia se define como:

$$Np = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot d^5} \quad \text{Ec. (2.2)}$$

En el caso general, el número de Reynolds de un impulsor para un fluido se define como:

$$Re_a = \frac{\rho N d^2}{\eta_a} \quad \text{Ec. (2.3)}$$

Para el caso de un fluido Newtoniano,  $\eta_a$  es constante e igual a la viscosidad  $\eta$ , por lo cual el número de Reynolds se reduce a:

$$Re = \frac{\rho \cdot N \cdot d^2}{\eta} \quad \text{Ec. (2.4)}$$

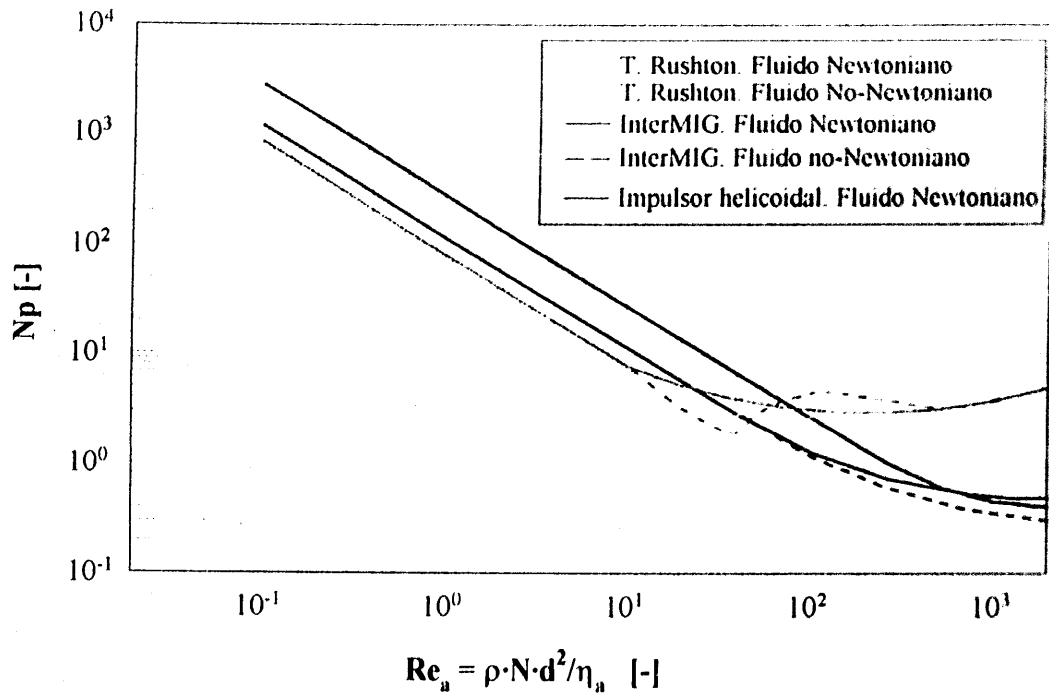
Expresiones de  $\eta_a$  para diversos tipos de fluidos no-Newtonianos se consignan en la **Tabla 2.2**

Cuando se grafica  $Np$  vs  $Re$  en escala logarítmica, se obtiene una curva de potencia únicamente válida para las condiciones geométricas con las que fue obtenida. Una curva de este tipo se presenta en la **Figura 2.4** para las geometrías de interés en este trabajo. En esta figura se aprecian 3 regiones definidas: la zona laminar, donde la relación entre  $Np$  y  $Re$  es lineal, la zona turbulenta en la que  $Np$  es constante, y una zona intermedia denominada de transición, caracterizada por patrones de flujo inestables. Para el caso de los impulsores InterMIG (IMIG) y para las turbinas Rushton (TR) las condiciones de flujo comúnmente son turbulentas mientras que los impulsores helicoidales han sido reconocidos por su excelente desempeño en flujo laminar.

En el régimen de flujo laminar, comúnmente señalado como el rango de  $Re < 10$ , puede demostrarse teóricamente, mediante un balance de fuerzas (Tatterson, 1991), que el número de potencia para un impulsor es una función inversa del número de Reynolds, expresada por:

$$Np \cdot Re_a = K_p = \frac{P}{N^2 \cdot d^3 \cdot \eta_a} \quad \text{Ec. (2.5)}$$

en donde  $K_p$  es una constante adimensional que para fluidos Newtonianos depende únicamente de las características geométricas del impulsor.



**Figura 2.4** Curvas de potencia para diferentes diseños de impulsores (adaptación de Oldshue, 1983; Dawson, 1990; Tatterson, 1991 y Argüello, 1993).

Combinando las ecuaciones (2.2), (2.3) y (2.5) se puede escribir para régimen laminar:

$$\frac{P}{\rho N^3 d^5} = \frac{K_p \eta_a}{\rho N d^2} \quad \text{Ec. (2.6)}$$

o equivalentemente:

$$\eta_a = \frac{P}{K_p N^2 d^3} \quad \text{Ec. (2.7)}$$

La potencia suministrada por el impulsor al fluido es una función tanto de la velocidad de rotación como del torque, de acuerdo con la expresión:

$$P = 2 \cdot \pi \cdot N \cdot M \quad \text{Ec. (2.8)}$$

Combinando la ecuación (2.7) con la ecuación (2.8), se obtiene:

$$\eta_a = \frac{2 \pi M}{K_p N d^3} \quad \text{Ec. (2.9)}$$



Si se mide el torque  $M$  como función de la velocidad de rotación para un fluido Newtoniano, en el cual la viscosidad es constante, se puede determinar el valor de la constante  $K_p$  mediante una regresión lineal; en dicha regresión, la pendiente de la curva  $M$  vs  $N$  corresponde a  $\eta \cdot K_p \cdot d^3 / 2\pi$ . Como los valores de  $d$  y  $\eta$  son conocidos, fácilmente se puede calcular  $K_p$ .

Una vez que la constante  $K_p$  ha sido determinada, la viscosidad aparente de un fluido no-Newtoniano puede ser determinada recolectando mediciones del torque ejercido por el impulsor como función de la velocidad de rotación del mismo (como es señalado por la **ecuación 2.9**). Sin embargo, expresar la viscosidad aparente como una función de la velocidad de rotación no es lo más conveniente para estudios reológicos, puesto que sería dependiente del impulsor utilizado. Recordando que la viscosidad de un fluido se define de acuerdo con la **ecuación 2.1**, una forma de expresar la viscosidad es desdoblar tal ecuación en términos de sus componentes,  $\tau$  y  $\dot{\gamma}$ . Para geometrías sencillas (como cilindros o conos) el esfuerzo de corte puede ser definido por consideraciones geométricas. Para un impulsor, la geometría se hace tan compleja que el esfuerzo de corte normalmente se define mediante el uso de analogías de flujo; por ejemplo, para el caso de un impulsor helicoidal,  $\tau$  se define por analogía con el flujo Couette: se considera que un impulsor helicoidal girando en el interior de un tanque cilíndrico es similar a un cilindro rotando dentro de otro cilindro (flujo Couette). El esfuerzo de corte en este caso (Tatterson, 1991) puede expresarse como:

$$\tau = \frac{2M}{\pi d^2 H_i} \quad \text{Ec. (2.10)}$$

De acuerdo con la literatura (Tatterson, 1991) si se asume que el fluido cumple el modelo de la ley de potencia ( $\tau = K \dot{\gamma}^n$ , con  $K$  y  $n$  constantes en el rango de medición) y que los cilindros externo e interno tienen diámetros muy similares ( $d/D \rightarrow 1.0$ ). Dado que esto ocurre en el caso de los impulsores helicoidales, el tratamiento matemático de las ecuaciones de movimiento para el flujo Couette permite expresar el gradiente de deformación como:

$$\dot{\gamma} = \frac{4\pi ND^2}{D^2 - d^2} \quad \text{Ec. (2.11)}$$

A partir de la **ecuación (2.11)** se derivan dos hechos importantes. El primero de ellos es que para un impulsor definido, el gradiente de deformación es una función lineal de la velocidad de rotación, lo cual es la base de la ley de Metzner y Otto (Metzner and Otto, 1957) que postula una relación lineal entre el gradiente de deformación y la velocidad de rotación de un impulsor dada por:

$$\dot{\gamma} = K_* N \quad \text{Ec. (2.12)}$$

en donde  $K_s$  es la constante de proporcionalidad de Metzner y Otto. El segundo hecho derivado de la **ecuación (2.11)** es que la constante  $K_s$  sólo depende de la geometría del sistema impulsor y no de las características reológicas del fluido a utilizar.

A pesar de las suposiciones hechas para generar la **ecuación (2.11)**, es claro que el flujo generado por el impulsor dista mucho de ser similar al generado por dos cilindros concéntricos en rotación. De hecho, el flujo llega a ser tan complejo que no ha permitido hasta la fecha un cálculo riguroso de los gradientes de deformación generados en un tanque agitado. Para obviar esta dificultad, Metzner y Otto (1957) sugirieron un método de acuerdo con el cual la **ecuación (2.12)** puede seguir siendo utilizada si se reemplaza el concepto de gradiente de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) por el de gradiente de deformación promedio ( $\dot{\gamma}_{av}$ ). En este caso, se supone que el flujo alrededor del impulsor se comporta como si *en promedio* tuviese un gradiente de deformación característico  $\dot{\gamma}_{av}$ . De esta manera:

$$\dot{\gamma}_{av} = K_s N \quad \text{Ec. (2.13)}$$

El valor de  $K_s$  debe ser encontrado experimentalmente. Para ello se utiliza un fluido de calibración de propiedades reológicas conocidas. Si el comportamiento reológico de dicho fluido es expresado por la “ley de la potencia”, entonces con el valor de viscosidad aparente obtenido de acuerdo con la **ecuación (2.9)** se puede calcular el valor del gradiente de deformación promedio a que corresponde dicha viscosidad aparente (con la **ecuación 2.14**):

$$\dot{\gamma}_{av} = \left( \frac{\eta_a}{K} \right)^{\left( \frac{1}{n-1} \right)} \quad \text{Ec. (2.14)}$$

Este procedimiento permite obtener parejas de valores ( $\dot{\gamma}_{av}$ ,  $N$ ). El valor de  $K_s$  se determina como la pendiente de la gráfica de  $\dot{\gamma}_{av}$  vs.  $N$ .

Un procedimiento alternativo para el cálculo de  $K_s$  fue sugerido por Rieger y Novak (1973). Para fluidos pseudoplásticos que sigan la ley de la potencia, los autores proponen que la viscosidad se evalúe a un gradiente de deformación igual a la velocidad de agitación ( $\dot{\gamma}_{av} = N$ ). De esta manera, la viscosidad del fluido vendrá dada por :

$$\eta_a = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} = \frac{K \dot{\gamma}^n}{\dot{\gamma}} = K \dot{\gamma}^{n-1} = K N^{n-1} \quad \text{Ec. (2.15)}$$

Este enunciado permite la definición de un número de Reynolds especial, dado por la siguiente ecuación :

$$Re_{pl} = \frac{\rho N d^2}{\eta_a} = \frac{\rho N d^2}{K N^{n-1}} = \frac{\rho N^{2-n} d^2}{K} \quad \text{Ec. (2.16)}$$

en donde el subíndice pl indica ley de la potencia. Como consecuencia, la **ecuación 2.5** se transforma en:

$$Np \cdot Re_{pl} = \frac{P}{K N^{n+1} d^3} = K_p(n) \quad \text{Ec. (2.17)}$$

en esta ecuación es importante señalar que, además de la geometría, el valor de  $K_p$  depende de las características del fluido, en este caso, del índice de flujo, por lo cual se denota como  $K_p(n)$ . Por lo tanto, para diferentes fluidos, el valor de  $K_p(n)$  será diferente.

Comparando las **ecuaciones 2.5** y **2.17** puede demostrarse que (Brito-De la Fuente, 1992):

$$\frac{K_p(n)}{K_p} = \frac{\eta_a}{K N^{n-1}} \quad \text{Ec. (2.18)}$$

Si se combinan las **ecuaciones 2.13**, **2.14** y **2.18**, se obtiene (Brito-De la Fuente, 1992):

$$\frac{K_p(n)}{K_p} = K_s^{n-1} \quad \text{Ec. (2.19)}$$

Si se hacen determinaciones de consumo de potencia como función de la velocidad de agitación para fluidos Newtonianos y no-Newtonianos que sigan el modelo de la ley de la potencia, a partir de las gráficas de  $Np$  vs  $Re_{pl}$ , es posible obtener los valores de  $K_p$  y  $K_p(n)$ . Con estos datos y mediante la **ecuación 2.19** se obtienen los valores de  $K_s$ , los cuales a su vez serán función del índice de flujo de los fluidos. Debe destacarse que este procedimiento es completamente independiente del método de Metzner y Otto y, por lo tanto, puede servir para comprobar los datos obtenidos con dicho método.

Una vez que el valor de  $K_s$  ha sido determinado para un fluido particular, puede ser utilizado para calcular  $Re_a$  a partir de  $Re_{pl}$ , como se señala en la **ecuación 2.20**:

$$Re_a = \frac{Re_{pl}}{K_s^{n-1}} \quad \text{Ec. (2.20)}$$

Posteriormente se dibuja la gráfica de  $Np$  vs  $Re_a$ ; los resultados obtenidos deberían ser iguales para todos los fluidos analizados, es decir, debería obtenerse una sola curva.

La determinación de  $K_s$  no solamente tiene como fin la predicción de la potencia suministrada por el impulsor a caldos no-Newtonianos en condiciones de flujo laminar. Como se mencionó en una sección anterior, la determinación de las características reológicas puede hacerse en la zona de flujo laminar utilizando diferentes tipos de impulsores. En tal caso, la determinación de  $K_s$  como función del índice de flujo es una condición necesaria para la determinación reológica, por lo que debe realizarse una calibración previa del instrumento de medición.

Para el caso de flujo turbulento, el tratamiento matemático es mucho más sencillo. Dado que el valor de  $N_p$  para un impulsor particular permanece constante con  $Re$ , el cálculo de la potencia entregada por un dispositivo cualquiera puede ser obtenido fácilmente de la **ecuación 2.2**.

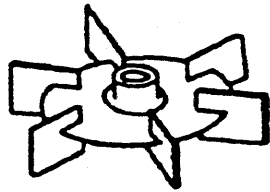
### **2.3.2 Impulsores utilizados para fluidos no-Newtonianos**

El propósito de ubicar un impulsor en un tanque es obtener un buen mezclado del contenido del recipiente y, paralelamente, lograr cumplir las necesidades de transferencia de masa y calor. Por lo tanto, la selección de un impulsor específico es de la mayor importancia para el desarrollo de un proceso particular de fermentación. Existen múltiples geometrías de impulsores (**Figura 2.5**), cada una adecuada para procesos de características específicas. Una breve discusión sobre dichas características se presenta a continuación.

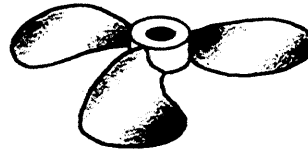
Los diseños antiguos de sistemas de fermentación asumían que el desempeño de todos los impulsores era muy similar, y por tanto unos pocos diseños estándar eran suficientes para cumplir con los requisitos de virtualmente todos los procesos. El diseño de impulsor más simple y por lo tanto el primero en ser utilizado fue el impulsor de paleta (**Figura 2.5**). La turbina Rushton (TR) con su característico flujo radial, se volvió muy popular en la década de 1950 debido a sus excelentes características de dispersión de gas, su facilidad de construcción y su diseño favorable para escalamiento (Solomons, 1980 ; Nienow, 1990). La turbina de paletas inclinadas de flujo axial compartió un lugar con la TR como uno de los dispositivos estándar para operaciones de mezclado en la industria, principalmente para lograr una buena suspensión de los sólidos contenidos en el caldo (Tatterson, 1991).

Investigaciones recientes han demostrado que las TR no son la mejor elección para algunos sistemas de fermentación con características no-Newtonianas, debido al pobre desempeño de este tipo de dispositivos en condiciones aireadas. De hecho, a pesar de las numerosas investigaciones, el diseño de una geometría óptima para fluidos no-Newtonianos no ha sido posible debido a que depende fuertemente del tipo de proceso que se esté llevando a cabo y una evaluación rigurosa implicaría la determinación del comportamiento con virtualmente cada tipo de impulsor diferente imaginable.

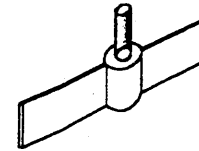
En el caso de las turbinas Rushton, la potencia entregada en fluidos Newtonianos puede caer hasta un 50% de su valor en condiciones no gaseadas con relativamente pequeñas cantidades de gas, y el efecto se incrementa para fluidos no-Newtonianos en virtud de la estabilización de las



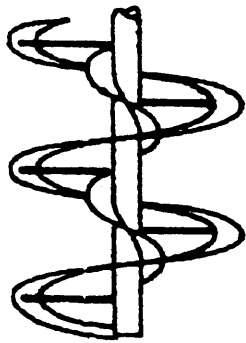
Turbina Rushton



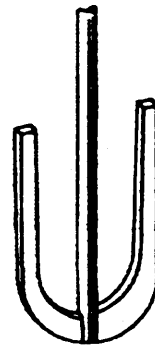
Propela Marina



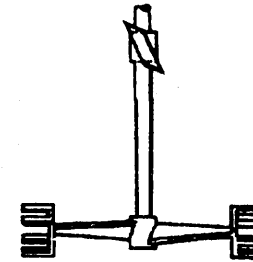
Impulsor de paleta



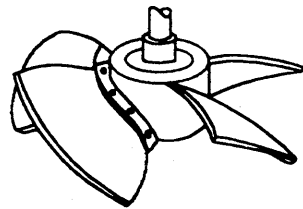
Impulsor helicoidal  
Tornillo helicoidal



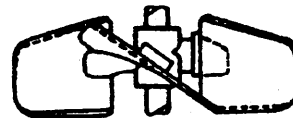
Impulsor de ancla



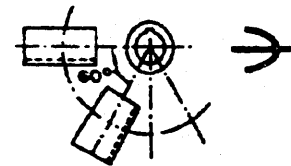
Impulsor InterMIG



Prochem Maxflo T



Lightnin A-315



Scaba 6SRGT

Figura 2.5. Diferentes configuraciones de impulsores utilizados en la industria

cavidades de aire detrás de las paletas. Dado que el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) depende del flujo de aire y de la potencia entregada al fluido, la caída de potencia implica una reducción en el potencial de transferencia de masa. Adicionalmente, las turbinas generan velocidades de disipación de energía no uniformes en el recipiente y mucha de la energía se disipa en la región próxima al impulsor, generándose altos esfuerzos mecánicos en esta región, que pueden ser dañinos para los microorganismos. Un incremento en la escala genera un incremento en tiempos de mezclado, dando lugar a variaciones sensibles en pH, temperatura, TOD y concentración de nutrientes, de manera que el microorganismo se verá sujeto a condiciones ambientales fluctuantes. Las turbinas de flujo radial tienden a dar un mezclado pobre en el sentido axial y, en fluidos pseudoplásticos la compartimentalización en el reactor puede ser particularmente severa. En general, todas estas características se ven acentuadas en fluidos viscosos no-Newtonianos, dando lugar a menores rendimientos y pobre control de las condiciones del reactor (McFarlane and Nienow, 1995-a, 1996-b).

Los impulsores SCABA SRGT son muy similares a las turbinas Rushton y de hecho fueron concebidos como una modificación de éstas para contender con el problema de la inundación y la caída de potencia a niveles bajos de aireación; el flujo de este tipo de impulsores es radial, de manera que el mezclado axial en el reactor es limitado. Aunque su número de potencia es más bajo que el de las TR (1.5), es capaz de manejar tres veces más capacidad de aire antes de inundarse (Nienow, 1990). Con el cambio en la viscosidad del caldo, la relación  $Pg/P$  puede caer hasta 0.8, pero aún así continúa teniendo un mejor desempeño que la turbina Rushton. Sin embargo, muchas de las desventajas que presenta la TR, como el alto esfuerzo mecánico en la vecindad del impulsor y el incremento en tiempos de mezclado con la escala del fermentador, aún se presentan en este tipo de impulsor.

Los impulsores InterMIG, normalmente se diseñan para que una pareja de IMIG de relación  $d/D=0.7$  reemplace una TR de relación  $d/D=0.33$ . Estos impulsores desarrollan esfuerzos de corte relativamente bajos, por lo que son de gran utilidad con material biológico sensible; adicionalmente, son recomendados para la homogeneización de líquidos viscosos, suspensión de sólidos, mezclado de tres fases y transferencia de calor (Kipke, 1982; Dawson, 1990). Todas estas características parecen hacerlos adecuados para trabajos con caldos miceliarios en donde tales circunstancias se presentan a menudo. Como desventaja, presentan inestabilidades en el torque y suelen provocar vibraciones del recipiente en caldos aireados de alta viscosidad.

Debido a su excelente capacidad de homogeneización a nivel macro (Oldshue, 1983), los impulsores helicoidales generalmente se utilizan para sistemas de alta viscosidad en la zona de flujo laminar. Resultan particularmente efectivos para sistemas de suspensiones debido a que generan un flujo axial (ascendente-descendente) con condiciones relativamente suaves en lo que concierne con esfuerzos mecánicos.

Los agitadores de ancla han sido utilizados ampliamente para mezclado de materiales altamente viscosos. A medida que las paletas barren las paredes del tanque, se generan vórtices creándose

un intercambio continuo de líquido entre el seno del tanque y el líquido atrapado entre las paletas y la pared del tanque. Este hecho hace del agitador de ancla un sistema particularmente efectivo en transferencia de calor en sistemas encaquetados, así como para remoción de sólidos en la pared. Sin embargo, es insatisfactorio para mezclado de líquidos viscosos e induce poco movimiento axial del fluido, por lo que para agitación de suspensiones sólidas la sedimentación puede ser un problema (See-Shown, 1989).

Los impulsores Prochem Maxflo T y Lightnin A-315 constituyen un conjunto de impulsores de flujo axial denominados aerodeslizantes (*hydrofoil*), caracterizados por sus paletas perfiladas en un diseño curvo especial. El comportamiento de estos impulsores en cuanto a características hidrodinámicas y de potencia es muy similar. En una detallada revisión, McFarlane y Nienow (1995-a,b ; 1996-a,b) señalan que, con respecto a tiempos de mezclados en régimen turbulento, la eficiencia de un impulsor Prochem es similar a la de una TR de similar relación  $d/D$ . Igual cosa sucede con los coeficientes de transferencia de masa a la misma potencia y velocidad de flujo de aire. Algunas ventajas, como una distribución más uniforme de la energía en el seno del fluido y un mejor mezclado del líquido, no han sido confirmadas definitivamente debido a la falta de evidencia directa. Estos impulsores presentan inestabilidades de flujo y torque indeseables por razones mecánicas, aunque éstas se ven reducidas en fluidos pseudoplásticos. Aunque estos impulsores presentan una caída de potencia menor en condiciones aireadas para fluidos pseudoplásticos (comparados con las TR), por encima de una cierta velocidad y flujo de gas mínimos, el desarrollo de grandes cavidades de aire causa una significativa reducción en la potencia, capacidad de bombeo y capacidad de dispersión de gas del impulsor. Sin embargo, para impulsores múltiples, los tiempos de mezclado y la compartimentalización son menores con respecto a sistemas con TR.

Para el lector interesado en profundizar en el desempeño de diferentes configuraciones geométricas de impulsor para el mezclado de fluidos no-Newtonianos, se sugiere consultar las obras de Nagata (1975), Oldshue (1983) y Tatterson (1991).

Uno de los efectos más importantes del mezclado sobre sistemas biológicos es la influencia que ejercen los esfuerzos mecánicos sobre el microorganismo al tratar de mantener condiciones de homogeneidad adecuadas dentro del cultivo. Tal efecto usualmente se mide como liberación al medio de nucleótidos o proteínas intracelulares, o cambios en la velocidad de crecimiento, morfología y/o productividad de los cultivos, y tiende a ser relacionado con parámetros de ingeniería, con el fin de obtener datos para escalamientos o desarrollos posteriores. Entre los diferentes parámetros que se han utilizado en estudios con microorganismos filamentosos se encuentran esfuerzo de corte (Edwards *et al.*, 1989), velocidad en la punta del impulsor ND, potencia por unidad de volumen,  $P/V$  (Ujcová *et al.*, 1980; Galindo *et al.* (1992), energía por unidad de volumen dada por  $P \cdot t_c / V$  (Reuss, 1988) y un parámetro de dispersión de energía dado por  $P/d^3 t_c$  (Smith *et al.*, 1990; Jüsten *et al.*, 1995). Aunque este último parece haber tenido un éxito relativo, el efecto del tipo de impulsor sobre un cultivo aún está lejos de poder ser predicho con suficiente precisión y por tanto aún se depende de la información experimental

con sistemas de impulsores específicos. En el presente trabajo se escogieron 3 tipos de impulsor para evaluar su desempeño en cultivos agitados en biorreactores : la turbina Rushton se escogió como estándar de comparación debido a que ya se tenían antecedentes trabajando con este dispositivo. Como dispositivos alternos se escogieron los impulsores InterMIG (fabricados por la compañía alemana Ekato), y el impulsor helicoidal, debido a sus excelentes características de mezclado en fluidos modelo no-Newtonianos altamente viscosos. En el resto de esta sección, se hará énfasis sobre las características de mezclado y su efecto en cultivos desarrollados con estos tres dispositivos.

Galindo *et al* (1992), evaluaron el efecto de la agitación con TR sobre la fermentación de melaza de caña por *S. cerevisiae* a diferentes escalas, concluyendo que un incremento en la potencia por unidad de volumen entregada al caldo resultó en aumentos sensibles en la producción de etanol y en la velocidad de consumo de glucosa. Pedersen *et al.* (1994) caracterizaron el mezclado de biorreactores agitados con turbinas Rushton usando cultivos de *P. chrysogenum*. Concluyen que la influencia de la hidrodinámica del reactor puede ser despreciada en conexión con estudios fisiológicos de hongos filamentosos en biorreactores hasta volúmenes de 40 L. Por otro lado Jüsten *et al.* (1995), evaluaron la influencia de la geometría del impulsor en la morfología de *P. chrysogenum* en términos de la longitud total promedio de hifa (HMTL). Se utilizaron impulsores radiales (T. Rushton e impulsor de paleta) y de flujo axial (paletas inclinadas, propela, InterMIG y Prochem Maxflow), a diferentes escalas. A la misma potencia por unidad de volumen, los cambios en la HMTL *dependieron de la geometría del impulsor*; tales cambios fueron correlacionados de forma satisfactoria por la función de disipación dada por  $P/kd^3t_c$ , obteniéndose un efecto negativo de este parámetro en la HMTL para valores por encima de  $30 \text{ kW/m}^3\text{seg}$ .

Lejeune y Baron (1995) estudiaron el efecto de la agitación en el crecimiento y producción de enzimas por *T. reesei* en cultivos por lote. Los autores encontraron un comportamiento caracterizado por máximos en el peso seco y velocidad de evolución de  $\text{CO}_2$  como función de la velocidad de agitación. A mayores valores de la velocidad de agitación, correspondieron mayores tiempos en la fase *lag* de crecimiento donde, aparentemente, el hongo se está adaptando a los mayores esfuerzos mecánicos y respirando a mayor velocidad para sostener el esfuerzo. Los autores concluyen que a mayores velocidades de agitación la productividad se ve afectada por un daño celular causado por los esfuerzos de corte.

Bujalski *et al.*, (1997) compararon el comportamiento entre sistemas duales de turbinas Rushton y un sistema de flujo axial de turbinas de paletas inclinadas de geometría especial en caldos de *A. niger*. Usando las TR se encontraron *pelotillas* más pequeñas y compactas, así como mayor cantidad de micelio difuso comparados con el sistema de flujo axial, por lo que se obtuvieron mayores viscosidades aparentes ; este efecto muy probablemente se debe a los mayores esfuerzos cortantes generados por las TR. Sin embargo, y en forma aparentemente contradictoria, se obtuvieron mayores valores de  $k_1a$  en el sistema de TR.



Argüello (1993) evaluó las características de mezclado de impulsores InterMIG y turbinas Rushton en fluidos modelo Newtonianos y no-Newtonianos pseudoplásticos con punto de cedencia. Con fluidos Newtonianos los números de potencia hallados para impulsores IMIG en condiciones turbulentas ( $Re > 10^4$ ) y sin aireación fueron mucho menores comparados con los de las TR (entre 0.5 y 0.7 para IMIG vs 5-6 para TR), correlacionando bien con otros reportes de la literatura (Nienow, 1990 ; Dawson, 1990). Con fluidos pseudoplásticos a iguales potencias por unidad de volumen, el mezclado sin aireación fue mucho mejor con el IMIG que con las TR, indicativo de que probablemente el impulsor IMIG tendría un mejor desempeño con fluidos de características similares a la de los caldos miceliarios. En condiciones aireadas, la relación potencia gaseada/potencia no gaseada para los impulsores IMIG cae a 0.6 vs 0.1 - 0.3 para TR, lo cual de nuevo, representa una ventaja en cuanto a la caída de potencia de los impulsores IMIG con respecto a las turbinas. Al respecto Dawson (1990) señala que la influencia del flujo de gas sobre la caída de potencia con los IMIG es despreciable, mientras que tal influencia es muy considerable en el caso de TR

Durante el desarrollo de fermentaciones, Dawson (1990) señala fenómenos contradictorios; en fluidos pseudoplásticos a bajas potencias volumétricas, los IMIG no comparan favorablemente en comportamiento con TR para levaduras, mientras que para *Bacillus subtilis* los impulsores IMIG tuvieron mejor desempeño que las TR. Para caldos miceliarios de alta viscosidad, los impulsores InterMIG dieron mejores coeficientes de transferencia de masa y mejor mezclado que las TR a la misma potencia y velocidad de agitación, mientras que en fluidos modelo pseudoplásticos (Dawson, 1990; Galindo *et al.*, 1996) se observa lo contrario. Dado este conjunto de contradicciones aparentes, es difícil sacar conclusiones y, por tanto, la determinación experimental resulta indispensable.

Velasco (1994) utilizó una combinación de impulsores T.R-IMIG para agitar caldos del hongo *Micromonospora purpurea*. La caída de potencia gaseada en este sistema es alta, pero no es afectada por los cambios de viscosidad del cultivo ni por el flujo de aire suministrado al reactor; por lo tanto es muy flexible para ejercer control sobre la TOD en un cultivo miceliar.

Finalmente, se harán unas consideraciones sobre el comportamiento en el mezclado de impulsores helicoidales. Muchos trabajos involucran el desarrollo de correlaciones para consumo de potencia por impulsores helicoidales en diferentes tipos de fluidos, aunque prácticamente todos ellos son fluidos modelo. Como una parte del trabajo a realizar involucra el uso de este tipo de dispositivos, un resumen de tales correlaciones se presenta en la **Tabla 2.5**. La literatura que refiere estudios sobre el desarrollo de fermentaciones con impulsores helicoidales es escasa. Kamen *et al.* (1991) utilizaron un sistema helicoidal para el desarrollo de células de insecto, encontrando que el comportamiento es altamente satisfactorio para el cultivo de estas células dada su fragilidad a los esfuerzos de corte. Jolicoeur *et al.* (1992) utilizaron un biorreactor equipado con un impulsor helicoidal de doble listón para crecer suspensiones de células vegetales de *Catharanthus roseus*. El comportamiento cinético del cultivo fue muy similar al obtenido en matraces agitados, resultando en un excelente desempeño para este tipo

**Tabla 2.5** Correlaciones de consumo de potencia y Ks encontradas en la literatura para impulsores helicoidales de uno y dos listones.

Autor	Correlación	Intervalo de validez
<p>Chavan &amp; Ulbrecht (1972) (Fluidos Newtonianos y no-Newtonianos pseudoplásticos que sigan el modelo de la ley de la potencia) (*)</p>	$N_p Re_{pl} = 2.49 \pi a_s N_R \left(\frac{d_e}{d}\right) \left(\frac{D}{d_e}\right)^2 \left\{ \frac{4\pi}{n \left[ \left(\frac{D}{d_e}\right)^{2n} - 1 \right]} \right\}^n$ $\frac{d_e}{d} = \left(\frac{D}{d}\right) - \frac{2 \left(\frac{w}{d}\right)}{\ln \left\{ \frac{\left(\frac{D}{d}\right) - 1 + 2 \left(\frac{w}{d}\right)}{\left(\frac{D}{d}\right) - 1} \right\}}$ $a_s = \frac{\left(\frac{h}{d}\right) \left(\frac{s}{d}\right)}{3\pi} \left\{ \frac{\pi \sqrt{\left(\frac{s}{d}\right)^2 + \pi^2}}{\left(\frac{s}{d}\right)^2} + \ln \left[ \frac{\pi}{\left(\frac{s}{d}\right)} + \frac{\sqrt{\left(\frac{s}{d}\right)^2 + \pi^2}}{\left(\frac{s}{d}\right)} \right] \right\} \left\{ 1 - \left[ 1 - 2 \left(\frac{w}{d}\right) \right]^2 \right\}$ $K_s = \left\{ \frac{4\pi \left[ \left(\frac{D}{d_e}\right)^2 - 1 \right]}{\left[ n \left[ \left(\frac{D}{d_e}\right)^{2n} - 1 \right] \right]^n} \right\}^{\frac{1}{n}}$	<p><math>1.05 \leq D/d \leq 1.58</math>  <math>0.5 \leq s/d \leq 1.25</math>  <math>w/d = 0.1</math>  <math>h/d = 1.0</math>  <math>N_R = 1-2</math></p>

**Tabla 2.5** Continuación.

<p>Hall &amp; Godfrey (1970) (Fluidos Newtonianos y no-Newtonianos pseudoplásticos que sigan el modelo de la ley de la potencia)</p>	$N_p Re_a = 66 \left(\frac{s}{d}\right)^{-0.73} (N_R) \left(\frac{h}{d}\right) \left(\frac{w}{d}\right)^{0.5} \left(\frac{c}{d}\right)^{-0.6}$ $Re_a = \left(\frac{\rho N^{2-n} d^2}{K}\right) (K_s)^{1-n}; K_s = 27$	<p>D/d = 1.058 s/d = 0.753 w/d = 0.118 h/d = 0.941 N<sub>R</sub> = 2</p>
<p>Nagata (1975)</p>	$N_p Re = 52.5 \left(\frac{s}{d}\right)^{-0.5} (N_R)^{0.5} \left(\frac{D-d}{d}\right)^{-0.5}$	<p>D/d = 1.053 0.5 ≤ s/d ≤ 1.0 w/d = 0.105 h/d = 1.0 N<sub>R</sub> = 1-2</p>
<p>Sawinski <i>et al.</i> (1976) (Fluidos Newtonianos)</p>	$N_p Re = 19 \left(\frac{D}{c}\right)^{0.45} (N_R) \left(\frac{h}{d}\right) \left[1 + \left(\frac{\pi d}{s}\right)^2\right]^{0.5}$	<p>1.046 ≤ D/d ≤ 1.19 0.36 ≤ s/d ≤ 1.3 0.084 ≤ w/d ≤ 0.12 0.8 ≤ h/d ≤ 2.36 N<sub>R</sub> = 1-2</p>
<p>Sawinski <i>et al.</i> (1976) (Fluidos no-Newtonianos pseudoplásticos que sigan el modelo de la ley de la potencia)<sup>(*)</sup></p>	$N_p Re_{pl} = \left\{ 19 \left(\frac{D}{c}\right)^{0.45} (N_R) \left(\frac{h}{d}\right) \left[1 + \left(\frac{\pi d}{s}\right)^2\right]^{0.5} \right\} \exp \left\{ [n-1] \left[ 4.2 \left(\frac{d}{D}\right) - 0.5 \right] \right\}$	<p>1.046 ≤ D/d ≤ 1.19 0.36 ≤ s/d ≤ 1.3 0.084 ≤ w/d ≤ 0.12 0.8 ≤ h/d ≤ 1.1 N<sub>R</sub> = 1-2</p>
<p>Käppel (1979)</p>	$N_p Re = 60 \left(\frac{s}{d}\right)^{-0.5} (N_R)^{0.8} \left(\frac{c}{d}\right)^{-0.3}$	<p>1.02 ≤ D/d ≤ 1.1 0.5 ≤ s/d ≤ 1.0 0.1 ≤ w/d ≤ 0.11 h/d = 1.0 N<sub>R</sub> = 1-2</p>
<p>Bourne <i>et al.</i> (1979) (Citado por Tatterson, 1991)</p>	$N_p Re = 134 \left(\frac{s}{d}\right)^{-0.3} \left(\frac{h}{d}\right) \left(\frac{c}{d}\right)^{-0.3} \left(\frac{d}{D}\right)^{0.4}$	<p>-</p>

Tabla 2.5 Continuación.

<p>Patterson <i>et al.</i> (1979) (**)</p>	$N_p Re^{0.93} = 24 N_R \left(\frac{D}{d}\right)^{-0.91} \left(\frac{d}{l}\right)^{-1.23}$	<p>1.11 ≤ D/d ≤ 1.37                  0.69 ≤ s/d ≤ 1.048                  0.072 ≤ w/d ≤ 0.195                  1.054 ≤ h/d ≤ 1.305                  N<sub>R</sub> = 1-2</p>
<p>Blasinski &amp; Rzycki (1980)</p>	$N_p Re = 34.1 \left(\frac{s}{d}\right)^{-0.63} N_R^{0.79} \left(\frac{H}{d}\right)^{0.45} \left(\frac{h}{d}\right)^{1.01} \left(\frac{c}{d}\right)^{-0.53} \left(\frac{w}{d}\right)^{0.14}$	<p>1.02 ≤ D/d ≤ 1.19                  0.36 ≤ s/d ≤ 1.3                  0.07 ≤ w/d ≤ 0.17                  0.862 ≤ h/d ≤ 1.11                  N<sub>R</sub> = 1-2</p>
<p>Takahashi <i>et al.</i> (1982)                  (**), (****)</p>	$N_p Re = \left(\frac{l}{d}\right) f\left(\frac{D}{c}\right) f(G) \left\{ \frac{16\pi^3}{2 \ln \left[ 4 + 8 \left(\frac{c}{w}\right) \right] - 1} \left( \frac{s}{\sqrt{(\pi d)^2 + s^2}} \right)^{0.555} \right\}$ $f\left(\frac{D}{c}\right) = 1 + 0.00539 \left(\frac{D}{c}\right)^{0.876}$ $f(G) = \left(\frac{N_R}{2}\right) + 2.08 \pi^3 N_a N_R \left(\frac{d_a}{d}\right)^{0.15} \left[ 0.15 - \left(\frac{w}{d}\right) \right]^{3.15}$ $K_s = 11.4 \left(\frac{c}{D}\right)^{-0.411} \left(\frac{s}{D}\right)^{-0.361} \left(\frac{w}{D}\right)^{0.164} \quad (***)$	<p>0.019 ≤ c/d ≤ 0.13                  s/d ≥ 0.49                  0.076 ≤ w/d ≤ 0.20                  N<sub>R</sub> = 1-4</p>
<p>Chavan (1983)</p>	$N_p Re = \left[ \frac{0.532 - 0.238 \left(\frac{s}{d}\right)}{1 - 0.3 N_R} \right] \left[ \frac{2\pi^3 \left(\frac{h}{d}\right) \left(\frac{D}{d}\right)^2}{\left(\frac{D}{d}\right) - 1 + \frac{w}{d}} \right]$	<p>1.02 ≤ D/d ≤ 1.37                  0.36 ≤ s/d ≤ 1.25                  0.09 ≤ w/d ≤ 0.18                  0.94 ≤ h/d ≤ 1.20                  N<sub>R</sub> = 1-2</p>

Tabla 2.5 Continuación.

Shamlou & Edwards (1985)	$N_p Re = 150 \left( \frac{h}{d} \right) \left( \frac{s}{d} \right)^{-0.5} (N_R)^{0.5} \left( \frac{c}{w} \right)^{-0.17}$ $K_s = 34 - 144 \left( \frac{c}{d} \right)$	$0.068 \leq c/d \leq 0.164$ $N_R = 1-2$
Kuriyama (***)	$K_s = 8.9 \left( \frac{c}{D} \right)^{-0.33}$	$0.35 \leq n \leq 0.75$
Brito-De la Fuente (1992) (Fluidos Newtonianos y pseudoplásticos que sigan el modelo de la ley de la potencia)	$K_s = 38.27 \left( \frac{s}{d} \right)^{-0.135} \left( \frac{w}{d} \right)^{-0.024} (0.814)^{\frac{1}{n}}$ $N_p Re = 173.1 \left( \frac{s}{d} \right)^{-0.72} \left( \frac{w}{d} \right)^{0.14} K_s^{(n-1)}$	$D/d = 1.135$ $0.5 \leq s/d \leq 1.0$ $0.108 \leq w/d \leq 0.162$ $h/d = 1.0$ $N_R = 1$

$$(*) Re_{pl} = \left( \frac{\rho N^{2-n} d^2}{K} \right)$$

$$(**) l = h \sqrt{1 + \left( \frac{d \pi}{s} \right)^2}$$

(\*\*\*) Citado por Brito-De la Fuente (1992)

(\*\*\*\*)  $N_s$  : Número de varillas de sostén.  
 $d_s$  : diámetro de las varillas de sostén.

de cultivos de alta densidad celular de características pseudoplásticas, debido a sus características de eficiencia de mezclado con bajos esfuerzos de corte y altas capacidades de bombeo y transferencia de oxígeno superficial hacia el cultivo. Rau *et al.* (1992) evaluaron sistemas triples de impulsores incluyendo turbinas Rushton, paletas inclinadas a 45°, InterMIG y un impulsor helicoidal para la producción de glucano por los hongos *Schizophyllum commune* y *Sclerotium glaucanum* en fermentadores de 30 y 50 L. El parámetro de comparación fue iguales tiempos de mezclado, puesto que el macromezclado fue considerado el factor decisivo durante los cultivos. El sistema InterMIG mostró alta disipación local de energía, por lo que la viscosidad disminuyó considerablemente por degradación de la estructura molecular del glucano, pero la concentración de glucano fue la más alta de todos los tipos de impulsores, siendo casi el doble de la obtenida con TR. Interesantemente, a la misma velocidad de agitación, el cultivo llevado a cabo con TR mostró una viscosidad específica elevada (probablemente por la obtención de un polímero de peso molecular más alto) pero la velocidad de formación de glucano fue la menor de todos los tipos de impulsor. A nivel de 10 litros, todos los tipos de impulsor mostraron comportamientos similares con la excepción del impulsor helicoidal, el cual mostró la mitad de concentración y velocidad de formación de glucano obtenida con los otros impulsores. Adicionalmente, los autores destacan que la baja viscosidad específica del glucano obtenido con este impulsor es inexplicable, aunque señalan que los bajos esfuerzos de corte generados por este impulsor probablemente son demasiado bajos para liberar el polímero de alto peso molecular de la pared del microorganismo.

En suma, es evidente que los reportes referentes al comportamiento de diferentes tipos de impulsores sobre caldos de fermentación reales son escasos. Muchos de los reportes se han enfocado a la influencia del impulsor sobre la morfología pero no se ha encontrado ninguna relación directa entre morfología y productividad, aunque parece ser que un aumento en la turbulencia y en los esfuerzos de corte resulta en crecimientos de tipo *pelotilla* en organismos filamentosos, lo cual está asociado en ocasiones con diferentes sustancias o velocidades de producción para el mismo microorganismo. Se ha propuesto el uso de una función de distribución de energía para correlacionar parámetros morfológicos y de liberación de nucleótidos; sin embargo, se requiere aún estudios más profundos para establecer su generalidad. Muy pocos reportes tienen que ver sobre la influencia de condiciones de fermentación (y en particular de la agitación) sobre la producción de aromas. Lo anterior indica claramente la importancia de realizar estudios de mezclado en estos sistemas empleando geometrías no estándar y con impulsores múltiples.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

**Evaluar la influencia de la geometría del impulsor sobre el crecimiento, reología y producción de aromas por *Trichoderma harzianum* en biorreactores agitados a escala de 10 L.**

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ◆ **Seleccionar un método de medición reológica adecuado y evaluar las propiedades reológicas de caldos de fermentación de *Trichoderma harzianum* como función de la edad de cultivo y del tipo de impulsor utilizado.**
- ◆ **Efectuar el montaje de un sistema de medición en línea de la potencia suministrada a fermentadores a nivel de 10 L.**
- ◆ **Determinar la influencia de la geometría del impulsor y de la potencia suministrada al cultivo sobre las cinéticas de crecimiento y producción de aroma en cultivos sumergidos de *T. harzianum* utilizando como fuente de carbono el aceite de ricino.**

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 MICROORGANISMO

Para esta investigación se utilizó el hongo *Trichoderma harzianum* var. *rifaii* obtenido de la colección del *International Mycological Institute* (IMI) número IMI 206040. El microorganismo liofilizado fue recuperado cultivándolo a 29° C y 200 rpm en un matraz Erlenmeyer que contenía un medio líquido constituido por extracto de Malta (20 g/L, Bioxon) y dextrosa (10 g/L J.T. Baker) a un pH de 5.6 y esterilizado previamente en autoclave a 121° C durante 20 minutos. Este medio será denominado en lo sucesivo "medio rico". Una vez recuperado, el hongo fue cultivado en *slants* con agar Papa-Dextrosa (Agar PDA. 39 g/L. Bioxon) durante 4 días a 29°C. Posteriormente, los *slants* fueron almacenados a 4° C. Para el mantenimiento de la cepa se realizaron resiembras mensuales .

### 4.2. CONDICIONES DE PRECULTIVO

Se preparó un preinóculo transfiriendo aseptícamente un cuadrado de agar PDA (1 cm<sup>2</sup> aprox.) con el hongo desde el *slant* de mantenimiento a una caja Petri con agar PDA. La caja se mantuvo a 29°C durante 4 días para obtener esporas frescas. Las esporas fueron recuperadas de la caja mediante lavados con 5 mL de una solución isotónica (NaCl, 9 g/L. Tween 40 (Merck, USA), 1.0 mL/L) para ser inoculadas en dos matraces Fernbach de 2800 mL de capacidad, los cuales contenían 500 mL de medio rico cada uno. La concentración de esporas en el inóculo fue de 5·10<sup>3</sup> esporas/mL, de acuerdo con lo reportado en trabajos previos (Flores, 1995) y se determinó mediante conteo directo con una cámara de Neubauer. Los matraces Fernbach fueron mantenidos durante 72 horas a 29°C y 200 rpm en una incubadora modelo G-25 (New Brunswick Scientific. Edison. N.J. USA.).

### 4.3. CONDICIONES DE CULTIVO

Se agregó un litro del inóculo a 9 litros de medio estéril de manera que la composición final del caldo de cultivo fue: aceite de ricino: 150 g/L (Drogueria Cosmopolita). (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 8.53 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 7.0 g/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2.0 g/L (Mallinckroot Chemical Works); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 1.5 g/L; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 0.067 g/L; FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O: 0.008 g/L y ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 0.0001 g/L; todos los reactivos, excepto cuando se señale lo contrario, fueron de J.T. Baker. Los cultivos se desarrollaron a 1.0 v.v.m y 29°C durante 8 días. El pH del medio fue mantenido en 5.6 ± 0.2 por medio de la adición de una solución estéril de NaOH 2N, mientras que la presión en el reactor se controló a 1.2 atmósferas absolutas. Muestras de aproximadamente 50 mL fueron drenadas durante el transcurso de la fermentación para llevar a cabo análisis de biomasa y aroma. El volumen de muestra para la medición de las propiedades reológicas del caldo fue de 100 mL.



#### 4.4. SISTEMAS DE FERMENTACIÓN.

Los siguientes impulsores fueron investigados en el sistema de fermentación:

- Turbina Rushton
- Impulsor InterMIG
- Impulsor helicoidal (IH3)

La configuración para los tres tipos de impulsor se muestra en la **Figura 4.1**. Las fermentaciones para la producción de aromas utilizando el impulsor helicoidal se desarrollaron en un fermentador de 14 L construido en el Centro de Instrumentos de la UNAM. Por su parte, las fermentaciones que utilizaron los impulsores InterMIG y turbina Rushton se llevaron a cabo en un fermentador New Brunswick de 14 L modelo MicroFerm 14 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J. USA). Se usó un fermentador diferente para el impulsor helicoidal debido a que su diámetro es muy similar al de la jarra, por lo cual hubiese sido necesario eliminar los baffles y adaptar la entrada de aire por el fondo de la jarra, lo cual era difícil de lograr sin afectar permanentemente la estructura de la jarra del modelo Microferm 14. Las dimensiones principales de estos fermentadores se aprecian en la **Figura 4.1**. La **Figura 4.2** muestra una vista general de los sistemas de fermentación en su conjunto. En todos los casos el volumen de trabajo fue de 10 L.

El oxígeno disuelto fue medido con un electrodo polarográfico esterilizable de 320 mm de longitud (Ingold, tipo S modelo 341003051) acoplado a un amplificador digital (Ingold, modelo 4300). La medición del pH se realizó por medio de un electrodo combinado de gel (Ingold, modelo 405-DPAS-K8S) de 325 mm de longitud acoplado a un amplificador digital (Ingold, modelo 2300). La determinación de la concentración de oxígeno y bióxido de carbono en los gases de salida del fermentador se hizo mediante un analizador de gases equipado con sensores paramagnético e infrarrojo, respectivamente (Columbus Instruments, modelo 180C).

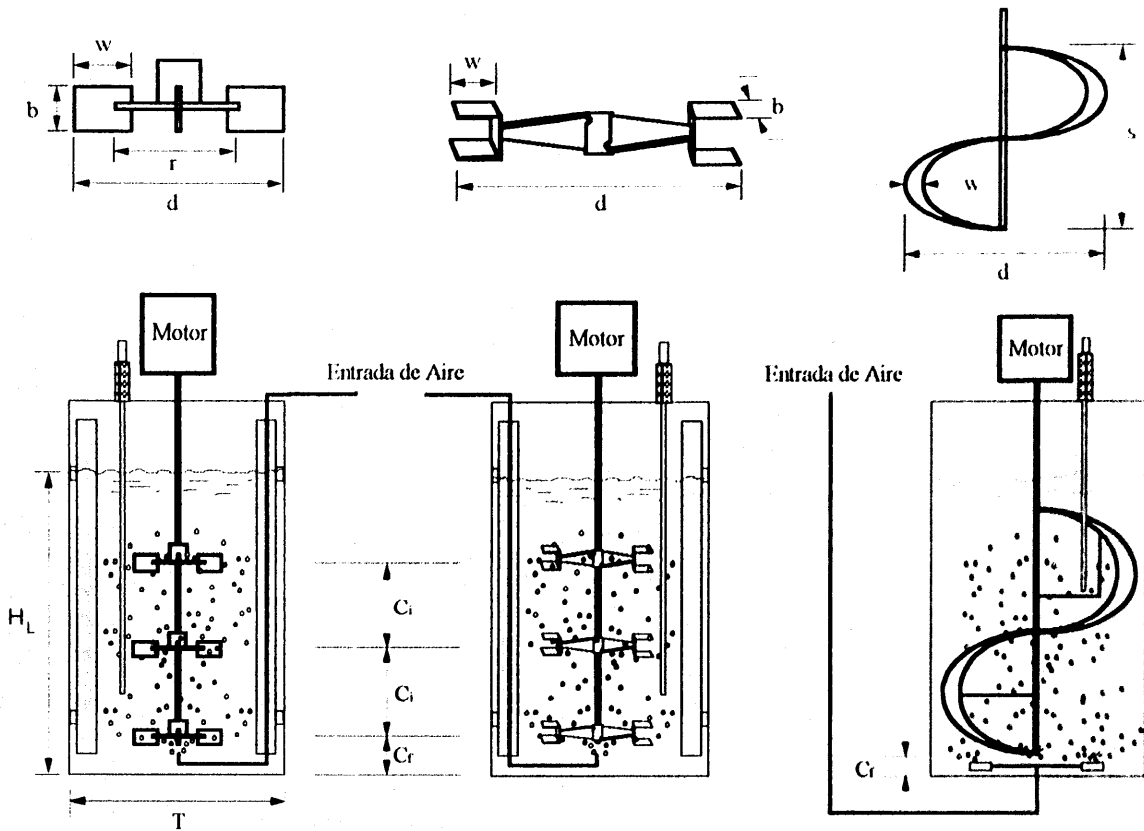
#### 4.5 VELOCIDAD DE AGITACIÓN

Igual potencia por unidad de volumen entregada al caldo al inicio de la fermentación fue el criterio utilizado para comparar el comportamiento de los cultivos desarrollados con los diferentes impulsores. La potencia inicial por unidad de volumen fue de 0.056 W/L, debido a que esta potencia volumétrica inicial ya se había utilizado en un trabajo previo (Flores, 1995) y corresponde al valor de la potencia por unidad de volumen entregada en agua por tres turbinas Rushton rotando a 200 rpm, medido en un dinamómetro (Reséndiz *et al.*, 1991) con la misma configuración mostrada en la **Figura 4.1**. Las velocidades de agitación que entregaron la misma potencia volumétrica inicial corresponden a 59 rpm para el impulsor helicoidal y 205 rpm para los impulsores InterMIG (determinadas en el torquímetro Himmelstein).

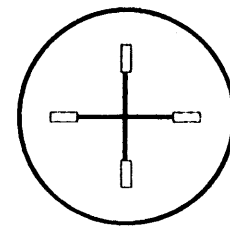
**Turbina Rushton**

**InterMIG**

**Impulsor Helicoidal (IH3)**

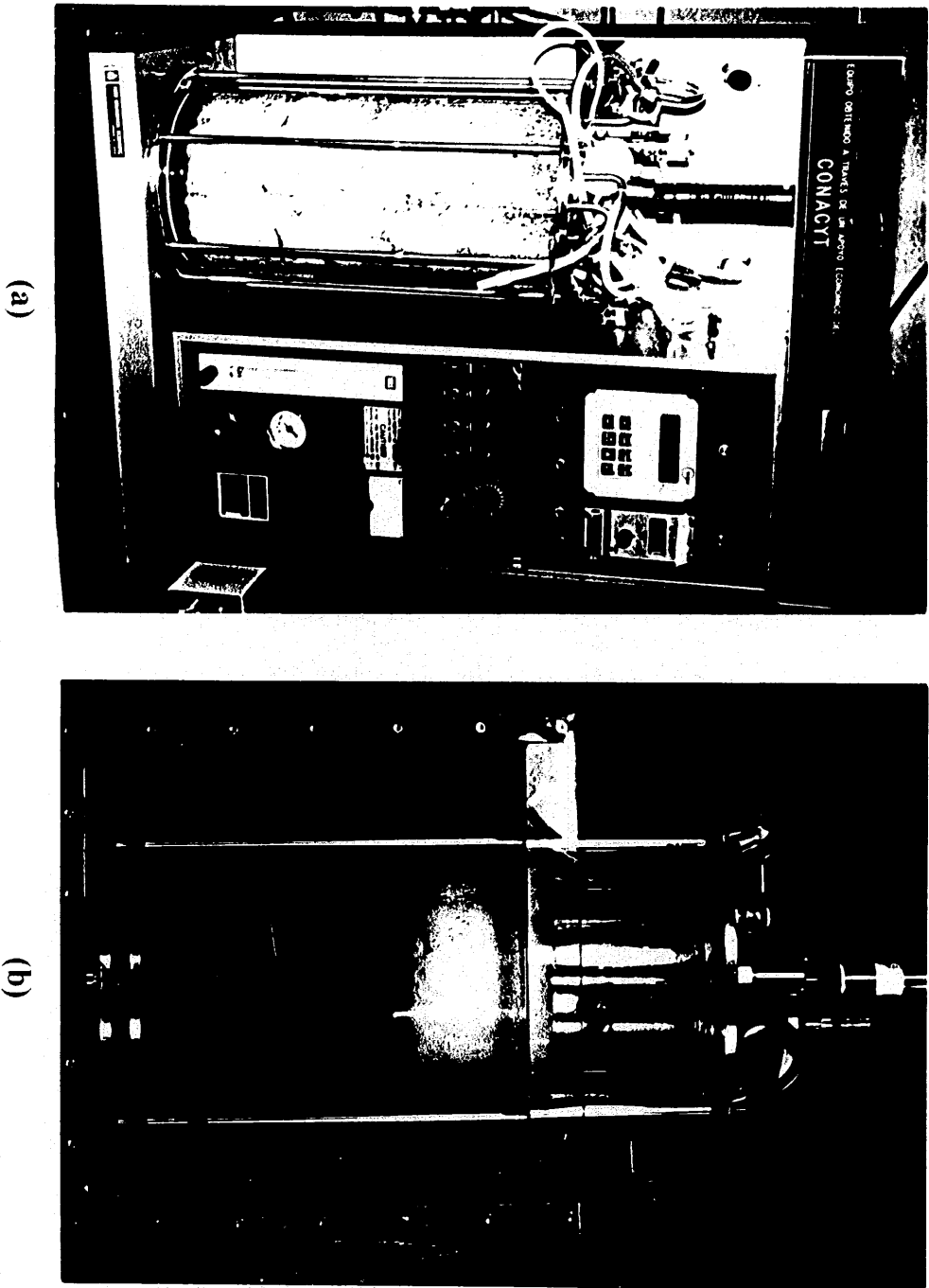


Dimensión \ Impulsor	Rushton (mm)	InterMIG (mm)	Impulsor Helicoidal (mm)
Diámetro del fermentador (T)	211	211	211
Diámetro del impulsor (d)	73.2	108.0	190.0
Diámetro del disco (r)	42.6	-	-
Ancho de paleta del impulsor (w)	17.8	17.2	30.7
Altura de paleta del impulsor (b)	10.5	13.5	-
Paso de la hélice (s)	-	-	195
Distancia del fondo al primer impulsor (C <sub>i</sub> )	54	54	20
Separación entre impulsores (C <sub>i</sub> )	73.2	73.2	-
Altura del líquido (H <sub>L</sub> )	286	286	286



Difusor de aire fermentador helicoidal (Vista inferior)

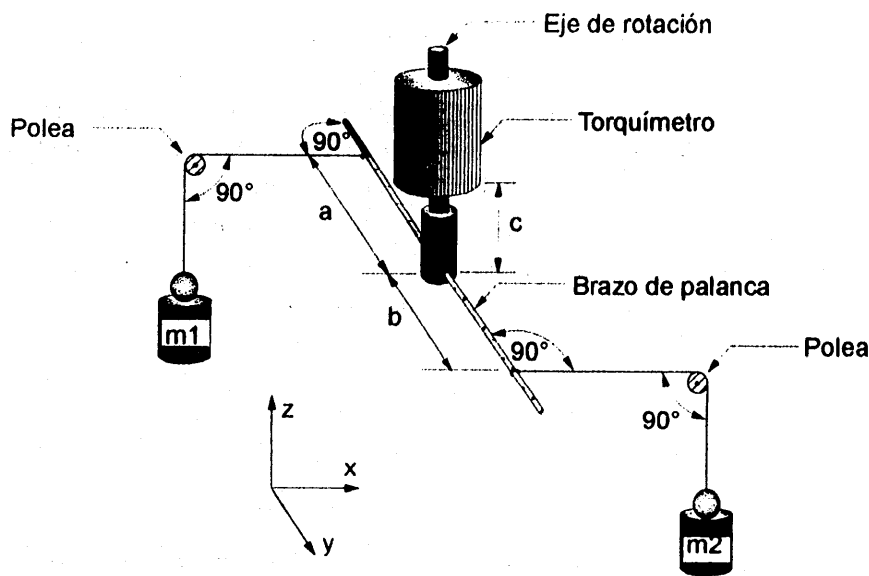
**Figura 4.1** Esquema de los impulsores y su configuración en el fermentador.



**Figura 4.2** Vista general de los sistemas de fermentación. **(a)** Fermentador MicroFerm (T. Rushton e InterMIG). **(b)** Fermentador de 14 litros (Helicoidal)

#### 4.6 CONSUMO DE POTENCIA DURANTE LA FERMENTACIÓN

El torque sobre la flecha de agitación fue medido en línea mediante un torquímetro de sensores de esfuerzo (*strain gauges*) modelo MCRT 28-01T(25-0) (S. Himmelstein & Co.). La velocidad de giro de la flecha del fermentador fue medida a través de un tacómetro incorporado en el torquímetro. La señal de velocidad de rotación fue procesada y presentada en un amplificador digital modelo 66032 (S. Himmelstein & Co). Se desarrolló una calibración estática del torquímetro para obtener una correlación entre el torque impuesto sobre el eje de rotación y la señal de los sensores de esfuerzo obtenida como voltaje. Para ello se aplicó un peso conocido en forma perpendicular a una palanca, acoplada a su vez al eje de rotación del torquímetro, como se muestra en la **Figura 4.3**.



Balance de fuerzas sobre el eje de rotación:

$$\Sigma F_x: F_x = m_2 g - m_1 g \quad \Sigma F_y: F_y = 0 \quad \Sigma F_z: F_z = 0$$

Balance de momento sobre el eje de rotación:

Torque radial:

$$\Sigma M_{xy}: M_{xy} = m_2 g \cdot b - m_1 g \cdot a$$

Torque axial:

$$\Sigma M_{xz}: M_{xz} = (m_2 - m_1) \cdot g \cdot c$$

Para evitar torques axiales se dispuso  $m_1 = m_2 = 0.4992 \text{ Kg}$ . Por tanto:

$$\Sigma M_{xy}: M_{xy} = m_2 g \cdot b - m_1 g \cdot a \quad \Sigma M_{xz}: M_{xz} = 0$$

**Figura 4.3** Arreglo experimental para la calibración estática del torquímetro

Se tomaron mediciones del potencial eléctrico generado por el amplificador de torque (mV) a medida que se variaba el sitio de aplicación del peso sobre la palanca. El torque impuesto se calculó de la siguiente manera:

$$M = F \cdot \ell \quad \text{Ec. (4.1)}$$

En donde:

M : Torque aplicado por las pesas sobre el eje de rotación [N·M].

F : Fuerza aplicada por las pesas (m·g) [N].

$\ell$  : Brazo de palanca [m].

La disposición simétrica de las pesas mostrada en la **Figura 4.3** permitió evitar torques axiales que también son medidos por el sensor. La correlación entre el torque aplicado y la señal eléctrica generada se muestra en **Figura 4.4**. Debido a que para cada fermentación se realizó el ajuste del cero del sistema de medición de torque (de acuerdo con el procedimiento del fabricante), hubo ligeras variaciones del valor del voltaje base en cada caso. Por este motivo, los valores en las abscisas de la curva de calibración mostrada en la **Figura 4.4** corresponden a la diferencia existente entre el voltaje registrado para cada medición de torque y el voltaje obtenido cuando no se aplica torque alguno al sistema ( $\Delta V$ ). La curva, como está construida, mostró excelente reproducibilidad.

De la **Figura 4.4** es claro que el voltaje leído es directamente proporcional al torque aplicado; la medición de voltaje se realizó con una resolución de 0.1 mV, siendo posible resolver torques tan bajos como  $6.9 \cdot 10^{-4}$  N·m.

Las medidas de torque como función de la velocidad de rotación fueron transformadas en potencia por medio de la siguiente expresión:

$$P = 2 \cdot \pi \cdot N \cdot (M - M_0) \quad \text{Ec. (4.2)}$$

En donde P es la potencia entregada al caldo de cultivo [Watts], N es la velocidad de agitación [rps], M es la lectura de torque entregada por el amplificador durante la fermentación [N·m], y  $M_0$  es la lectura de torque debida a la fricción en el sello mecánico y los rodamientos de la tapa del fermentador [N·m]. Esta última se determina operando el sistema de fermentación mientras se encuentra vacío a diferentes velocidades de rotación.

#### 4.7 BIOMASA

La biomasa del micelio se estimó como peso seco. Una muestra del caldo con un volumen conocido se centrifugó a 14000 rpm (23700·g en el extremo del tubo) durante 20 minutos en

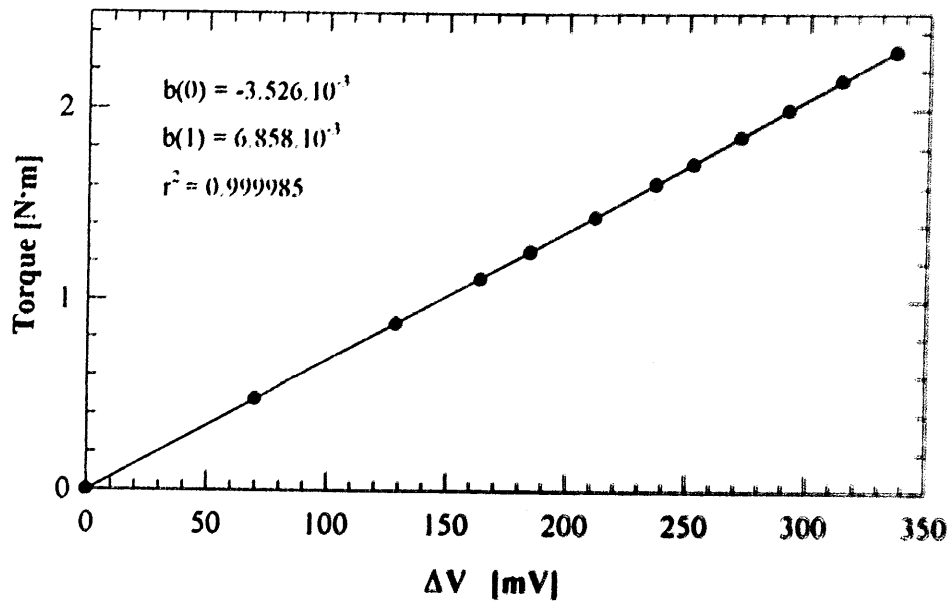


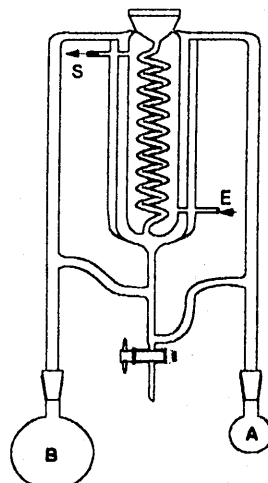
Figura 4.4 Calibración estática del torquímetro. Lecturas con el milivoltímetro.

una centrifuga Beckman J2HS, con un rotor Beckman JA-20. El sobrenadante, el cual contenía la mayoría del aceite, fué desechado. Posteriormente, se agregó al tubo con el centrifugado 30 mL de solución isotónica y 0.25 mL de Tween 40 (Merck, USA); la mezcla se agitó con un dispositivo de vórtex durante un minuto y se centrifugó nuevamente. El proceso de lavado se repitió 3 veces más con el objetivo de retirar la mayor cantidad posible de aceite adherido al micelio. A continuación, las células fueron filtradas al vacío con un embudo Buchner a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  de peso conocido. Durante la filtración se realizaron lavados con agua destilada para eliminar las sales de la solución isotónica. La membrana con las células se secó a 85°C durante 24 horas y posteriormente se dejó enfriar en un desecador para ser pesado nuevamente. La concentración de biomasa se calculó mediante la ganancia en peso de la membrana Millipore y se expresó como gramos de células secas/litro de caldo de cultivo.

#### 4.8. AROMA

El aroma fue extraído del caldo de cultivo mediante un aparato de destilación-extracción diseñado con base en el de Likens-Nickerson modificado por Godefroot *et al.* (1980) y que se ilustra en la Figura 4.5. Este aparato fue construido por Fabrelab (México). El procedimiento para la extracción del aroma fue el siguiente:

20 mL de cloruro de metileno grado cromatográfico (J.T. Baker) fueron colocados en el balón A (Figura 4.5). Simultáneamente, un volumen conocido de caldo de cultivo fresco de aproximadamente 50 mL fue depositado en el balón B junto con 250  $\mu\text{L}$  de estándar interno. Se utilizó como estándar interno la  $\gamma$ -undecalactona (Aldrich, Milwaukee, USA) en concentraciones de aproximadamente 800 mg/L en cloruro de metileno. Ambos balones fueron



- A: Solvente (Diclorometano,  $T_{eb} = 70^{\circ}\text{C}$ )  
B: Caldo de cultivo más estándar interno ( $T_{eb} \approx 115^{\circ}\text{C}$ )  
E,S: Entrada y salida, respectivamente, de agua de refrigeración

**Figura 4.5** Aparato de destilación-extracción empleado para la determinación de aroma.

entonces conectados rápidamente al aparato de extracción y calentados hasta su correspondiente temperatura de ebullición. El reflujo en ambas ramas del aparato de extracción se mantuvo durante 50 minutos, apagando posteriormente el calentamiento del balón B con el caldo y dejando el reflujo del solvente durante 15 minutos más con el propósito de arrastrar completamente el aroma de las paredes del aparato extractor. El solvente se recuperó del balón A y se concentró 10 veces pasando gas nitrógeno sobre la superficie del solvente para su posterior análisis cromatográfico.

La determinación de los compuestos de aroma se llevó a cabo con un cromatógrafo de gases Varian Aerograph Modelo 374000-00 equipado con un detector de ionización de flama. Para el análisis se inyectó  $1 \mu\text{L}$  de la muestra utilizando una jeringa de  $10 \mu\text{L}$  modelo Gastight #1801 (Hamilton, Nevada, USA). La señal fue dirigida a través de una interfase hacia una computadora equipada con un programa de adquisición y análisis de datos (Peaksimple II, SRI Inc.). Se utilizó una columna capilar SPB-20 de sílica fundida (No. catálogo 2-4086, Supelco, Bellefonte, PA), de 30 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno. Se utilizó helio como gas acarreador. Las condiciones del cromatógrafo y el programa de temperatura se muestran en la **Tabla 4.1**.

La cuantificación del aroma se hizo por el método del estándar interno (e. int). Se construyó una curva de calibración inyectando soluciones de concentraciones conocidas tanto de estándar interno ( $\gamma$ -undecalactona) como de los aromas de interés  $\gamma$ -decalactona (Aldrich, Milwaukee, USA) y 6-pentil- $\alpha$ -pirona (Penta International Corporation, New Jersey, USA). Las áreas bajo la curva para cada concentración conocida se muestran en la **Figura 4.6**.

**Tabla 4.1** Condiciones de operación del cromatógrafo de gases para la determinación de aroma.

<b>Gases</b>	<b>Presión de entrada (lbf·pulg<sup>2</sup>)</b>	<b>Flujo (cm<sup>3</sup>·min<sup>-1</sup>)</b>
Hidrógeno	40	+
Helio	40	10
Aire	60	+

<b>Componente del sistema</b>	<b>Temperatura [°C]</b>
Inyector	230
Detector de ionización de flama	250

<b>Columna</b>		
<b>Programa de temperaturas</b>	<b>Limpieza</b>	<b>Corrida</b>
Temperatura inicial [°C]	220	113
Tiempo [min]	10	2
Incremento [°C·min <sup>-1</sup> ]	5	5
Temperatura final [°C]	220	240
Tiempo [min]	10	5

En este caso, dado que las áreas para concentración cero de los compuestos deben ser cero (línea base), se forzó a las correlaciones a pasar por el origen (ordenada = 0). Como resultado se obtuvieron las siguientes regresiones:

$$[6PP]_s = \frac{(\text{área } 6PP)}{6.7178} \quad \text{Ec. (4.3)}$$

$$[e. \text{ int}]_s = \frac{(\text{área } e. \text{ int})}{6.5333} \quad \text{Ec. (4.4)}$$



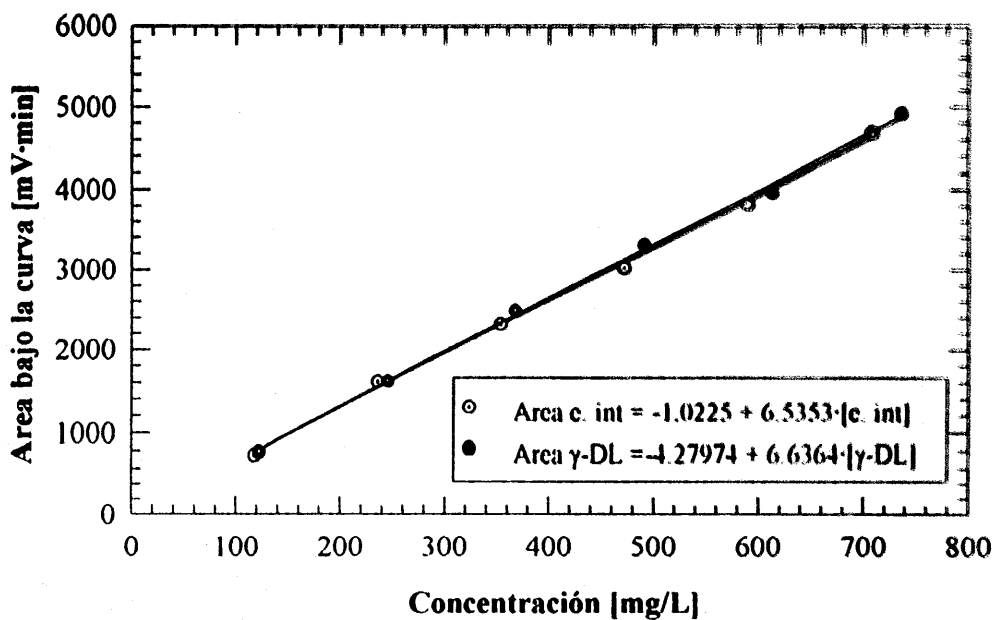
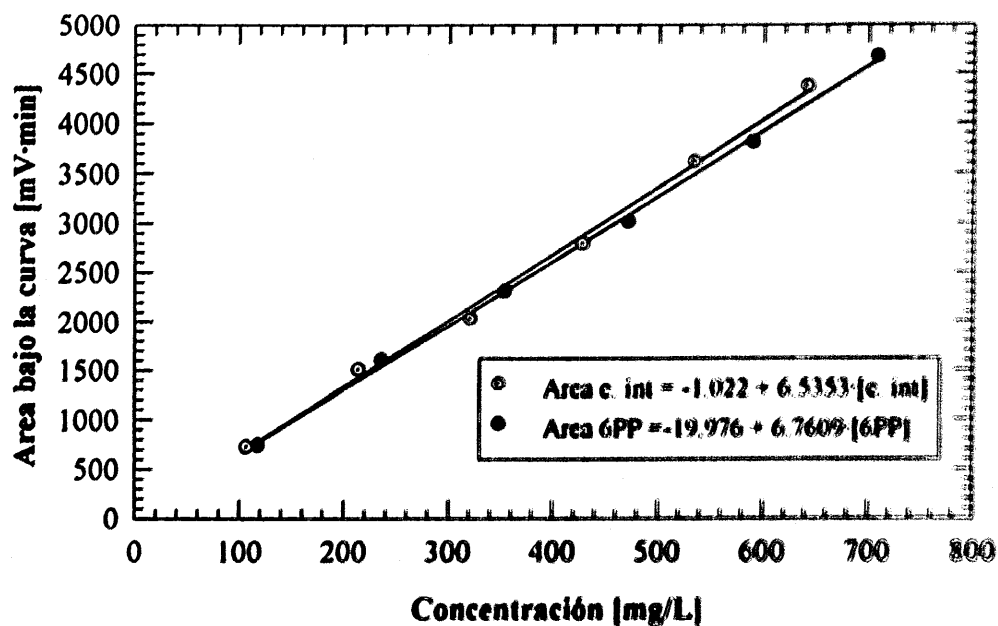


Figura 4.6 Curvas de calibración para la cuantificación de aroma.

en donde  $[6PP]_s$  y  $[e. \text{ int}]_s$  son, respectivamente, las concentraciones de 6PP y estándar interno en la solución del balón B.

Dividiendo la ecuación 4.3 entre la ecuación 4.4, se obtiene:

$$\frac{[6PP]_s}{[e. \text{ int}]_s} = \frac{6.5333 \left[ \frac{(\text{área } 6PP)}{(\text{área } e. \text{ int})} \right]}{6.7178 \left[ \frac{(\text{área } 6PP)}{(\text{área } e. \text{ int})} \right]} \quad \text{Ec. (4.5)}$$

rearrglándola se obtiene:

$$[6PP]_s = 0.9725 [e. \text{ int}]_s \left[ \frac{(\text{área } 6PP)}{(\text{área } e. \text{ int})} \right] \quad \text{Ec. (4.6)}$$

Como es obvio,  $[6PP]_s$  es la concentración que deseamos conocer en las muestras. Sin embargo,  $[e. \text{ int}]_s$  es diferente a la concentración del estándar interno patrón que se agrega al balón B, debido a la dilución de los 250  $\mu\text{L}$  de estándar interno en los 50 mL de la muestra. Por lo tanto, haciendo la corrección para la dilución, se obtiene la siguiente fórmula para determinar la concentración de 6PP en las muestras:

$$[6PP]_s = 0.9725 [e. \text{ int}]_p \left[ \frac{(\text{área } 6PP)}{(\text{área } e. \text{ int})} \right] \left[ \frac{V_{e. \text{ int}}}{V_{\text{muestra}}} \right] \quad \text{Ec. (4.7)}$$

Siguiendo un procedimiento similar, se obtiene la siguiente fórmula para la  $\gamma$ -decalactona:

$$[\gamma - DL]_s = 0.9856 [e. \text{ int}]_p \left[ \frac{(\text{área } \gamma - DL)}{(\text{área } e. \text{ int})} \right] \left[ \frac{V_{e. \text{ int}}}{V_{\text{muestra}}} \right] \quad \text{Ec. (4.8)}$$

en donde:

$[6PP]_s$ : Concentración de 6-pentil- $\alpha$ -pirona en la muestra [mg/L].

$[\gamma - DL]_s$ : Concentración de  $\gamma$ -decalactona en la muestra [mg/L].

$[e. \text{ int}]_p$ : Concentración de estándar interno patrón preparado (usualmente 800 mg/L) [mg/L].

$V_{\text{muestra}}$ : Volumen del caldo de cultivo (usualmente 50 mL) [L].

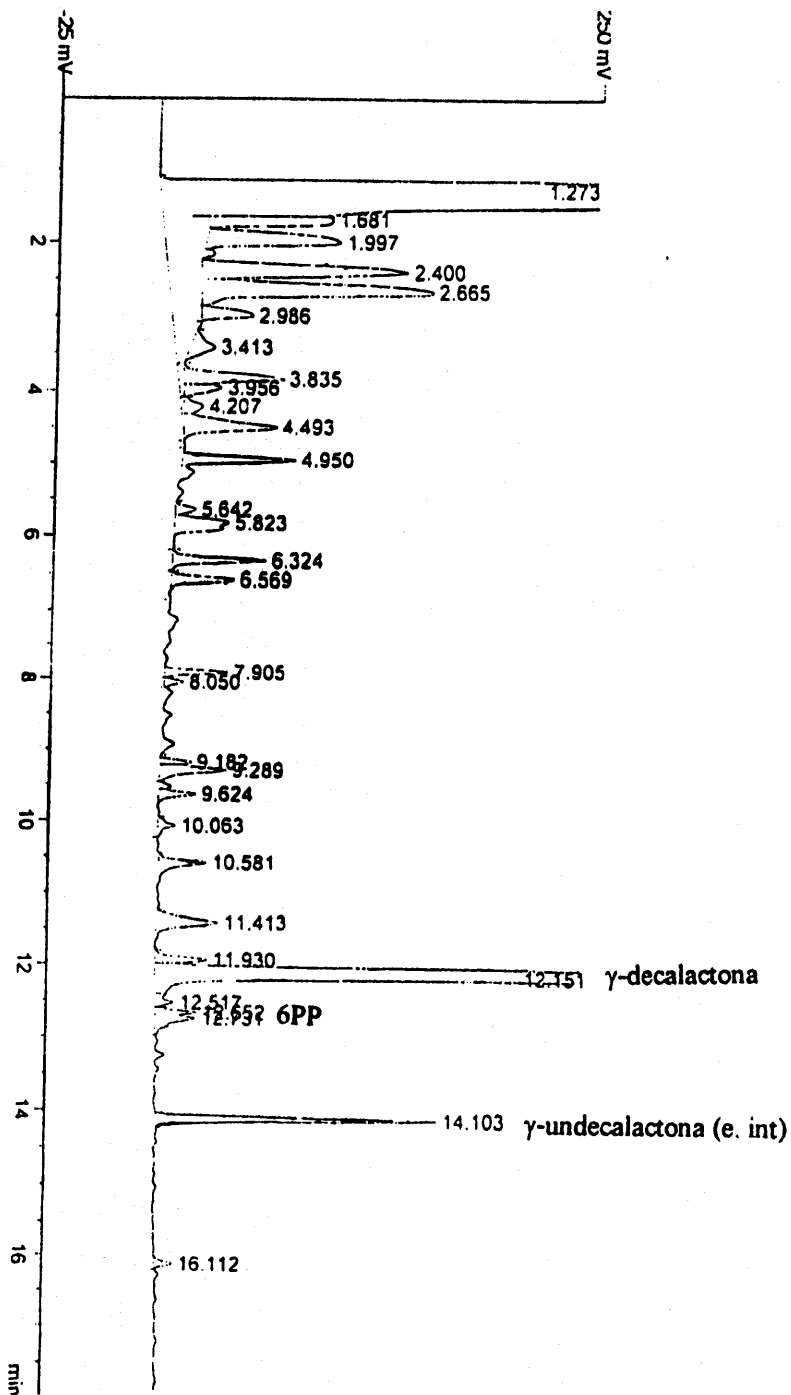
$V_{e. \text{ int}}$ : Volumen de estándar interno agregado (usualmente 250  $\mu\text{L}$ ) [L].

(área 6PP): área bajo la curva del pico de 6-pentil- $\alpha$ -pirona en el cromatograma [mV·min].

(área e. int): área bajo la curva del pico de estándar interno en el cromatograma [mV·min].

(área  $\gamma$ -DL): área bajo la curva del pico de  $\gamma$ -decalactona en el cromatograma [mV·min].

Figura 4.7 Cromatograma típico de una fermentación. (Fermentación IH3)



La determinación de cual sustancia (y por tanto qué ecuación utilizar para su cuantificación) se determinó mediante los tiempos de retención de las moléculas. Un cromatograma típico de una fermentación se presenta en la **Figura 4.7**.

#### 4.9 MORFOLOGÍA

La morfología del hongo se siguió durante el transcurso de las fermentaciones mediante observación directa en un microscopio Nikon Alphaphot modelo 2452. Para ello se utilizó micelio fresco que siguió el mismo proceso de centrifugación y lavado que sufrieron las muestras para las determinaciones de peso seco. El micelio se fijó por temperatura al portaobjetos y luego se tiñó cubriendo el micelio con una solución de azul de algodón (*amiline blue w.s.*, ALDRICH. Milwaukee, USA) durante 5 minutos. El exceso de colorante fue retirado con agua destilada. Posteriormente se colocó la lámina cubreobjetos sobre la muestra, asegurándose que ésta estuviese húmeda durante la observación, para evitar distorsiones ópticas en las fotografías, las cuales fueron tomadas utilizando el objetivo de 40X.

#### 4.10 COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE LOS CALDOS DE CULTIVO:

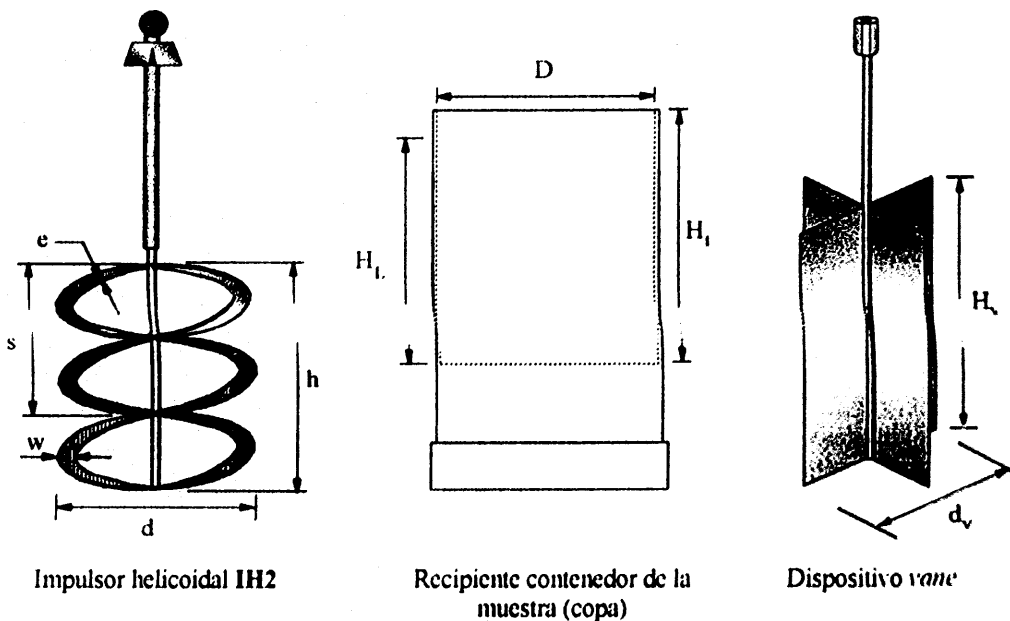
Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron 2 dispositivos de medición reológica:

Dispositivo *vane*  
Impulsor helicoidal IH2

En ensayos preliminares se encontró que el impulsor helicoidal IH2 resultó ser el más adecuado para caracterizar las propiedades reológicas de los caldos, debido a que no presentó los problemas de separación de fases y sedimentación del micelio que fueron observados con el dispositivo *vane*. Por este motivo en el capítulo 5 se presenta la caracterización del dispositivo IH2. La caracterización del dispositivo *vane* fue realizada por Velasco (1994) y en este trabajo se utilizaron sus resultados. Para el caso de los caldos de cultivo, todas las mediciones fueron realizadas a 29°C.

##### 4.10.1 Sistemas de medición.

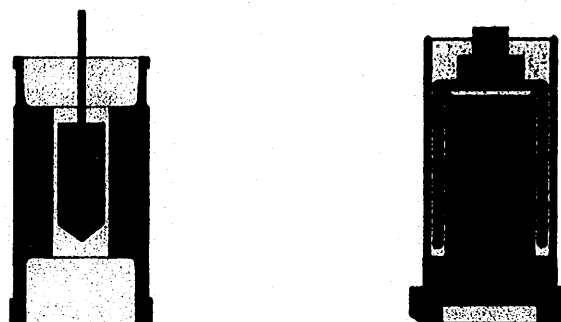
El dispositivo helicoidal IH2, mostrado en la **Figura 4.8** es un pequeño impulsor constituido por un listón de acero inoxidable doblado en espiral alrededor de un eje. El impulsor gira dentro de un recipiente cilíndrico (copa) cuya función es contener la muestra, permitir el control de la temperatura del fluido y mantener constantes algunas relaciones geométricas indispensables para realizar las mediciones reológicas. Este dispositivo fue construido *ex profeso*, y se conectó al sistema de medición de un reómetro Contraves Rheomat 120 (Contraves, Zurich, Suiza). El reómetro está conectado a una computadora PC para la adquisición de datos a través de una interfase GPIB. De acuerdo con las especificaciones técnicas dadas por el fabricante, el torque máximo de medición del instrumento corresponde a  $50 \cdot 10^{-3}$  N·m, y la resolución de medidas de torque corresponde a  $4.9 \cdot 10^{-4}$  veces el torque máximo ( $2.5 \cdot 10^{-5}$  N·m). Todas las lecturas son



d	D	w	s	h	H <sub>t</sub>	e = d <sub>a</sub>	H <sub>i</sub>	N <sub>R</sub>	N <sub>a</sub>	d <sub>v</sub>	H <sub>v</sub>
47.0	49.6	8.5	30.3	45.4	56.0	1.2	63.0	2	4	37.5	65.0

Dimensiones en mm.

Figura 4.8 Dimensiones de los dispositivos de medición reológica (IH2 y vane)



DIN-114

MS-0/115

Propiedad	Dispositivo	
	DIN-114	MS-0/115
$\gamma$ (s <sup>-1</sup> )	$6.5 \cdot 10^{-2} - 1.006 \cdot 10^3$	$2.4 \cdot 10^{-1} - 3.64 \cdot 10^3$
$\eta$ (Pa.s)	$6.5 \cdot 10^{-2} - 9.77 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^{-4} - 2.73 \cdot 10^2$

Figura 4.9 Dispositivos estándar de medición reológica

múltiplos de este valor; por seguridad se decidió descartar todos los valores de lecturas de torque inferiores a  $2 \cdot 10^{-4}$  N·m. La adquisición y manejo de datos se realizó mediante el programa de computadora SWR120, desarrollado por la compañía Mettler-Toledo. La temperatura de la muestra se controló por medio de un baño recirculador Contraves rheoterm 115 (Contraves, Zurich, Suiza). Los principios de medición, así como los procedimientos de calibración y medición, se encuentran ampliamente descritos en los manuales correspondientes suministrados por el fabricante y por lo tanto no se discutirán aquí. Sin embargo, algunas generalidades sobre las geometrías usadas para la calibración se mencionarán en párrafos posteriores.

El dispositivo *vane* es un impulsor de paletas planas de elevada relación altura diámetro ( $H/d_v = 1.73$ ; **Figura 4.8**), conectado al sistema de medición de torque de un viscosímetro HBTDV-I. El recipiente que contiene la muestra debe tener por lo menos el doble de altura y diámetro que el *vane*, con el fin de evitar interferencias en las mediciones ocasionadas por las paredes del vaso. El procedimiento de medición es descrito detalladamente por Velasco (1994) y Flores (1995).

#### 4.10.2 Fluidos de calibración

El impulsor helicoidal IH2 fue calibrado utilizando fluidos Newtonianos y no-Newtonianos cuyas propiedades fueron determinadas utilizando los dispositivos DIN 114 y MS 0/115 (cilindros concéntricos) del Rheomat 120. Los rangos de medición para estos dispositivos se muestran en la **Figura 4.9**. Como fluidos Newtonianos se utilizaron 3 fluidos estándar de viscosidad Brookfield (Brookfield, Massachusetts, USA) y aceite de transmisión Veedol SAE-350 (Veedol International Limited, Swindon, England). Como fluidos no-Newtonianos se prepararon una serie de soluciones de diferente concentración de goma xantana marca Keltrol-T, grado alimenticio (Kelco, Div. de Merck & Co) y de carboximetilcelulosa sódica (Sigma Chemical, Co). Estos fluidos fueron seleccionados por la excelente reproducibilidad durante la medición de sus características reológicas con todos los dispositivos utilizados y fácil consecución. La **Tabla 4.2** muestra algunas de las propiedades físicas así como el comportamiento reológico para estos fluidos de calibración. A las soluciones de goma xantana se les adicionó  $1 \text{ Kg/m}^3$  de NaCl para estabilizar la viscosidad.

**Tabla 4.2** Propiedades físicas de los fluidos de calibración utilizados.

Denominación	Componente	Concentración [Kg·m <sup>-3</sup> ]	Comportam. Reológico	Densidad (25°C) [Kg·m <sup>-3</sup> ]
B-100	Aceite de silicona <sup>(a)</sup>	-	Newtoniano	960
B-1000	Aceite de Silicona <sup>(a)</sup>	-	Newtoniano	962
B-5000	Aceite de Silicona <sup>(a)</sup>	-	Newtoniano	966
SAE-350	Aceite mineral	-	Newtoniano	919
GX-1	Goma Xantana	0.66	Pseudoplástico	998
GX-3	Goma Xantana	3.33	Pseudoplástico	999
GX-10	Goma Xantana	10.0	Pseudoplástico	1003
GX-13	Goma Xantana	13.3	Pseudoplástico	1003
GX-17	Goma Xantana	16.7	Pseudoplástico	1009
GX-20	Goma Xantana	20.0	Pseudoplástico	1013
CMC-5/10	Carboximetilcelulosa	5.0	Pseudoplástico	1005 <sup>(b)</sup>
CMC-5/25	Carboximetilcelulosa	5.0	Pseudoplástico	1003
CMC-15/10	Carboximetilcelulosa	15.0	Pseudoplástico	1009 <sup>(b)</sup>
CMC-15/25	Carboximetilcelulosa	15.0	Pseudoplástico	1008

<sup>(a)</sup> Estándares de viscosidad Brookfield.

<sup>(b)</sup> Densidad a 10°C.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

Este capítulo se ha organizado en 3 secciones. En la sección 5.1 se presentan los resultados de consumo de potencia y calibración del sistema de medición reológica helicoidal (IH2). Posteriormente, en la sección 5.2, se caracteriza el comportamiento del sistema de medición de potencia en línea para fermentadores de 10 L, así como el desempeño del impulsor helicoidal (IH3), construidos ambos durante el desarrollo de este proyecto. Los resultados de utilizar diferentes impulsores en el crecimiento, comportamiento reológico, y producción de aromas por *Trichoderma harzianum* se discuten en la sección 5.3

### 5.1 CALIBRACION DEL SISTEMA HELICOIDAL IH2

En esta sección se discuten los resultados experimentales del torque (o, equivalentemente consumo de potencia) desarrollado por el impulsor IH2, como función de la velocidad de agitación para un grupo de fluidos de diferentes características reológicas con especial énfasis en la región laminar de flujo, puesto que es allí donde pueden llevarse a cabo mediciones reológicas con alguna validez. Se determina el valor de la constante de Metzner y Otto ( $K_s$ ) para el impulsor helicoidal IH2 y se discute la variación de dicha constante como función de las propiedades del fluido.

#### 5.1.1 Fluidos Newtonianos

Con el impulsor IH2 conectado al cabezal de medición del Rheomat 120, se desarrollaron ensayos de torque como función de la velocidad de agitación para cada uno de los fluidos Newtonianos utilizados (ver **Tabla 4.2** para la descripción de dichos fluidos). Todos los ensayos fueron realizados a una temperatura constante de 25°C y en dirección contraria a las manecillas del reloj, obteniéndose siempre un movimiento ascendente del fluido. Las **Figuras 5.1** y **5.2** muestran algunos de los resultados experimentales de dichos ensayos obtenidos con el impulsor IH2.

Para el caso de flujo laminar, reorganizando la **ecuación 2.9** se obtiene :

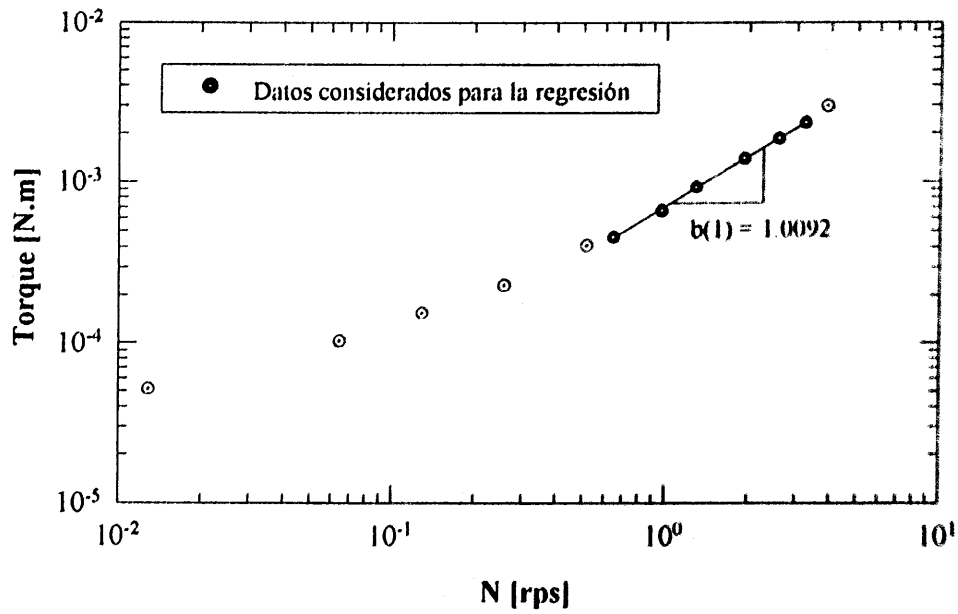
$$M = \left( \frac{K_p d^3 \eta_a}{2\pi} \right) N \quad \text{Ec. (5.1)}$$

o, en forma logarítmica:

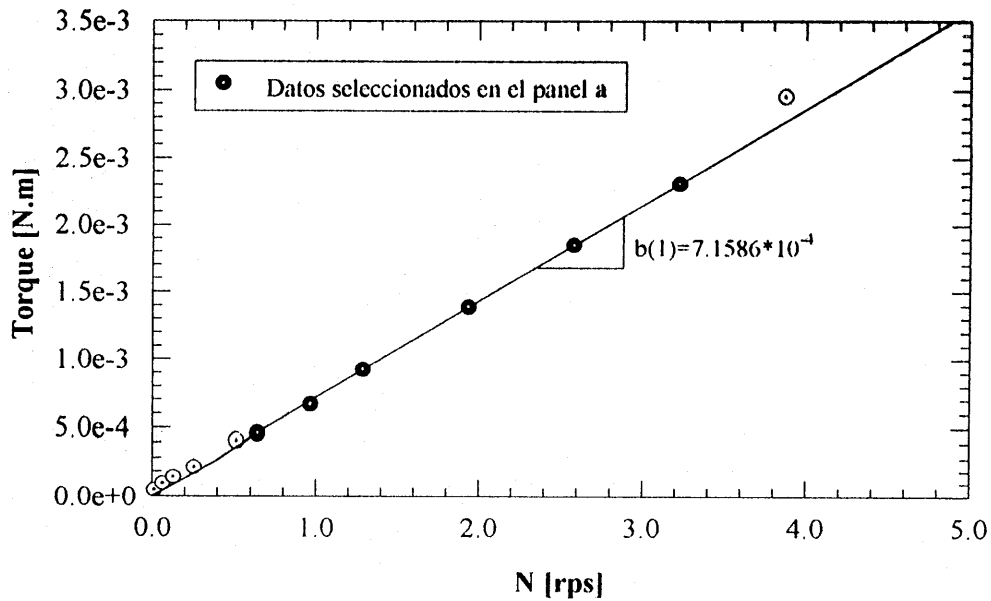
$$\log(M) = \log\left(\frac{K_p d^3 \eta_a}{2\pi}\right) + \log(N) \quad \text{Ec. (5.2)}$$

De acuerdo con la **ecuación 5.2**, los datos de torque como función de la velocidad de agitación en coordenadas logarítmicas para un impulsor particular, flujo laminar y fluidos Newtonianos ( $\eta_a$  constante) deben aparecer como una línea recta de pendiente  $b(1) = 1$ . Con base en este criterio, se construyó el panel **a** de las **Figuras 5.1** y **5.2**, en donde se

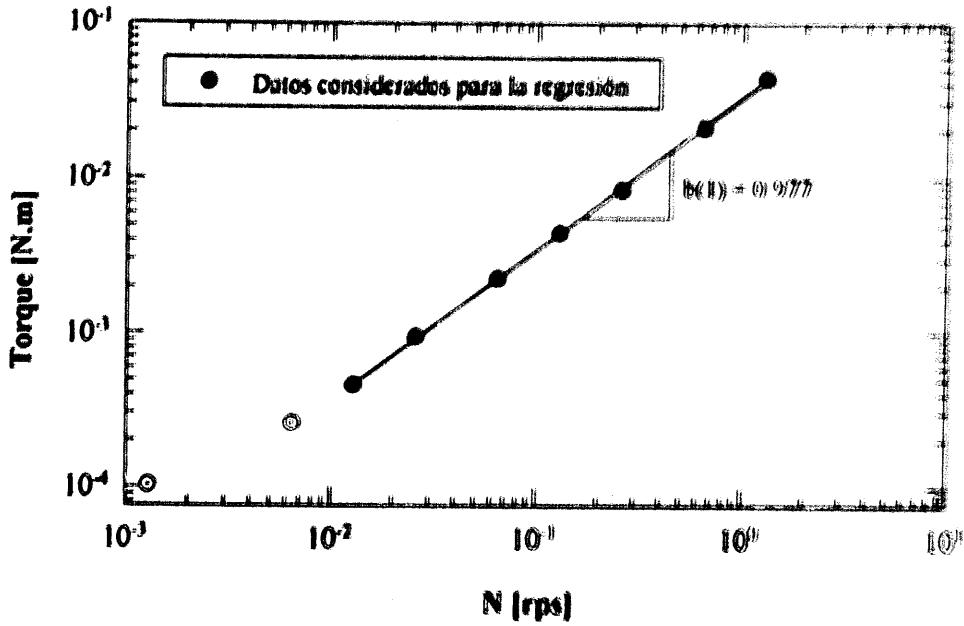




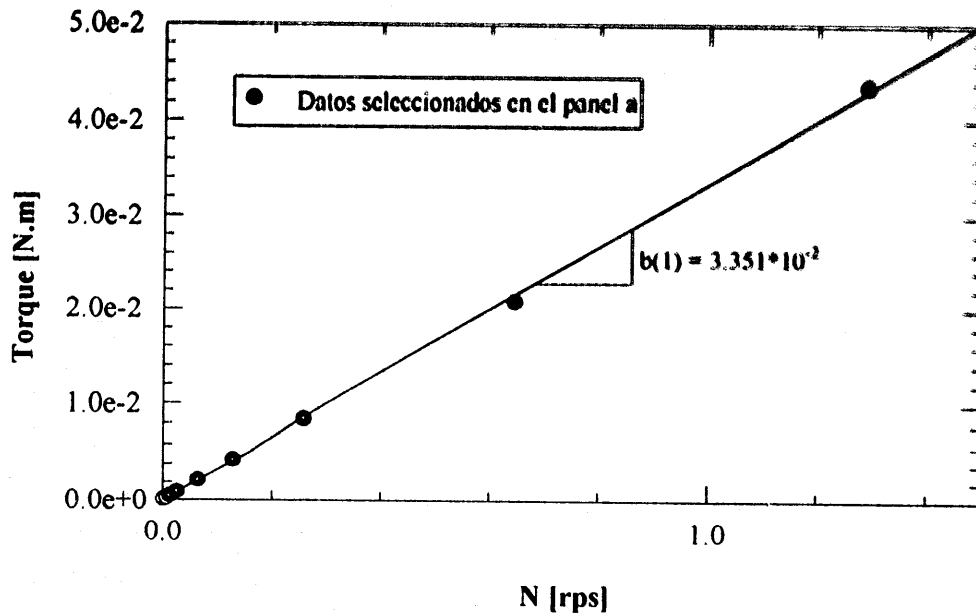
**Figura 5.1.a** Torque leído como una función de la velocidad de rotación del impulsor.  
Selección de los puntos a considerar para el cálculo de la constante  $K_p$ .  
Escala logarítmica. Fluido B-100. Impulsor IH2.



**Figura 5.1.b** Torque leído como una función de la velocidad de rotación del impulsor.  
Escala lineal. Fluido B-100. Impulsor IH2.



**Figura 5.2.a** Torque leído como una función de la velocidad de rotación del impulsor. Selección de los puntos a considerar para el cálculo de la constante  $K_p$ . Escala logarítmica. Fluido B-5000. Impulsor IH2.



**Figura 5.2.b** Torque leído como una función de la velocidad de rotación del impulsor. Escala lineal. Fluido B-5000. Impulsor IH2.

seleccionan aquellos datos que corresponden a esta aproximación teórica. Como es aparente de dichas figuras, los datos que se ajustan a la predicción teórica son aquellos cuyos valores de torque son mayores a aproximadamente  $5 \cdot 10^{-4}$  N·m, lo que permitiría suponer que sólo se podrán tener lecturas confiables cuando se midan torques 20 veces mayores a la mínima lectura detectada por el instrumento. Este resultado concuerda en forma aceptable con las 10 veces que se habían supuesto previamente como margen de seguridad para las mediciones. Los datos seleccionados en el panel **a** de las Figuras 5.1 y 5.2 se ajustaron a una regresión lineal en el panel **b** de las mismas figuras. La constante  $K_p$  del impulsor con cada fluido fue calculada a partir de la pendiente de la figura, de acuerdo con la ecuación 5.1. Los valores de  $K_p$  se presentan en la Tabla 5.1.

**Tabla 5.1** Valores calculados de  $K_p$  para los diferentes fluidos Newtonianos utilizados.

Fluido	$\rho$ [Kg·m <sup>-3</sup> ]	$\mu$ [Pa·s]	Pendiente b(1) [N·m·s] <sup>(*)</sup>	$K_p$ [-]
B-100	960	0.101	$7.1586 \cdot 10^{-4}$	428.93
B-1000	962	0.995	$7.2660 \cdot 10^{-3}$	441.94
B-5000	966	4.820	$3.3509 \cdot 10^{-2}$	420.73
SAE-350	919	2.598	$1.79595 \cdot 10^{-2}$	418.35
Promedio	-	-	-	427.49

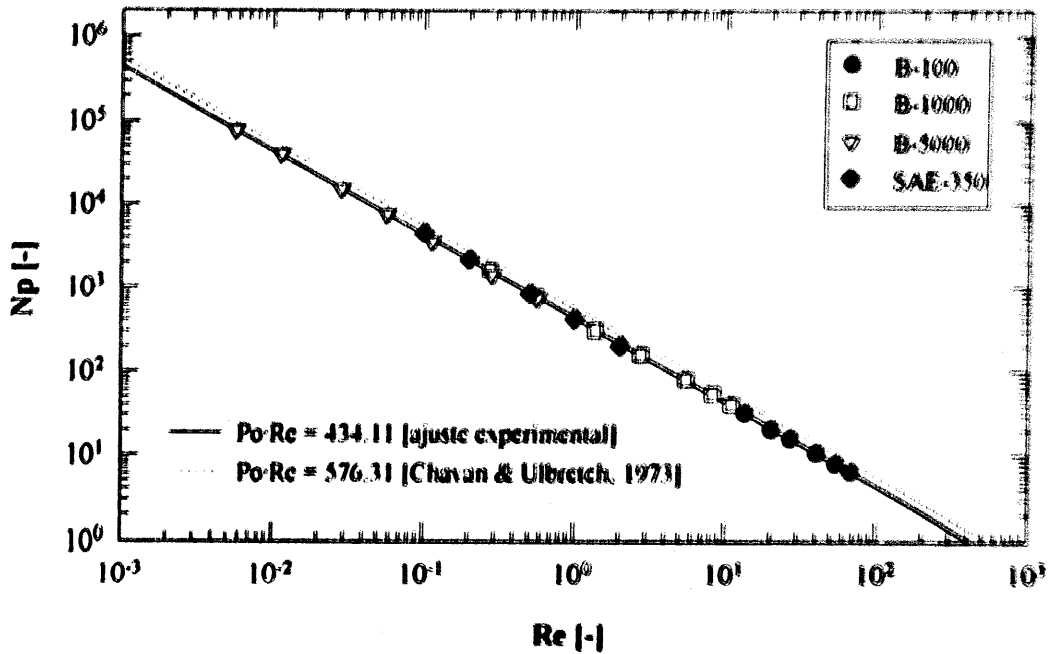
(\*) Ver Figuras 5.1 y 5.2

Brito-De la Fuente (1992) reporta que para fluidos Newtonianos en la región de flujo laminar (usualmente aceptada como  $Re \leq 10$  para impulsores helicoidales) la constante  $K_p$  depende únicamente de la geometría del impulsor; por tanto, para una geometría definida, debería obtenerse un único valor de  $K_p$ . Esto está de acuerdo con las ecuaciones de la Tabla 2.5. Se encontró una variación máxima de 5.5 % con respecto al promedio aritmético entre los diferentes fluidos. Correspondientemente, se encontró que la desviación estándar fue el 2.2% del valor promedio encontrado. Los datos seleccionados de torque y velocidad de rotación fueron transformados en número de Potencia ( $N_p$ ) y número de Reynolds ( $Re$ ) respectivamente, con el fin de estimar una constante  $K_p$  representativa. Esto se hizo por medio de un análisis de regresión para todos los fluidos Newtonianos medidos con el impulsor IH2, como se aprecia en la Figura 5.3. El resultado de la regresión aparece en la Tabla 5.2, para dos diferentes intervalos de  $Re$ . La pendiente de la curva fue de  $b(1) = -1.00461$  lo cual se ajusta a la predicción teórica de que  $N_p$  es proporcional a  $Re^{-1}$  para flujo laminar.

**Tabla 5.2** Correlación de datos para la curva de potencia. Impulsor IH2.

$Re$	$K_p$	Pendiente b(1)	$r^2$
$\leq 10$	433.12	-1.00577	0.9997
$\leq 70$	434.11	-1.00461	0.9999

## Resultados y discusión



**Figura. 5.3** Curva de Potencia Newtoniana para el impulsor IH2

Es interesante observar que los valores para el fluido B-100 (Figura 5.3) caen en la región de  $10 \leq Re \leq 70$ , que usualmente se considera como de transición. La regresión obtenida al considerar solamente datos con  $Re \leq 10$  es esencialmente igual a la obtenida al correlacionar todos los datos por lo que, aparentemente, se puede extender el intervalo de la región laminar por lo menos hasta  $Re \leq 70$ . Este resultado contrasta con lo reportado en la literatura por diferentes autores (Skelland, 1983; Ulbrecht y Carreau, 1985; ambos autores citados por Brito-De la Fuente, 1992), aunque Käppel (1979) señaló en su trabajo que el límite superior para la región laminar utilizando fluidos Newtonianos llegaba hasta  $Re = 30$ .

En la Tabla 5.3 se compara el resultado experimental de  $K_p$  con los valores obtenidos a partir de las diferentes correlaciones reportadas en la literatura que se mencionaron en la Tabla 2.5. Los resultados se presentan como un porcentaje de desviación con respecto al promedio experimental obtenido. El desacuerdo existente entre las predicciones y el valor experimental sugieren que, en general, la potencia consumida para fluidos Newtonianos con el impulsor helicoidal IH2 no puede ser predicha satisfactoriamente a partir de correlaciones de la literatura, probablemente debido a que la geometría del impulsor no permite adaptarse a los rangos de validez de la mayoría de las correlaciones mencionadas, y a que la precisión obtenida con las correlaciones no son muy elevadas en virtud de que fueron desarrolladas para propósitos de diseño ingenieril y no para cálculos viscométricos. Por estos motivos, los resultados deberían ser analizados con precaución. En la Tabla 5.3 se aprecia que una de las relaciones geométricas más limitativa para el uso de las correlaciones es el valor de  $w/d$ , por cuanto el valor del ancho de la banda se restringe en la

mayoría de los trabajos al 10% del diámetro del impulsor aproximadamente (ver **Tabla 2.5**). En el caso del impulsor IH2, el valor de  $w/d = 0.18$  fue seleccionado con el propósito de aumentar el torque ejercido por el impulsor y, consecuentemente, aumentar la sensibilidad en las mediciones reológicas.

**Tabla 5.3** Comparación de valores de  $K_p$  calculados para el impulsor helicoidal IH2 para fluidos Newtonianos.

Autor <sup>(*)</sup>	$K_p$ predicho [ - ]	% desviación
Este trabajo.	434.11	0.0
Hall & Godfrey	643.18 <sup>a,b,c</sup>	48.16
Nagata	393.15 <sup>a</sup>	-9.43
Sawinski <i>et al.</i>	791.74 <sup>a</sup>	82.38
Käppel	381.72 <sup>a</sup>	-12.07
Blasinski & Rzyki	428.6	-1.37
Shamlou & Edwards	351.18	-19.10
Chavan & Ulbrecht	576.31 <sup>a</sup>	32.76
Chavan	267.30	-38.42
Takahashi	478.57	10.24
Patterson	315.13 <sup>b,d,e</sup>	-27.41

<sup>a</sup>. Extrapolación para  $w/d$  fuera del rango de validez de la ecuación.

<sup>b</sup>. Extrapolación para  $D/d$  fuera del rango de validez de la ecuación.

<sup>c</sup>. Extrapolación para  $c/d$  fuera del rango de validez de la ecuación.

<sup>d</sup>. Extrapolación para  $s/d$  fuera del rango de validez de la ecuación.

<sup>e</sup>. Extrapolación para  $h/d$  fuera del rango de validez de la ecuación. El valor reportado no corresponde exactamente a la definición de  $K_p$ . Ver **Tabla 2.5**.

<sup>f</sup>. No disponible el rango de las relaciones geométricas.

(\*) Ver referencias en la **Tabla 2.5**.

De acuerdo con Brito-De la Fuente (1992), la potencia consumida es una función muy débil del ancho del listón helicoidal. Esta afirmación se sustenta en el pequeño exponente de la relación  $w/d$  de las diferentes correlaciones (alrededor de 0.2). Como se muestra en la **Tabla 5.4**, al pasar de  $w/d = 0.1$  a  $w/d = 0.18$ , se obtendría un aumento en el valor de  $K_p$  del orden del 12%. Esto permitiría explicar las discrepancias de las correlaciones que no tienen en cuenta este factor, como las de Käppel, Nagata y Patterson, aunque no las correspondientes a las correlaciones de Chavan & Ulbrecht y Sawinsky *et al.*

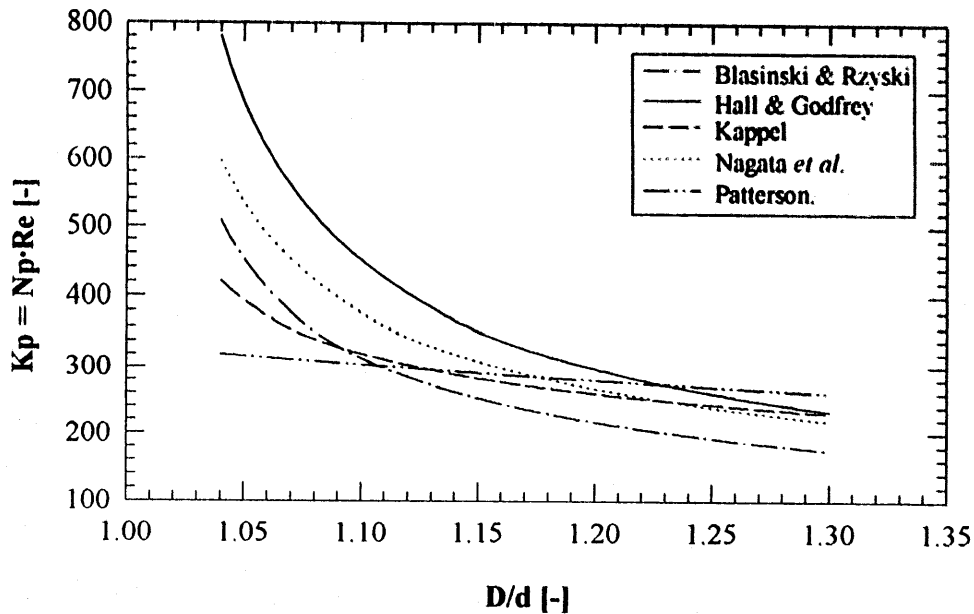
Brito-De la Fuente (1992) reportó un análisis del efecto del claro de pared en el valor de  $K_p$  para impulsores de tipo helicoidal, que se retoma y adapta aquí a las condiciones del impulsor IH2. Como se muestra en la **Figura 5.4**, los comportamientos predichos por las diferentes correlaciones concuerdan en señalar que, a medida que el valor de  $D/d$  tiende a uno, - esto es, a medida que el claro entre el impulsor y la copa se reduce - los valores de  $K_p$  se incrementan de manera importante. Con base en este comportamiento, el valor de  $K_p$

**Tabla 5.4** Exponentes de las relaciones geométricas para diferentes correlaciones de consumo de potencia para impulsores helicoidales de doble listón.

Correlación <sup>(*)</sup>	Relación Geométrica					
	c/d	h/d	w/d (0.08-0.2)	D/d (1.04-1.1)	s/d (0.5-1.0)	NR
Hall & Godfrey	-0.6	1.0	0.5	-9.57 <sup>F.C.</sup>	-0.73	1.0
Nagata	-0.5	-	-	-7.98 <sup>F.C.</sup>	-0.5	0.5
Sawinski <i>et al.</i>	-0.45	1.0	-	0.45	-1.0 <sup>F.C.</sup>	1.0
Käppel	-0.3	-	-	-4.78 <sup>F.C.</sup>	-0.5	0.8
Blasinski & Rzycki	-0.53	1.01	0.14	-8.45 <sup>F.C.</sup>	-0.63	0.79
Shamlou & Edwards	-0.17	1.0	0.17	-	-0.5	0.5
Chavan & Ulbretch	-	1.0	0.26 <sup>F.C.</sup>	F.C.	F.C.	1.0
Chavan	-	1.0	-0.70 <sup>F.C.</sup>	F.C.	1.0	F.C.
Takahashi	F.C.	1.0	0.21 <sup>F.C.</sup>	F.C.	F.C.	F.C.
Patterson	-	1.23	-	-0.91	1.23 <sup>F.C.</sup>	1.0

F.C. : Función compleja de la variable que no puede resolverse como una función exponencial. El exponente reportado se obtuvo a partir de suponer las dimensiones del impulsor IH2 y hacer variar la correlación como función de la variable particular en el rango señalado. Posteriormente se hizo una regresión para determinar el exponencial que mejor ajustara los datos.

(\*) : Ver referencias en la **Tabla 2.5**



**Figura 5.4** Efecto del claro de pared en el consumo de potencia para la región laminar. Predicciones de  $K_p$  para el impulsor IH2. Comparación de correlaciones. (Metodología adaptada de Brito-De la Fuente, 1992)

predicho por la ecuación de Hall & Godfrey tendería a incrementarse y no a disminuir cuando se hiciese la corrección de las relaciones  $D/d$  y  $w/d$  para ajustarse a las relaciones geométricas del impulsor IH2. Consecuentemente, el error se incrementará con respecto al valor obtenido experimentalmente y se concluye que esta correlación no se considera satisfactoria para predecir el comportamiento del impulsor IH2.

La correlación de Blasinski & Rzycki es la que mejor predice el valor de  $K_p$ , con un error del 1.4 %. Esta ecuación, junto con las de Takahashi, y Chavan constituyen el grupo de correlaciones para las cuales la geometría del impulsor IH2 permite hacer una estimación válida (dentro de rangos geométricos válidos) del valor de  $K_p$ . De éstas, la de Chavan predice un valor 38% menor que el obtenido experimentalmente. Por su parte, la ecuación de Takahashi predice valores 10% más altos que el  $K_p$  experimental.

De la anterior discusión se puede concluir que el consumo de potencia para fluidos Newtonianos no puede ser predicho en forma suficientemente precisa para aplicaciones viscométricas a partir de correlaciones de consumo de potencia publicadas en la literatura. Esto quizás pueda deberse a que la mayoría de reportes existentes tienen que ver con problemas de mezclado en ingeniería, en los que una precisión de  $\pm 10\%$  es suficientemente buena para efectos de diseño, pero no son suficientemente precisas para realizar mediciones reológicas, por lo menos, con el dispositivo IH2 ensayado.

### 5.1.2 Fluidos no-Newtonianos (pseudoplásticos)

Los fluidos pseudoplásticos conforman, sobradamente, la clase más común de fluidos no-Newtonianos. Como se mencionó en el capítulo 2, la mayoría de caldos de fermentación miceliares y muchos de los que incluyen exopolisacáridos en su composición, presentan un comportamiento de adelgazamiento al corte. Por este motivo, el desarrollo de la caracterización del impulsor IH2 se desarrolló básicamente con este tipo de fluidos.

El análisis de consumo de potencia en fluidos pseudoplásticos se complica por la necesidad de definir el número de Reynolds de manera conveniente. Para ello es necesario establecer el valor de la viscosidad. Esta tarea no es fácil en virtud de la gama de gradientes de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) generados cuando un impulsor gira dentro de un fluido con características pseudoplásticas. De las diferentes aproximaciones empíricas o teóricas para estimar valores del gradiente de deformación, se seleccionó el concepto de gradiente de deformación promedio ( $\dot{\gamma}_{av}$ ), el cual es el más ampliamente utilizado (ecuación 2.13). Con ello es posible estimar la viscosidad previa caracterización del impulsor con fluidos de características reológicas conocidas. Consecuentemente, en la siguiente sección se describirá el comportamiento reológico de los fluidos utilizados para la calibración; posteriormente se presentarán los resultados de la estimación de gradientes de deformación en dichos fluidos con el impulsor IH2.

### 5.1.2.1 Caracterización reológica de los fluidos no-Newtonianos

En las **Figuras 5.5** y **5.6** se presentan los resultados de los ensayos de viscosidad como función del gradiente de deformación para los fluidos no-Newtonianos utilizados en este estudio (ver **Tabla 4.2** para la descripción de los fluidos).

Todos los fluidos presentaron características pseudoplásticas marcadas (adelgazamiento al corte) en el intervalo de gradientes de deformación ensayado. El grado del adelgazamiento al corte dependió tanto de la naturaleza como de la concentración del polímero. Se observó un comportamiento muy diferente entre las soluciones de goma xantana y las de CMC. Para las soluciones de goma xantana se apreció un comportamiento adelgazante al corte durante todo el intervalo de gradientes de deformación ensayados. En el caso de las soluciones de CMC se observó una zona de "meseta" o estabilización de la viscosidad a bajos gradientes de deformación, pasando suavemente a una zona de adelgazamiento al corte a mayores gradientes. En ambos casos la extensión del adelgazamiento (pseudoplasticidad) aumentó con la concentración del polímero. También se observó un efecto de reducción de la viscosidad con la temperatura a las dos concentraciones ensayadas de CMC.

Para el caso de soluciones concentradas de goma xantana se observó la existencia del efecto Weissemberg, lo que denota la existencia de esfuerzos normales, aunque éstos no fueron marcados. Adicionalmente, durante el desarrollo de mediciones con el dispositivo *vane* en algunas soluciones concentradas de goma xantana y CMC, se observó que al detener la rotación del motor, el momento de torsión no regresaba a lectura cero, sino que el dispositivo de medición de torque detectó una lectura residual aún después de 1 hora de mantener inmóvil el motor. Igualmente se observó la inmovilización de pequeñas burbujas de aire en el seno de dichas soluciones por lapsos prolongados. Los fenómenos anteriores permiten sospechar la existencia de punto de cedencia aparente en tales soluciones. Aunque diferentes métodos han sido propuestos para evaluar el punto de cedencia aparente en suspensiones concentradas (Bongenaar *et al.*, 1973; Dzuy and Boger, 1983; Leong-Poi and Allen, 1992; Velasco, 1994), en el presente trabajo no fue posible su determinación con el impulsor IH2 por limitaciones técnicas con el equipo de medición.

El comportamiento reológico de soluciones de polímeros (así como de caldos de fermentación miceliar) ha sido descrito por modelos relativamente simples (ver sección 2.2.2). Estos modelos responden a la necesidad de calcular el gradiente de deformación promedio y el número de Reynolds en el sistema de medición. Los parámetros de diferentes modelos para cada uno de los fluidos se presentan en las **Tablas 5.5** a **5.9**. Se utilizó un programa de computadora (SIGMA PLOT, v. 1.02 for Windows. Jandel Scientific) para ajustar los parámetros por el método de mínimos cuadrados. Como es aparente a partir de las **Figuras 5.7** y **5.8**, el modelo de la ley de la potencia ajusta bastante bien los datos experimentales de viscosidad de goma Xantana para todas las concentraciones ensayadas, aunque en todos los casos es posible observar indicios de la forma sigmoideal típica de la **Figura 2.2**. Modelos más complejos lograron un ajuste mejor a los datos experimentales, aunque la bondad del ajuste de los diferentes modelos dependió del fluido particular. Por ejemplo, en el caso del fluido GX-1 los modelos de Carreau, Carreau-Yasuda, Cross-Williamson ajustaron prácticamente igual de bien los datos y superaron al modelo de la ley



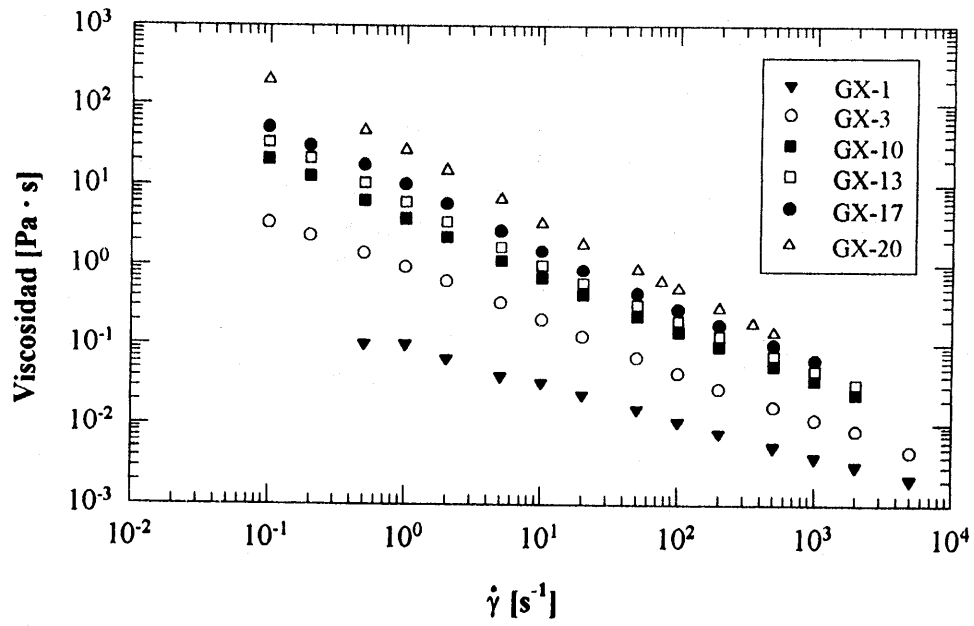


Figura 5.5 Comportamiento reológico de soluciones de goma xantana. T = 25°C.

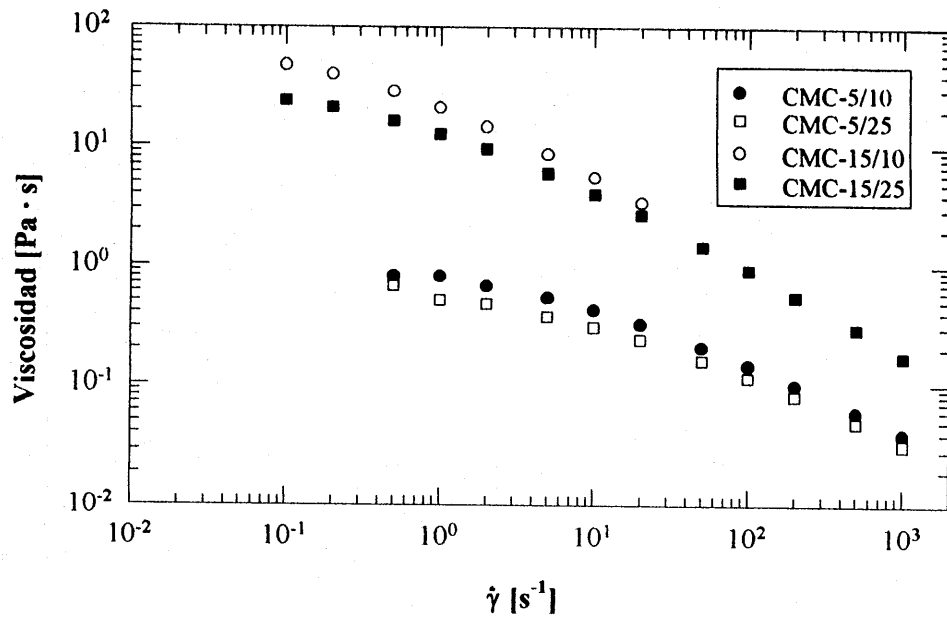


Figura 5.6 Comportamiento reológico de soluciones de CMC.

de la potencia. Contrariamente, la bondad del ajuste de los modelos de Carreau y Cross-williamson, en el caso del fluido GX-17, no fue tan buena como el modelo de la ley de la potencia.

El ajuste de los datos de CMC al modelo de la ley de la potencia (**Figuras 5.9 y 5.10**) es menos satisfactorio que en el caso de la goma xantana, puesto que la estabilización gradual del valor de la viscosidad a bajos gradientes de deformación es mucho más marcada que en el caso de goma xantana a una concentración similar. Modelos más complejos como el de Carreau o el de Cross-Williamson, que predicen la forma sigmoïdal de las curvas, lograron un ajuste más satisfactorio, aunque el de Carreau predice un cambio más moderado entre las regiones constante y exponencial de las curvas, así como viscosidades mayores a las reales a gradientes de deformación altos.

En forma paralela se decidió ajustar todos los datos mediante una regresión polinómica de tercer orden, como se muestra en el panel **b** de las **Figuras 5.7 a 5.10**. Este procedimiento, que dio excelentes coeficientes de correlación, se desarrolló con el fin de obtener una mejor aproximación a los valores de  $K_s$  utilizando el método de Metzner y Otto, como se explicará posteriormente.

**Tabla 5.5** Parámetros del modelo de la ley de la potencia.

Fluido	$K [Pa \cdot s^n]$	$n [-]$	Intervalo [ $s^{-1}$ ]	$r^2$
GX-1	0.08764	0.556	$10 \leq \dot{\gamma} \leq 5000$	0.9971
GX-3	0.8665	0.373	$10 \leq \dot{\gamma} \leq 5000$	0.9986
GX-10	3.7687	0.311	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 2000$	0.9980
GX-13	5.8825	0.285	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 2000$	0.9975
GX-17	9.2468	0.255	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 1000$	0.9979
GX-20	26.221	0.143	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 500$	0.9994
CMC-5/10	0.8828	0.588	$0.5 \leq \dot{\gamma} \leq 1000$	0.9657
CMC-5/25	0.6208	0.6113	$0.5 \leq \dot{\gamma} \leq 1000$	0.9728
CMC-15/10	18.3848	0.5	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 20$	0.9813
CMC-15/25	11.4008	0.453	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 1000$	0.9729

En las siguientes líneas se intentará una comparación de los parámetros de la ley de la potencia de los fluidos utilizados con valores reportados en la literatura. Las **Figuras 5.11 y 5.12** comparan los índices de consistencia ( $K$ ) y de flujo ( $n$ ) de las soluciones de goma xantana, respectivamente. El comportamiento de los datos de  $K$  obtenidos para goma Xantana es consistente con el encontrado por otros autores, para soluciones de diferentes tipos de goma comercial. Se observa una marcada influencia de la concentración del polisacárido en el índice de consistencia. Los datos a bajas concentraciones ( $< 4 \text{ kg/m}^3$ ) son muy similares para todas las preparaciones. Sin embargo, para altas concentraciones (entre  $4$  y  $20 \text{ kg/m}^3$ ) los valores de  $K$  obtenidos con soluciones de Rhodopol (Dussap *et al.*, 1985,

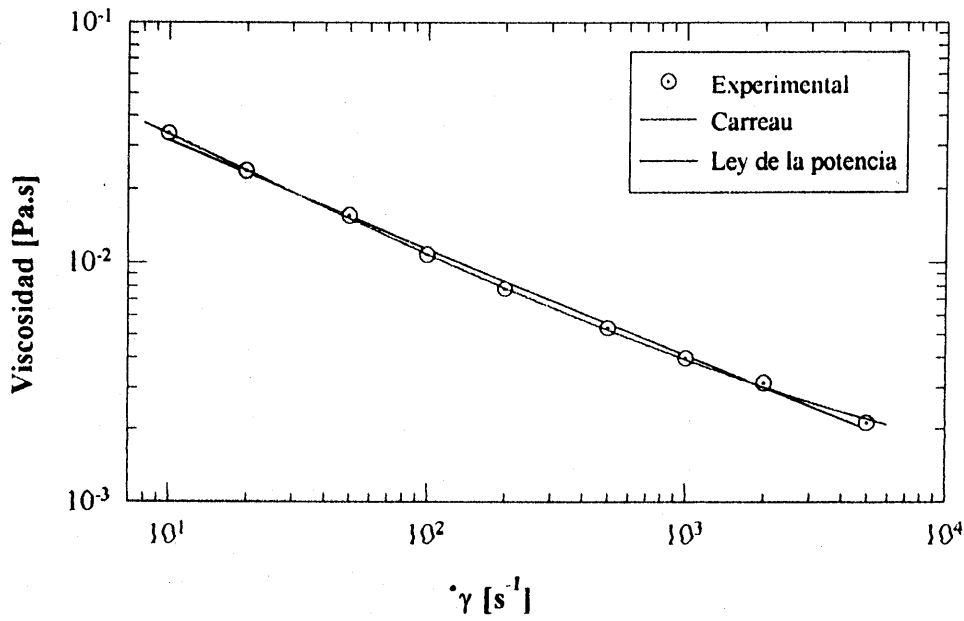


Figura 5.7.a Reograma del fluido GX-1. T = 25°C. Dispositivo MS-0/115. Ajuste a los modelos de la ley de la potencia y Carreau

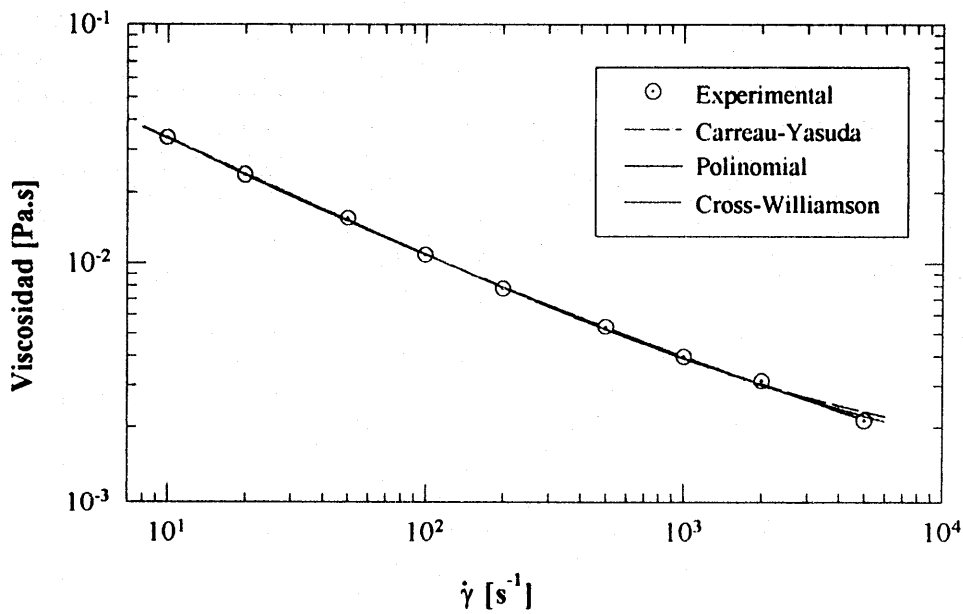
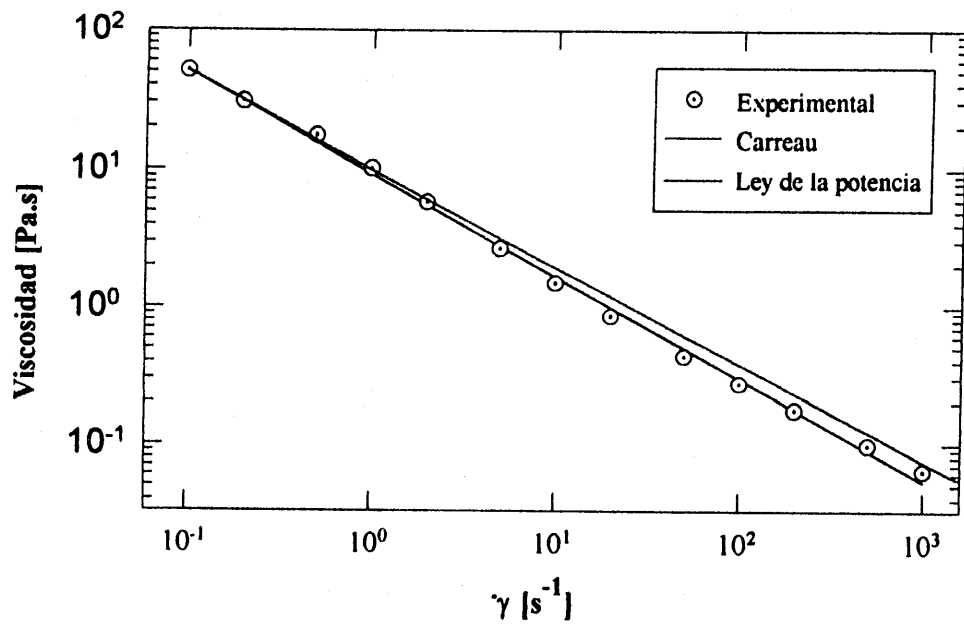
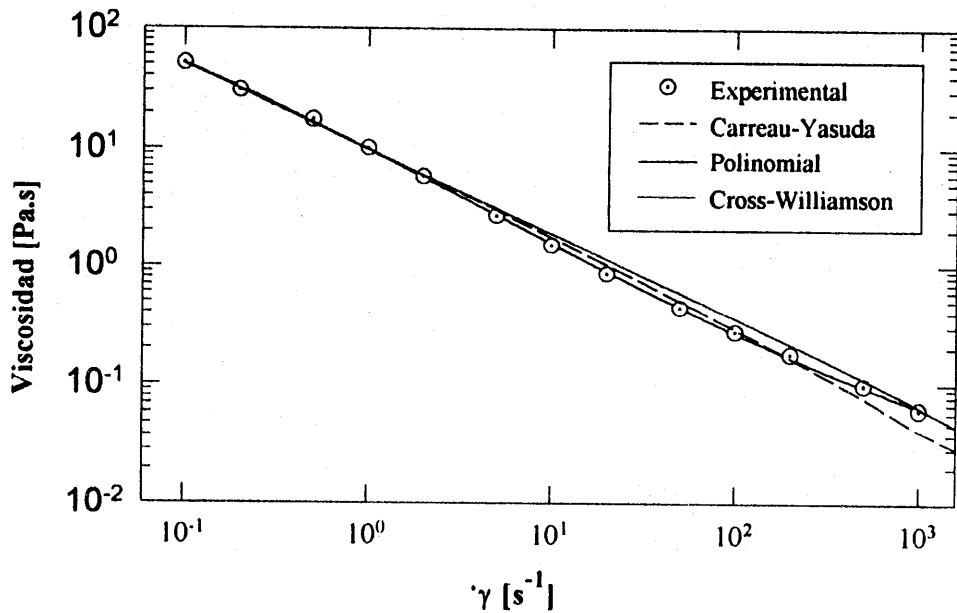


Figura 5.7.b Reograma del fluido GX-1. T = 25°C. Dispositivo MS-0/115. Ajuste a los modelos de Carreau-Yasuda, Cross-Williamson y polinomial de tercer orden.

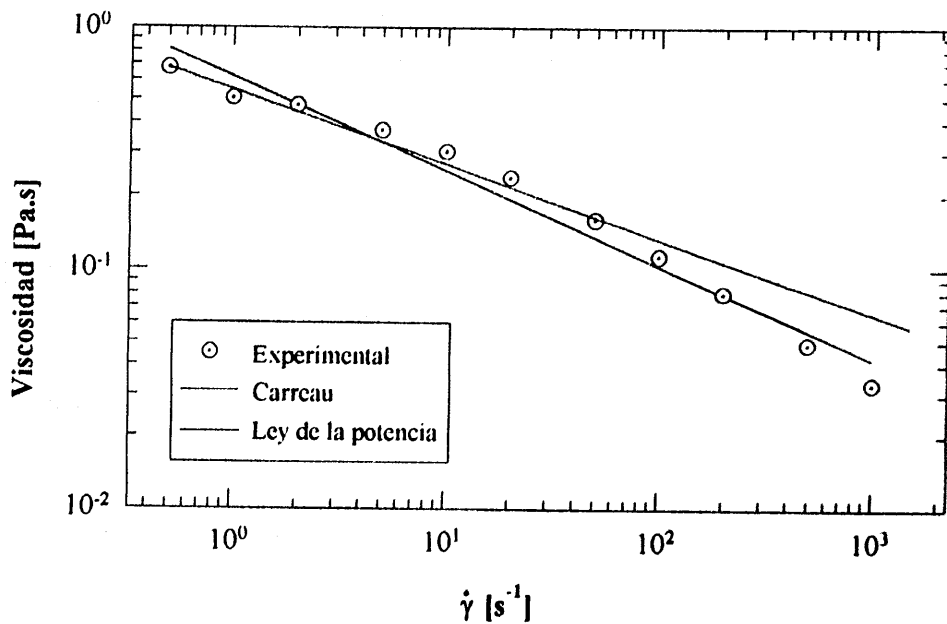
ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



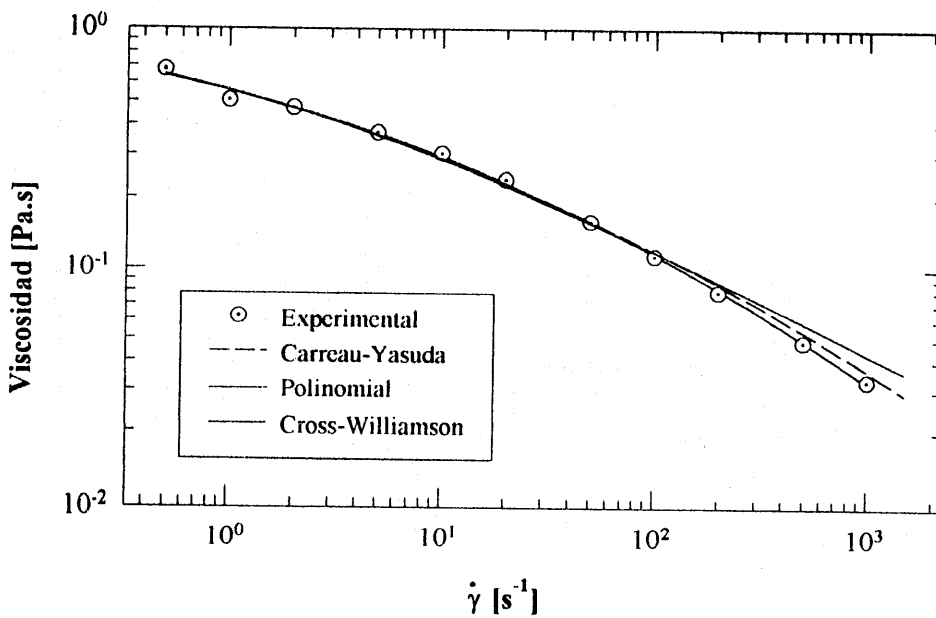
**Figura 5.8.a** Reograma del fluido GX-17. T = 25°C. Dispositivo MS-0/115. Ajuste a los modelos de la ley de la potencia y Carreau



**Figura 5.8.b** Reograma del fluido GX-17. T=25°C. Dispositivo MS-0/115. Ajuste a los modelos de Carreau-Yasuda, Cross-Williamson y polinomial de tercer orden.



**Figura 5.9.a** Reograma del fluido CMC-5. T = 25°C. Dispositivo MS-0/115.  
Ajuste a los modelos de la ley de la potencia y Carreau



**Figura 5.9.b** Reograma del fluido CMC-5. T = 25°C. Dispositivo MS-0/115.  
Ajuste a los modelos de Carreau-Yasuda, Cross-Williamson  
y polinomial de tercer orden.

Resultados y discusión

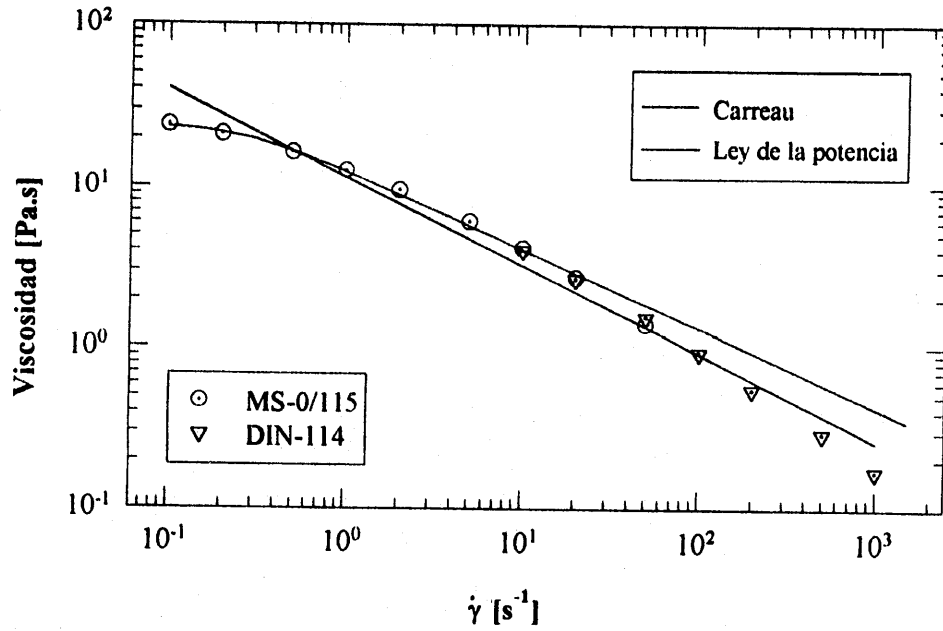


Figura 5.10.a Reograma del fluido CMC-15. T = 25°C. Dispositivos MS-0/115 y DIN-114. Ajuste a los modelos de la ley de la potencia y Carreau.

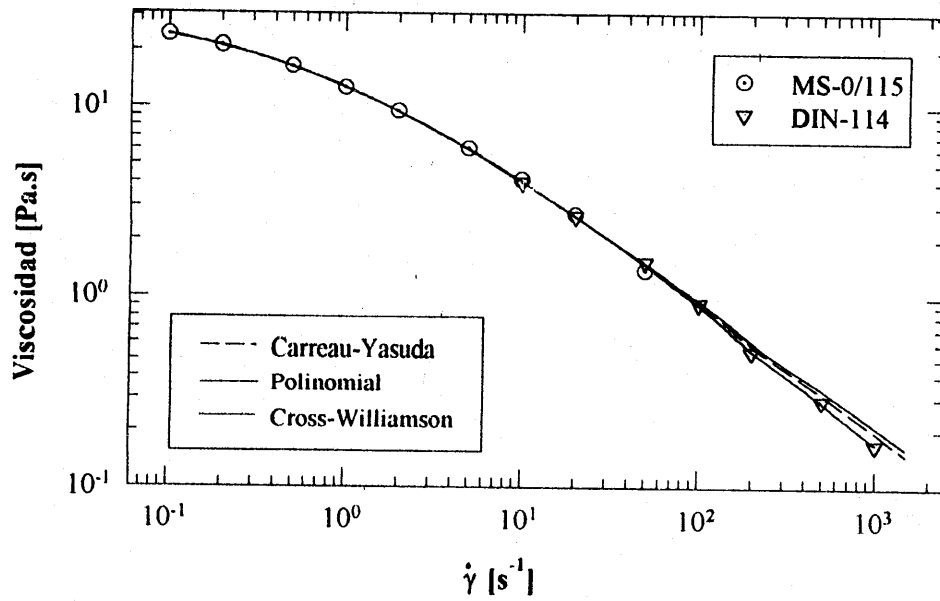


Figura 5.10.b Reograma del fluido CMC-15. T = 25°C. Dispositivos MS-0/115 y DIN-114. Ajuste a los modelos de Carreau-Yasuda, Cross-Williamson y polinomial de tercer orden.

Tabla 5.6 Parámetros del modelo de Cross-Williamson.

Fluido	$\eta_0$	$\eta_\infty$	$\lambda$	a
GX-1	1.520	$9.558 \cdot 10^{-4}$	146.718	0.524
GX-3	11.973	$3.650 \cdot 10^{-11}$	40.988	0.665
GX-10	117.973	$5.040 \cdot 10^{-2}$	68.611	0.808
GX-13	110.288	$7.441 \cdot 10^{-2}$	26.649	0.867
GX-17	$1.168 \cdot 10^{-3}$	$1.947 \cdot 10^{-9}$	724.731	0.722
GX-20	30043.5	0.195	2710.68	0.893
CMC-5/10	0.951	$1.881 \cdot 10^{-2}$	0.139	0.722
CMC-5/25	1.070	$63887 \cdot 10^{-10}$	0.834	0.4697
CMC-15/10	70.400	$3.173 \cdot 10^{-10}$	3.367	0.6972
CMC-15/25	31.552	$8.274 \cdot 10^{-10}$	1.773	0.666

Tabla 5.7 Parámetros del modelo de Carreau.

Fluido	$\eta_0$	$\eta_\infty$	$\lambda$	n
GX-1	0.766	$8.935 \cdot 10^{-4}$	45.405	0.485
GX-3	4.889	$1.348 \cdot 10^{-10}$	15.513	0.392
GX-10	39.329	$3.712 \cdot 10^{-2}$	20.840	0.226
GX-13	53.121	$3.044 \cdot 10^{-2}$	15.108	0.201
GX-17	479.7	$2.262 \cdot 10^{-9}$	240.20	0.294
GX-20	8232.66	$1.827 \cdot 10^{-1}$	649.732	0.110
CMC-5/10	5.962	$2.747 \cdot 10^{-9}$	1123.89	0.705
CMC-5/25	5.0321	$1.089 \cdot 10^{-9}$	1367.79	0.693
CMC-15/10	51.068	$3.667 \cdot 10^{-8}$	5.688	0.476
CMC-15/25	24.284	$8.228 \cdot 10^{-9}$	3.8074	0.511

Tabla 5.8 Parámetros del modelo de Carreau-Yasuda.

Fluido	$\eta_0$	$\eta_\infty$	$\lambda$	a	n
GX-1	43.972	$1.340 \cdot 10^{-3}$	53.971	0.117	0.250
GX-3	113.21	$5.409 \cdot 10^{-3}$	9.771	0.197	$2.99 \cdot 10^{-10}$
GX-10	1109.59	$6.301 \cdot 10^{-2}$	329.498	0.318	0.092
GX-13	55.780	$3.403 \cdot 10^{-2}$	15.831	1.847	0.197
GX-17	84171	$6.056 \cdot 10^{-10}$	13721	0.179	0.136
GX-20	936.62	$1.825 \cdot 10^{-1}$	56.564	40.862	0.110
CMC-5/10	0.885	$3.116 \cdot 10^{-10}$	0.324	1.045	0.481
CMC-5/25	1.909	$4.680 \cdot 10^{-10}$	$3.756 \cdot 10^{-3}$	0.214	$5.334 \cdot 10^{-9}$
CMC-15/10	68.947	$1.119 \cdot 10^{-8}$	3.584	0.728	0.317
CMC-15/25	32.51	$9.997 \cdot 10^{-10}$	1.522	0.620	0.306

**Tabla 5.9** Parámetros del modelo polinomial.

Fluido	b(0)	b(1)	b(2)	b(3)	r <sup>2</sup>
GX-1	-0.9080	-0.5982	0.03740	-1.149 · 10 <sup>-3</sup>	0.9996
GX-3	-0.0311	-0.6206	-0.0451	0.0125	0.9998
GX-10	0.5748	-0.7444	8.9064 · 10 <sup>-3</sup>	4.749 · 10 <sup>-3</sup>	0.9999
GX-13	0.7754	-0.7728	-1.9085 · 10 <sup>-3</sup>	8.6007 · 10 <sup>-3</sup>	0.9991
GX-17	0.9933	-0.7759	-0.0444	2.0687 · 10 <sup>-2</sup>	0.9997
GX-20	1.4258	-0.8867	-7.0995 · 10 <sup>-3</sup>	8.4285 · 10 <sup>-3</sup>	0.9999
CMC-5/10	-0.1082	-0.1244	-0.1586	0.0188	0.9998
CMC-5/25	-0.2552	-0.2118	-0.0604	-1.9633 · 10 <sup>-3</sup>	0.9984
CMC-15/10	1.3247	-0.4786	-0.1102	0.0114	0.9999
CMC-15/25	1.1066	-0.3959	-0.1120	0.0121	0.9998

citado por Tecante, 1991) y Rhodigel (Reuss *et al.*, 1982) son bastante mayores que los obtenidos experimentalmente con Keltrol-T grado alimenticio en este estudio. Analizando solo los datos obtenidos con Keltrol, es posible observar que el comportamiento experimental se aproxima bastante al reportado por Sánchez (1991) en el intervalo de altas concentraciones señalado. Los valores reportados por Tecante (1991) y Brito-De la Fuente (1992) son significativamente mayores que los de Sánchez (1991) para concentraciones menores que 5 kg/m<sup>3</sup>. A 30 kg/m<sup>3</sup>, los datos de Brito-De la Fuente (1992) muestran un menor valor de K que el reportado por Sánchez aunque aún son del mismo orden de magnitud.

La influencia de la concentración del polímero en el índice de flujo es muy marcada a bajas concentraciones de aquel. Como se aprecia en la **Figura 5.12**, hay una caída drástica en el índice de flujo a concentraciones hasta de 3 kg/m<sup>3</sup>, con una disminución mucho más gradual a valores mayores de concentración del polisacárido. Contrariamente, a bajas concentraciones de goma xantana el índice de flujo siguió un comportamiento muy similar al reportado por Tecante (1991) y Brito-De la Fuente (1992), y completamente diferente al reportado por Sánchez (1991). Esencialmente, el valor del índice de flujo para concentraciones mayores que 20 kg/m<sup>3</sup> es el mismo para todos los reportes y corresponde aproximadamente a 0.2.

La diferencia en comportamientos reológicos para la goma Xantana puede ser explicada en virtud de la diferencia de pesos moleculares de los diferentes productos comerciales. En el caso del Keltrol-T, esta explicación podría no ser satisfactoria si se tiene en cuenta que el producto debe cumplir con cierto tipo de especificaciones que probablemente hayan permanecido uniformes en los diferentes reportes. Sánchez (1991) menciona una marcada variación de las propiedades reológicas en la goma Xantana como función de la fuerza iónica: un aumento en la fuerza iónica incrementa considerablemente K, mientras n tiende a disminuir. La fuerza iónica (medida en un conductímetro) fue ajustada en 5.4 mMHos, valor que equivale al de una solución de 2.7 kg/m<sup>3</sup> de NaCl en agua destilada. Esta concentración es más del doble de la agregada en el presente trabajo (1 kg/m<sup>3</sup>), y por Tecante (1991) y Brito-De la Fuente (1992). En consecuencia, se esperaría que los valores



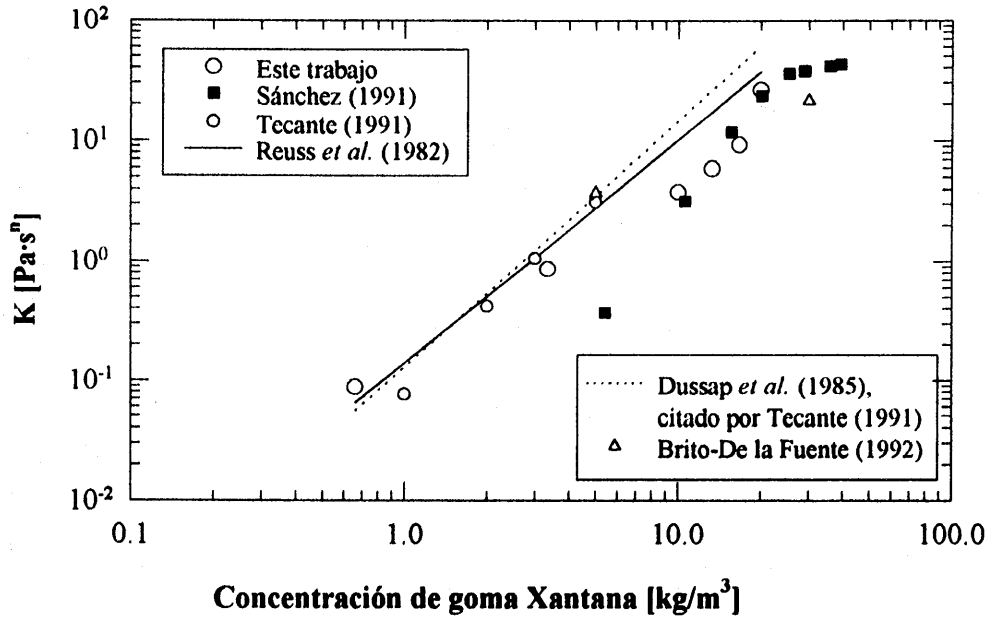


Figura 5.11 Variación del índice de consistencia (K) de la ley de la potencia como función de la concentración para goma Xantana.

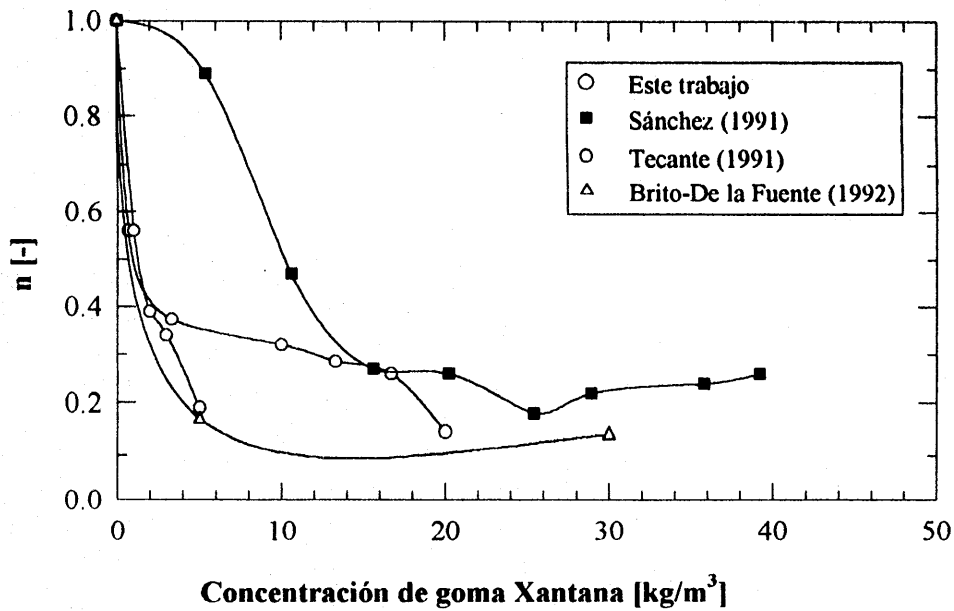


Figura 5.12 Variación del índice de flujo (n) de la ley de la potencia como función de la concentración para goma Xantana.

de K reportados por estos últimos autores fuesen menores y los valores de n fuesen mayores que los encontrados por Sánchez a la misma concentración del polímero, encontrándose exactamente lo contrario. En cuanto a la temperatura, todos los reportes mencionan ensayos a 25° C. El trabajo experimental de calibración del IH2 también se llevó a cabo a 25°C. Brito-De la Fuente (1992) reportó una dependencia lineal de K y n con la temperatura para una solución de goma xantana de 5 kg/m<sup>3</sup> dada por:

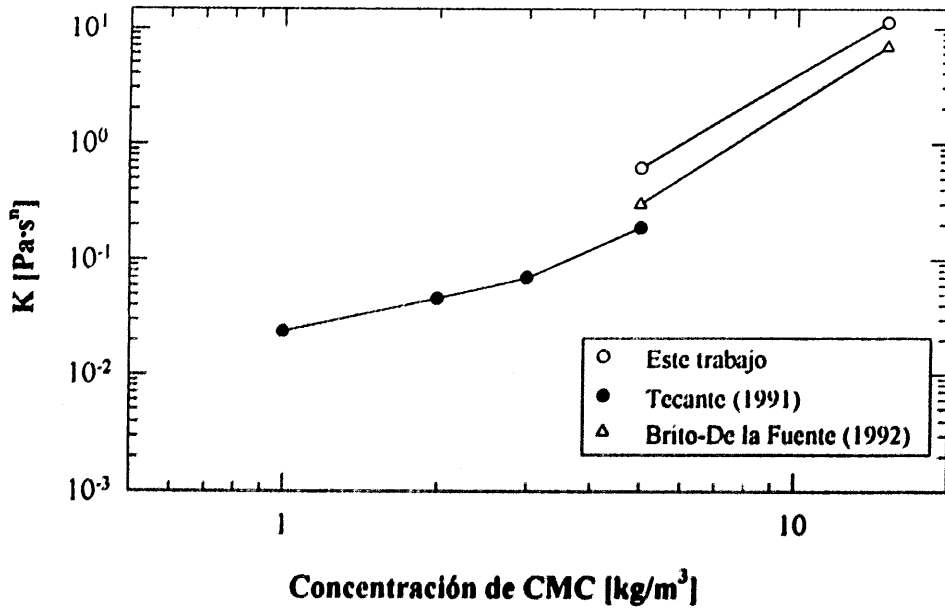
$$n [-] = 0.0916 + 3.0 \cdot 10^{-3} \cdot \theta$$

$$K [\text{Pa} \cdot \text{s}^n] = 5.0817 - 5.42 \cdot 10^{-2} \cdot \theta$$

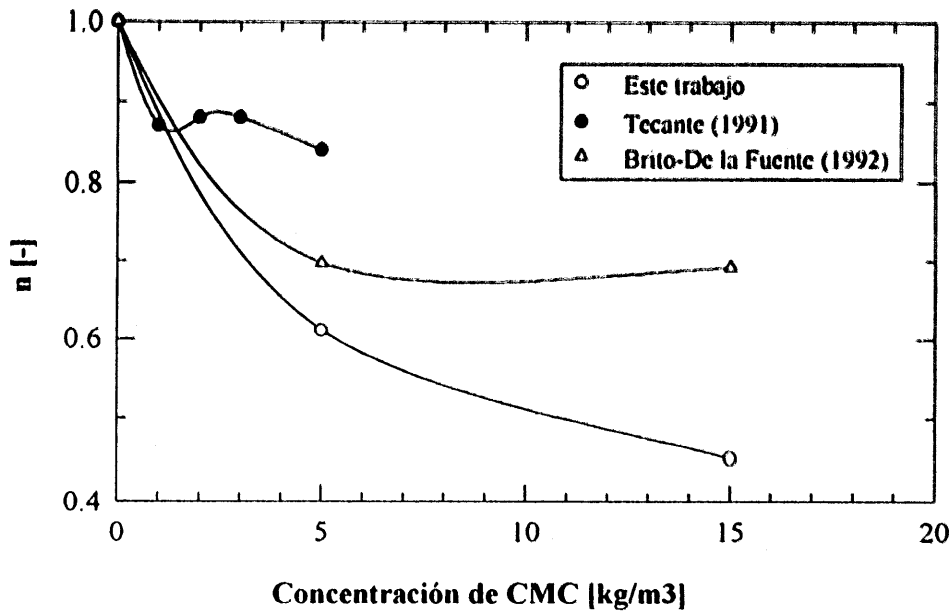
para  $20 \leq \theta [^{\circ}\text{C}] \leq 26$  y  $1 \leq \dot{\gamma} [\text{s}^{-1}] \leq 100$ . De acuerdo con estos resultados, la influencia de un cambio pequeño de temperatura (p.ej. 1° C) es despreciable. Dado que la variación en los valores obtenidos entre diferentes trabajos no puede ser explicada, es probable que se deba a una diferencia efectiva en el peso molecular de el polímero, o a factores específicos no mencionadas en los reportes respectivos. Pese a ello, la reproducibilidad de los datos durante la realización de este trabajo fue excelente, por lo que su uso como fluidos de calibración se consideró adecuado.

Las Figuras 5.13 y 5.14 muestran los datos correspondientes a CMC. A pesar de que el ajuste de los datos reológicos al modelo de la ley de la potencia no fue el mejor, se utilizó este modelo para comparar los resultados obtenidos con otros reportes. Las propiedades reológicas de este polisacárido fueron similares a las desarrolladas con las soluciones de goma xantana. Los datos muestran la misma tendencia de incremento exponencial en el valor de K con un aumento de la concentración del polímero, aunque los valores de K encontrados para CMC son menores que para goma xantana a la misma concentración del polímero. Los datos de K de Brito-De la Fuente (1992) y Tecante (1991) son consistentes entre sí y el comportamiento es muy similar al encontrado en este trabajo. Pese a que los valores experimentales son algo mayores, son del mismo orden de magnitud que los reportados por Brito-De la Fuente.

En cuanto al índice de flujo, la tendencia es muy similar, con una disminución pronunciada de n a bajas concentraciones de CMC, alcanzándose un valor estable a concentraciones mayores del polímero. El valor final de n y la concentración a la que éste se alcanza son diferentes en todos los casos. Tecante (1991) llega a un valor final de  $n = 0.9$  a concentraciones tan bajas como 1 kg/m<sup>3</sup> mientras que Brito-De la Fuente alcanza  $n = 0.7$  a 5 kg/m<sup>3</sup>. En este trabajo, se estimó un valor final de  $n = 0.4$  para concentraciones mayores que 15 kg/m<sup>3</sup>. Como explica Tecante, estos resultados no deberían ser sorprendentes si se considera la gran variedad de preparaciones comerciales de CMC que puede ofrecer incluso una sola compañía. Con esta gran variedad de sustancias de diferentes grados de metilación, peso molecular y polidispersidad, no es de esperarse que tengan las mismas propiedades reológicas, lo cual no constituye impedimento para usar estas soluciones como fluido de calibración debido a la gran reproducibilidad en las propiedades obtenida para cada solución preparada durante el desarrollo de este trabajo.



**Figura 5.13** Variación del índice de consistencia (K) de la ley de la potencia como función de la concentración para CMC a 25 °C.



**Figura 5.14** Variación del índice de flujo (n) de la ley de la potencia como función de la concentración para CMC a 25°C.

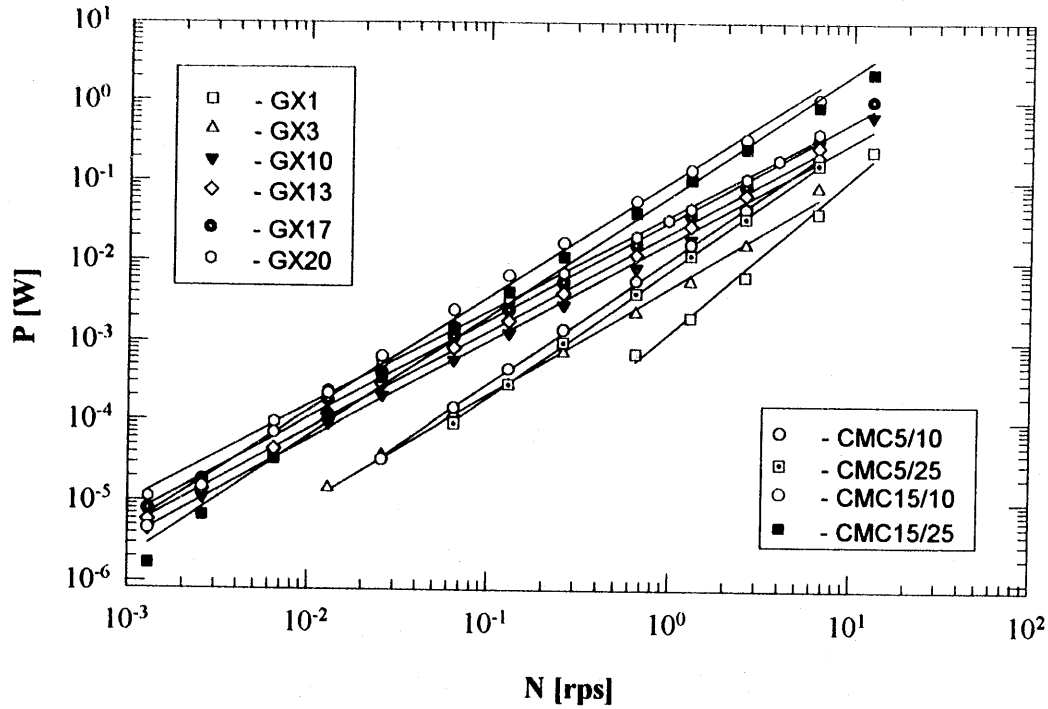
### 5.1.2.2 Caracterización del impulsor IH2 con los fluidos no-Newtonianos

La caracterización del impulsor IH2 para fluidos pseudoplásticos se circunscribe a la determinación de  $K_s$  como función de las propiedades del fluido. El valor de  $K_s$  es importante puesto que es necesario para determinar el valor de  $\dot{\gamma}_{av}$  con el cual se calcularán posteriormente las propiedades reológicas de las sustancias en las que se está interesado (caldos de fermentación de *Trichoderma*). El efecto del adelgazamiento en la constante  $K_s$  se determinó por 2 vías diferentes, ya discutidas en el capítulo 2: el método de Metzner y Otto (1957), y el propuesto por Rieger y Novak (1973). Los resultados de ambos análisis se comparan posteriormente, junto con los valores calculados a partir de correlaciones de la literatura. Finalmente, se comparan los resultados obtenidos experimentalmente con los reportados para otros trabajos en los que se utilizaron dispositivos helicoidales para la evaluación de la reología de caldos de fermentación.

Para seleccionar los datos a tener en cuenta en la determinación de  $K_s$ , se siguió un procedimiento equivalente al desarrollado con los datos de fluidos Newtonianos: en la **Figura 5.15** se graficó en coordenadas logarítmicas el consumo de potencia ( $P$ ) como función de la velocidad de agitación ( $N$ ). La curva para cada fluido se ajustó al modelo  $P = b(0) \cdot N^{b(1)}$ , en donde teóricamente  $b(1) = 2$  para fluidos Newtonianos en la región de flujo laminar, de acuerdo con la **ecuación 2.7**. Para fluidos no-Newtonianos, la viscosidad aparente,  $\eta_a$ , varía con la velocidad de rotación del impulsor  $N$ , por lo que el exponente será menor que 2. Para fluidos que siguen la ley de la potencia, en la región laminar de flujo, se puede demostrar que tal exponente se encuentra entre 1 y 2. Los resultados de la regresión se presentan en la **Tabla 5.10**. De dicha tabla se aprecia que todos los fluidos, incluyendo GX-1, exhiben valores del exponente  $b(1) \leq 2$ , lo que indica que el flujo está en la región laminar. Sin embargo, los datos para GX-1 se encuentran cerca del límite de confiable, por lo que el valor de  $K_s$  obtenido con este fluido deberá ser tomado con precaución.

**Tabla 5.10** Coeficientes de la regresión  $P = b(0) \cdot N^{b(1)}$  para los fluidos pseudoplásticos utilizados en este estudio (ver **Figura 5.15**).

Fluido	b(0)	b(1)	r <sup>2</sup>
GX-1	$1.3608 \cdot 10^{-3}$	1.9313	0.9901
GX-3	$4.9682 \cdot 10^{-3}$	1.3573	0.9973
GX-10	$1.8226 \cdot 10^{-2}$	1.2444	0.9976
GX-13	$2.3752 \cdot 10^{-2}$	1.2393	0.9993
GX-17	$3.3181 \cdot 10^{-2}$	1.2405	0.9986
GX-20	$3.8699 \cdot 10^{-2}$	1.1969	0.9991
CMC-5/10	$1.1197 \cdot 10^{-2}$	1.5730	0.9997
CMC-5/25	$8.1960 \cdot 10^{-3}$	1.6163	0.9997
CMC-15/10	0.10335	1.4477	0.9967
CMC-15/25	$6.9183 \cdot 10^{-3}$	1.5136	0.9960



**Figura 5.15** Potencia consumida por los diferentes fluidos no-Newtonianos como función de la velocidad de agitación. Resultados para el impulsor IH2

#### 5.1.2.2.1 El método de Metzner y Otto

Metzner y Otto (1957) propusieron el concepto de gradiente de deformación promedio ( $\dot{\gamma}_{av}$ ). Según los autores el gradiente de deformación para un impulsor en flujo laminar es directamente proporcional a su velocidad de rotación, siendo la constante de proporcionalidad  $K_s$  función únicamente de la geometría del sistema, y debe ser determinada experimentalmente desarrollando por duplicado estudios de consumo de potencia en el mismo sistema geométrico con fluidos Newtonianos y con los no-Newtonianos. El procedimiento para calcular la función  $K_s$  a partir de mediciones de torque ( $M$ ) como función de la velocidad de agitación ( $N$ ) para cualquier impulsor, se aplicará al impulsor IH2 y por ello se describe a continuación.

Como se explicó en la sección 2.3.1, el valor de la viscosidad aparente para un fluido no-Newtoniano puede ser obtenido con un impulsor cualquiera, previa calibración con un fluido Newtoniano, mediante la **ecuación 2.9**:

$$\eta_{ap} = \frac{2\pi M}{K_p N d^3}$$

que en el caso del impulsor helicoidal H12 se reduce a

$$\eta_{ap} = 139.4076 \left( \frac{M}{N} \right) \quad \text{Ec. (5.3)}$$

Por tanto, es posible obtener  $\eta_{ap}$  como función de la velocidad de agitación a partir de los datos de torque y velocidad de agitación, tal y como son entregados por el reómetro. El problema se reduce ahora a calcular  $\dot{\gamma}_{av}$ . Dado que el concepto  $\dot{\gamma}_{av}$  no involucra ningún modelo reológico *per se*, cualquier modelo que ajuste los datos puede ser utilizado para calcular  $\eta_{ap}$ . Se consideró que entre mejor fuese el ajuste de  $\eta_{ap}$  al valor real, mejor sería estimado Ks. Como el modelo que mejor ajustó los datos de todos los fluidos fue el ajuste polinomial desarrollado en la sección 5.1.2.1 ( $\eta_{ap} = f(\dot{\gamma}_{av}) = b(0) + b(1)\dot{\gamma}_{av} + b(2)\dot{\gamma}_{av}^2 + b(3)\dot{\gamma}_{av}^3$ ), se decidió su uso para obtener valores más confiables de Ks. Para cada valor de  $\dot{\gamma}_{av}$  existe un único valor de  $\eta_{ap}$ ; consecuentemente, cada valor de  $\eta_{ap}$  debe corresponder a un valor de  $\dot{\gamma}_{av}$ . Es posible obtener  $\dot{\gamma}_{av} = f^{-1}(\eta_{ap})$  también como función de  $N^{\dagger}$ . Para derivar dicha función ( $\dot{\gamma}_{av} = f^{-1}(\eta_{ap})$ ) fue necesario resolver cada polinomio de tercer orden. La solución de una ecuación cúbica sigue una regla descubierta por Gerolamo Cardano en el siglo XVI y que puede ser encontrada en cualquier texto de álgebra. Sin embargo, el procedimiento se reproduce aquí para efectos de claridad:

- 1-. Calcular  $\eta_{ap}$  para cada valor de N de cada fluido mediante la **ecuación 5.3**.
- b-. calcular las constantes p y q según las siguientes ecuaciones (regla de Cardano):

$$\begin{aligned} a &= b(3) \\ b &= b(2) \\ c &= b(1) \\ d &= b(0) - \eta_{ap} \\ p &= \frac{c}{a} - \frac{b^2}{a^2} \\ q &= \frac{2b^3}{27a^3} - \frac{cb}{3a^2} + \frac{d}{a} \end{aligned}$$

los valores de b(0), b(1), b(2) y b(3) se obtienen para cada fluido de la **Tabla 5.9**

- c-. con estas constantes, calcular las raíces de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

<sup>†</sup> No debe asumirse que esta función inversa tenga un significado físico en el sentido de que el gradiente de deformación generado por el instrumento sea función de la viscosidad del fluido (esto es, que si a la misma velocidad de agitación se ensaya un fluido más viscoso, el dispositivo generará como *resultado* un gradiente de deformación menor, recuérdese que en un reómetro el gradiente de deformación generado por el instrumento es función de N y de la geometría, y es independiente del fluido), sino que el valor de la viscosidad detectada en una cierta medición debe corresponder a un gradiente de deformación promedio generado por el instrumento igual al que debió generarse en un dispositivo reométrico para medir la misma viscosidad

$$\theta = \frac{1}{3} \cos^{-1} \left( \frac{q}{2 \left( \frac{-p}{3} \right)^3} \right)$$

$$\alpha = -2 \left( \frac{-p}{3} \right) \cos \theta$$

$$\beta = -2 \left( \frac{-p}{3} \right) \cos(\theta + 120^\circ)$$

$$\delta = -2 \left( \frac{-p}{3} \right) \cos(\theta + 240^\circ)$$

$$\dot{\gamma}_{av} = \text{raíz} - \frac{b}{3a}$$

en donde *raíz* es cada una de los valores  $\alpha$ ,  $\beta$ , o  $\delta$ . Como es lógico, se obtienen 3 raíces, de las cuales algunas veces dos son complejas y a veces las tres son reales. Es necesario tener cuidado para seleccionar la raíz correcta. Una vez que se tiene el valor adecuado de viscosidad para la velocidad de agitación escogida, se reinicia el procedimiento, hasta obtener la totalidad de las parejas ( $\dot{\gamma}_{av}$ , N) para todos los fluidos ensayados.

En análisis posteriores se utilizará el modelo de la ley de la potencia. Por este motivo, también se utilizó dicho modelo para el cálculo de las constantes Ks del impulsor IH2. El valor de  $\dot{\gamma}_{av}$  se calculará empleando la ecuación 5.4:

$$\dot{\gamma}_{av} = \left[ \frac{\eta_{ap}}{K} \right]^{(n-1)} \quad \text{Ec. (5.4)}$$

Como se aprecia en la **Figura 5.6** y en la **Tabla 5.5**, el modelo de la ley de la potencia ajusta muy bien el comportamiento reológico de las soluciones de goma xantana en todo el intervalo de gradientes de deformación ensayado pero no es tan satisfactorio para las soluciones de CMC, particularmente a bajos gradientes de deformación, que es precisamente en donde debe ser determinado el valor de Ks. Los parámetros K y n generales para estas soluciones no describen adecuadamente ni la zona de meseta, ni la zona francamente exponencial de las curvas. Para solucionar esta dificultad se decidió trabajar únicamente con los datos de la zona exponencial de las curvas reológicas de tales soluciones, y ajustar un conjunto de parámetros de la ley de la potencia mucho más satisfactoria. Para ello, se dividió en forma arbitraria el intervalo de gradientes de deformación de la caracterización reológica completa de cada solución de CMC, y se ajustó el comportamiento reológico en la zona exponencial al modelo de la ley de la potencia. Los

resultados se presentan en la **Tabla 5.12**, en donde el subíndice **B** indica que los parámetros corresponden únicamente a la zona exponencial (altos gradientes de deformación). Asumiendo que los valores de  $K_s$  obtenidos con los dos modelos son muy parecidos, se utilizó el valor de  $K_s$  derivado con el modelo polinomial para, a partir de los intervalos de gradiente de deformación de la **Tabla 5.12**, calcular el correspondiente intervalo de velocidades de rotación para el cual es válido el modelo reológico y, por tanto, la regresión para el cálculo de  $K_s$ .

Las determinaciones de  $K_s$  para algunos de los fluidos utilizados se muestran en las **Figuras 5.16 a 5.19** para los dos modelos reológicos utilizados, en el panel **a** se muestra la totalidad de la curva, mientras que en el panel **b** se amplía la región inicial de la misma. Como se puede apreciar en estas figuras, para cada fluido medido con el impulsor IH2 en el intervalo de valores de  $N$  entre 0 y 1.5 r.p.s. aproximadamente,  $\dot{\gamma}_{av}$  es proporcional a  $N$ , como era de esperarse a partir de la **ecuación 2.11**. Los valores calculados de  $K_s$  para todos los fluidos no-Newtonianos se reportan en la **Tabla 5.11**. Como se puede apreciar, los valores de  $K_s$  calculados con el modelo polinomial y con el de la ley de la potencia son muy similares, lo cual justifica la suposición hecha para derivar el valor de  $K_s$  con el modelo de la ley de la potencia con las soluciones de CMC.

Un hecho significativo durante la determinación de  $K_s$  del fluido GX-1 debe ser mencionado. Debido a la baja viscosidad de este fluido, los datos medibles de torque con el impulsor IH2 estuvieron en un intervalo de gradientes de deformación relativamente altos. Por tanto la estimación de  $K_s$  se realizó mediante una regresión entre dos puntos lo cual siempre da una línea recta. El valor de  $K_s$  estimado, se desvió excesivamente del comportamiento de los demás valores obtenidos, por lo cual se decidió no considerar este resultado en posteriores discusiones. Los resultados de  $K_s$  serán discutidos posteriormente.

**Tabla 5.11** Valores de  $K_s$  obtenidos con diferentes fluidos no-Newtonianos para el dispositivo IH2.

Fluido	$K_s$ (Polinomial)	$K_s$ (ley de la potencia)	Intervalo [ $s^{-1}$ ] <sup>(*)</sup>
GX-1	11.45	10.18	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 14.8$
GX-3	32.74	35.27	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 42.3$
GX-10	29.97	35.11	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 38.7$
GX-13	28.91	34.35	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 74.6$
GX-17	31.67	37.63	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 84.5$
GX-20	56.17	59.31	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 72.5$
CMC-5/10 B	32.83	30.14	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 84.8$
CMC-5/25 B	36.09	31.82	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 93.2$
CMC-15/10 B	34.38	34.65	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 88.8$
CMC-15/25 B	40.42	38.52	$0 \leq \dot{\gamma}_{av} \leq 104.4$

<sup>(\*)</sup> Denota el intervalo del gradiente de deformación en el cual se cumple la relación  $\dot{\gamma}_{av} = K_s N$ , basado en el modelo polinomial.



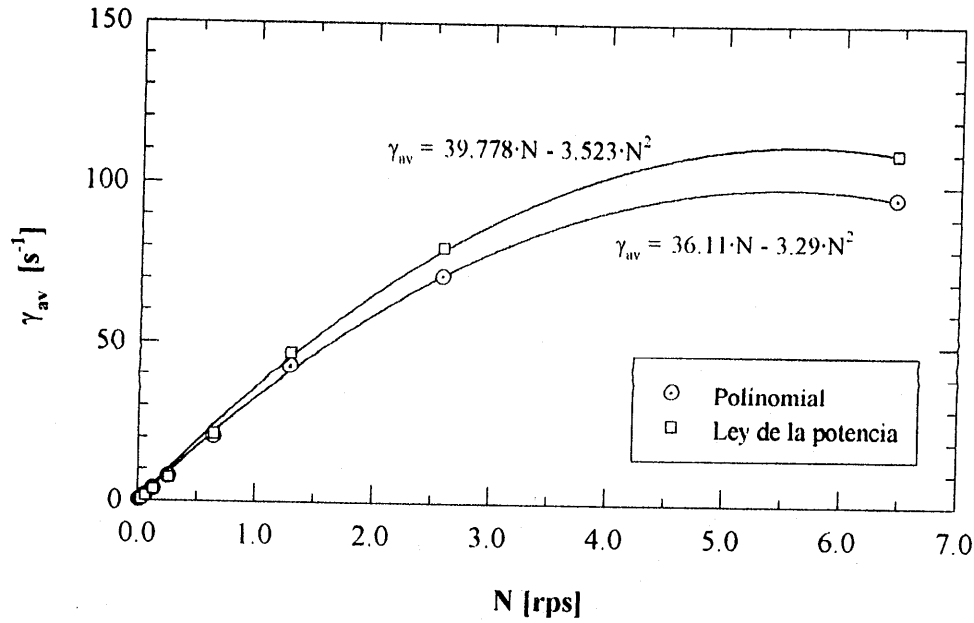


Figura 5.16.a  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de rotación.  
Impulsor IH2. Fluido: GX-3.

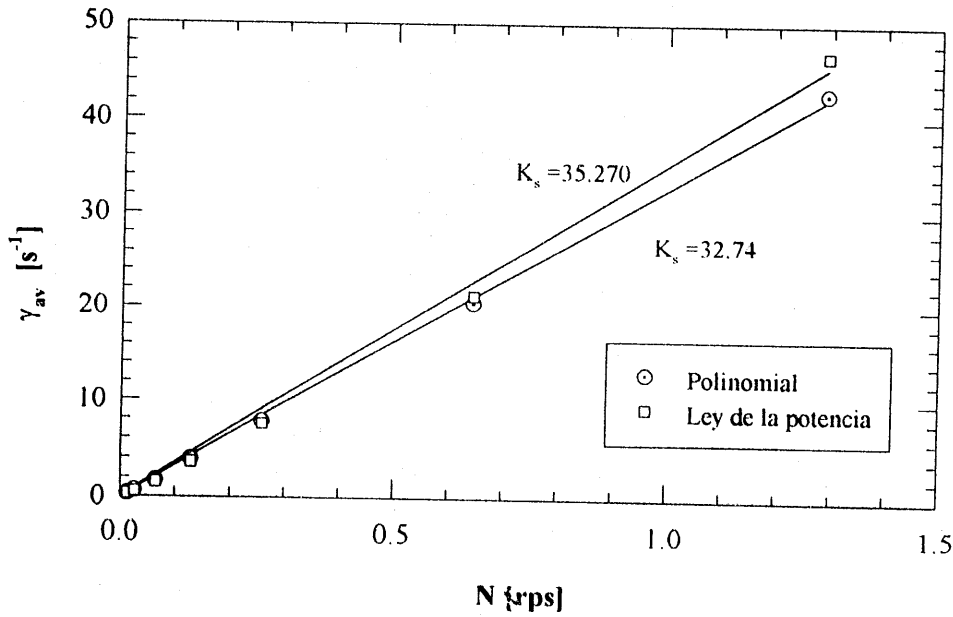


Figura 5.16.b  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de rotación. (Ampliación)  
Cálculo de la constante  $K_s$ . Impulsor IH2. Fluido: GX-3.

Resultados y discusión

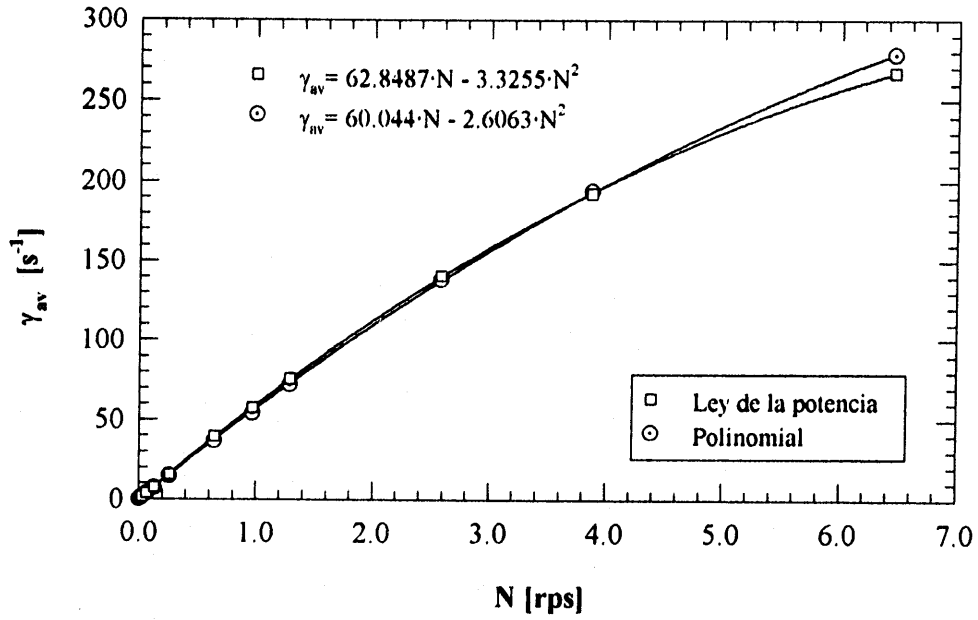


Figura 5.17.a  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de rotación. Impulsor IH2. Fluido: GX-20.

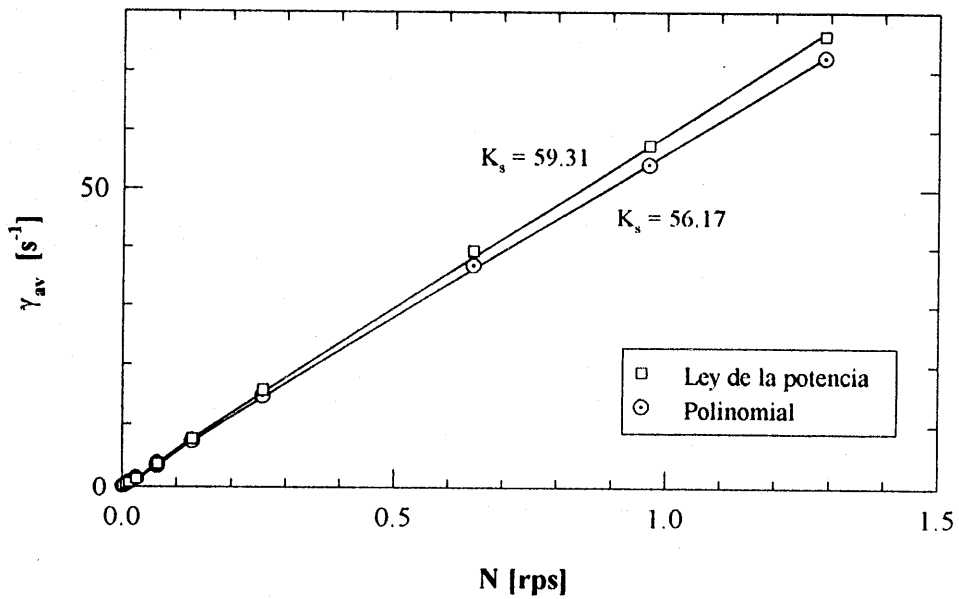


Figura 5.17.b  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de rotación. (Ampliación). Cálculo de la constante  $K_s$ . Impulsor IH2. Fluido: GX-20.

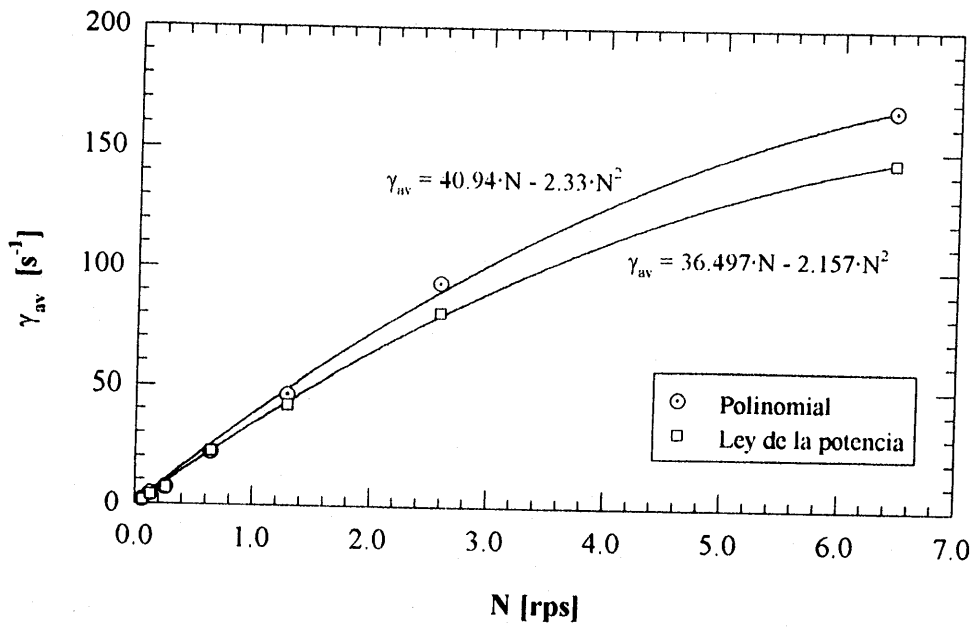


Figura 5.18.a  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de rotación. Impulsor IH2. Fluido: CMC-5/25. T = 25° C.

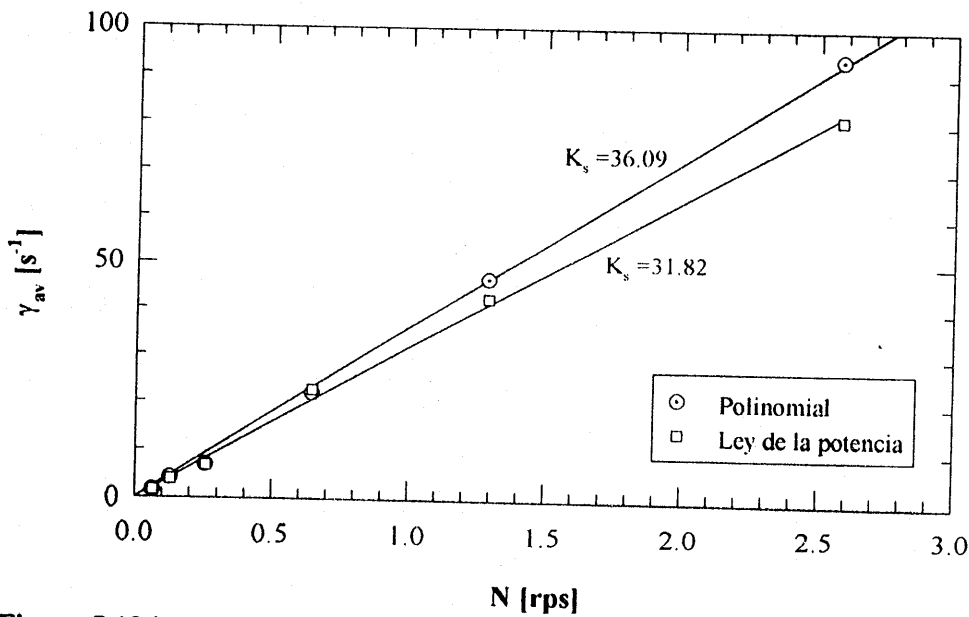


Figura 5.18.b  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de rotación. (Ampliación). Cálculo de  $K_s$ . Impulsor IH2. Fluido: CMC-5/25. T = 25°C.

Resultados y discusión

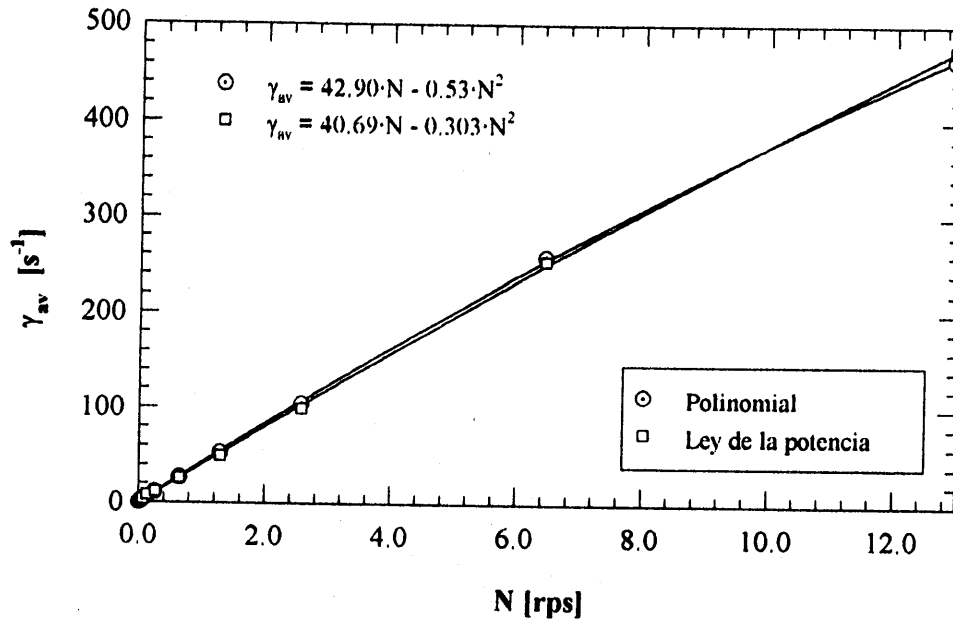


Figura 5.19.a  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de rotación. Impulsor IH2. Fluido: CMC-15/25. T = 25° C.

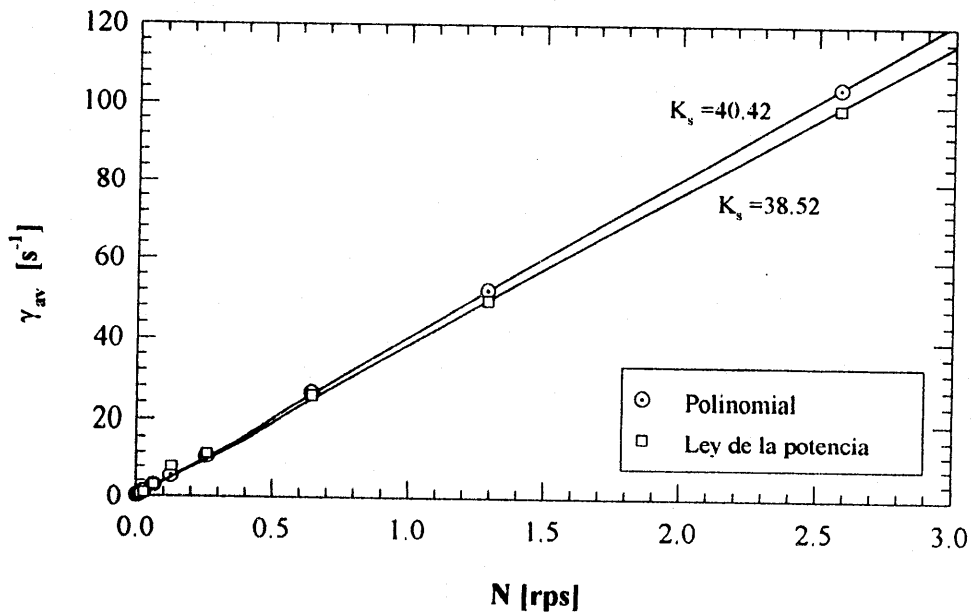


Figura 5.19.b  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de rotación. (Ampliación).

Cálculo de  $K_s$ . Impulsor IH2. Fluido: CMC-15/25. T = 25°C.

### 5.1.2.2.2 El método de Rieger y Novak

La determinación de  $K_p$  para fluidos no-Newtonianos no es directa en virtud de la dificultad para definir  $\eta_a$ . Para resolver este problema, Rieger y Novak (1973) propusieron un número de Reynolds especial,  $Re_{pl}$ , basado en la ley de la potencia (ecuación 2.16). Los resultados del número de potencia experimental se presentan en la **Figura 5.20** como función de  $Re_{pl}$ . Los resultados de las soluciones de CMC se dibujan en otro panel para mayor claridad. A iguales  $Re_{pl}$ , el número de potencia disminuye a medida que disminuye el valor del índice de flujo  $n$ , indicando que  $K_p$  depende del índice de flujo, en acuerdo con algunos reportes de la literatura (Rieger y Novak, 1973; Brito-De la Fuente, 1992).

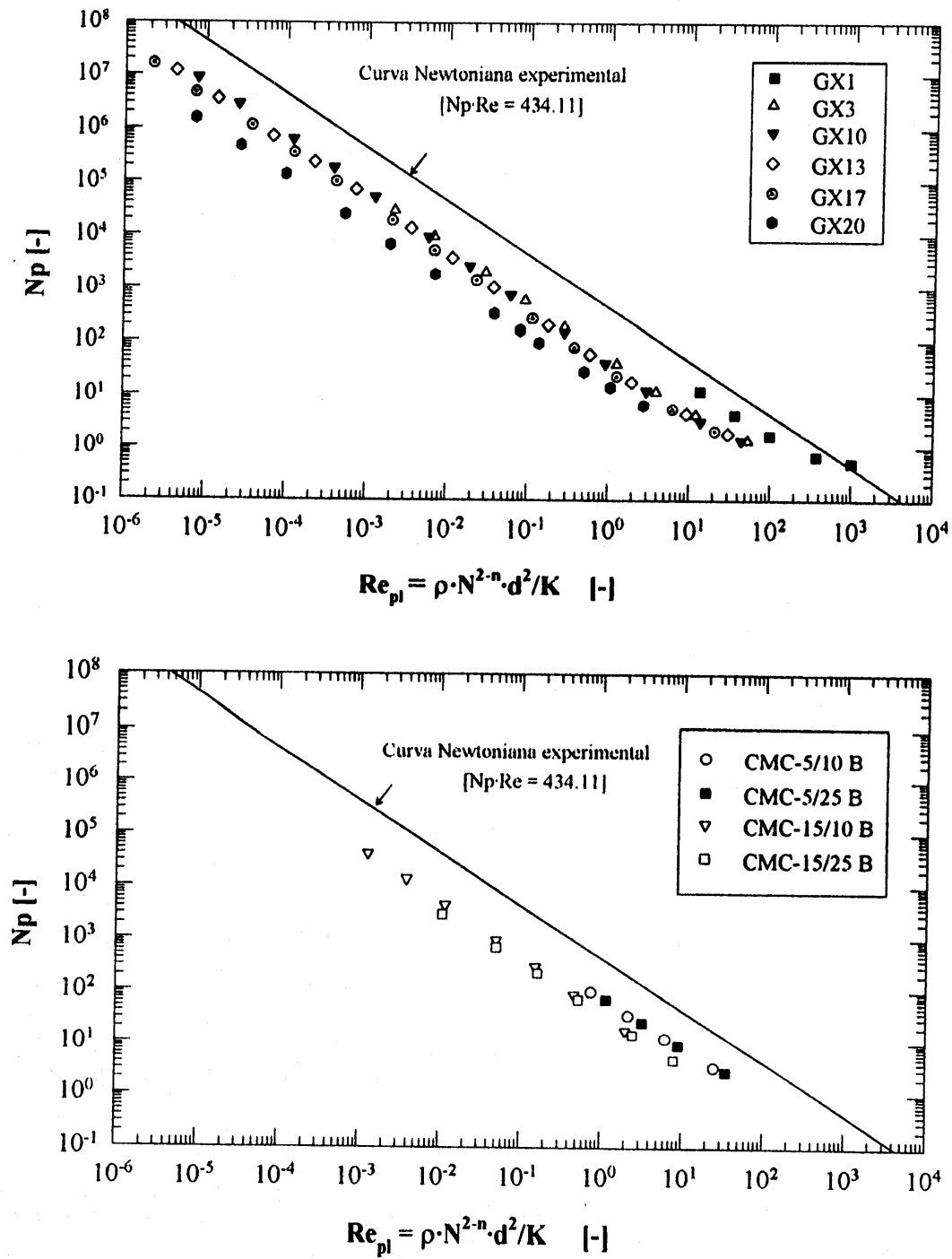
A partir de un análisis de regresión de la curva de potencia para cada fluido en el intervalo  $Re_{pl} \leq 100$ , se obtuvieron los valores de  $K_p(n)$  que se muestran en la **Tabla 5.12**. Las pendientes de todas las curvas en este intervalo de  $Re_{pl}$  fueron esencialmente iguales que -1, sugiriendo que los datos se hallan en la región laminar de flujo. Como se señaló en la sección anterior, para las soluciones de CMC se utilizó únicamente el intervalo de comportamiento exponencial del reograma (altos gradientes de deformación, o zona B), con el objetivo de ajustar mejor los parámetros del modelo de la ley de la potencia y así poder hacer uso de este método de determinación de  $K_s$ . Al igual que en el método de Metzner y Otto, el fluido GX-1 se desvió significativamente del comportamiento de los demás fluidos por causas ya discutidas, y por tanto no será tenido en cuenta en discusiones posteriores.

**Tabla 5.12** Parámetros del modelo de la ley de la potencia obtenidos con los dispositivos MS-0/115 y DIN-114 y valores obtenidos de  $K_p$  para el impulsor helicoidal IH2 con los diferentes fluidos de calibración utilizados.

Fluido	$\rho$ [Kg·m <sup>-3</sup> ]	K [Pa·s <sup>n</sup> ]	n [-]	Intervalo [s <sup>-1</sup> ]	$K_p$ (n) [-]
GX-1	998	0.0876	0.556	$10 \leq \dot{\gamma} \leq 5000$	144.71
GX-3	999	0.867	0.373	$10 \leq \dot{\gamma} \leq 5000$	55.60
GX-10	1003	3.769	0.311	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 2000$	46.29
GX-13	1003	5.883	0.285	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 2000$	41.49
GX-17	1009	9.247	0.255	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 1000$	34.15
GX-20	1013	26.221	0.143	$0.1 \leq \dot{\gamma} \leq 500$	15.27
CMC-5/10 B	1005	1.503	0.481	$10 \leq \dot{\gamma} \leq 1000$	72.35
CMC-5/25 B	1003	1.007	0.515	$10 \leq \dot{\gamma} \leq 1000$	74.96
CMC-15/10 B	1009	21.948	0.399	$1.0 \leq \dot{\gamma} \leq 20$	38.64
CMC-15/25 B	1008	21.131	0.311	$10 \leq \dot{\gamma} \leq 1000$	35.13
Newtonianos(*)	-	-	1.0	-	434.11

\*) Ver **Tabla 5.2**

Resultados y discusión



**Figura 5.20** Curva de consumo de potencia para los fluidos no-Newtonianos usados en este estudio. Resultados para el impulsor IH2.

Los valores de  $K_p$  de la **Tabla 5.12** se presentan como función del índice de flujo del modelo de la ley de la potencia en la **Figura 5.21**. Los resultados experimentales fueron ajustados tanto por una regresión polinomial de tercer orden, como mediante un modelo sugerido por Brito-De la Fuente (1992). La forma de la ecuación y los parámetros de los dos modelos se presentan en la **Tabla 5.13**.

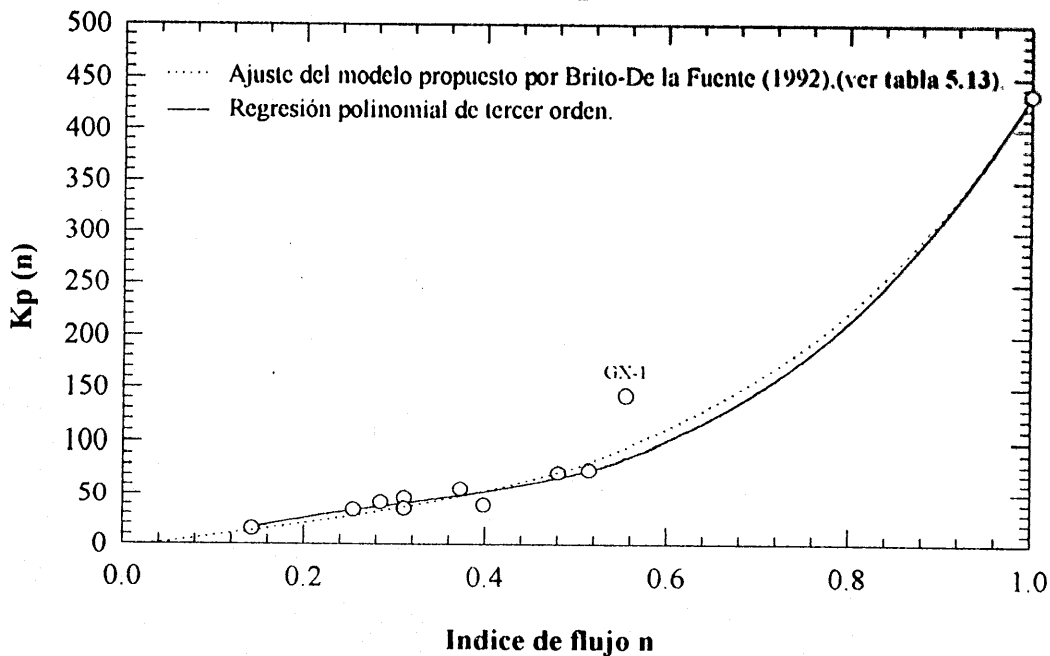
**Tabla 5.13** Parámetros de ajuste para los modelos de  $K_p(n)$

Modelo	Ecuación	Parámetros
Polinomial	$K_p(n) = b(0) + b(1) \cdot n + b(2) \cdot n^2 + b(3) \cdot n^3$	$b(0) = -22.725$ $b(1) = 370.984$ $b(2) = -815.077$ $b(3) = 900.988$
Brito-De la Fuente (1992)	$K_p(n) = ab^{n-1}c^{\frac{1}{n}}$	$a = 434.11$ $b = 23.955$ $c = 1.1364$

Como se puede observar en la **Figura 5.21**, ambos modelos ajustan muy bien los datos experimentales para valores de  $n$  entre 0.14 y 1.0. En el modelo propuesto por Brito-De la Fuente, el valor  $a$  corresponde al  $K_p$  obtenido para fluidos Newtonianos.

A partir de  $K_p(n)$  puede obtenerse la función  $K_s$  de acuerdo con la **ecuación 2.19**:

$$K_s = \left[ \frac{K_p(n)}{K_p} \right]^{(n-1)}$$



**Figura 5.21** Valores de  $K_p$  como función de el índice de flujo,  $n$ . Impulsor IH2.

## Resultados y discusión

Para el modelo propuesto por Brito-De la Fuente, la ecuación anterior se convierte en:

$$K_s = b c^{\frac{1}{n}} \quad \text{Ec. (5.5)}$$

### 5.1.2.2.3 Comparación de los valores de $K_s$ resultantes.

Los resultados obtenidos para  $K_s$  de las dos aproximaciones independientes discutidas previamente se presentan en la **Figura 5.22.a**, junto con algunos datos reportados por Brito-De la Fuente (1992), para otra geometría de impulsor. En dicha figura, los puntos representan los valores de  $K_s$  obtenidos mediante el método de Metzner y Otto con el modelo de la ley de la potencia, mientras que la línea representa la función de  $K_s$  obtenida con la aproximación de Rieger y Novak, siguiendo el modelo propuesto por Brito-De la Fuente (1992). El acuerdo obtenido con las dos aproximaciones es satisfactorio.

Los resultados sugieren que para  $n > 0.26$  el valor de  $K_s$  es prácticamente constante, lo cual está de acuerdo con reportes previos (Rieger and Novak, 1973). Para valores menores del índice de flujo,  $K_s$  aumenta considerablemente. En la **Figura 5.22.b** se comparan los datos experimentales con los de diferentes correlaciones para  $K_s$  encontradas en la literatura, con los valores geométricos correspondientes al IH2. En el intervalo  $0.1 \leq n \leq 1.0$ , la mayoría de estas correlaciones sugieren valores constantes de  $K_s$ , muy cercanos a los valores encontrados experimentalmente para  $n > 0.25$ . La correlación de Chavan y Ulbrecht es la que parece ajustar mejor los datos para  $n > 0.25$ , prediciendo un valor de  $K_s$  constante de 34. La correlación de Brito-De la Fuente (1992), es una fuerte función de  $n$ , según la cual el valor de  $K_s$  disminuye con el índice de flujo. Esto se presenta si y solo si el valor de  $c$  en dicha correlación es menor que 1. Brito-De la Fuente (1992) reporta en su trabajo que el valor de  $c$  permanece constante alrededor de 0.814, mientras que el valor de  $b$  es fuertemente influenciado por la geometría del impulsor, principalmente por la relación  $s/d$  y sólo muy débilmente por la relación  $w/d$ . Por lo tanto, la tendencia de la correlación de Brito-De la Fuente es a aumentar el valor de  $K_s$  a medida que el valor de  $n$  se incrementa, exactamente al contrario de la tendencia encontrada en este trabajo. Analizando cuidadosamente la **Figura 5.22.a**, podría sugerirse que el único punto que hace que la curva sea cóncava hacia arriba es el valor correspondiente al  $K_s$  para GX-20 ( $n=0.143$ ). Si este punto no estuviese, los datos ajustarían bastante bien con los reportados por Brito-De la Fuente (1992), obteniéndose valores de  $b = 49.201$  y  $c = 0.816$ , los cuales concuerdan excelentemente con el reporte de este autor. Aunque los datos no corresponden a la misma geometría y por tanto no deberían ser tratados conjuntamente, se han utilizado con la intención de mostrar una tendencia. El valor de  $K_s$  para el fluido GX-20 se obtuvo directamente por el método de Metzner y Otto de los datos para bajas velocidades de agitación y con valores de torque altos, por lo cual es difícil sospechar que hubo errores asociados con la precisión de las medidas, tanto reológicas como con el IH2. Desafortunadamente, no se probaron otros fluidos para valores de  $n < 0.2$ , ni  $n > 0.6$  por lo que sería interesante complementar la caracterización del IH2 con mediciones adicionales en estos intervalos de índices de flujo.



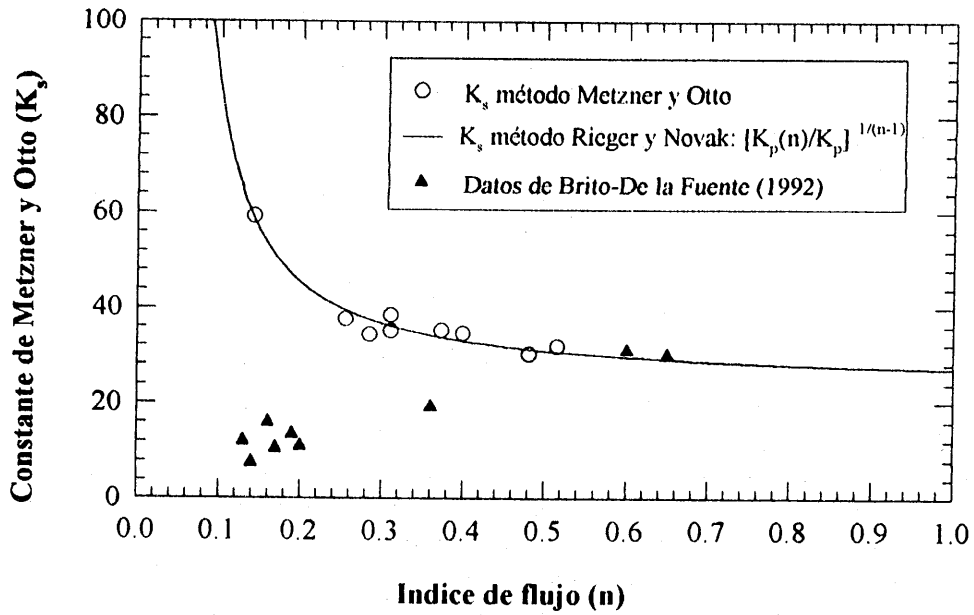


Figura 5.22.a  $K_s$  experimental como función del índice de flujo.

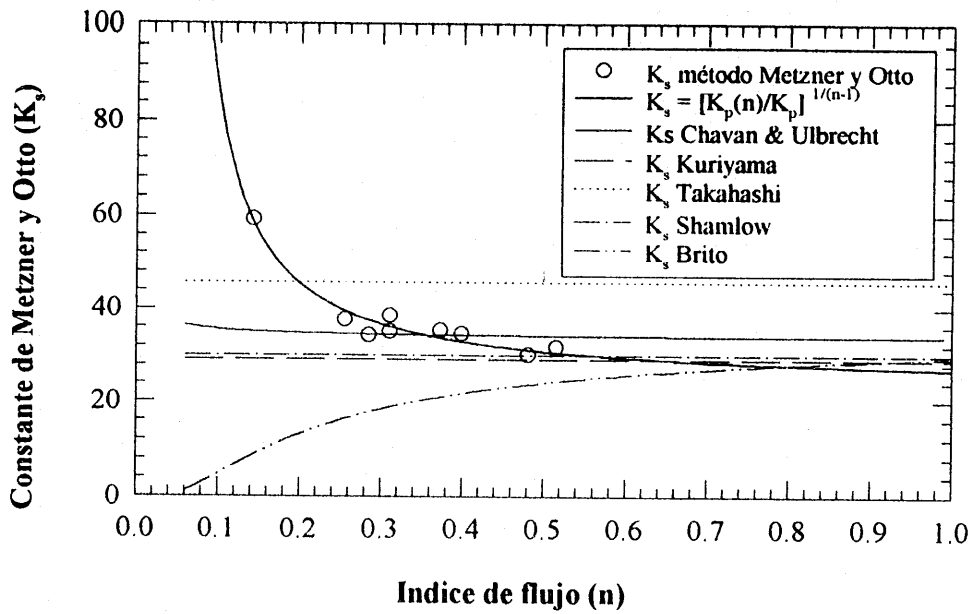
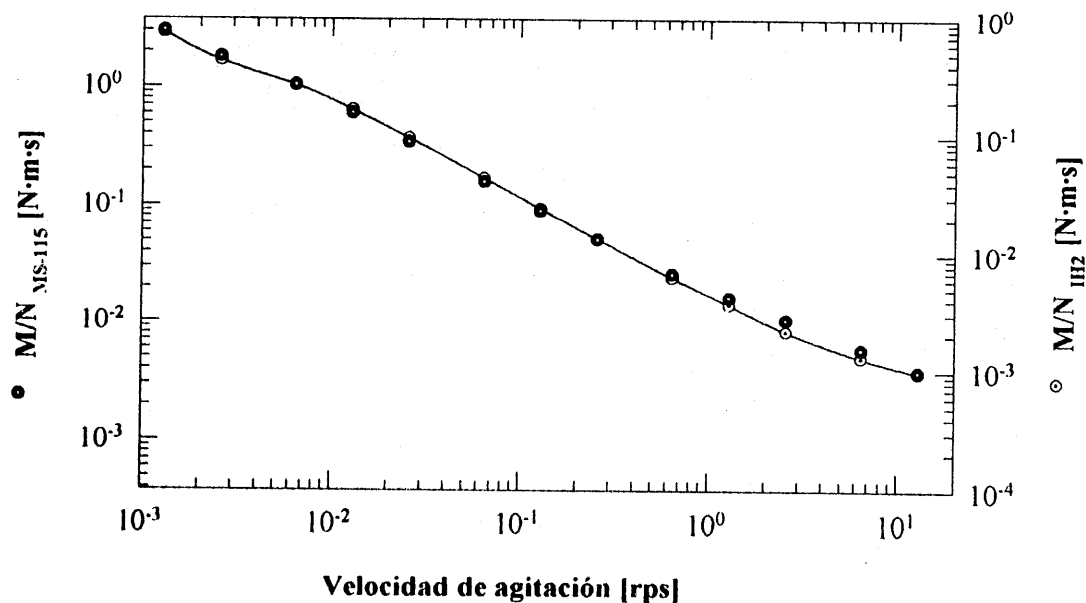


Figura 5.22.b Comparación del  $K_s$  experimental con valores reportados en la literatura. (Ver Tabla 2.5)

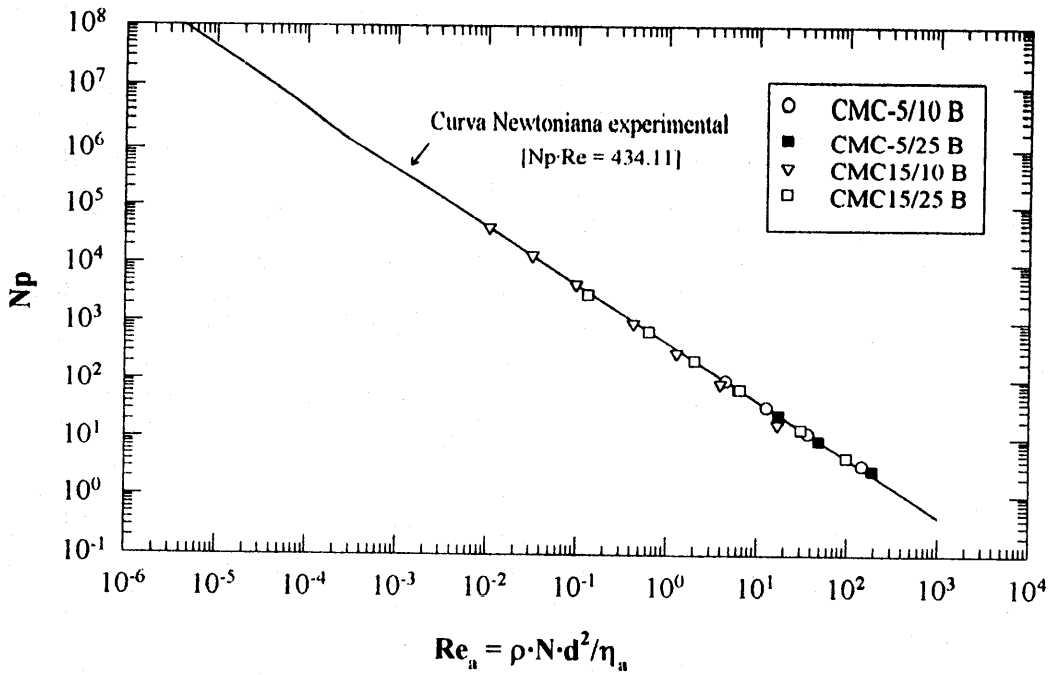
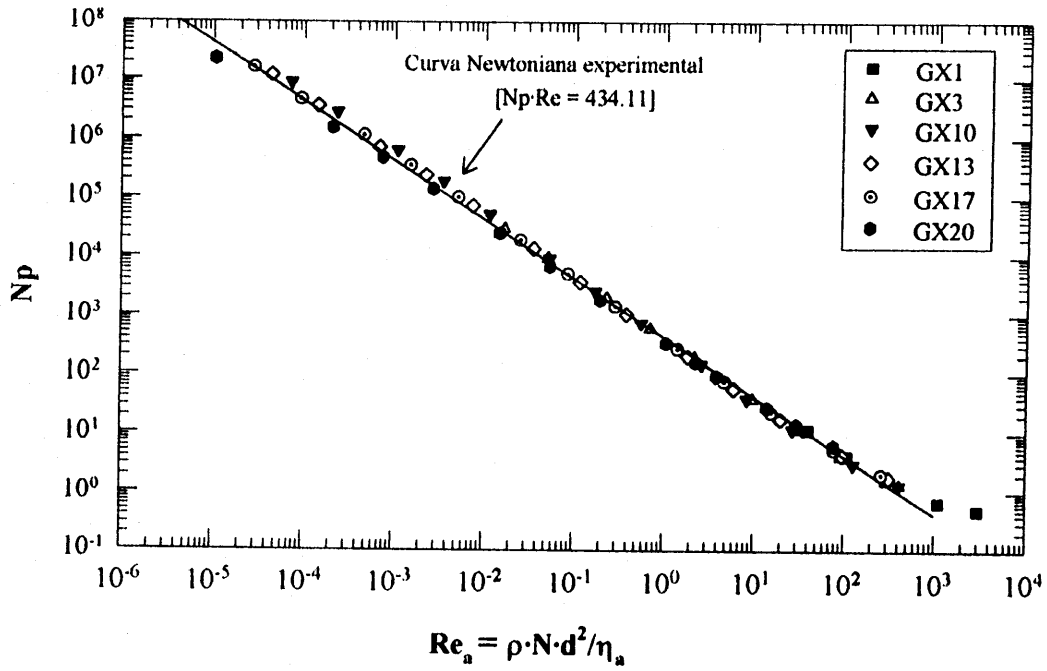
Finalmente, utilizando los valores de  $K_s$  obtenidos a partir del método de Rieger y Novak, se recalcularon los valores de  $N_p$  como función del número de Reynolds aparente,  $Re_a$ , mediante el uso de la **ecuación 2.20**. Los resultados se presentan en la **Figura 5.23**. Como se advierte en esta figura, los datos experimentales Newtonianos y no-Newtonianos son colapsados en una sola curva adimensional. De manera similar a lo reportado por Brito-De la Fuente (1992), se observó una extensión del intervalo de régimen laminar hasta  $Re \leq 100$ , tanto para fluidos Newtonianos como no-Newtonianos.

### 5.1.2.3 Comparación de la caracterización reológica con otros trabajos

El proceso de calibración reológica del dispositivo IH2 discutido anteriormente se realizó con la expectativa de poder utilizarlo como un sistema apropiado para realizar mediciones reológicas de caldos de fermentación miceliales. Para hacerlo, se utilizaron fluidos modelo homogéneos. En la **Figura 5.24** se presenta una comparación típica entre los resultados obtenidos con un dispositivo reológico (MS-115) y con el IH2. Como se ve en dicha figura, los resultados obtenidos para fluidos de reología compleja son bastante satisfactorios. Sin embargo, existen reportes de acuerdo con los cuales, en términos estrictos, la anterior caracterización reológica no sería adecuada para caldos con sólidos suspendidos, puesto que éstos pueden hacer variar significativamente el valor de  $K_s$  obtenido con fluidos homogéneos (Brito-De la Fuente, 1996). Sería necesaria entonces una caracterización reológica mucho más profunda para incluir el efecto de la concentración y tamaño de los sólidos suspendidos en el comportamiento de la constante  $K_s$  para el impulsor IH2, lo cual está más allá de los alcances del presente proyecto. Por lo tanto, los datos brutos obtenidos



**Figura 5.24** Comparación del comportamiento típico de una medición reológica con los dispositivos de doble gap (MS-0/115) y helicoidal (IH2). Fluido GX-17



**Figura 5.23** Curva generalizada de consumo de potencia para los fluidos no-Newtonianos usados en este estudio. Resultados para el impulsor IH2.

del reómetro (M, N, M/N) parecen ser la única alternativa de reportar datos correctos de propiedades reológicas de suspensiones miceliarias. Desafortunadamente, los datos brutos obtenidos con instrumentos de medida diferentes no son comparables, de manera que aunque exactos, son poco útiles para hacer cualquier tipo de estudio o inferencia. Por este motivo, cualquier aproximación, aunque sea burda, a una caracterización reológica de caldos de fermentación, resulta muy conveniente. El lector debe tener en cuenta esta intención al utilizar los datos reológicos obtenidos en este trabajo.

Reuss *et al.* (1982), reportaron la calibración de un dispositivo helicoidal semejante al IH2 pero del doble de diámetro, para la determinación de propiedades reológicas de caldos de cultivo miceliarios de *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*. En ambos casos, los modelos de Casson, de la ley de la potencia y Herschel-Bulkley ajustaron igualmente bien los datos reológicos en un intervalo de gradientes de deformación entre 1 y 20  $s^{-1}$ . Por lo tanto, desde el punto de vista pragmático de la ingeniería, el modelo más sencillo (ley de la potencia) serviría convenientemente para efectos de cualquier diseño. Aunque no se presentaron datos de calibración del dispositivo, en el reporte se muestra que los gradientes de deformación alcanzados para el impulsor helicoidal utilizado llegan a 100  $s^{-1}$ , valor muy similar al alcanzado en este trabajo para el impulsor IH2. Si se supone que el valor de  $K_s$  es del orden de 35 (como es predicho por muchas de las correlaciones mostradas en la Figura 5.22b), entonces la velocidad máxima de rotación del impulsor para flujo laminar estaría en 3 r.p.s. aproximadamente, lo cual daría, para los valores reportados de  $K$  y  $n$ ,  $Re \approx 100$  que coincide muy bien con los valores encontrados en este trabajo.

Kim *et al.* (1983), utilizaron un dispositivo helicoidal de dimensiones ligeramente menores que el IH2 del presente trabajo, para caracterizar propiedades reológicas de caldos de fermentación miceliar. Para la calibración se reportó el uso de una solución de sacarosa de 0.225 Pa·s como fluido Newtoniano, y una solución de 5  $kg/m^3$  de goma xantana como estándar de fluido pseudoplástico. Utilizando el fluido Newtoniano, se encontró que el Reynolds laminar llegaba hasta 82, lo cual está en concordancia con los resultados encontrados en el presente trabajo. Adicionalmente, la constante  $K_s$  hallada fue de 45.6 para la solución de goma xantana. A juzgar por la ausencia de información en el reporte, el valor de la constante  $K_s$  se asumió independiente de las propiedades reológicas del caldo; suponiendo que el valor de las constantes  $K$  y  $n$  no difieren excesivamente de las encontradas en el presente trabajo ( $K = 2 Pa \cdot s^n$ ,  $n = 0.35$  de las Figuras 5.11 y 5.12), el valor de  $K_s$  se encuentra en la zona en la que no hay variación sensible con respecto al índice de flujo (Figura 5.22). De acuerdo con los resultados del presente estudio, la suposición de  $K_s$  constante puede generar errores considerables únicamente cuando los valores del índice de flujo para caldos miceliarios se encuentren por debajo de 0.25.

Allen y Robinson (1990) utilizaron diferentes dispositivos de medición reológica para medir propiedades reológicas de cultivos miceliarios, entre ellos un dispositivo helicoidal de dimensiones similares al utilizado por Kim *et al.* (1983). Para la calibración del impulsor helicoidal utilizaron una serie de fluidos con índices de flujo entre 0.43 y 1.0. Valores del gradiente de deformación así como del Número de Reynolds máximos fueron de 150 y 100 respectivamente, lo cual está de acuerdo con los valores obtenidos en este estudio. Los autores hacen un extenso análisis de la influencia de las propiedades reológicas (índice de flujo y punto de cedencia aparente) en el valor de  $K_s$  obtenido para el modelo reológico de

Bingham, utilizando viscosímetros de impulsor, y señalan que el valor de  $K_s$  aumenta considerablemente a medida que  $n$  disminuye; paradójicamente, para el impulsor helicoidal sólo se presenta un valor de  $K_s = 30$  basado en los fluidos pseudoplásticos, por lo que al parecer se utilizó este único valor de  $K_s$  para el cálculo de datos reológicos. De acuerdo con los autores, diferentes estudios en la literatura muestran que la suposición de  $K_s$  constante independiente de las características reológicas del fluido es aproximadamente válida para impulsores helicoidales, lo cual está de acuerdo con sus datos experimentales. Si se toma en cuenta que los valores de índice de flujo de sus fluidos de calibración, así como de los caldos de fermentación ensayados no son muy bajos ( $n > 0.3$ ) no es extraño que los valores obtenidos de  $K_s$  hayan permanecido constantes.

Finalmente, Brito-De la Fuente *et al.* (1996) reportaron la caracterización de un impulsor helicoidal con el objetivo de utilizarlo para obtener curvas de flujo viscométricas. La geometría de este estudio difiere ligeramente de la de los reportes mencionados previamente y de la del presente estudio en que el impulsor helicoidal solo tienen un listón y sólo tiene un paso en lugar de paso y medio en los listones de los otros impulsores. El valor de  $K_p$  encontrado para el impulsor es de 162.55, y se señala que es prácticamente independiente de la escala, pues es similar al encontrado para un dispositivo 10 veces más grande. El  $K_p$  es pequeño comparado con el encontrado para el impulsor IH2, probablemente debido a que solo tiene un listón. Reporta el autor que el valor de  $K_s$  es fuertemente dependiente de las propiedades reológicas del fluido para  $n < 0.5$ . Sin embargo, al contrario de la caracterización encontrada en el presente trabajo, el valor de  $K_s$  disminuye a medida que el índice de flujo disminuye.

### 5.1.3 Conclusiones

Los fluidos empleados en la calibración del impulsor helicoidal presentaron diferentes comportamientos reológicos. Se utilizaron tanto fluidos Newtonianos como no-Newtonianos. Los fluidos Newtonianos utilizados tuvieron viscosidades que fluctuaron entre valores medios (0.1 Pa·s) y altos (5 Pa·s). Aunque estos valores son grandes si se comparan con la viscosidad del agua, se seleccionaron por la necesidad de obtener datos confiables de torque para la calibración en condiciones de flujo laminar. Los fluidos no-Newtonianos se caracterizaron como fluidos pseudoplásticos y se utilizó la ley de la potencia para modelar su comportamiento. Se detectaron efectos ocasionados por fuerzas normales y punto de cedencia aparente, pero estos efectos no fueron medidos. Las soluciones de goma xantana mostraron un excelente ajuste a la ley de la potencia, con valores del índice de flujo entre 0.15 y 0.55. El índice de consistencia osciló para los mismos fluidos entre 0.09 y 26 Pa·s<sup>n</sup>. Esencialmente, los datos reológicos fueron consistentes con los encontrados en la literatura, aunque algunas variaciones no pudieron ser explicadas satisfactoriamente. Para CMC, el comportamiento pseudoplástico se alejó significativamente del modelo de la ley de la potencia, aunque fue consistente con algunos valores reportados en la literatura. Su comportamiento reológico ajustó mucho mejor con los modelos de Carreau-Yasuda y Cross-Williamson. Se encontraron valores de  $K$  mayores y valores de  $n$  significativamente menores que los reportados por otros autores. Todos los datos de viscosidad como función del gradiente de deformación para los fluidos pseudoplásticos se ajustaron excelentemente a una correlación polinomial de tercer orden.

La calibración del impulsor IH2 permitió establecer valores de  $K_p$  y una función de  $K_p(n)$  como función del índice de flujo de la ley de la potencia por el método de Rieger y Novak. Esta función ajustó muy bien los datos experimentales y permitió obtener una correlación derivada para  $K_s$ . Los valores de  $K_s$  también fueron determinados siguiendo otra metodología (Metzner y Otto). Ambos métodos se correspondieron satisfactoriamente. Para efectos de los cálculos reológicos, la función:

$$K_s = 23.96 \cdot (1.136)^{\frac{1}{n}}$$

será adoptada en el resto del trabajo. Los valores de  $K_p$  y  $K_s$  experimentales no fueron predichos con precisión por correlaciones de la literatura por estar fuera de rango (en algunas relaciones geométricas) además de que probablemente tales correlaciones no son suficientemente precisas para aplicaciones viscométricas. Sin embargo, los datos de  $K_s$  predichos siguen la misma tendencia que los encontrados experimentalmente, volviéndose constantes para valores de  $n$  por encima de 0.25.

Mientras en la literatura hay reportes de medición reológica con impulsores helicoidales en los que  $K_s$  se toma independiente de las propiedades reológicas de la sustancia a medir, algunos otros trabajos coinciden con los resultados del presente estudio en afirmar que el valor de  $K_s$  es función del índice de flujo, aunque el incremento en  $K_s$  a medida que  $n$  disminuye encontrado experimentalmente contrasta con el comportamiento inverso encontrado por Brito-De la Fuente (1996).

## 5.2 SISTEMA DE MEDICION DE POTENCIA

La construcción del sistema de medición de potencia en línea en fermentadores de 10 L constituyó uno de los resultados principales de este trabajo ya que permite adquirir información valiosa sobre la energía entregada directamente al fluido y correlacionarla con otras variables como  $k_{L,a}$ , propiedades reológicas, etc. permitiendo aumentar considerablemente la comprensión de los fenómenos que suceden al interior del fermentador. En esta sección se presentan detalles sobre la calibración del sistema, así como del impulsor IH3, para el cual se construyó una jarra especial de fermentación, con el objetivo de caracterizar el comportamiento de este tipo de impulsor en fermentaciones miceliares.

### 5.2.1 Calibración estática

Luego del montaje del sistema se procedió a calibrar estáticamente el torquímetro mediante el sistema de pesas descrito en la sección 4.6. Las lecturas de torque se registraron simultáneamente a través del amplificador anexo al torquímetro y de un milivoltímetro conectado a la salida analógica del amplificador. Los resultados de la calibración se muestran en las Figuras 5.25 y 5.26. Como puede apreciarse en ambas gráficas, el desempeño del equipo es perfectamente lineal y reproducible en el rango de medición de 0 a 2.82 N·m (0 - 25 Lbf·pulg.), en acuerdo con lo señalado por el fabricante. La sensibilidad del amplificador permite detectar cambios mínimos del torque de 0.02260 N·m (0.2 lbf·pulg.), mientras que el milivoltímetro detecta variaciones de hasta 0.1 mV. De acuerdo con la Figura 5.25, un

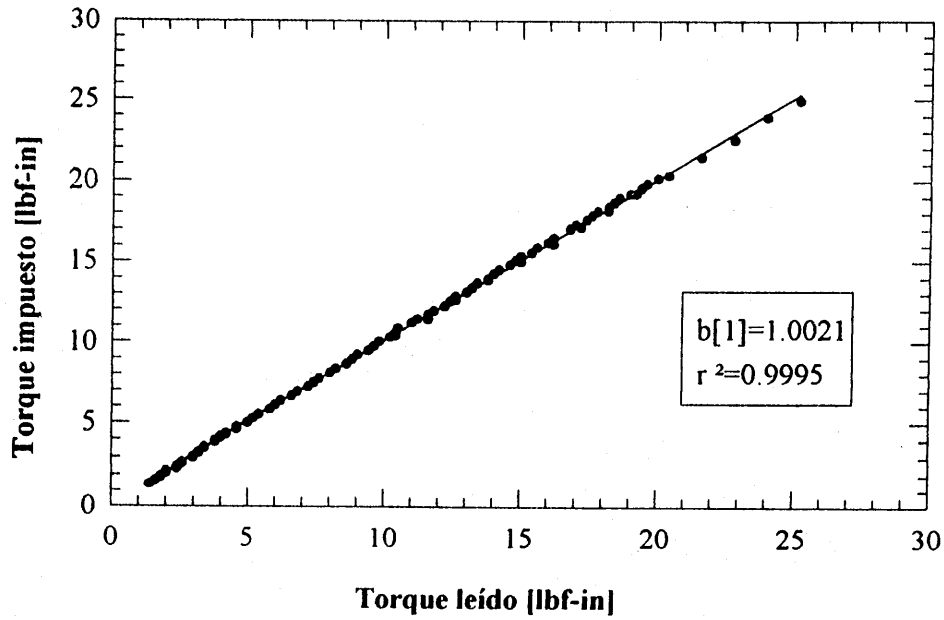


Figura 5.25 Calibración estática del torquímetro. Lecturas tomadas del amplificador.

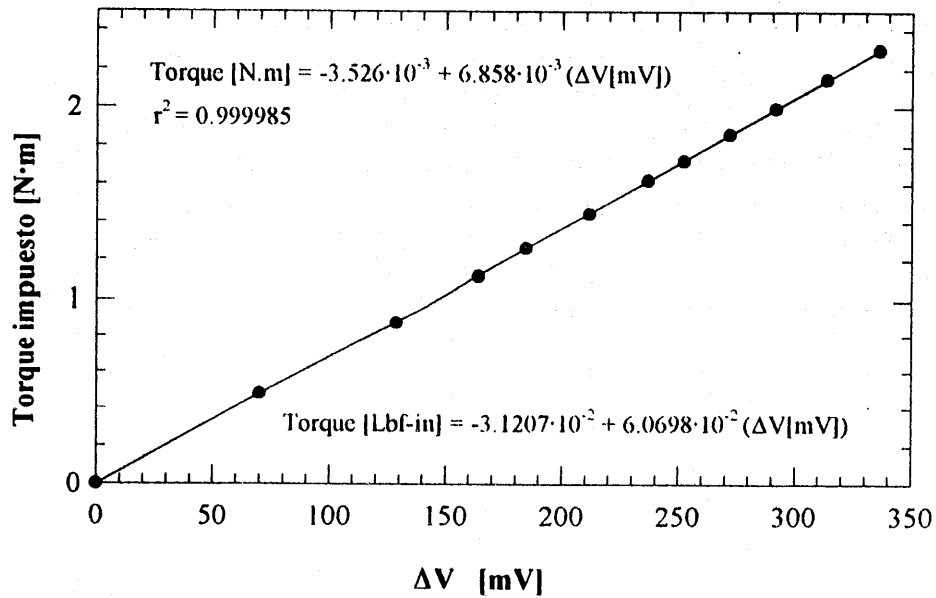


Figura 5.26 Calibración estática del torquímetro. Lecturas con el milivoltímetro.

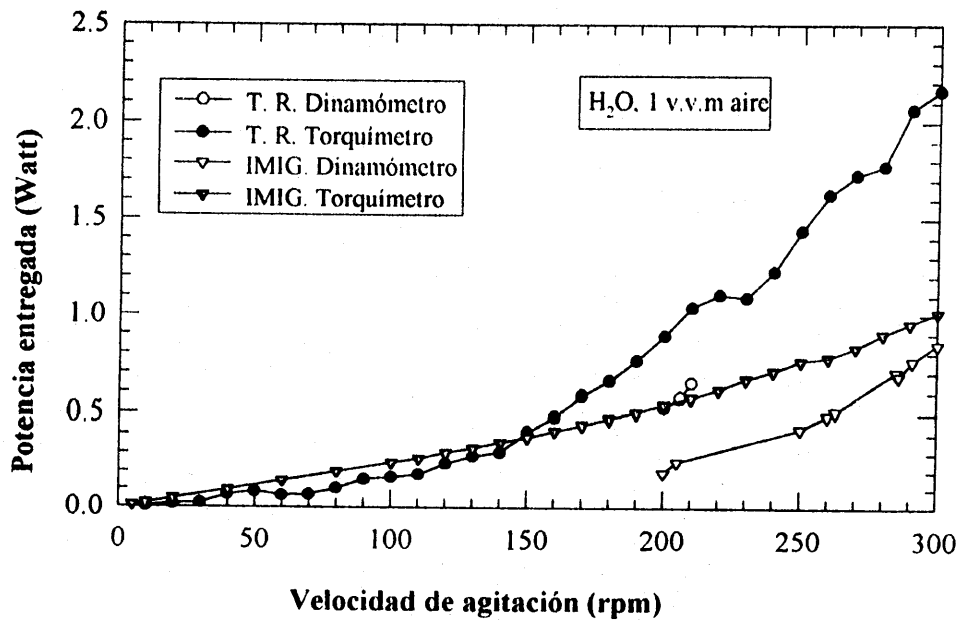
cambio de voltaje de 0.1 mV corresponde a un cambio en torque de 0.000686 N·m (0.00607 Lbf·pulg); como las lecturas con el milivoltímetro permiten una precisión 33 veces más alta que con el amplificador, se escogió hacer las lecturas en voltaje y utilizar la curva de calibración para convertir los datos a torque y, finalmente, consumo de potencia.

### 5.2.2 Evaluación del desempeño del torquímetro

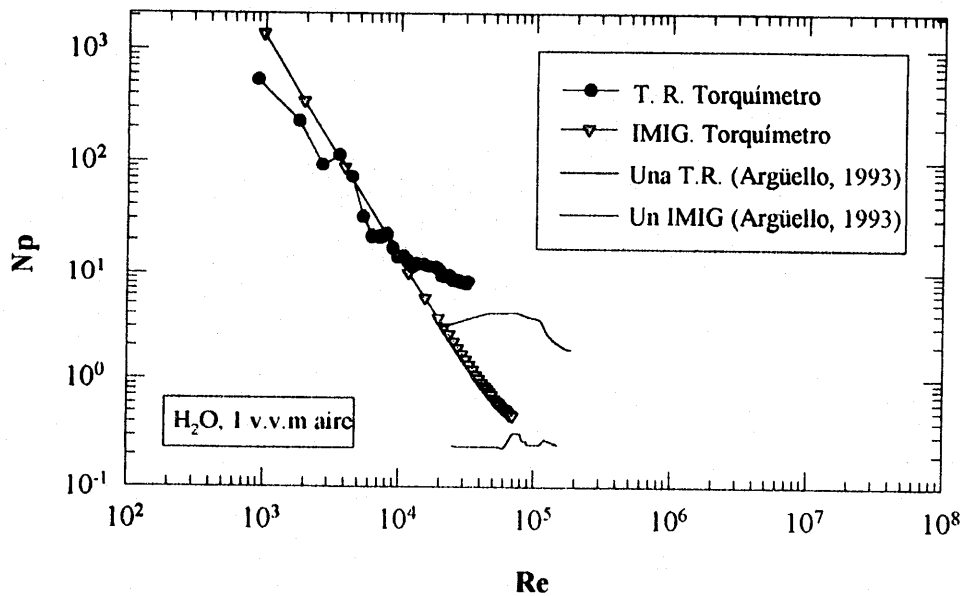
Se realizaron ensayos de potencia entregada al fluido como función de la velocidad de agitación para sistemas de tres turbinas Rushton (TR) y tres impulsores InterMIG (IMIG) en agua, con un flujo de aire de 1 v.v.m. tanto en el torquímetro, como en un dinamómetro (Reséndiz *et al.*, 1991) disponible en la planta piloto del Instituto de Biotecnología. Los ensayos se realizaron con el fin de determinar la velocidad de agitación adecuada para entregar la misma potencia volumétrica con TR y con IMIG. La temperatura se mantuvo en promedio en 20 °C. Para cada velocidad de agitación se tomaron 10 lecturas y se promediaron. Los resultados se muestran en las **Figuras 5.27 y 5.28**. La desviación estándar en dichas figuras es de menor tamaño que los símbolos, por lo cual no se pueden apreciar. El intervalo de velocidad de agitación para las turbinas Rushton se limitó, a propósito, a un intervalo de 3.33 a 3.5 r.p.s. (200 a 210 r.p.m.) debido a que la velocidad de agitación para los ensayos de fermentación se mantuvo siempre fija en 3.33 r.p.s. (200 r.p.m.). La potencia en el torquímetro se calculó de acuerdo con la **ecuación 4.2**. La potencia en vacío varió cada vez que el fermentador fue instalado en el torquímetro debido a que la alineación de los ejes de giro fue realizada manualmente, así como a variaciones en el rozamiento generado por el sello mecánico de cada jarra. Por este motivo, el consumo de potencia en vacío fue determinado cada vez que se realizó un cambio de jarra. Los datos presentados en las **Figuras 5.27 y 5.28** corresponden a la potencia efectivamente entregada al fluido. Como se aprecia en las figuras, no hay un acuerdo absoluto entre las dos curvas: a la misma velocidad de agitación, la potencia leída por el torquímetro fue siempre mayor a la leída por el dinamómetro; posteriormente a la conclusión del trabajo se logró determinar que el dinamómetro se encontraba descalibrado, mientras que los datos del torquímetro fueron correctos. Desafortunadamente, la potencia de las TR fue determinada originalmente con el dinamómetro (0.056 Watt/L para 200 r.p.m.), por lo que la velocidad de agitación tanto para InterMIG como para el impulsor helicoidal IH3 fue determinada para entregar esta potencia, resultando en 3.5 r.p.s (205 r.p.m.) y 0.983 r.p.s. (59 r.p.m.) respectivamente. Este error instrumental causó que la potencia inicial entregada a los caldos con TR fuese 0.0894 Watt/L en lugar de 0.056 Watt, o sea un 60% mayor que con los otros dispositivos, aunque aún sigue siendo un valor extremadamente pequeño comparado con los 2.5 Watt/L que se entregan comúnmente en la industria.

De la **Figura 5.27** es posible observar que para TR por debajo de 2.5 r.p.s. (150 r.p.m.) la potencia entregada al agua es menor que con los impulsores InterMIG, a pesar de tener un número de potencia mucho mayor. Esto se debe muy probablemente a que la caída en la potencia gaseada es mucho mayor para la turbina Rushton que para el impulsor InterMIG, lo cual parece verse confirmado por el hecho de que, al aumentar la velocidad de agitación al mismo caudal, se disminuye el número de aireación, por lo cual la caída en potencia se disminuye y la potencia efectivamente entregada al fluido vuelve a ser mayor en el caso de TR. Durante la toma de los datos fue posible observar inestabilidades en forma de variaciones aleatorias en la lectura de potencia para TR, particularmente a bajas





**Figura 5.27.** Determinación del consumo de potencia en agua para sistemas con 3 turbinas Rushton (T.R.) y 3 impulsores InterMIG (IMIG), utilizando dos sistemas de medición de consumo de potencia. 1 V.V.M.



**Figura 5.28.** Curva adimensional de consumo de potencia en agua para impulsores triples 1 v.v.m.

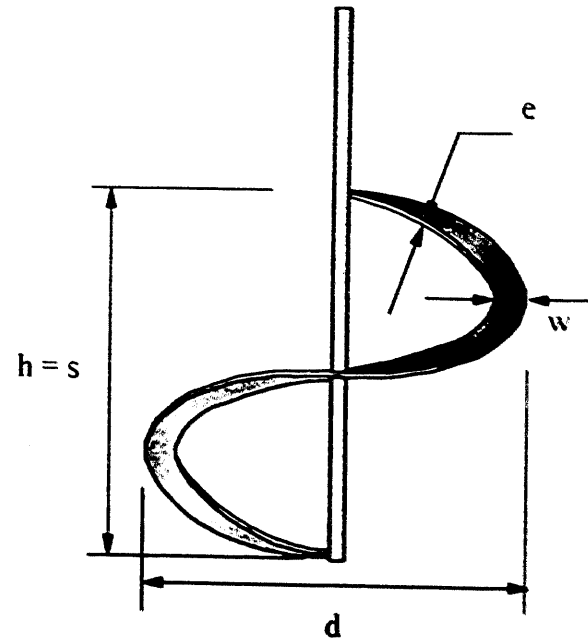
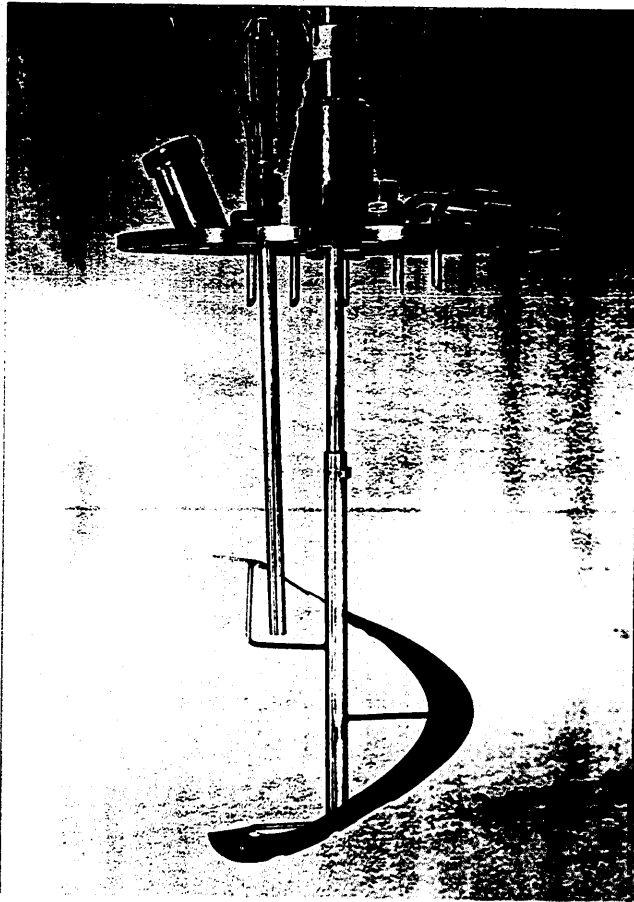
velocidades de agitación. Esto se ve reflejado en la **Figura 5.28**, en donde es posible observar que la curva del número de potencia es mucho menos irregular para el caso de IMIG, probablemente debido a que el ascenso de las burbujas afecta mucho más a la TR por tener mayor superficie horizontal expuesta al gas, comparada con el impulsor IMIG.

La tendencia de la curva generada para 3 IMIG y 3 TR parece ser diferente a la reportada por Argüello (1993) para impulsores individuales (**Figura 5.28**); aparentemente el valor de  $N_p$  para  $Re > 2 \cdot 10^4$  permanece estable para los 2 tipos de impulsores cuando se usan individualmente mientras que la estabilización del  $N_p$  aún no es evidente cuando se usan impulsores múltiples en la zona mencionada. Desafortunadamente, los intervalos de  $Re$  reportados por Argüello son diferentes a los utilizados para la evaluación del torquímetro en el presente trabajo, por lo que la comparación se basará en los valores de  $Re$  utilizados experimentalmente en las fermentaciones. A  $Re = 1.8 \cdot 10^4$  se encontraron valores del  $N_p$  de 11.5 para TR, mientras que para IMIG, a  $Re = 4 \cdot 10^4$ , el valor de  $N_p$  fue de 0.98. Argüello reporta que el  $N_p$  no gaseado a los mismos valores de  $Re$  para un solo impulsor TR es de 4.8 y para IMIG 0.53, mientras que con aire a 1 v.v.m estos valores caen a 3.0 y 0.24, respectivamente. Si los 3 impulsores se comportaran idéntica e independientemente, la potencia aireada de 3 impulsores debería ser 3 veces la potencia aireada de 1 solo impulsor, y por tanto  $N_{p(3 \text{ impulsores})}/N_{p(1 \text{ impulsor})}$  debería ser 3. En el caso de TR esta relación es de 3.83 y para IMIG es de 4.08. Este resultado indica que la aireación afecta en menor grado la potencia entregada al fluido para sistemas de múltiples impulsores que para sistemas de un solo impulsor, probablemente debido a que los impulsores superiores reciben menor cantidad de gas que el inferior, puesto que éste se ha encargado de realizar una dispersión parcial del gas en el medio líquido. Para trabajos posteriores, sería interesante comparar estos resultados con los obtenidos para impulsores duales y analizar si las potencias para el segundo y tercer impulsor se ven afectadas igualmente por la aireación.

### 5.2.3 Impulsor helicoidal IH3

Uno de los objetivos principales del presente trabajo consistió en evaluar el comportamiento de fermentaciones de *T. harzianum* a nivel de 10 L, utilizando diferentes impulsores, entre ellos un impulsor helicoidal. Para este fin se construyó un impulsor de tal tipo, que se denominó IH3 y cuyas características geométricas se presentan en las **Figuras 4.1 y 5.29**.

Flores (1995) señala que los caldos de cultivo de *Trichoderma* tienen propiedades reológicas que cambian desde muy similares a las del agua, hasta suspensiones pseudoplásticas de alta viscosidad con punto de cedencia aparente. Desafortunadamente, los fluidos señalados en la **Tabla 4.2** no pudieron ser empleados para la calibración del impulsor IH3 debido a que la escala de este último dispositivo (10 L) obligaba a un gasto elevado de goma xantana y CMC para preparar las soluciones de calibración. Por este motivo, y teniendo en cuenta la disponibilidad de reactivos en la Planta Piloto del Instituto de Biotecnología, para la caracterización del impulsor IH3 se seleccionaron los fluidos que se listan en la **Tabla 5.14**. Las propiedades reológicas de los fluidos de calibración pseudoplásticos (C4 a C6) fueron muy bien modeladas por la ley de la potencia (ver **Figura 5.30**). Los parámetros del modelo de la ley de la potencia se presentan en la **Tabla 5.15**.



d	w	h	e	da	NR	Na	b
190.0	30.7	195	1.2	2.6	1	3	20

Dimensiones en mm.

Na: Número de varillas de sostén.

da: Diámetro de las varillas de sostén.

NR: Número de listones helicoidales

b: Distancia del extremo inferior del impulsor al fondo del tanque

Figura. 5.29 Características geométricas del impulsor helicoidal IH3.

Resultados y discusión

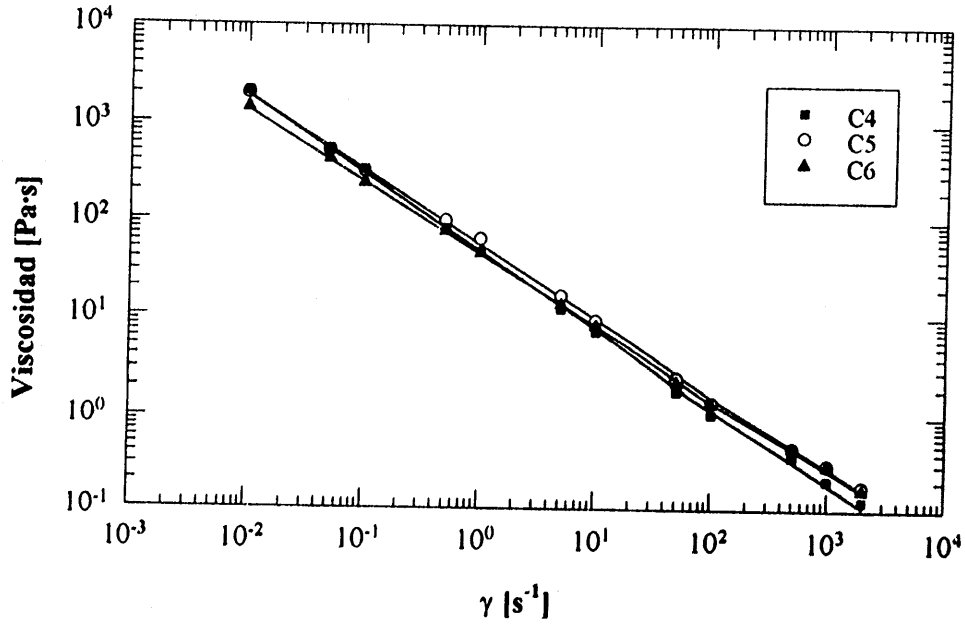


Figura 5.30 Reograma de los fluidos de calibración para el impulsor IH3. Dispositivo DIN-114.

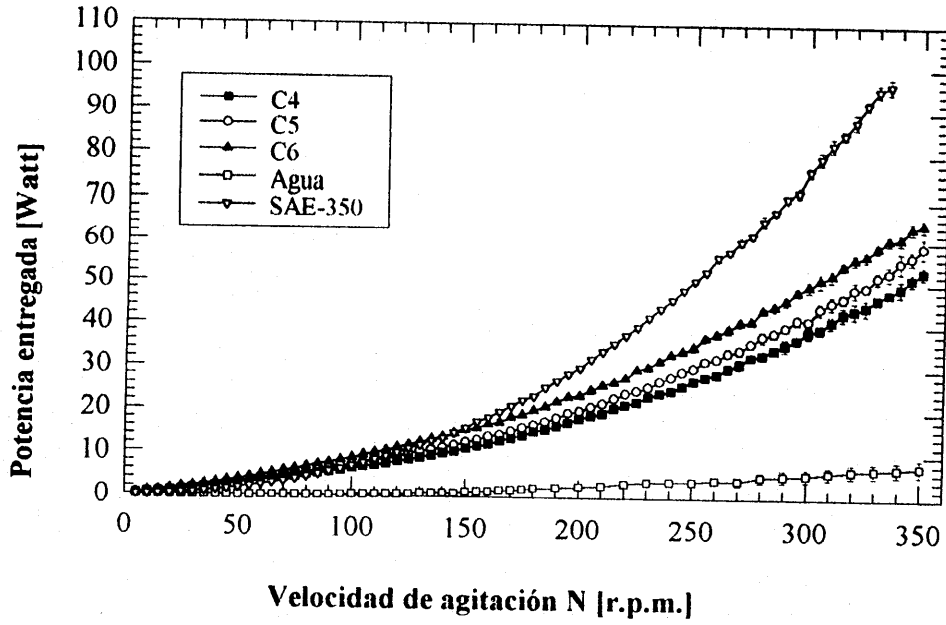


Figura 5.31 Resultados de calibración con diferentes fluidos. Impulsor helicoidal IH3.

**Tabla 5.14** Propiedades físicas de los fluidos de caracterización del impulsor IH3.

Denominación	Componente	Concentración [Kg·m <sup>-3</sup> ]	Comportam. Reológico	Densidad (25°C) [Kg·m <sup>-3</sup> ]
SAE-350	Aceite mineral	-	Newtoniano	919
C4	Carbopol pH 4.73	2.5	Pseudoplástico	999
C5	Carbopol pH 5.20	2.5	Pseudoplástico	999
C6	Carbopol pH 5.97	2.5	Pseudoplástico	999

El procedimiento seguido fue similar al utilizado para la caracterización del impulsor IH2: se tomaron mediciones de torque como función de la velocidad de agitación para los fluidos correspondientes. El torque se convirtió a potencia utilizando la ecuación 4.2. Los resultados de estos ensayos se muestran en la **Figura 5.31**. Es interesante notar como, para fluidos de propiedades reológicas tan similares como C4, C5 y C6, es posible apreciar diferencias importantes en la potencia entregada por el impulsor IH3 a cada uno de ellos, probablemente debido a sus altos valores del índice de consistencia, K. Sin embargo, para fluidos de baja viscosidad a muy bajas velocidades de agitación, la potencia perdida por rozamiento en los sellos y rodamientos es muy similar a la entregada y están cerca del límite de detección del torquímetro. En consecuencia estas lecturas hechas en tales condiciones deberían tomarse con cuidado. Como fue imposible eliminar los sellos mecánicos por la necesidad de mantener esterilidad en las fermentaciones, el torquímetro se ve limitado para desarrollar mediciones precisas a baja velocidad de agitación. Cualquier mejora adicional que se haga en el diseño de un sello con menor rozamiento permitirá incrementar apreciablemente la precisión de los datos en las condiciones mencionadas.

Los datos de potencia como función de la velocidad se dibujan nuevamente en la **Figura 5.32** pero en escala logarítmica, con el fin de seleccionar los datos adecuados para el análisis de flujo en la zona laminar. En esta figura se aprecia que las curvas para todos los fluidos, excepto el agua, tienen pendientes menores que 2, indicativo de estar en la región laminar de flujo, por lo menos a bajas velocidades de agitación. La **Figura 5.33** muestra una representación del número de potencia ( $N_p$ ) como función de  $Re_{pi}$ . Se aprecia en dicha figura que los datos para agua efectivamente se encuentran en la zona de flujo turbulento, con un valor aproximadamente constante de  $N_p$  de 0.4. Los datos para el fluido Newtoniano SAE-350 y para los fluidos pseudoplásticos siguen el mismo comportamiento encontrado para el impulsor IH2: para  $Re_{pi}$  bajos, el valor del  $N_p$  es inversamente proporcional a  $Re_{pi}$ ; igualmente, los valores de la constante de proporcionalidad dependen de las características reológicas del fluido en cuestión, disminuyendo apreciablemente a medida que el índice de flujo disminuye, tal como se señala en la **Tabla 5.15**.

**Tabla 5.15** Valores obtenidos de  $K_p$  para los diferentes fluidos utilizados como función del índice de flujo. Impulsor helicoidal IH3.

Fluido	$\rho$ [ $\text{Kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ]	$K$ [ $\text{Pa}\cdot\text{s}^n$ ]	$n$ [-]	Intervalo [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_p(n)$ [-]
SAE-350	919	2.598	1.00	$0.01 \leq \dot{\gamma} \leq 2000$	141.72
C4	999	48.555	0.200	$0.01 \leq \dot{\gamma} \leq 2000$	10.718
C5	999	55.957	0.234	$0.01 \leq \dot{\gamma} \leq 2000$	10.6497
C6	999	45.048	0.260	$0.01 \leq \dot{\gamma} \leq 2000$	16.086

Para analizar los resultados de la caracterización del impulsor IH3, se realizó una comparación con los resultados obtenidos por Brito-De la Fuente (1992) con un impulsor muy similar al utilizado en este trabajo. Las características geométricas de dicho impulsor (denominado HR-1B por el autor) se señalan en la **Tabla 5.16**. Como se aprecia en dicha tabla, las relaciones geométricas de los dos trabajos son muy similares entre sí, por lo que sería de esperar que los resultados de la caracterización también lo sean. El valor de  $K_p$  para fluidos Newtonianos obtenido por Brito-De la Fuente corresponde a 135.2 para  $Re < 10$ , valor muy similar al encontrado en este trabajo, aunque con un intervalo ligeramente mayor ( $Re < 30$ ). El incremento en el valor de  $K_p$  podría explicarse por la ligera reducción en la relación  $D/d$ , así como en un incremento en la potencia entregada debido a que durante las pruebas se incluyeron dos (2) electrodos de oxígeno disuelto para simular los electrodos de O.D. y pH, a efectos de asemejarse en la medida de lo posible a las condiciones de fermentación. Este par de electrodos actuaron como deflectores, incrementando ligeramente el valor de la potencia entregada por el impulsor al líquido.

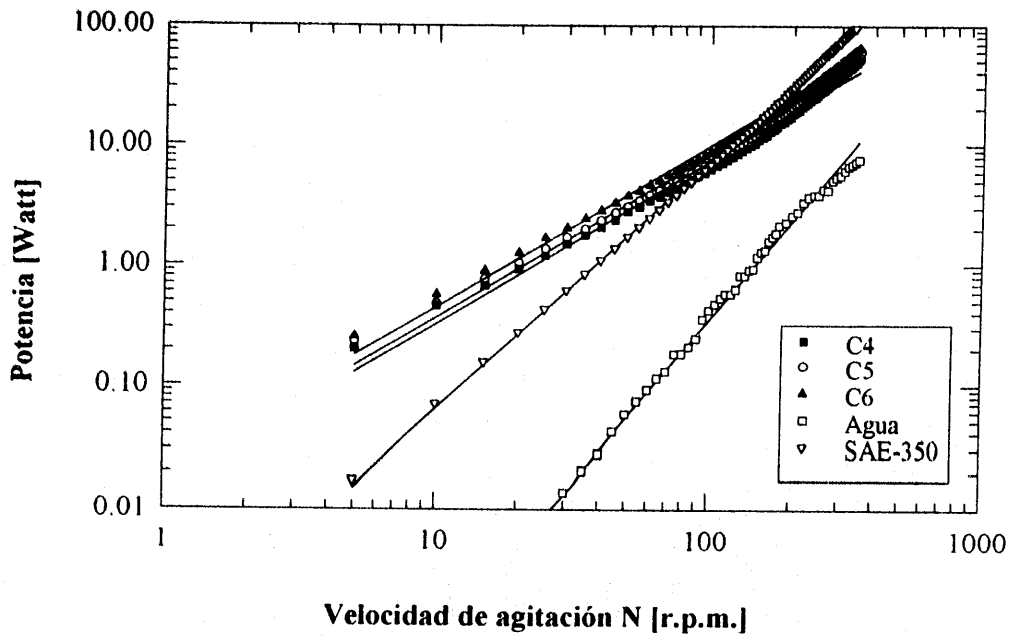
**Tabla 5.16** Características geométricas de los impulsores IH3 y HR-1B<sup>†</sup>.

Impulsor	Relación geométrica				
	$D/d$	$s/d = h/d$	$w/d$	$b/d$	$Na$
HR-1B	1.135	1	0.162	0.1460	3
IH3	1.1105	1.026	0.1616	0.1053	3

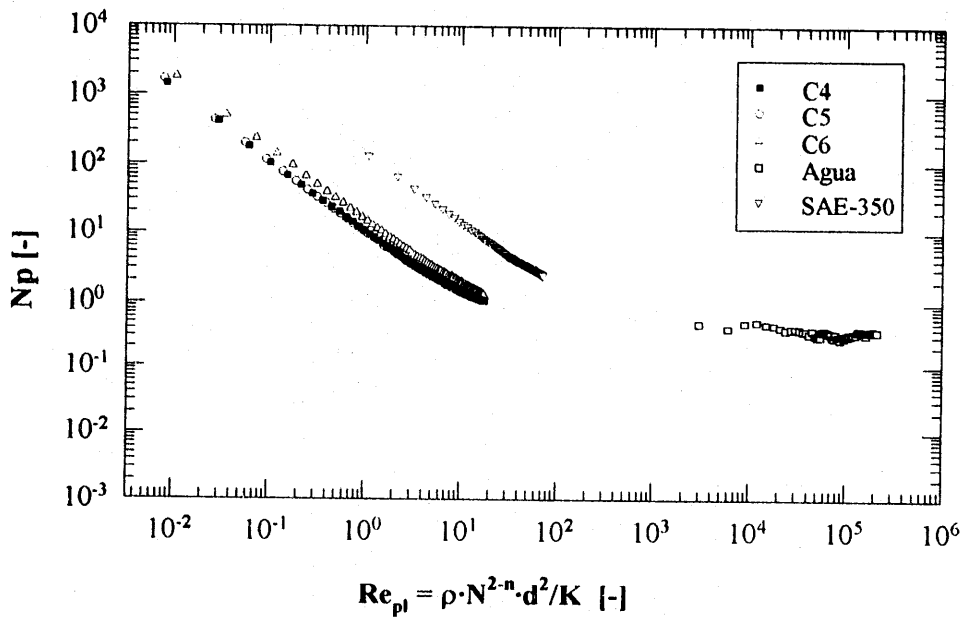
<sup>†</sup>: Brito-De la Fuente (1992).

En la **Figura 5.34** se presentan los datos experimentales de  $K_p(n)$  como función del índice de flujo. En la misma figura se representan los datos encontrados por Brito-De la Fuente con el impulsor HR-1B así como la correlación desarrollada por el mismo autor. Como se aprecia en dicha figura, la correspondencia entre los datos de este trabajo y los de Brito-De la Fuente es excelente. Con base en este hecho, aunque en este trabajo no se utilizaron fluidos con valores intermedios del índice de flujo para ajustar una correlación propia para este impulsor, es razonable suponer que el comportamiento con valores intermedios del índice de flujo también es similar.

En algún momento durante el desarrollo del proyecto se pensó en utilizar el impulsor helicoidal IH3 para desarrollar las mismas funciones que el IH2, es decir, utilizarlo como



**Figura 5.32** Potencia consumida por los diferentes fluidos de calibración como función de la velocidad de agitación. Resultados para el impulsor IH3.



**Figura 5.33** Curva de potencia consumida para los diferentes fluidos de calibración. Resultados para el impulsor IH3.

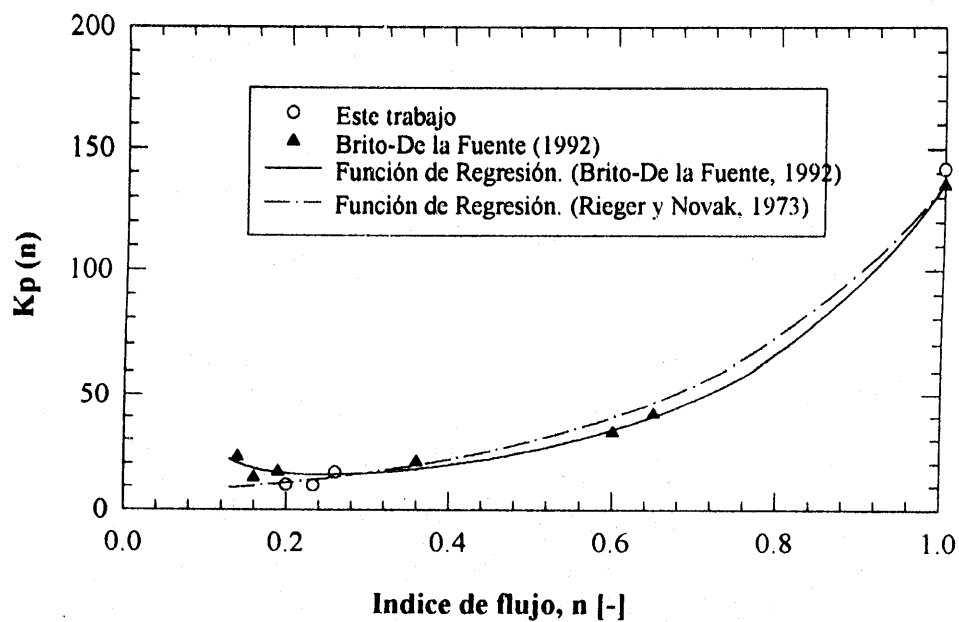


Figura 5.34 Valores de  $K_p$  como función del índice de flujo,  $n$ . Impulsor IH3

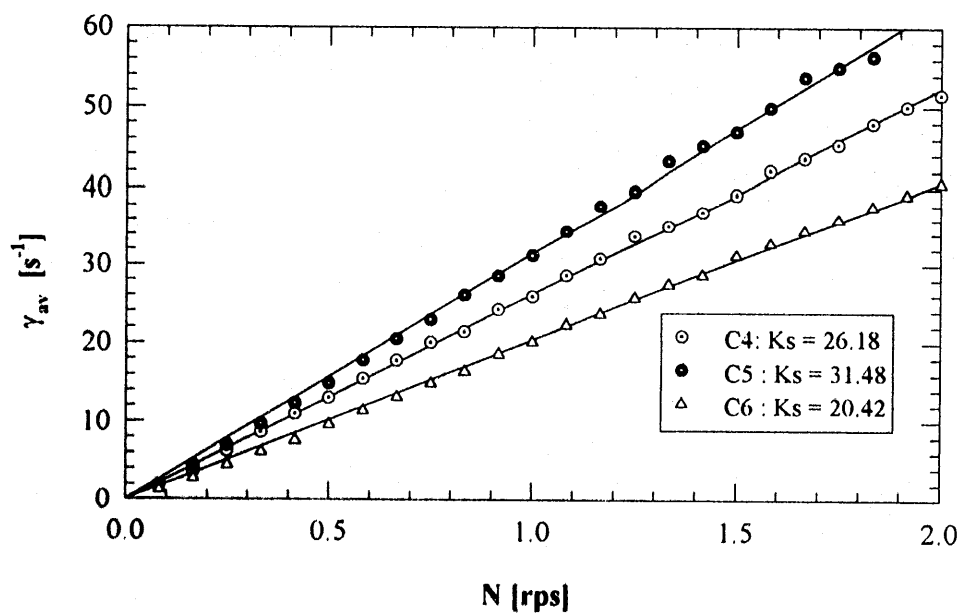


Figura 5.35  $\gamma_{av}$  calculado como función de la velocidad de agitación. Cálculo de la constante  $K_s$ . Impulsor IH3.



reómetro para determinar - en línea - las propiedades del caldo de fermentación. El caldo inicial tiene características similares a las del agua, por lo que el impulsor estará operando en régimen turbulento y no sería válido utilizarlo para determinar la viscosidad del caldo. A medida que transcurre el tiempo de fermentación, la viscosidad del caldo aumenta, pero aún así sería necesario operarlo a velocidades de rotación muy bajas; dado que el dispositivo de regulación de velocidad es inoperable por debajo de 5 r.p.m., la operación del torquímetro como reómetro sería imprecisa tanto por la velocidad de agitación, como por los datos de torque obtenidos, por lo que, desafortunadamente, la idea tuvo que ser desechada para este tipo de caldos, aunque para caldos más viscosos (como los de goma Xantana) podría ser viable.

Los valores de  $K_p(n)$  obtenidos se utilizaron para calcular el valor de  $K_s$  por el método de Rieger y Novak y se compararon con los obtenidos experimentalmente por el método de Metzner y Otto (**Figura 5.35**), siguiendo la misma metodología que ya se explicó para el impulsor IH2. Los resultados de los cálculos se presentan en la **Tabla 5.17** y en la **Figura 5.36**. Como se aprecia en esta figura, el ajuste de los datos al modelo de Brito-De la Fuente para valores de índice de flujo bajos es menos satisfactorio. La tendencia de los datos pareciera indicar que el valor de  $K_s$  es aproximadamente constante aún para índices de flujo tan bajos como 0.2, lo cual correspondería con los resultados de Rieger y Novak, pero estaría en desacuerdo con el modelo desarrollado por Brito-De la Fuente (1992). En el presente trabajo el ajuste es aproximado, en virtud de que no se experimentó con todo el intervalo de índices de flujo, por lo que no existe manera de resolver entre uno u otro modelos. Se recomienda un mayor trabajo en este sentido para completar la caracterización de este impulsor en la zona de flujo laminar.

**Tabla 5.17** Constante  $K_s$  para el impulsor IH3 con los fluidos de calibración.

Fluido	n	$K_s$ (Rieger y Novak)	$K_s$ (Metzner y Otto)	Diferencia %
C4	0.2003	25.24	26.18	3.6
C5	0.2336	29.29	31.48	7.0
C6	0.2598	18.91	20.42	7.4

Los valores de  $K_s$  obtenidos con el método de Rieger y Novak corresponden bastante bien con los valores calculados por el método de Metzner y Otto. Debe recalarse que los métodos son completamente independientes, por lo que los resultados obtenidos no necesariamente tienen que ser concordantes. En forma idéntica a como sucedió con el impulsor IH2, los valores de  $K_s$  calculados por el método de Rieger y Novak son sistemáticamente menores que los del método de Metzner y Otto, aunque la razón de este comportamiento no aparece clara.

Finalmente, en la **Figura 5.37** se representaron los datos de número de potencia como función del número de Reynolds aparente,  $Re_a$ , el cual se calculó utilizando los valores de  $K_s$  obtenidos por el método de Rieger y Novak. Como puede apreciarse, en forma similar al impulsor IH2, los datos se colapsan en una sola curva; sin embargo, el rango de  $Re_a$  para el

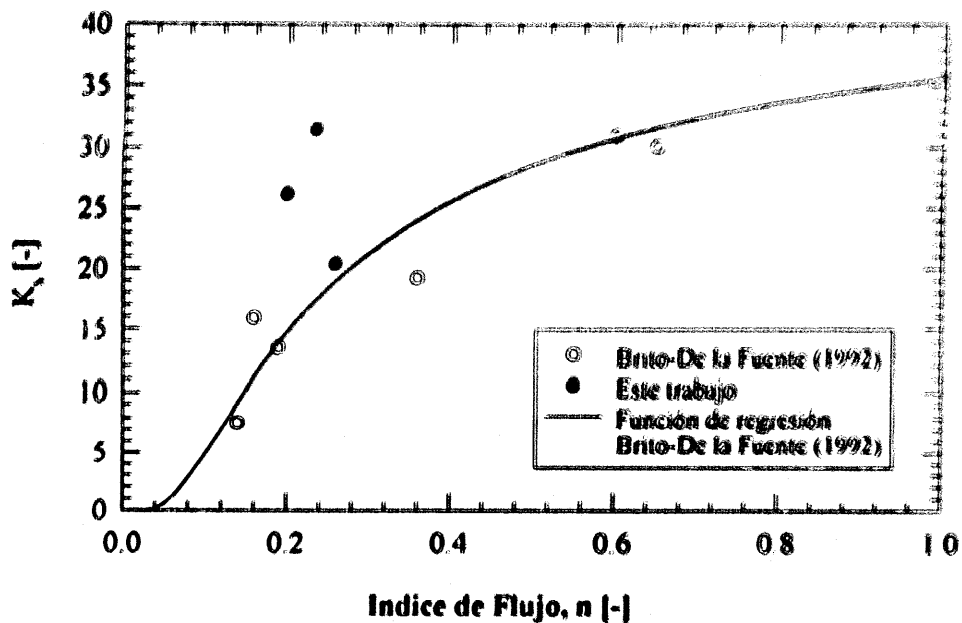


Figura 5.36  $K_s$  como una función del índice de flujo para los fluidos utilizados. Resultados para el impulsor IH3.

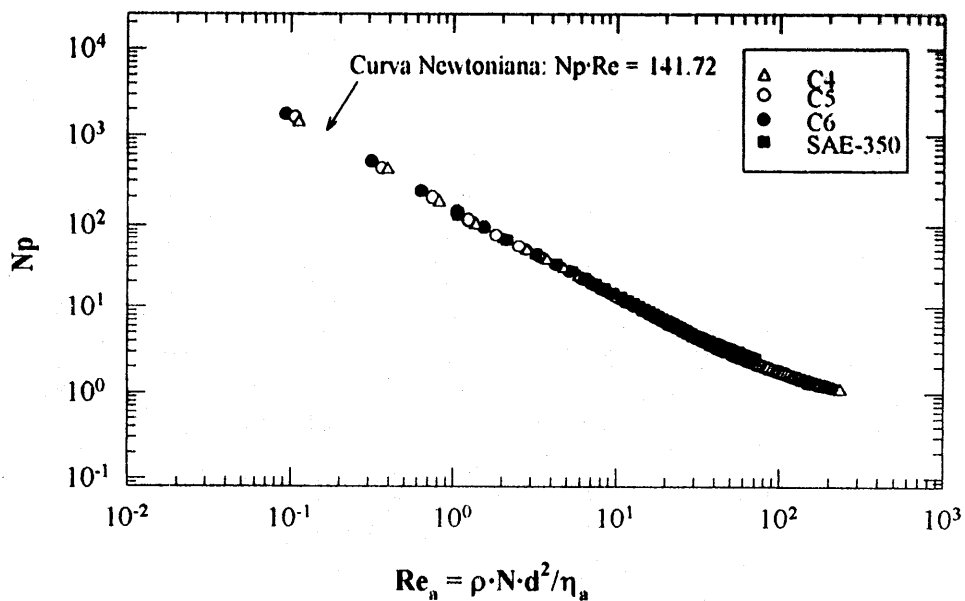


Figura 5.37 Curva generalizada de consumo de potencia para los fluidos utilizados en este estudio. Resultados para el impulsor IH3.

cual el flujo es laminar se extiende únicamente hasta 30 - 50 y no hasta 100 como señala Brito-De la Fuente, lo cual puede deberse nuevamente a la interrupción de flujo causada por los electrodos actuando como deflectores.

#### 5.2.4 Conclusiones

Se montó exitosamente el sistema de medición de potencia en línea (torquímetro) en fermentadores de 10 litros de volumen útil. La inclusión de un milivoltímetro para la toma de datos permitió incrementar 33 veces la precisión en las medidas. El sistema es capaz de detectar torques hasta un máximo de 2.82 N·m, con una resolución de 0.0226 N·m. Dado que la resolución del tacómetro es de 1 r.p.m., el sistema es capaz de detectar diferencias de 0.00237 Watt en la potencia entregada al sistema. Desafortunadamente, la potencia perdida por fricción cambia cada vez que se utiliza el sistema, debido a que la alineación de la flecha con el torquímetro debe ser ajustada manualmente. Cualquier leve desalineación generará un torque adicional que será medido por el torquímetro. Adicionalmente, cada jarra tiene su propio sello mecánico y rodamientos, por lo que el rozamiento en vacío variará para cada jarra. Por tal motivo es necesario determinar la potencia perdida por fricción experimentalmente en cada ocasión, desocupando el fermentador a través de la llave de toma de muestras, una vez que se haya terminado el proceso de fermentación.

Se determinó la potencia inicial de trabajo con 3 TR y 3 IMIG. En ambos casos, la potencia entregada fue mayor que el triple de la potencia entregada por un solo impulsor en condiciones gaseadas, indicativo de que la aireación tuvo menor influencia sobre el segundo y tercer impulsores que sobre el impulsor del fondo. Por una descalibración en un equipo previamente existente, la potencia entregada por la TR correspondió a 0.0894 Watt/L, valor 60% mayor que el entregado por los impulsores IMIG. Ambos valores son, sin embargo, extremadamente bajos comparados con las potencias por unidad de volumen entregada a nivel industrial que se consideran típicas (0.5 - 3 Watt/L).

Se construyó un impulsor helicoidal para desarrollar con él fermentaciones a nivel de 10 litros. La caracterización de dicho impulsor (IH3) se llevó a cabo parcialmente; pese a ello, los resultados muestran excelente concordancia con los datos reportados por Brito-De la Fuente (1992), lo cual no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que el impulsor fue construido con base en el trabajado por dicho autor. Las pequeñas desviaciones encontradas se atribuyen a variaciones en la configuración geométrica de la jarra (algunas variaciones en las relaciones geométricas y la presencia de electrodos que actuaron como deflectores en las mediciones).

### 5.3 EFECTO DEL TIPO DE IMPULSOR SOBRE EL CRECIMIENTO, LA REOLOGIA Y LA PRODUCCION DE AROMAS POR *Trichoderma harzianum*

En esta sección se presentan los resultados de una serie de fermentaciones de *Trichoderma harzianum* en medio con aceite de ricino, llevadas a cabo con los tres tipos de impulsores señalados en la sección 4.4. Se determinó el efecto del tipo de impulsor sobre el crecimiento y producción de aromas por *Trichoderma*, así como cambios morfológicos y

## Resultados y discusión

reológicos en el transcurso de los cultivos. Dado que no existe información disponible sobre los efectos de la agitación sobre cultivos de *T. harzianum*, los resultados se comparan con los obtenidos para otro tipo de cultivos en la literatura.

### 5.3.1 Efecto del tipo de impulsor sobre el crecimiento y producción de aromas por *T. harzianum*

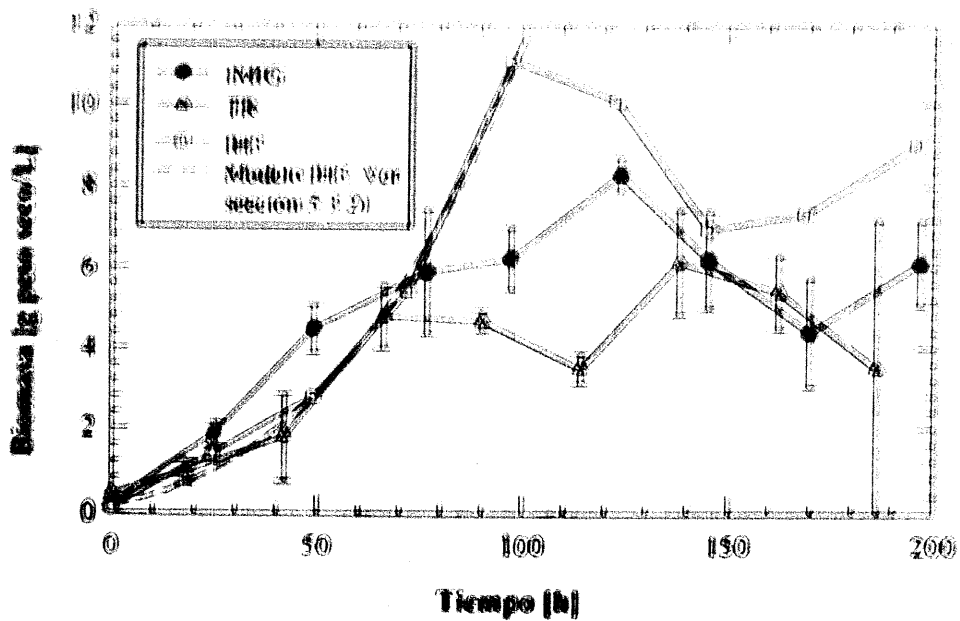
Las Figuras 5.38 a 5.40 muestran los resultados de utilizar diferentes configuraciones de impulsor en los cultivos con *Trichoderma harzianum* manteniendo potencias volumétricas iguales. La evolución de la biomasa en los tres cultivos (Figura 5.38.a) fue diferente, dependiendo del tipo de impulsor utilizado. El micelio inicialmente creció con una tendencia exponencial hasta un valor máximo, llegando a una fase estacionaria claramente definida entre las 50 y 60 horas de cultivo (Figura 5.38.b). Tanto la biomasa como la velocidad específica de crecimiento máximas mostraron variaciones importantes en los tres tipos de fermentaciones, como puede apreciarse en la Tabla 5.18.

Tabla 5.18. Valores máximos de las cinéticas de cultivo de *Trichoderma harzianum*.

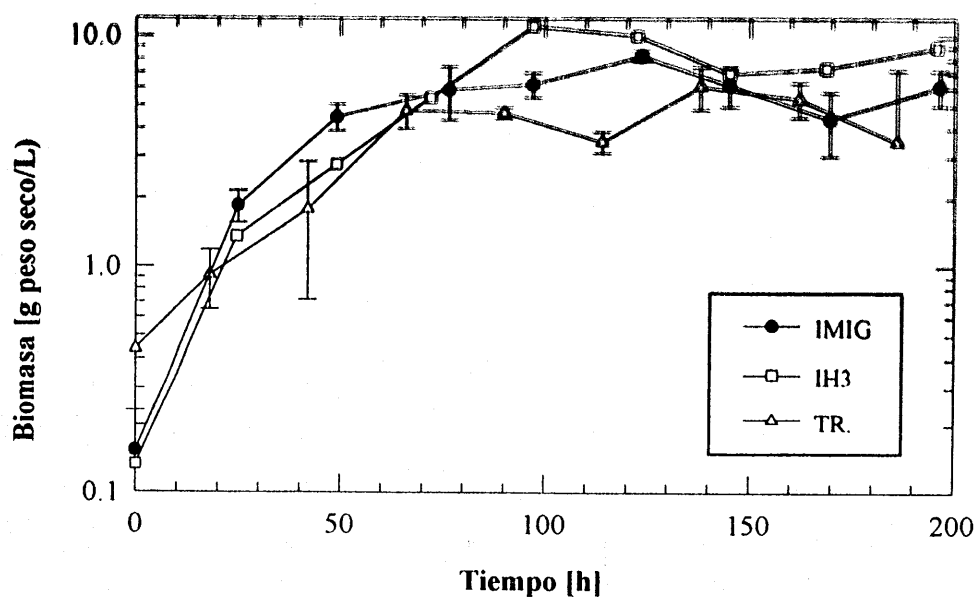
Impulsor	$\mu_{max}$ [h <sup>-1</sup> ]	Biomasa [g/L peso seco]	Aroma [mg $\gamma$ -decalactona /L]
TR	0.0153	6.13	196.5
IMIG	0.043	8.30	130.9
IH3	0.041	11.08	57.1

En la figura 5.38.b se aprecian diferencias en el inóculo entre las fermentaciones con TR y las demás fermentaciones. Dado que todos los inóculos se prepararon de la misma forma, es probable que las diferencias detectadas sean originadas por la toma de muestra: debido a la baja concentración del micelio en ese momento, es muy probable que la presencia de cualquier pequeño cambio en la cantidad de micelio en las muestras origine un cambio muy importante en la concentración celular. Es interesante notar que aunque los datos señalan que aparentemente la TR tuvo la mayor concentración de biomasa en el tiempo de inoculación, la velocidad de crecimiento fue la menor y lo mismo sucedió con la cantidad de biomasa total, comparado con los otros 2 impulsores. Este fenómeno no puede ser explicado por problemas de baja concentración de sustrato, puesto que la cantidad del mismo se encontraba en gran exceso; es posible que esta disminución en la velocidad de crecimiento pueda deberse al efecto de esfuerzos mecánicos generados por el impulsor dentro del reactor.

El crecimiento del hongo estuvo asociado a una caída de la TOD debido al consumo de oxígeno por parte del microorganismo (Figura 5.39). El final de la fase de crecimiento coincidió con la caída de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) por debajo del 10% de saturación con aire. Esta caída de TOD fue más pronunciada con los impulsores InterMIG, debido probablemente a la mayor biomasa y velocidad de crecimiento comparada con los cultivos de TR, ya que la capacidad de dispersión de oxígeno en el cultivo para ambos tipos de impulsor parece ser muy similar (Dawson, 1990).



(a)



(b)

Figura 5.38 Perfiles de biomasa de cultivos de *T. harzianum* utilizando diferentes impulsores. (a) Escala lineal. (b) Escala logarítmica.

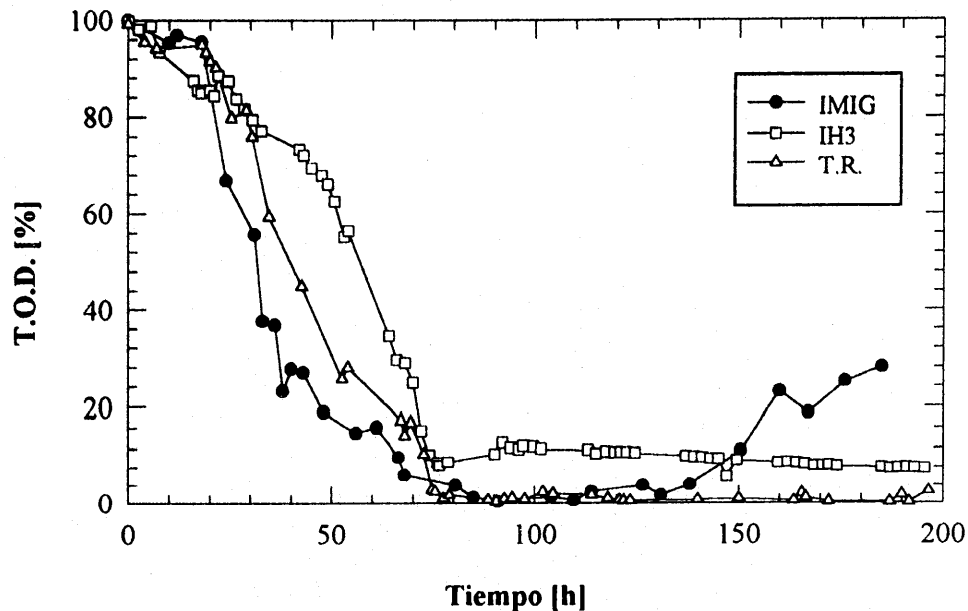


Figura 5.39 Evolución de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) durante cultivos desarrollados con diferentes tipos de impulsor.

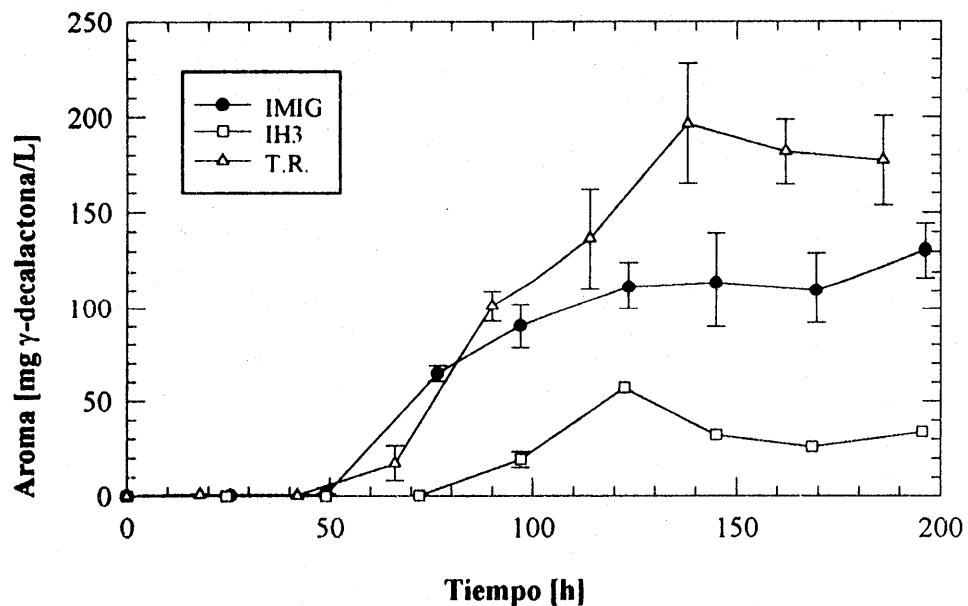


Figure 5.40 Perfiles de producción de aroma en los cultivos de *T. harzianum* utilizando diferentes tipos de impulsores.

Es interesante notar que los cultivos con el impulsor IH3 presentaron los mayores valores de la TOD y de la biomasa. El tercer objetivo específico de este trabajo involucraba medir el efecto del impulsor sobre los cultivos y no el efecto de la tensión de oxígeno disuelto en los mismos. *Por lo tanto, estrictamente hablando, hubiese sido necesario montar un sistema experimental que permitiese mantener la TOD constante en todos los cultivos.* Dado que esto estuvo más allá de las posibilidades del proyecto, se decidió realizar las fermentaciones en condiciones tales que los  $k_{L,a}$  de los diferentes fermentadores fuesen lo más similares posible. Durante la construcción del fermentador para el impulsor helicoidal se partió del supuesto de obtener bajos  $k_{L,a}$ , con base en la limitada capacidad de dispersión de gas de este tipo de impulsor. Reportes de la literatura demuestran que la capacidad de transferencia de masa durante aireación de fluidos Newtonianos y no-Newtonianos de baja viscosidad con este tipo de impulsor a bajas velocidades de agitación, depende casi exclusivamente de la capacidad de burbujeo de gas del difusor, ya que el impulsor helicoidal ejerce poco o ningún efecto sobre la dispersión y ruptura de las burbujas (Tecante, 1991; Tecante *et al.*, 1991; Tecante y Choplin, 1993). Incluso, a bajas velocidades de agitación se puede promover la coalescencia de las burbujas, disminuyendo el valor efectivo del  $k_{L,a}$ . Utilizando los resultados del trabajo de Tecante (1991) se calculó el coeficiente de transferencia de oxígeno que tendría el fermentador con el IH3 en agua, utilizando las mismas condiciones de fermentación de TR (0.056 W/L y 1 v.v.m.), obteniéndose un valor de  $32.9 \text{ h}^{-1}$ . Este valor era aproximadamente la mitad del  $k_{L,a}$  medido en agua durante el desarrollo de este trabajo por técnica dinámica en fermentadores con TR ( $53.6 \text{ h}^{-1}$ ). Era probable que el valor obtenido con el IH3 fuese menor debido a que el difusor utilizado por Tecante (1991) fue de tipo anillo, el cual da una distribución de las burbujas más uniforme que cuando se usa un difusor de punto. En vista de que las fermentaciones ya realizadas con TR indicaban una gran demanda de oxígeno por parte del microorganismo, para mejorar las condiciones de transferencia del fermentador helicoidal en este trabajo, se decidió cambiar el sistema de difusor de punto de 1 mm de diámetro de las jarras con TR e IMIG colocado 0.5 cm bajo el impulsor del fondo, por un sistema de diseño propio consistente en cuatro cilindros de acero inoxidable sinterizado de  $2 \mu\text{m}$  de diámetro promedio de poro, colocados en cruz con ángulos de  $90^\circ$ , como se mostró en la **Figura 4.1**. En este caso, la calidad de dispersión de aire y el tamaño de las burbujas fueron visualmente mejores que los obtenidos con TR e IMIG, resultando en mayores TOD y, consecuentemente, mayores concentraciones de biomasa durante el cultivo, comparado con las configuraciones de TR e IMIG. Debe señalarse que la hidrodinámica del cultivo conducido con IH3 fue visualmente más semejante a la de un fermentador de columna de burbujeo que a la de un fermentador agitado mecánicamente. En tales condiciones, la principal influencia del impulsor helicoidal parece residir en la dispersión de la fase orgánica (aceite de ricino) y en un excelente mezclado del caldo de cultivo.

Para comparar la transferencia de oxígeno durante los cultivos, se hicieron algunas mediciones del coeficiente de transferencia de oxígeno  $k_{L,a}$  en los 3 fermentadores, utilizando el método del balance. Los resultados se presentan en la **Tabla 5.19**. Como se puede apreciar en dicha tabla, los valores de  $k_{L,a}$  fueron muy similares para IMIG y TR, mientras que el valor obtenido con el IH3 se incrementó muy significativamente a un valor algo mayor del doble de lo obtenido con los otros dos impulsores, lo que demuestra la **eficiencia del difusor en la dispersión de aire**. Desafortunadamente, es muy probable que la **mejora en la transferencia de oxígeno** haya podido influenciar fuertemente el

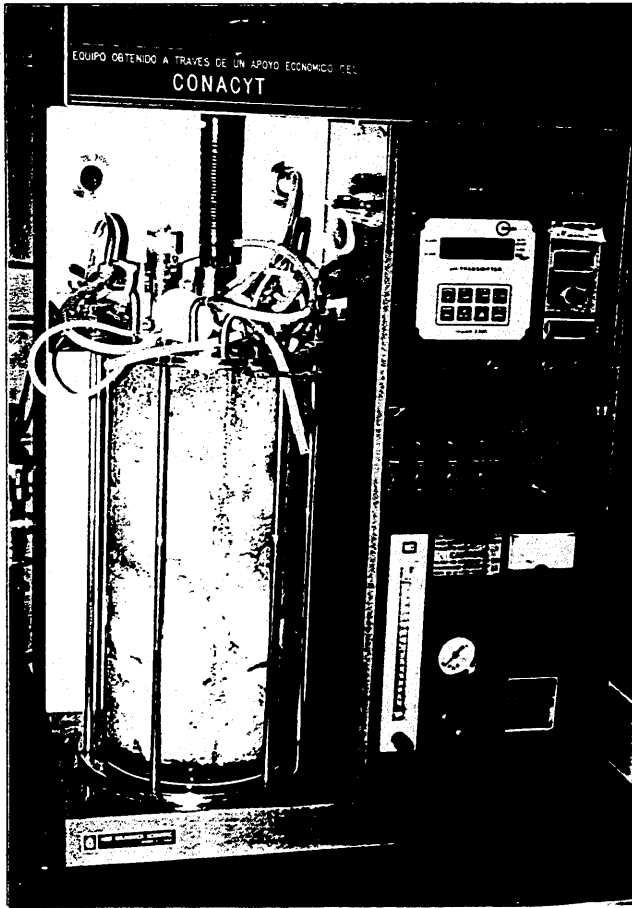
comportamiento de las cinéticas, interfiriendo o enmascarando el efecto del impulsor que fue el objeto de este estudio. En el caso de la biomasa, es muy probable que el incremento del 25% en la biomasa para el cultivo con IH3 con respecto a IMIG y 45% con respecto a TR haya sido el resultado de un efecto conjunto entre una mayor TOD en el caldo de fermentación y un mejor mezclado del impulsor helicoidal. El efecto del impulsor queda demostrado en la comparación entre los impulsores IMIG y TR en los cuales la transferencia de oxígeno y la TOD fueron muy similares, pero hubo un efecto significativo sobre el crecimiento del microorganismo. Serán necesarios estudios posteriores a TOD constante para corroborar estas hipótesis.

**Tabla 5.19** Valores medidos de  $k_{L,a}$  durante cultivos de *T. harzianum* con diferentes tipos de impulsor.

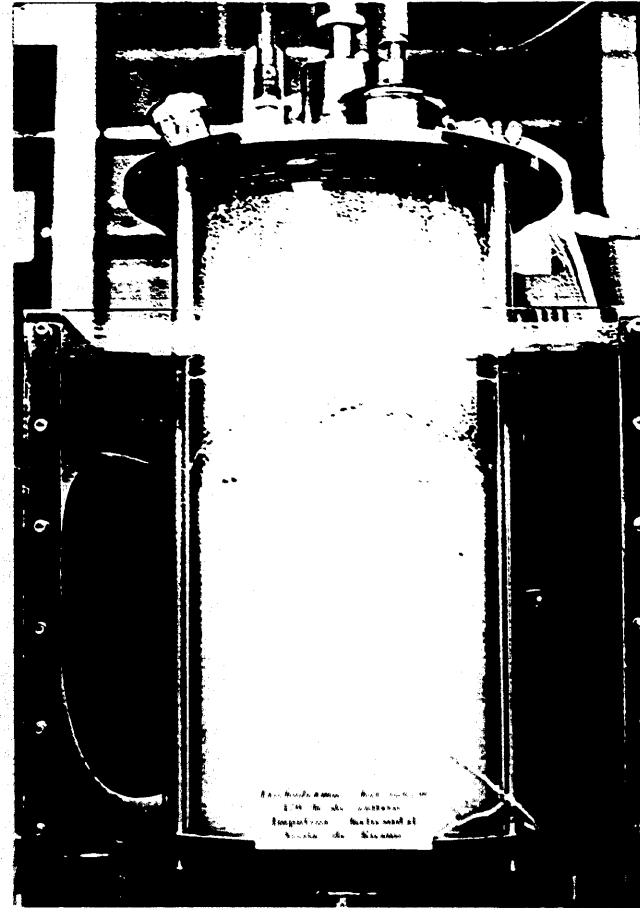
Impulsor	$k_{L,a}$ [ $h^{-1}$ ]	Tiempo de cultivo [h]
TR	59.6	25
IMIG	63.8	23.5
IH3	143.8	25.5

En todos los casos se apreció un descenso en la biomasa expresada como peso seco después de la fase de crecimiento (**Figura 5.38**). Esto pudo estar asociado a diferentes fenómenos. En cultivos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio se observó que, durante la fase de crecimiento, el micelio experimenta un considerable engrosamiento, posiblemente asociado a la incorporación de ácidos grasos dentro de las células como material de reserva (Serrano-Carreón *et al.*, 1997). Cuando el crecimiento se detiene (probablemente asociado con limitación por oxígeno y a mayores tiempos de cultivo, agotamiento de la fuente de nitrógeno) es posible que las células adelgacen como resultado del catabolismo de los lípidos acumulados. Por lo tanto, aunque el número de células prácticamente no cambie, el peso seco del conjunto experimentaría una caída sensible. El metabolismo de los ácidos grasos mediante  $\beta$ -oxidación, cuando el crecimiento se detiene, también permitiría explicar la presencia de  $\gamma$ -decalactona como metabolito secundario, por cuanto la bioconversión de la  $\gamma$ -decalactona a partir de ácido ricinoleico involucra una serie de  $\beta$ -oxidaciones sucesivas (**Figura 2.1**). Otra explicación posible de la caída en el peso seco podría asociarse a muerte (ruptura) celular por limitación de oxígeno en el cultivo. Debido a que el micelio crece principalmente en forma de agregados (*grumos*), una baja en la tensión de oxígeno disuelto en el medio podría incrementar las limitaciones de transferencia de oxígeno hacia el interior del agregado (Gosmann y Rehm, 1986) resultando en ruptura de las células localizadas en el interior del *grumo* y, probablemente, en una desintegración del agregado, que además disminuiría la viscosidad del medio. Los mismos efectos de caída en el peso seco y disminución de la viscosidad podrían ser el resultado de daño celular por los esfuerzos (*stress*) mecánicos generados por el impulsor dentro del recipiente del cultivo, como ha sido descrito para otros cultivos miceliares (Reuss, 1988). Finalmente, debe señalarse que los cultivos con IH3 tuvieron una excelente homogeneización mientras, por el contrario, los cultivos con TR e IMIG presentaron una gran cantidad de zonas poco mezcladas o completamente inmóviles (zonas muertas). Este fenómeno puede apreciarse claramente en la **Figura 5.41**. Otra posibilidad de la caída en peso seco para estos últimos cultivos podría





(a)



(b)

Figura 5.41 Vista general de las características de mezclado en la fermentación de *T. harzianum*. (a) Fermentador MicroFerm (T. Rushton e InterMIG). La viscosidad del cultivo es muy alta y se aprecian zonas muertas en toda la extensión del reactor. (b) Fermentador de 14 litros (Helicoidal). Es visible la diferencia en la homogeneidad del cultivo comparado con el de la parte (a)

residir en el hecho de que la muestra tomada para la determinación de biomasa no fuese representativa de todo el caldo. A pesar de que se realizó un ligero incremento de la velocidad de agitación a la hora de tomar la muestra (con la finalidad de homogeneizar el caldo), no fue posible evitar totalmente la presencia de zonas muertas puesto que hubiese sido necesario aumentar excesivamente la velocidad de agitación, resultando probablemente en daño miceliar e influenciando de manera impredecible el comportamiento de los cultivos. Este último razonamiento no es aplicable para el cultivo con el IH3 puesto que la homogeneidad de estos caldos fue excelente. Finalmente, observaciones directas del cultivo permiten señalar que el efecto de disminución en la biomasa pudo ser reforzado por un incremento en el crecimiento del microorganismo en las paredes estáticas del reactor (baffles, zona central de los impulsores, sensores, etc.), así como una pérdida de la biomasa por arrastre del aire : cuando las burbujas de aire lograban atravesar la fase aceitosa, estallaban al contacto con la interfase gas-líquido, arrojando algo de la biomasa hacia las paredes del espacio de la cabeza del reactor. Si bien estos efectos pudieron ser visualizados, no pudieron ser evaluados cuantitativamente.

La **Figura 5.40** muestra la producción de aroma para cultivos con los tres impulsores estudiados. El aroma es producido principalmente después de que ha cesado la fase de crecimiento, indicativo de un metabolito secundario. Debe señalarse que aunque se encuentran trazas de 6PP, la principal molécula de aroma producido es  $\gamma$ -decalactona (ver **Figura 4.7**). La presencia de 6PP puede ser explicada si suponemos que proviene del inóculo, en donde es producida por el hongo a partir de glucosa (Serrano-Carreón *et al.*, 1997). En un reporte previo (Godoy-Silva *et al.*, 1997), se había hipotetizado respecto a la síntesis de 6PP en los cultivos con el IH3; sin embargo, resultados posteriores confirmaron que el aroma producido en los tres reactores es el mismo, correspondiendo a  $\gamma$ -decalactona.

En general, la tendencia para la producción del compuesto de aroma es incrementarse hasta un valor máximo, el cual depende nuevamente del tipo de fermentación. Parece ser que mayores TOD tienen un efecto desfavorable sobre la producción de aroma (ver **Figuras 5.39** y **5.40**). En el caso de TR, en donde la TOD cayó prácticamente a cero, la concentración de aroma fue la mayor (197 mg/L), mientras que para el IH3 (con la mayor TOD en la fase estacionaria), la concentración de aroma máxima fue de sólo 57 mg/L. Sin embargo, en los cultivos con IMIG, los cuales tuvieron una caída similar en la TOD a la exhibida por los cultivos con TR, la concentración máxima de aroma fue de 131 mg/L, indicando que no solo la TOD sino también la hidrodinámica del reactor afecta la producción de aroma en forma importante. Como se señaló en el capítulo 2, la diferencia en concentraciones máximas de aroma en el biorreactor también pudo ser el resultado del cambio en la morfología del microorganismo : debido a limitaciones difusionales dentro de las *pelotillas*, la única biomasa disponible para producción de aromas sería la localizada en las capas externas de la *pelotilla*, resultando en menores velocidades de producción y menor concentración final de producto.

Con TR y el impulsor helicoidal se aprecia una ligera caída en la concentración de aroma en el caldo de cultivo en las etapas finales de la fermentación. Como primera alternativa, esta caída podría ser el resultado del arrastre de la molécula volátil en la corriente de aire que abandona el reactor. Para determinar la cantidad de aroma que podría perderse por esta

via, se montó el sistema de fermentación con el medio de cultivo reportado previamente, y se le adicionó una cantidad conocida de  $\gamma$ -decalactona. La corriente de aire de salida se hizo pasar por un condensador de vidrio enfriado con agua a 0°C y posteriormente se burbujeó, a través de un tubo de vidrio, entre un balón con aceite de ricino, con la finalidad de recuperar el aroma que estuviese siendo arrastrado. Los resultados indicaron que aunque si escapa aroma, la cantidad que escapa corresponde a un cambio total en la concentración de aroma en el reactor de 1.86mg/L en 196 horas de cultivo, lo cual es, para efectos prácticos, despreciable. Lo que no resultó despreciable fue la evaporación de 2.46 litros de agua del reactor en el mismo periodo. Esta disminución del volumen, aunado con la correspondiente a la toma de muestras, podría hacer completamente falsa la cinética medida. Para evitar estos inconvenientes se montó un sistema de pre-humidificación del aire, con lo cual se consiguió disminuir satisfactoriamente los efectos mencionados. Las posibilidades anteriores no explican los datos de reducción en la concentración de aroma satisfactoriamente. Otras probables explicaciones podrían ser que el micelio lo utilice como fuente suplementaria de carbono, lo cual es poco probable puesto que el aceite de ricino se encuentra en gran exceso. O bien que esté siendo degradado por enzimas liberadas al medio de cultivo. Finalmente, la caída en la concentración de aroma podría asociarse con un efecto hidrodinámico de los cultivos: la molécula del aroma es no polar y por tanto, es probable que se concentre en la capa de aceite de ricino que por su menor densidad, tiende a establecerse en la parte superior de la jarra; dado que la toma de muestra se realiza por la parte inferior de la jarra, la presencia de zonas muertas en TR y la baja viscosidad de los caldos con IH3 pudieron hacer que el aceite no alcanzase el punto de toma de muestra, disminuyendo la concentración medida en el reactor. En estos casos, no se hicieron mediciones para probar las diferentes posibilidades.

### 5.3.2 Efecto del impulsor sobre la reología y morfología del microorganismo en cultivos de *T. harzianum*

Durante el desarrollo de este trabajo se observaron efectos importantes de la geometría del impulsor sobre la morfología y reología de los caldos de fermentación. Como puede apreciarse en las Figuras 5.42 y 5.43, hubo marcados cambios de las características morfológicas de cada cultivo a lo largo del mismo. Inicialmente, se observan hifas delgadas y muy poco ramificadas debido a la germinación de las esporas. A las 25 h, el micelio se aprecia mucho más ramificado y el citoplasma se observa uniformemente teñido. Hacia las 48 h ya ha habido esporulación, ocasionada probablemente por deficiencias en la TOD en el caldo. En forma similar a la reportada por Flores (1995), hacia las 78 h de cultivo, el diámetro de las hifas aumenta notablemente, lo cual fue atribuido por la autora a un proceso de acumulación lipídica en el interior de la célula. Edades mayores del cultivo corresponden a un micelio más delgado, mucho menos ramificado y con un citoplasma visiblemente vacuolizado (190 h). Estas variaciones morfológicas fueron muy similares para TR e IMIG. En ambas figuras se incluye una imagen final (con menos aumento) en la que se aprecia el crecimiento del microorganismo en forma de red con formación de agregados (*grumos*) más o menos densos de características variadas. Este crecimiento surge del entrecruzamiento de las hifas durante el momento de la germinación, como se aprecia en la primera imagen de la Figura 5.42. Como se comprenderá, este primer desarrollo se lleva a cabo en condiciones hidrodinámicas muy suaves en los matraces Fernbach durante las 72 horas del inóculo, en donde se favorece la formación de agregados, por la carencia de

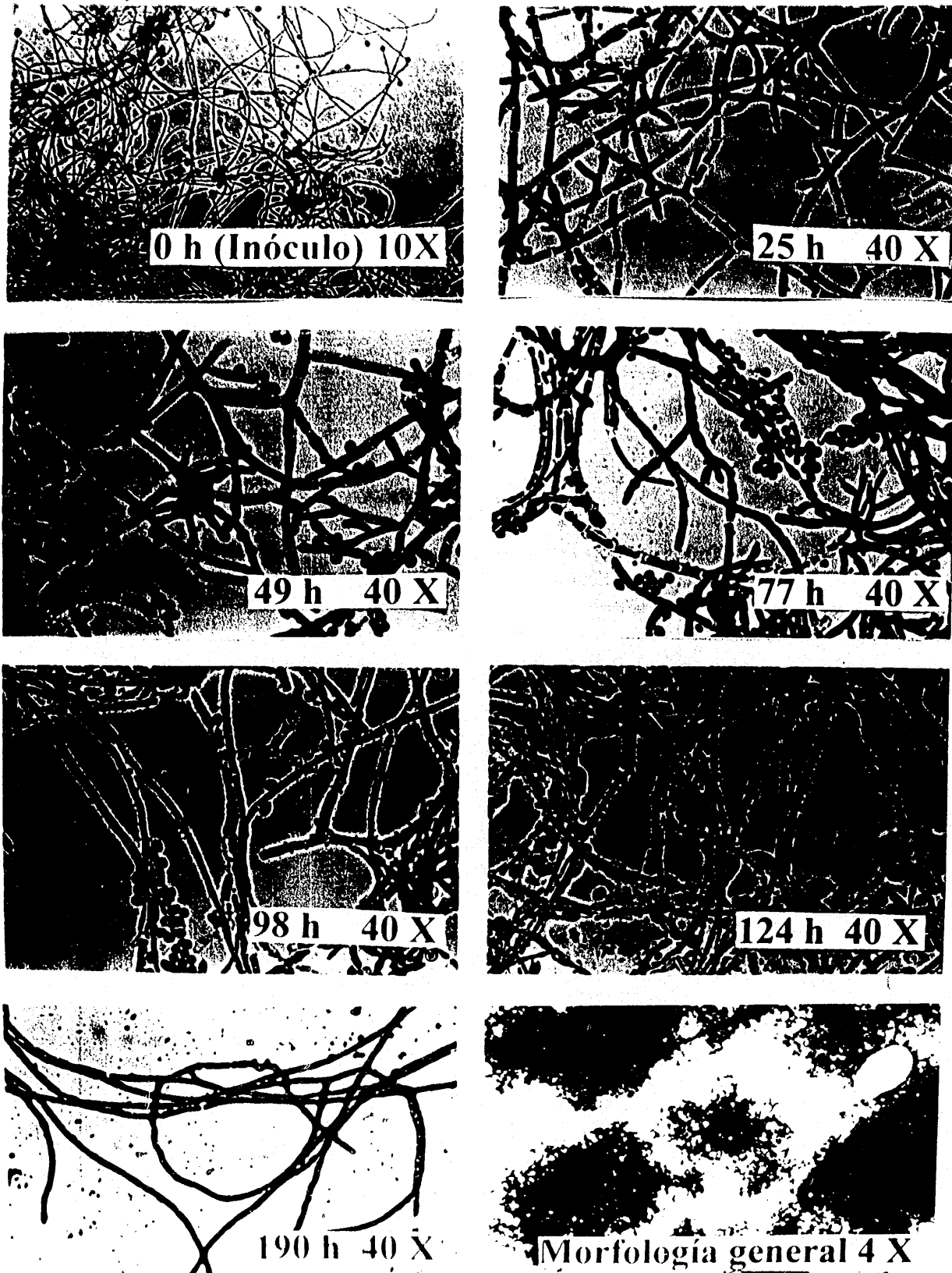


Figura 5.42. Evolución de la morfología de *T. harzianum* en cultivo sumergido. Impulsor:

3 TR a 200 rpm

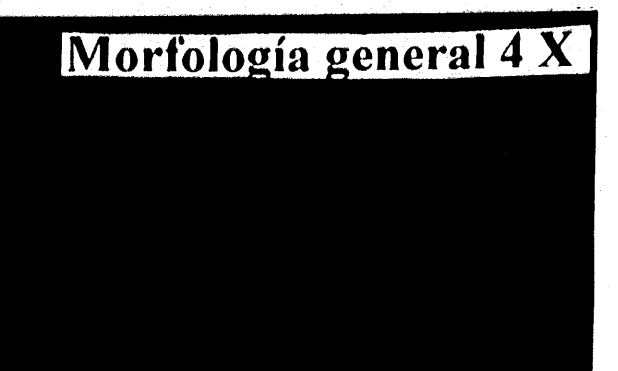
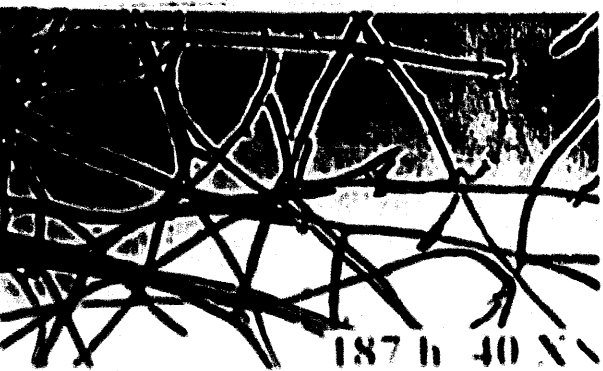
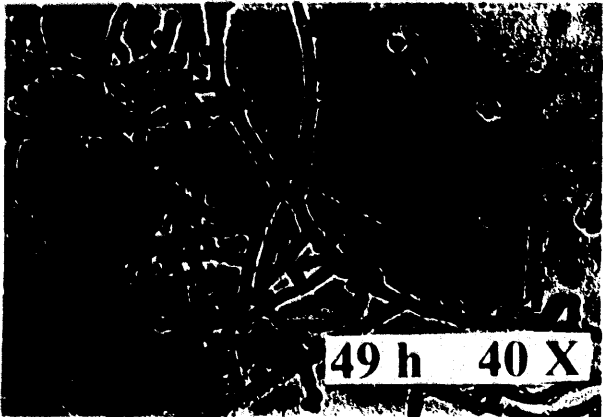
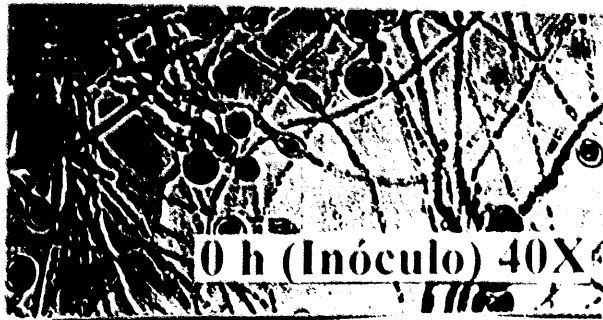


Figura 5.43 Evolución de la morfología de *F. kerzianum* en cultivo sumergido. Impulsor S. IMIC a 20°C por 200

algún elemento disruptor (impulsor); adicionalmente, este fenómeno es muy similar para los tres tipos de cultivo.

El desarrollo del microorganismo en el cultivo con IH3 también se inicia con la formación de agregados pequeños en el matraz del inóculo. Sin embargo, el crecimiento en forma de *pelotilla* en el cultivo con IH3 prosigue durante todo el tiempo de la fermentación y es similar al observado para otros cultivos miceliales desarrollados en fermentadores de columnas de burbujeo (Berovic *et al.*, 1993). Como ya se ha mencionado, bajo las condiciones de fermentación, la principal influencia del impulsor helicoidal pareció ser un mezclado excelente del contenido del reactor. Como puede divisarse en la **Figura 5.44**, cada pequeño cúmulo de micelio tiene características similares a las de una pluma, con largas y delgadas hifas laterales de crecimiento radial. Este crecimiento puede ser modelado por una ecuación cúbica (Shuler and Kargi, 1992) de la forma :

$$X = \left( X_0^3 + \frac{\psi t}{3} \right)^3$$

en donde  $\psi$  es una constante que depende de la densidad del hongo y de la velocidad de crecimiento radial de las hifas. Los datos de crecimiento con IH3 fueron ajustados por medio de regresión por mínimos cuadrados, obteniéndose la ecuación :

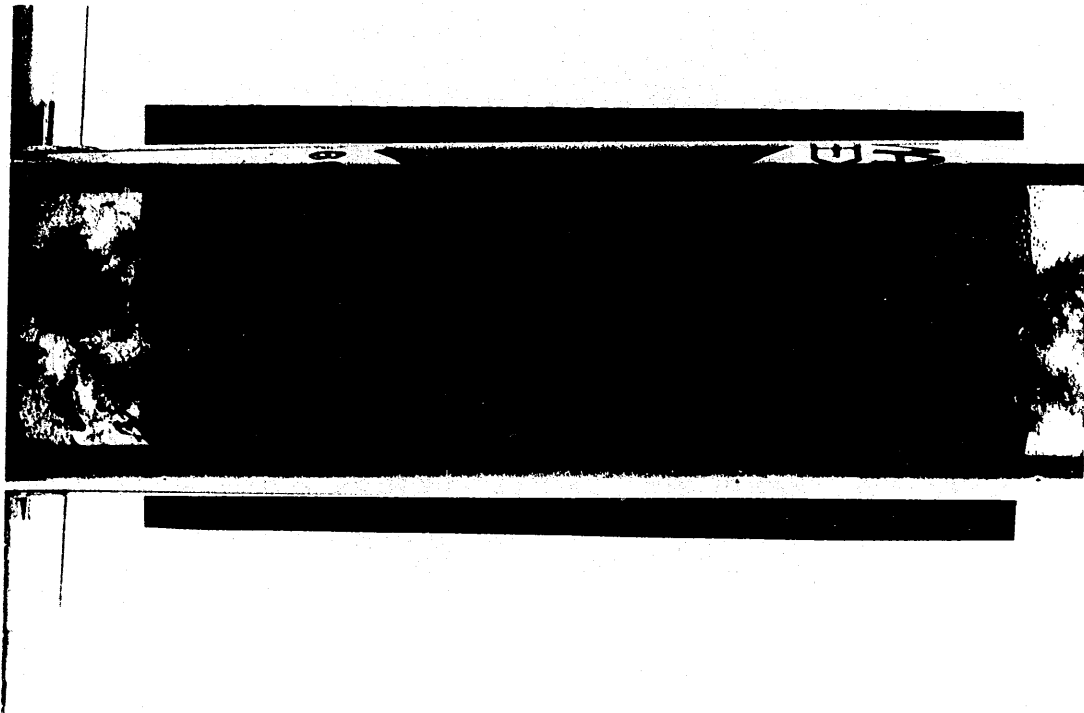
$$X = \left( (0.1891)^3 + \frac{5.0887 \cdot 10^{-2} t}{3} \right)^3$$

En donde X está en [g/L] y t en [h]. El modelo y los datos experimentales se presentan en la **Figura 5.38 a**. Como puede verse, el acuerdo entre el modelo teórico y el resultado experimental es satisfactorio. Sin embargo, aunque en las fermentaciones con TR el hongo no tuvo morfología de *pelotilla*, el crecimiento en esta jarra durante las primeras 50 h de cultivo también se ajusta a la ecuación cúbica anterior, con  $X_0 = 0.45$  y  $\psi = 3.23 \cdot 10^{-2}$ . Esto sólo es un indicativo de que múltiples morfologías de crecimiento pueden asociarse con una misma ecuación cinética.

En cuanto a las características reológicas del cultivo, en las **Figuras 5.45** y **5.46** se aprecia que los caldos de fermentación desarrollados con IMIG y TR presentaron marcadas características no-Newtonianas pseudoplásticas. En dichas figuras se presentan los resultados brutos obtenidos directamente del reómetro con la intención de evitar alteraciones de comportamiento originadas en cualquier limitación o imprecisión en la calibración del dispositivo de medición reométrica. Se aprecia una estabilización de la relación torque/velocidad de agitación (equivalente a viscosidad) a altas velocidades de agitación ( $N > 1$  r.p.s.) debido muy probablemente a que a estas velocidades el dispositivo excede el intervalo de flujo laminar. La viscosidad de los caldos obtenidos con el impulsor IH3, medida con el dispositivo *vane*, estuvo por debajo del límite de detección del instrumento (en ese momento no estaba disponible aún el dispositivo helicoidal IH2). En la **Figura 5.47** se presenta una medición desarrollada con el dispositivo *vane* en un caldo con IH3 a las 72 horas de cultivo (aproximadamente 5 g/L). Aparentemente, el caldo mostró

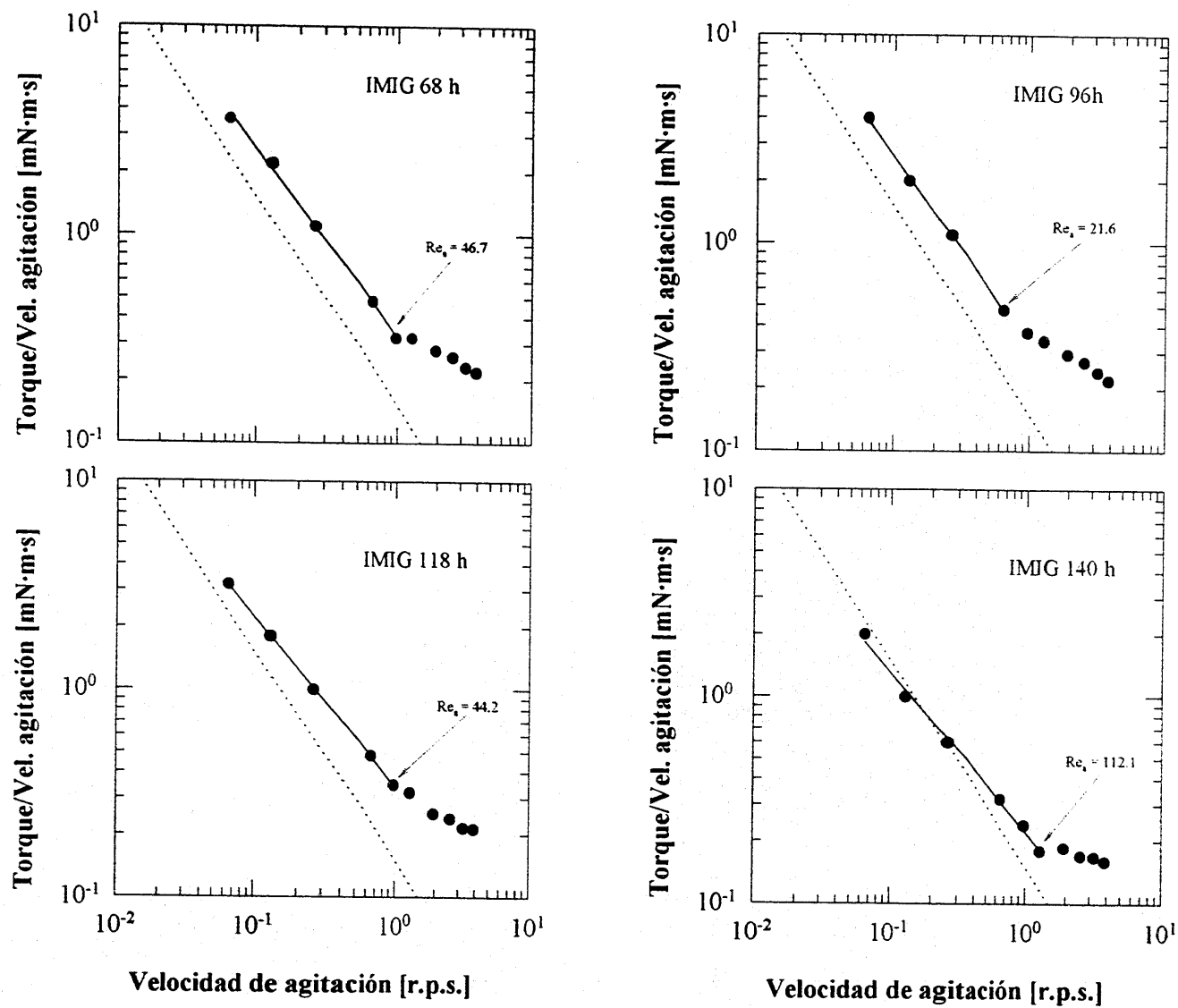


a.



b.

**Figura 5.44** Morfología de *T. harzianum* en cultivo sumergido con el impulsor helicoidal III a - 24 h de cultivo b - 48 h de cultivo



**Figura 5.45** Comportamiento reológico de caldos de cultivo de *T. harzianum* como función de la edad de cultivo. Instrumento de medición: IH2. La línea punteada representa el límite inferior de detección confiable. La línea sólida indica los datos correlacionados, y el valor máximo de  $Re_a$ . Impulsor InterMIG.



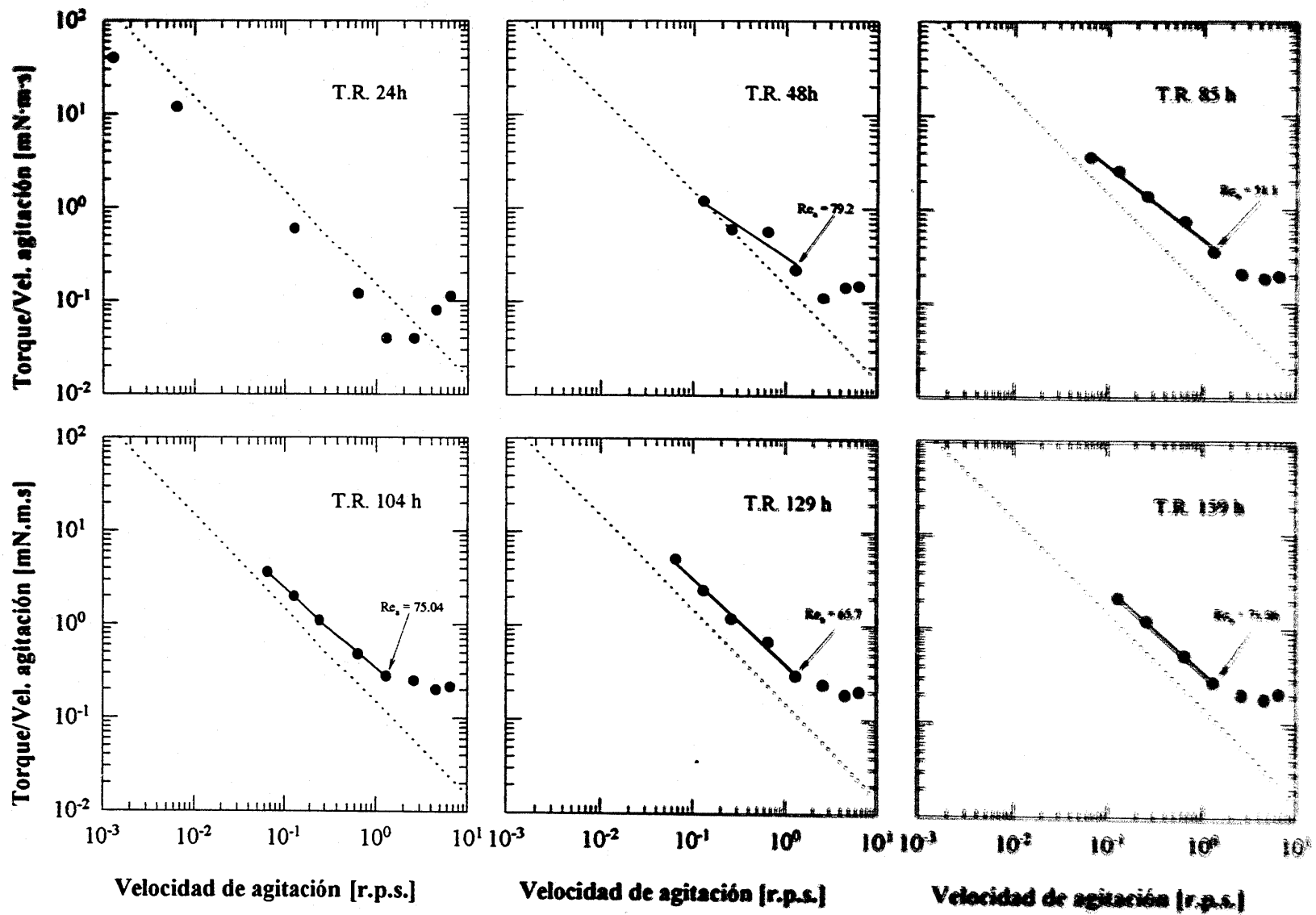
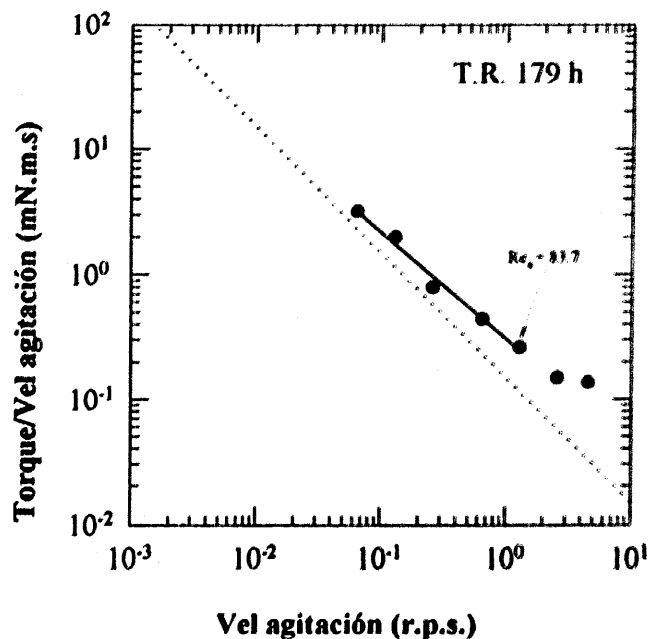
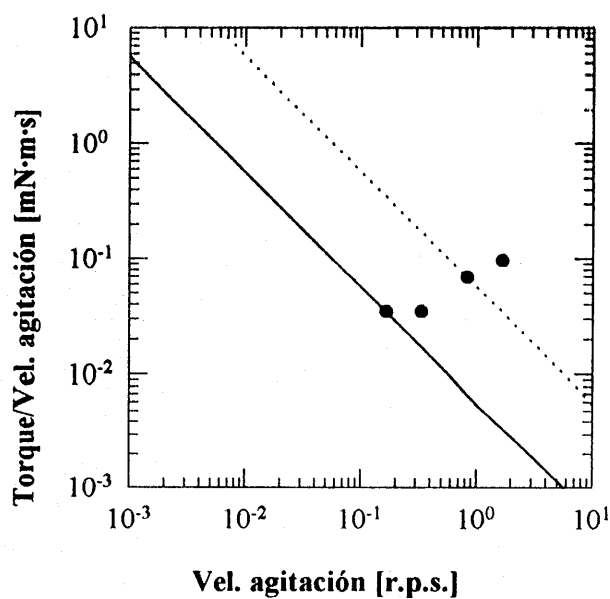


Figura 5.46 Comportamiento reológico de caldos de *T. harzianum* como función de la edad de cultivo. Impulsor turbina Rushton (TR). Instrumento de medición: IH2. La línea punteada representa el límite inferior de detección confiable. La línea sólida indica los datos correlacionados y el valor máximo de  $Re_m$ .



**Figura 5.46. Continuación.** Comportamiento reológico de caldos de cultivo de *T. harzianum* como función de la edad de cultivo. Impulsor Turbina Rushton. Instrumento de medición: IH2. La línea punteada representa el límite inferior de detección confiable.



**Figura 5.47** Comportamiento reológico de caldos de *T. harzianum* a las 72 h de cultivo. Impulsor: IH3. Instrumento de medición: Vane. La línea punteada representa el límite inferior de detección confiable. La línea roja representa el límite de detección del instrumento.

una tendencia dilatante, caracterizada por un incremento en la viscosidad aparente con un aumento en  $\dot{\gamma}_{av}$ . Aunque este comportamiento ha sido observado en suspensiones de esferas de PVC (Hoffman, 1972) y de poliestireno (Gadala-Maria and Acrivos, 1980), el autor considera que el caldo también debería mostrar características pseudoplásticas aunque mucho menos marcadas que con los otros tipos de cultivos y que el comportamiento observado es derivado de la insuficiente sensibilidad del instrumento de medición, así como de la baja viscosidad del caldo. Un fenómeno similar se aprecia en el caldo de cultivo de TR a las 24 h (**Figura 5.46**) en las regiones de altos  $\dot{\gamma}_{av}$ , probablemente debido a que el instrumento se encuentra fuera del intervalo de flujo laminar en que son válidas las mediciones reológicas. Para corroborar este fenómeno, se necesitan más mediciones con un instrumento más sensible.

La baja viscosidad de los caldos con IH3 comparada a la obtenida en los desarrollados con IMIG o TR se debe muy probablemente a las diferencias morfológicas entre los tipos de cultivo, ya que la concentración de biomasa fue mayor en cultivos con IH3. En este último caso, el micelio creció en forma de *pelotillas*, probablemente asociado a condiciones hidrodinámicas mucho más suaves a las creadas con los otros impulsores, aunque la potencia por unidad de volumen fuese similar (**Figura 5.48**). Este resultado no es nuevo, pues para un mismo microorganismo, se ha reportado que la morfología de *pelotilla* es mucho menos viscosa que la forma filamentosa (Kim *et al.*, 1983). La baja viscosidad de los caldos, junto con la mejor dispersión de oxígeno, pueden explicar las mayores TOD obtenidas en los cultivos con IH3. Dado que en este trabajo no se hicieron determinaciones morfológicas cuantitativas, no es posible intentar una correlación entre aspectos morfológicos y reológicos, más allá de los comentarios realizados.

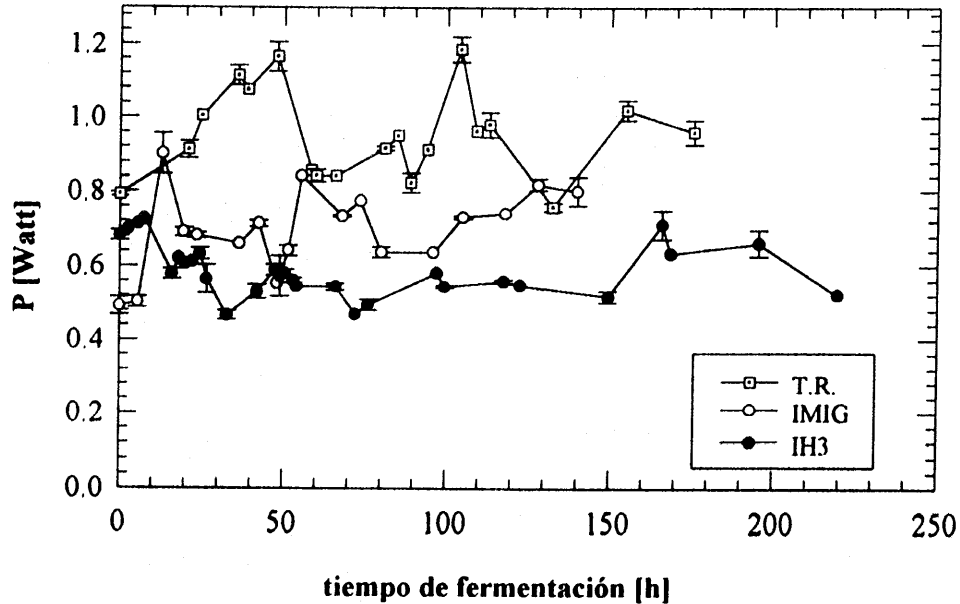
Utilizando los resultados de la calibración descrita en la sección 5.1, se calcularon los datos de la ley de la potencia a partir de los datos de las **Figuras 5.45 y 5.46**. Como primer paso fue necesario determinar el valor de  $n$ ; combinando las **ecuaciones 2.9, 2.13 y 2.14** se obtiene:

$$\frac{2\pi M}{K_p N d^3} = K(K_s N)^{n-1} \quad \text{Ec. (5.6)}$$

o equivalentemente,

$$\log\left(\frac{M}{N}\right) = \log\left(\frac{K_p d^3 K K_s^{n-1}}{2\pi}\right) + [n-1]\log(N) \quad \text{Ec. (5.7)}$$

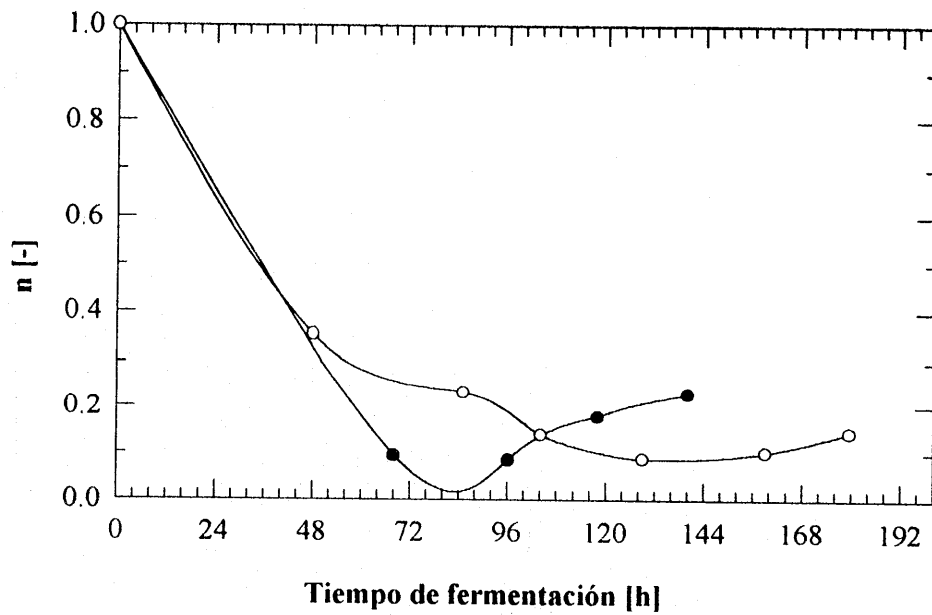
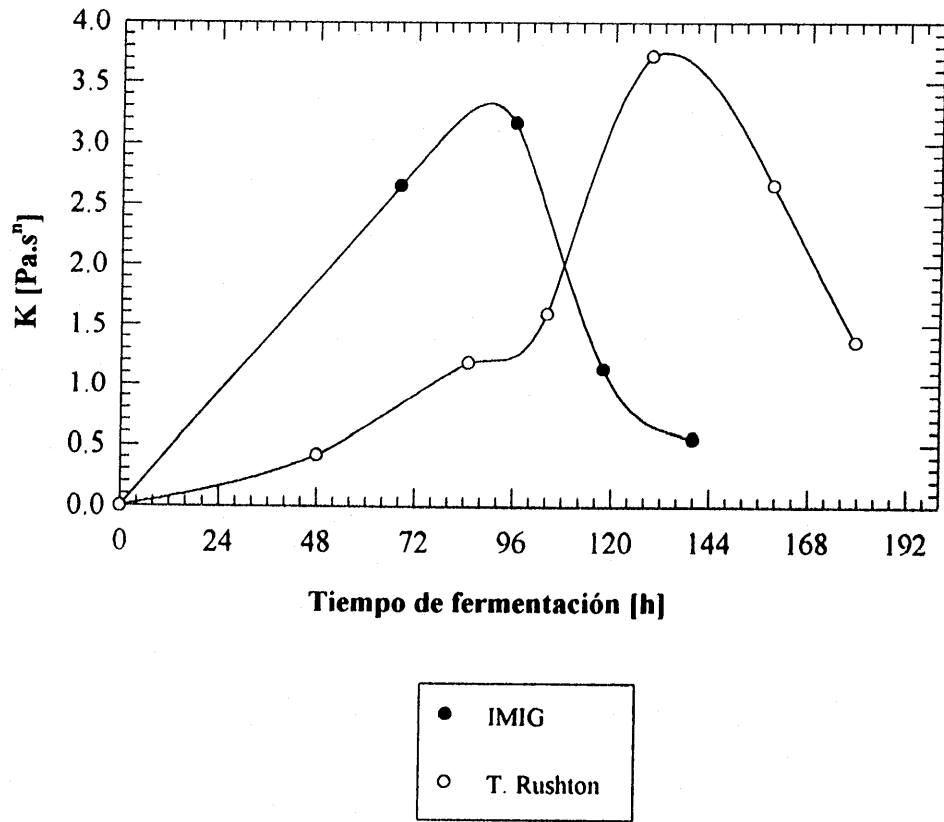
Consecuentemente, a partir de la pendiente de cada reograma ( $M/N$  vs  $N$ ) en coordenadas logarítmicas (**Figuras 5.45 y 5.46**), es posible obtener el valor de  $n$  mediante la **ecuación 5.7**. En tales reogramas solamente se consideró la parte de la gráfica que ajustara los datos a una línea recta y se trazó una línea para identificar el correspondiente intervalo. Una vez determinado  $n$ , se calculó el valor de  $K_s$  con la **ecuación 5.5** y se determinó el valor de  $K$  para el modelo de la ley de la potencia a partir de la **ecuación 5.7**. Los resultados se presentan en las **Figuras 5.49 y 5.50** como función del tiempo y de la biomasa, respectivamente. El índice de consistencia  $K$  varió considerablemente a lo largo del cultivo siguiendo un devenir similar tanto para IMIG como para TR (**Figura 5.49**). Inicialmente, el



**Figura 5.48** Evolución de la potencia entregada al cultivo por los diferentes tipos de impulsor.

valor de  $K$  se incrementó, probablemente debido a un incremento en la concentración celular; posteriormente,  $K$  alcanza un máximo, para después descender sensiblemente hacia el final de la fermentación. El momento al cual se alcanza el punto máximo y la magnitud del mismo dependen del tipo de impulsor. Es interesante observar que durante las primeras 100 h de cultivo el caldo con IMIG es mucho más viscoso que para TR, mientras que lo contrario sucede en las etapas posteriores del cultivo. Es posible que la caída en el valor de  $K$  sea debida a cambios morfológicos, por cuanto en las etapas finales de la fermentación la diferenciación celular ha originado hifas más delgadas y mucho menos ramificadas que en las etapas tempranas del cultivo, aunque la disminución de la concentración de biomasa podría estar jugando un papel importante en este efecto. En todo caso, la caída sensible en la viscosidad del caldo con IMIG podría ayudar a explicar el incremento en la TOD de las etapas finales del cultivo, por un aumento en el coeficiente de transferencia de oxígeno como resultado de la disminución de la viscosidad del caldo.

Los valores de  $n$  disminuyen desde 1.0, al comienzo de la fermentación, hasta valores que oscilan entre 0.1 y 0.2 en las primeras 60 horas de fermentación y se mantienen en ese intervalo a lo largo de todo el cultivo. Otros cultivos también mantienen el valor de  $n$  constante durante el transcurso del cultivo (Kim *et al.*, 1983; Gavrilescu *et al.*, 1992). Para IMIG hay un leve incremento de  $n$  a partir de las 96 horas, probablemente asociado con cambios morfológicos del micelio. Los valores de  $n$  son lo suficientemente bajos como para hacer que el valor de  $K_s$  del impulsor IH2 sea influenciado fuertemente por las características pseudoplásticas del caldo. Aunque en otros trabajos han reportado valores de  $n$  en un intervalo similar ( $n < 0.2$ ) (Reuss *et al.*, 1982; Kembrowski and Kristiansen, 1986; Gavrilescu *et al.*, 1992; Flores, 1995), en muy pocos trabajos se ha tenido en cuenta



**Figura 5.49** Evolución de los parámetros de la ley de la potencia  $K$  y  $n$ , a lo largo del cultivo para dos diferentes tipos de impulsor.

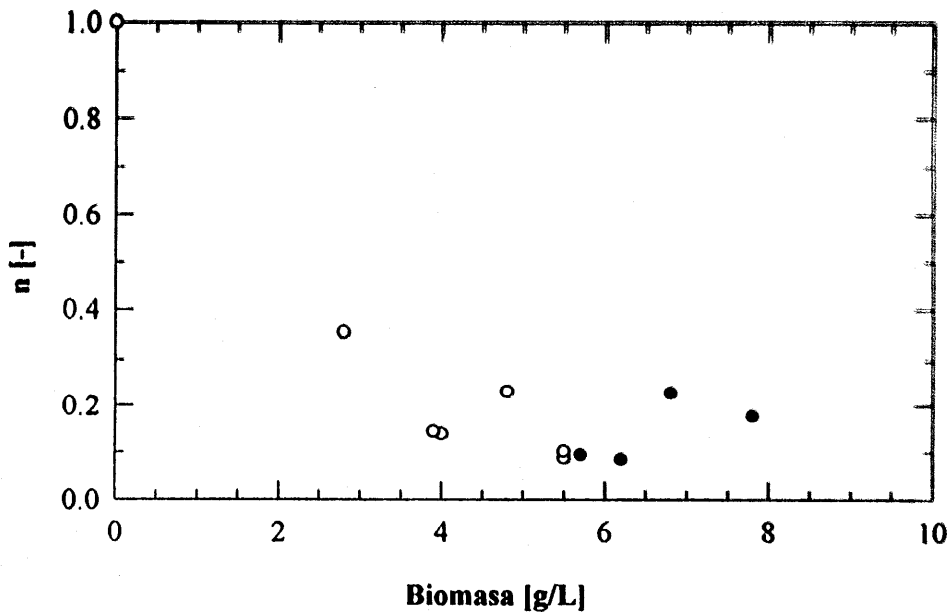
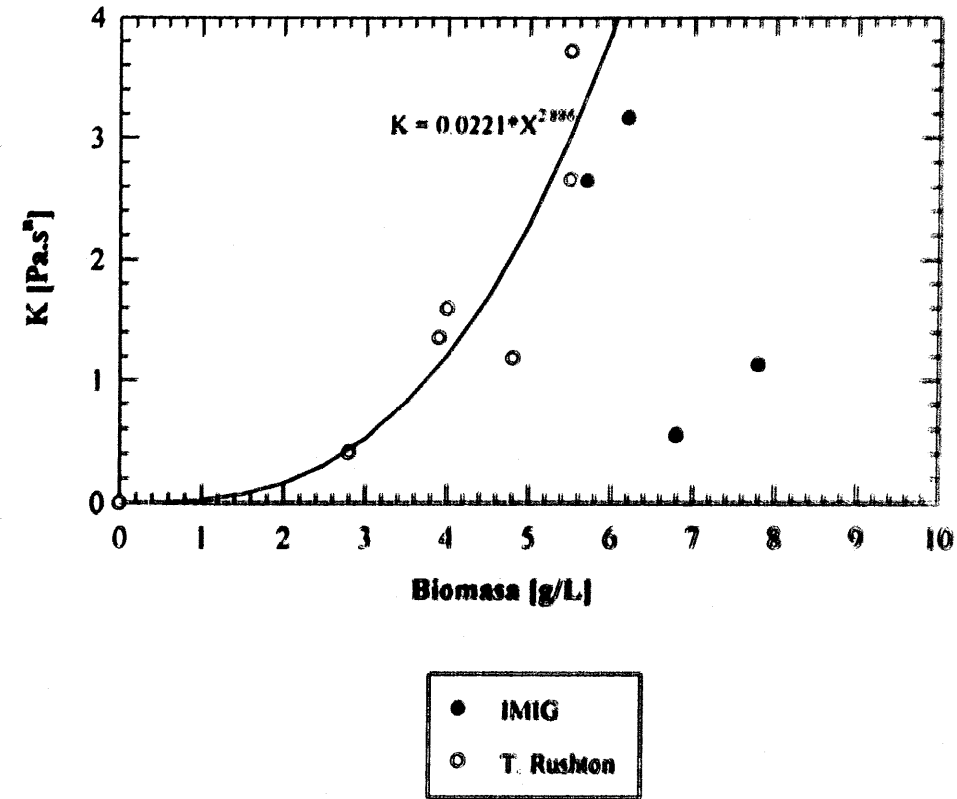


Figura 5.50 Comportamiento de los parámetros de la ley de la potencia como función de la concentración de biomasa en cultivos desarrollados con diferentes impulsores.

el cambio de  $K_s$  con el índice de flujo a efectos de medir las propiedades reológicas de los cultivos. Por lo tanto, una de las consecuencias más importantes de este trabajo podría ser que algunas de las mediciones del índice de consistencia ( $K$ ) realizadas con impulsores de cualquier tipo (en caldos muy pseudoplásticos) podrían estar equivocadas y serían realmente mayores que las reportadas.

La representación de los datos como función de la biomasa para turbinas Rushton (**Figura 5.50**), permitió establecer una correlación de tipo exponencial entre  $K$  y  $X$  de la forma  $K = K_0 X^n$ , muy similar a la encontrada por otros autores (Reuss *et al.*, 1982 ; Kim *et al.*, 1983 ; Allen and Robinson, 1990). Para IMIG no fue posible desarrollar tal forma de correlación, debido a que los valores obtenidos después de las 96 h siguen una tendencia muy diferente que los valores previos. Los valores de  $K$  previos a las 96 h de cultivo siguen prácticamente la misma tendencia que los de TR. Sin embargo, en las horas siguientes, el caldo se vuelve mucho menos viscoso y  $K$  tiene una tendencia muy diferente a la de las primeras horas de cultivo, aunque nuevamente se incrementa con la concentración celular en forma aparentemente exponencial. Esto demuestra que, además de la concentración de biomasa, la morfología juega un papel importante en el comportamiento reológico de los caldos de cultivo miceliares. Aunque se aprecian algunas diferencias en el grado de ramificación del micelio entre las 98 y 122 h en los cultivos con IMIG (**Figura 5.43**), se necesitan estudios morfológicos detallados para obtener una mejor comprensión de los fenómenos involucrados en la reología de estos caldos.

Por otro lado,  $n$  decrece rápidamente con la biomasa y adquiere un valor más o menos constante (**Figura 5.50**). La línea no fue ajustada por ningún procedimiento de cálculo y simplemente es una intención del comportamiento. Diferentes reportes señalan un comportamiento similar de  $n$  con la biomasa (Reuss *et al.*, 1982 ; Allen and Robinson, 1990 ; Pedersen *et al.*, 1993). Sin embargo, ninguna ecuación ha sido derivada a partir de los resultados en dichos trabajos y, por tanto, no es fácil hacer comparaciones. Lo único claro es que la concentración de biomasa necesaria para alcanzar un valor estable de  $n$  es relativamente pequeña (del orden de 2 a 5 g/L).

Finalmente, se intenta una comparación de los datos reológicos hallados en este trabajo y los encontrados en reportes precedentes. En la **Tabla 5.20** se presentan los resultados obtenidos por Flores (1995) para caldos de cultivo de *T. harzianum* en las mismas condiciones que las de este trabajo. Debe notarse que con TR nunca se alcanzó una biomasa de 8 g/L durante el cultivo, por lo que se utilizó la correlación desarrollada para calcular la  $K$  en tales condiciones. Como puede apreciarse, no hay un acuerdo satisfactorio cuando se hace comparación por concentración biomasa o por tiempo de cultivo. En términos del tiempo de cultivo, el caldo de Flores fue mucho más viscoso y menos pseudoplástico, mientras que por biomasa, los caldos obtenidos durante este trabajo serían casi 3 veces más viscosos que los obtenidos por Flores a la concentración de biomasa señalada. Como explicación de este fenómeno, se propone que, debido a la inhomogeneidad del reactor, la toma de muestras pudo ocasionar variaciones importantes entre la biomasa y reología del caldo reportado por Flores y las medidas en este trabajo. Como no hay manera de lograr una homogeneización total con TR sin afectar las propiedades reológicas a medir, el problema resultó prácticamente insoluble, sirviendo para realzar las dificultades de cultivo

con este microorganismo y la importancia de utilizarlo como modelo para mejorar aspectos de mezclado y transferencia de oxígeno en fermentaciones miceliarias. Adicionalmente, es muy probable que el dispositivo *vane* sea mucho más influenciado que el dispositivo helicoidal por acción del índice de flujo del caldo, por lo que el valor real de K sería mucho mayor al reportado por Flores (1991) y por tanto, se asemejaría al valor encontrado en el presente trabajo.

**Tabla 5.20** Comparación reológica de caldos de cultivo de *T. harzianum* con TR a las 168 h de cultivo.

Autor	Criterio de comparación			
	Biomasa : 8 g/L		Tiempo : 168 h	
	K	n	K	n
Flores (1995)	3.1	0.24	3.1	0.24
Este trabajo	8.9	0.15	2.1	0.12

### 5.3.3 Conclusiones

La morfología de *T. harzianum*, así como su crecimiento y producción de aromas en cultivo sumergido resultaron diferentes en cada tipo de fermentación. El impulsor helicoidal IH3, equipado con un dispersor de gas particularmente eficiente, dio el máximo rendimiento en biomasa, el cual es cerca del doble de la cantidad de biomasa obtenida con turbinas Rushton. Muy probablemente este hecho se deba a un efecto combinado de mejor homogeneización del impulsor IH3 y una mejor transferencia de oxígeno y mayores TOD debidos al difusor sinterizado utilizado en este tipo de fermentación. El aroma mostró ser un metabolito secundario. En el fermentador equipado con el IH3, la concentración del aroma fue la más baja entre los 3 tipos de impulsores probados, probablemente debido a un fuerte efecto de la TOD sobre la síntesis del aroma. Otras posibles razones causantes de esta diferencia en concentración de aroma incluyen efectos hidrodinámicos que pueden causar limitaciones para una toma adecuada de muestras representativas, así como variaciones morfológicas en virtud de las suaves condiciones hidrodinámicas (crecimiento en forma de *pelotillas*). De otro lado, las TR probaron ser el mejor tipo de impulsor para la producción de  $\gamma$ -decalactona, obteniéndose una concentración máxima de este aroma de 197 mg/L. Los impulsores IMIG dieron concentraciones de aroma y biomasa promedios entre los dos extremos mencionados. En los dos últimos casos el micelio creció en forma más filamentosa, con presencia de *grumos* más o menos densos. De esta manera, aparentemente un cambio del tipo de impulsor se convierte en una forma de mejorar el comportamiento de fermentaciones para la producción de aromas. Sin embargo se requieren más estudios para comprobar ésta hipótesis.

Las diferencias obtenidas en morfología y concentración de biomasa resultaron en marcadas diferencias del comportamiento reológico de los cultivos. Mientras los cultivos con el impulsor helicoidal probaron ser de baja viscosidad, los cultivos con TR e IMIG mostraron características no-Newtonianas pseudoplásticas, que fueron ajustadas al modelo de la ley de la potencia. El índice de flujo en estos 2 tipos de fermentaciones llegó a valores



tan bajos como 0.1, mientras que el índice de consistencia mostró una dependencia tanto de la biomasa como del tipo de impulsor y de la edad de cultivo del micelio.

Una evaluación completa del efecto de la hidrodinámica del reactor en la producción de aromas en cultivos sumergidos requiere un estudio paralelo del efecto de la TOD sobre la misma. Esta evaluación se está desarrollando actualmente como parte de otro trabajo de maestría en el laboratorio.

## 6. CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se estudió la influencia del mezclado sobre el comportamiento de caldos de fermentación altamente viscosos utilizando como modelo de investigación cultivos de *Trichoderma harzianum* para la producción de aromas. Para tal efecto se escogieron como variables de análisis, las cinéticas de producción de aroma y biomasa, así como la evolución de la morfología del microorganismo y el comportamiento reológico de los caldos desarrollados con tres diferentes geometrías de impulsor. Como parámetro de comparación se mantuvo, en todas las fermentaciones, el mismo valor de potencia volumétrica inicial (alrededor de 0.06 W/L). Se encontraron resultados muy interesantes, los cuales son útiles para entender la complejidad del mezclado de caldos no-Newtonianos altamente viscosos con impulsores que generan altos gradientes de deformación, así como con impulsores de proximidad. Los resultados también se emplearon para realizar mejoras en el diseño del reactor y aventurar sugerencias sobre algunos temas de investigación. Las conclusiones del estudio se delinearán a continuación:

La técnica de determinación del comportamiento reológico mostró ser un campo vasto de investigación por sí sola. Un análisis de la literatura permitió concluir que no existe un dispositivo reométrico adecuado para hacer mediciones de caldos de fermentación miceliares debido a sus características heterogéneas, por lo que se decidió utilizar un viscosímetro de impulsor. Se seleccionó el impulsor helicoidal por sus ventajas sobre otras geometrías. Se diseñó y construyó un dispositivo de doble listón helicoidal para desarrollar mediciones reológicas y se montó la metodología para evaluación de la viscosidad de caldos miceliares. Este dispositivo (IH2) combinó las ventajas de bajo volumen de muestra (100 mL vs 600 mL del dispositivo *vane*), con la eliminación de los problemas de sedimentación y separación de fases de los dispositivos tradicionales. La calibración del impulsor IH2 permitió determinar una influencia marcada del índice de flujo sobre el valor de la función  $K_s$  para valores de  $n$  inferiores a 0.25. Es común encontrar reportes que presentan datos reológicos de caldos de fermentación con  $n < 0.25$ , en los que se ha tomado  $K_s$  como un valor constante. En tales casos, los datos de  $K$  calculados probablemente estén sujetos a considerables errores. El proceso de calibración reológica con 14 fluidos de diferentes propiedades reológicas (4 Newtonianos y 10 no-Newtonianos pseudoplásticos) permitió concluir que con el dispositivo IH2 se pueden obtener determinaciones precisas de consumo de potencia y viscosidades de proceso.

Se logró desarrollar exitosamente un sistema de medición en línea de potencia en fermentadores. La inclusión de un milivoltmetro para la toma de datos incrementó 33 veces la precisión en las medidas, permitiendo detectar torques hasta un máximo de 2.82 N·m, con una resolución de 0.0226 N·m, correspondiente a incrementos de 0.00237 Watt en la potencia entregada al fluido. Con este sistema se determinó la potencia inicial entregada por 3 TR o 3 IMIG en agua en condiciones gaseadas. En ambos casos, la potencia entregada fue mayor que el triple de la potencia entregada por un solo impulsor, indicativo de que la aireación tuvo

menor influencia sobre el segundo y tercer impulsores que sobre el impulsor del fondo. Por una descalibración en un equipo previamente existente (dinamómetro), la potencia inicial real entregada durante fermentaciones con TR correspondió a 0.0894 Watt/L, valor 60% mayor que el entregado en el caso de IMIG. Ambos valores fueron, sin embargo, extremadamente bajos comparados con las potencias por unidad de volumen entregada a nivel industrial.

En cuanto a los resultados de las fermentaciones, se encontró una marcada influencia del tipo de impulsor en la morfología y las cinéticas de crecimiento y producción de aromas en cultivo sumergido por *T. harzianum*. Con los tres tipos de impulsores el aroma obtenido fue  $\gamma$ -decalactona. Este aroma estuvo asociado con el uso de aceite de ricino como fuente de carbono, y su producción mostró un comportamiento típico de un metabolito secundario. Se obtuvieron algunas trazas de 6-pentil- $\alpha$ -pirona, probablemente producidas durante el inóculo desarrollado en un medio con glucosa como fuente de carbono.

El impulsor helicoidal (IH3), generó el mayor rendimiento en biomasa, seguido por los IMIG y, finalmente, las TR. Por su parte, la concentración del aroma en los cultivos siguió un orden exactamente inverso. Estos efectos probablemente estén asociados con la mayor tensión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo de los caldos con el IH3, ocasionada a su vez por una mejor transferencia de oxígeno gracias al difusor sinterizado de este fermentador. Se requiere más trabajo experimental para corroborar esta afirmación.

Los cambios morfológicos observados en el transcurso de las fermentaciones para TR e IMIG fueron muy similares, con un crecimiento en forma filamentosa y con la presencia de *grumos* más o menos densos. Por su parte, los caldos con el impulsor helicoidal IH3 desarrollaron una morfología de *pelotilla*, debido a las condiciones hidrodinámicas mucho más suaves existentes en el cultivo.

Los caldos de fermentación con IMIG y TR mostraron características no-Newtonianas altamente viscosas, que fueron ajustadas satisfactoriamente al modelo de la ley de la potencia. Contrariamente, los caldos desarrollados con el impulsor IH3 probaron ser de baja viscosidad. Los valores de K y n dependieron de la geometría de impulsor utilizada. En general, el índice de consistencia (K), se incrementó en forma exponencial con un aumento en la concentración de biomasa. Sin embargo, este parámetro no siguió exactamente el curso de la cinética, apreciándose una reducción en su valor a partir de cierta edad del cultivo dependiente del tipo de impulsor. Tal reducción pudo estar asociada con características morfológicas o fisiológicas del microorganismo no determinadas en este trabajo.

El índice de consistencia (n), decreció rápidamente con la biomasa hasta adquirir un valor más o menos constante alrededor de 0.1- 0.2. La concentración de biomasa necesaria para alcanzar un valor estable de n fue relativamente pequeña (del orden de 2 a 5 g/L).

**La inclusión del difusor sinterizado, pese a que sirvió para mejorar la transferencia de oxígeno en el fermentador helicoidal, no fue muy afortunada porque no permitió obtener conclusiones absolutas sobre el efecto de este tipo de impulsor en las fermentaciones. Por lo tanto, se**

## Conclusiones generales

necesitan estudios adicionales en los que se utilice el mismo tipo de difusor y/o se mantenga la tensión de oxígeno disuelto constante, a fin de desarrollar una evaluación completa del efecto de la hidrodinámica en el reactor sobre la producción de aromas en cultivos sumergidos y sacar conclusiones concretas sobre la influencia real del tipo de impulsor sobre el comportamiento global de las fermentaciones con *T. harzianum*.

Finalmente, con los datos obtenidos se puede señalar que el uso de diferentes tipos de impulsor resultó en una estrategia efectiva para el control de procesos con caldos miceliarios altamente viscosos, ya que se lograron cambios considerables en la concentración de biomasa, morfología y viscosidad de los cultivos con solo cambiar el tipo de impulsor, aún a la misma potencia entregada al cultivo. Curiosamente, en el sistema IH3, con el que se logró un mejor mezclado y mejor transferencia de oxígeno, se obtuvo el menor rendimiento de aromas, probablemente asociado con un cambio en la morfología del microorganismo y con mayores TOD. Esto plantea la conclusión de que no siempre un mejor mezclado o transferencia de oxígeno implica un mejor desarrollo del proceso. Por tanto, la evaluación experimental del efecto del mezclado siempre es necesaria para poder escalar o desarrollar mejoras en un proceso de fermentación.

## 7. RECOMENDACIONES

### 7.1 MODIFICACIONES POSTERIORES AL SISTEMA DE MEDICIÓN REOLÓGICA.

Se encontró que el dispositivo IH2 no es suficientemente sensible para caldos de baja viscosidad. Por lo tanto se sugiere cambiar las relaciones geométricas del dispositivo para incrementar su sensibilidad. Por ejemplo, se puede disminuir el paso del listón helicoidal (s) y aumentar la altura (h) o el diámetro (d) del dispositivo, aunque estas últimas modificaciones aumentarían necesariamente el volumen de la muestra necesario para hacer la determinación reológica.

Sería muy útil construir un dispositivo que permitiese la adaptación en línea del reómetro al fermentador. Los problemas a superar son el mantenimiento de la esterilidad y la posibilidad de esterilización del dispositivo IH2. Estos problemas pueden ser solucionados con un sistema de derivación del caldo hacia un pequeño recipiente anexo, en donde se ubicaría el dispositivo IH2, de modo que todo el sistema sea esterilizado inicialmente. El recipiente se llenaría por gravedad, y se vaciaría por inyección de aire a presión previamente filtrado. Para mantener la esterilidad, el IH2 contaría con un dispositivo de sello mecánico forzado por un resorte, el cual sería liberado en el momento de realizar la medición, y el roce se eliminaría elevando el IH2 mediante un sistema neumático semejante al descrito por Reséndiz *et al.* (1991), que funcionase con aire estéril; posteriormente se montaría el cabezal de medición y se realizaría la determinación reológica. Dos conexiones para vapor podrían asegurar una esterilización después de cada medición. Tal dispositivo no sería extremadamente costoso y podría eliminar los problemas de toma de muestra para determinación de propiedades reológicas, aún en cultivos de 1 L.

Se recomienda seguir trabajando para completar el protocolo de comunicación entre el reómetro y el computador para poder desarrollar estudios de reología dinámica oscilatoria.

Se sugiere utilizar el impulsor helicoidal IH2 para determinar la sensibilidad del micelio al esfuerzo de corte. En un experimento preliminar tipo (no reportado aquí) se filtró micelio de cierta edad de cultivo y se sometió a agitación con el IH2 a diferentes velocidades de agitación durante periodos de 30 minutos, en los que se tomó muestras de 2 mL cada 5 minutos; cada muestra se centrifugó en tubos de Eppendorf a 14000 rpm y en el sobrenadante se cuantificó la liberación de ácidos nucleicos y proteínas por medio espectrofotometría. Se encontró una relación lineal de la absorbancia con el tiempo, y con el aumento de la velocidad de agitación. Ensayos similares realizados en el torquímetro podrían servir para encontrar bases de comparación entre diferentes tipos de impulsores a diferentes potencias entregadas al caldo. Tal comparación podría, por ejemplo, evaluarse en términos de la función de disipación  $P/kd^3t$ , propuesta por Jüsten *et al.* (1995), la cual ha tenido en relativo éxito en diferentes reportes de la literatura.

## 7.2 MODIFICACIÓN DEL DISEÑO Y OPERACIÓN DEL BIOREACTOR.

El cambio realizado en el difusor con el objetivo de tratar de eliminar las limitaciones de transferencia de oxígeno en el fermentador equipado con el IH3 no permitió una comparación rigurosa de los tres tipos de impulsores. Para subsanar esta deficiencia, se recomienda instalar el mismo difusor en los tres tipos de fermentaciones (difusor de orificio) y realizar con el nuevo difusor fermentaciones con el impulsor IH3 para comparar los resultados con los obtenidos en el presente trabajo. Para eliminar el problema de transferencia de oxígeno, se debería montar un sistema de control que mantuviese constante la TOD en todo momento y en todas las fermentaciones. Este montaje podría permitir estudios adicionales sobre el efecto de diferentes niveles de TOD en los cultivos. Durante el desarrollo de este trabajo se realizó un primer intento (sin éxito), de montar tal sistema de adquisición y análisis de datos por computador que permitiese mantener un control y vigilancia permanentes de los procesos fermentativos en el dispositivo fermentador-torquímetro, pero se detectaron problemas con la comunicación entre el torquímetro y la computadora. Por tal motivo se recomienda instalar una tarjeta de adquisición de datos externa. El sistema de control debería ser capaz de adquirir datos y controlar los siguientes parámetros : TOD, pH, T, presión dentro del fermentador, flujo de gases hacia el sistema, composición de los gases de entrada y salida del fermentador, velocidad de agitación y potencia suministrada. Esto permitiría obtener mayor cantidad de información y permitiría eliminar cualquier posible error humano, además de agilizar el tratamiento de datos y el análisis de los resultados.

Con el objetivo de mejorar la precisión relativa de las mediciones de potencia entregada a los caldos de fermentación, debería trabajarse sobre el diseño de la tapa del fermentador, creando un sistema que permita disminuir el roce existente en los rodamientos y el sello mecánico de la tapa.

Se recomienda realizar una limpieza exhaustiva de los filtros de acero sinterizado ubicados en el difusor del fermentador helicoidal antes de cada fermentación, puesto que se observó que con el tiempo se va taponando, lo que origina que el tamaño de burbuja sea cada vez más pequeño. Dado que la fuente de carbono, el aceite de ricino, tiene una densidad menor que el agua, y atrapa una gran cantidad de aire, el mezclado de esta capa aceitosa se hace más y más difícil, impidiendo el contacto de las células con el sustrato lo que origina una esporulación temprana del caldo.

Con el objetivo de acercarse más a condiciones de tipo industrial, se podría pensar en trabajar con impulsores de diámetros mayores lo que, adicionalmente, haría que la medición de la potencia entregada al caldo, con el torquímetro, fuese mucho más precisa

Finalmente, para desarrollos futuros, se sugiere inicialmente trabajar con un medio de cultivo homogéneo antes de intentar estudios de 4 fases como sucedió en el presente trabajo, lo que hace mucho más difícil la interpretación de los resultados.

### **7.3 MODELOS BIOLÓGICOS Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS.**

Se podría trabajar con modelos biológicos diferentes para evaluar el efecto de diferentes tipos de impulsor en cultivo sumergido. Por ejemplo podría utilizarse otro tipo de hongos o bacterias productoras de biopolímeros (*Xantomonas*, *Azotobacter vinelandii*, etc).

Adicionalmente, se espera que los resultados de estudios de análisis de imágenes estén a punto en un tiempo corto para poder obtener información más concreta y cuantificable sobre efectos morfológicos en la reología de este tipo de caldos. Estos estudios, podrían también evaluarse en términos de la función de disipación mencionada en el párrafo final de la sección 7.1 lo que, junto con los resultados de liberación de nucleótidos y proteínas, podría aportar una nueva metodología para la comparación de impulsores en términos de sus efectos sobre microorganismos vivos.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Allen, G. D. and Robinson, C.W. 1990. Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. *Chem. Eng. Sci.* **45**, 1 : 37-48.
- Allen, G. D. 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.
- Argüello, M. A. 1993. Características de mezclado de impulsores no convencionales en fluidos pseudoplásticos con punto de cedencia. Tesis en Ingeniería Química. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Puebla.
- Berovic, M., Koloini, T., Olsvik, E. S. and Kristiansen, B. 1993. Rheological and morphological properties of submerged citric acid fermentation broth in stirred tank and bubble column reactors. *Chem. Eng. J.* **53** : B35-B40.
- Bird, R. B., Stewart, W. E. and Lightfoot, E. N. 1990. *Transport Phenomena*. Cap. 3. Wiley, New York.
- Björkman, U. 1987-a. Properties and principles of mycelial flow : a tube rheometer system for fermentation fluids. *Biotechnol. Bioeng.* **29** : 101-113.
- Björkman, U. 1987-b. Properties and principles of mycelial flow : experiments with a tube rheometer. *Biotechnol. Bioeng.* **29** : 114-129.
- Blakebrough, N., McManamey W. J. and Tart, K. R. 1978. Rheological measurements on *Aspergillus niger* fermentation systems. *J. Appl. Chem. Biotechnol.* **28** : 453-461.
- Blanch, H. W. and Bhavaraju, S. M. 1976. Non-Newtonian fermentation broths : Rheology and mass transfer. *Biotechnol. Bioeng.* **18** : 745-790.
- Blasinski, H. and Rzycki, E. 1980. Power requirements of helical ribbon mixers. *Chem. Eng. J.* **19**: 157-160.
- 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.
- Braun, S. and Vecht-Lifshitz, S. E. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *Trends Biotechnol.* **9**, 2 : 63-68.



- Bríto-De la Fuente, E. 1992. Mixing of rheological complex fluids with helical ribbon and helical screw ribbon impellers. Ph D Thesis Université Laval, Québec, Canada
- Bríto-De la Fuente, E., Leuliet, J. C., Choplin, L. and Tanguy, P. A. 1990. Mixing and circulation times in rheologically complex fluids. *ICHEME Symp. Ser.* **121**: 75-96.
- Bríto-De la Fuente, E., Nava, J. A., Medina, L., Ascanio, G. and Tanguy, P. A. 1996. On the use of helical ribbon based -viscometry for the determination of flow curves. *Ind. Proceses Rheol.*
- Bujalski, W., Cox, P. W., Thomas, C. R. and Nienow, A. W. 1997. Mixing in fungal (*A. niger*) fermentations using dissimilar impeller systems. In: *Procc. 4<sup>th</sup> International Conference on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics*. A. W. Nienow (ed). Mechanical Engineering Publications Limited, Suffolk, U. K. pp 9-25.
- Carrillo, R. E., Svihla, C. K. and Hanley, T. R. 1991. Rheological characterization of simulated mycelial broths.
- Charles, M. 1978. Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures. *Adv. Biochem. Eng.* **8**: 1-62.
- Chavan, V. V. 1983. Close-clearance helical impellers : a physical model for Newtonian liquids at low Reynolds numbers. *A.I.Ch.E. Journal.* **29**, 2: 177-186.
- Chavan, V. V. and Ulbrecht, J. 1972. Power correlation for helical ribbon impellers in inelastic non-Newtonian fluids. *Chem. Eng. J.* **3**: 308-311.
- Cheetham, P. S. J. 1993. The use of biotransformations for the production of flavours and fragrances. *Trends Biotechnol.* **11**: 478-488.
- Dawson, M. K. 1990. InterMIG and MIG impeller literature survey. Internal Report, University of Birmingham, U. K.
- Edwards, N., Beeton, S., Bull, A. T. and Merchuk, J. C. 1989. A novel device for the assessment of shear on suspended microbial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30** : 190-195.
- Endo H., Sode, K., Karube, I. and Muramatsu, H. 1990. On-line monitoring of the viscosity in dextran fermentation using piezoelectric quartz crystal. *Biotechnol. Bioeng.* **36** : 636-641.
- 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.

## Bibliografía

- Flores, C. 1995. Producción de aromas frutales por *Trichoderma harzianum*: aspectos microbiológicos y del proceso. Tesis de licenciatura en Química Industrial. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Fronza, G., Fuganti, C., Graselli, P. and Servi, S. 1993. Biogeneration of aromas. *Chimia*. **47**, 4: 107-109.
- Gadala-Maria, F. and Acrivos, A. 1980. Shear-induced structure in a concentrated suspension of solid spheres. *J. Rheol.* **24** : 799-814.
- Galindo, E., Román, B. and Salvador, M. 1992. Effect of mechanical agitation on alcoholic fermentation. Tatterson, G., Calabrese, R. and Penney, W. (Eds). A.I.Ch.E. Symposium Series. Process Mixing-Chemical and Biochemical Applications : Part II. **89**, 293 : 72-75.
- Galindo, E., Argüello, M. A., Velasco, D., Albiter, V. and Martínez, A. 1996. A comparison of cavern development in mixing a yield stress fluid by Rushton and InterMIG impellers. *Chem. Eng. Technol.* **19** : 315-323.
- Gavrilescu, M., Roman, R. V. and Efimov, V. 1992. Rheological behaviour of some antibiotic biosynthesis liquids. *Acta Biotechnol.* **12**, 5 : 383-396.
- Godoy-Silva, R. D., Serrano-Carreón, L. Ascanio, G. and Galindo, E. 1997. Effect of impeller geometry on the production of aroma compounds by *Trichoderma harzianum*. In : Procc. 4<sup>th</sup> International Conference on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics. A. W. Nienow (ed). Mechanical Engineering Publications Limited, Suffolk, U. K. pp. 61-72.
- Hall, K. R. and Godfrey, J. C. 1970. Power consumption by helical impellers. *Trans. Instn. Chem. Engrs.* **48** : T201-T209.
- Hanssen, H.-P., Urbasch, I. and Grunwald, P. 1992. Immobilization of *Trichoderma sp.* For the production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone (6-PP). *DECHEMA-Biotechnol. Conf. 5, Part. B* : 735-737.
- Hoffman, R. L. 1972. Discontinuous and dilatant viscosity behaviour in concentrated suspensions. I. Observation of a flow instability. *Trans. Soc. Rheol.* **16** : 155-173.
- Hotop, S., Möller, J., Niehoff, J. and Schügerl, K. 1993. Influence of the preculture conditions on the pellet size distribution of *Penicillium chrysogenum* cultivations. *Process Biochem.* **28** : 99-104.
- Janssens, L., De Pooter, H.L., Schamp, N.M. and Vandamme, E.J. 1992. Production of flavours by microorganisms. Review. *Process Biochem.* **27**, 4: 195-215.

- Jolicoeur, M., Chavarie, C., Carreau, P. J. and Archambault, J. 1992. Development of a helical-ribbon impeller bioreactor for high-density plant cell suspension culture. *Biotechnol. Bioeng.* **39** : 511-521.
- Jüsten, P., Paul, G. C., Nienow, A. W. and Thomas, C. R. 1995. Variation of mycelial morphology with impeller geometry. Biochemical Eng. Symposium III. Stuttgart (Germany). p. 144.
- Kamen, A. A., Tom, R. L., Caron, A. W., Chavarie, C., Massie, B. and Archambault, J. 1991. Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **38** : 619-628.
- Käppel, M. 1979. Development and application of a method for measuring the mixture quality of miscible liquids. III. Application of the new method for highly viscous Newtonian liquids. *Int. Chem. Eng.* **19**, 4: 571-590. October, 1979.
- 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.
- Kipke, K. 1982. Fluid loadings in impellers and tanks in gassed liquids. Proc. 4<sup>th</sup> European Conference on Mixing, B.H.R.A. Paper K1, 355-370.
- Lee, S.-L. and Chou, C.-C. 1994. Growth and production of  $\gamma$ -decalactone and cis-6-dodecen-4-olide by *Sporobolomyces odorus* in the presence of fatty acids and oils. *J. Ferment. Bioeng.* **78**, 1 : 114-116.
- Lee, S.-L., Lin, S.-J. and Chou, C.-C. 1995. Growth of and production of  $\gamma$ -decalactone by *Sporobolomyces odorus* in jar fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 2 : 195-199.
- Lejeune, R. and Baron, G. V. 1995. Effect of the agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43** : 249-258.
- Lejeune, R., Nielsen, J. and Baron, G. V. 1995. Influence of pH on the morphology of *Trichoderma reesei* QM9414 in submerged culture. *Biotechnol. Lett.* **17**, 3 : 341-344.
- Liu, T. and Yu, D. 1993. Morphological measurements on *Penicillium chrysogenum* broths by rheology and filtration methods. *Biotechnol. Bioeng.* **42** : 777-784.
- Maga, J. A. 1976. Lactones in foods. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **8** : 1-56.

## Bibliografía

- Marten, M. R., Velkovska, S., Khan, S. A. and Ollis, D. F. 1996. Rheological, mass transfer and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnol. Prog.* **12** : 602-611
- McFarlane, C. M. and Nienow, A. W. 1995-a. Studies of high solidity ratio hydrofoil impellers for aerated bioreactors. 1. Review. *Biotechnol. Prog.* **11**, 6 : 601-607.
- McFarlane, C. M. and Nienow, A. W. 1995-b. Studies of high solidity ratio hydrofoil impellers for aerated bioreactors. 2. Air water studies. *Biotechnol. Prog.* **11**, 6 : 608-618.
- McFarlane, C. M. and Nienow, A. W. 1996-a. Studies of high solidity ratio hydrofoil impellers for aerated bioreactors. 3. Fluids of enhanced viscosity and exhibiting coalescence repression. *Biotechnol. Prog.* **12**, 1 : 1-8.
- McFarlane, C. M. and Nienow, A. W. 1996-b. Studies of high solidity ratio hydrofoil impellers for aerated bioreactors. 4. Comparison of impeller types. *Biotechnol. Prog.* **12**, 1 : 9-15.
- Metz, B. and Kossen, N. W. F. 1977. The growth of molds in the form of pellets - a literature review. *Biotechnol. Bioeng.* **19** : 781-799.
- Metz, B., Kossen, N. W. F. and van Suijdam, J. C. 1979. The rheology of mould suspensions. *Adv. Biochem. Engng* **11** : 103-155.
- 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. 1988. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnol. Bioeng.* **32**, 6 : 835-840.
- 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.
- Morimura, S., Kida, K. and Sonoda, Y. 1992. The influence of shear stress and its reduction in the production of saccharifying enzyme from *sochu* distillery wastewater by *Aspergillus awamori* var. *kawachi*. *J. Ferment. Technol.* **74**, 2: 129-131.
- Nagata, S. 1975. *Mixing : Principles and Applications*. Kodansha Ltd. and John Wiley & Sons. Japón.
- Nienow, A. W. 1990. Agitators for mycelial fermentations. *Trends Biotechnol.* **8**, 8: 224-233.
- Oldshue, J. Y. 1983. Fluid Mixing Technology. Chemical Engineering. McGraw-Hill, New York.

- Olsvik, E. S. and Kristiansen, B. 1992. Influence of oxygen tension, biomass concentration and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. *Biotechnol. Bioeng.* **40** : 1293-1299.
- Olsvik, E., Tucker, K. G., Thomas, C. R. and Kristiansen, B. 1993. Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* **42** : 1046-1052.
- Packer, H. L. and Thomas, C. R. 1990. Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **35** : 870-881.
- Patterson, W. I., Carreau, P. J. and Yap, C. Y. 1979. Mixing with helical ribbon agitators II. Newtonian fluids. *A.I.Ch.E. J.* **25**, 3: 508-516.
- Pedersen A. G., Bundgaard-Nielsen, M., Nielsen, J., Villadsen, J. and Hassager, O. 1993. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **41** : 162-164.
- Pedersen A. G., Bundgaard-Nielsen, M., Nielsen, J. and Villadsen, J. 1994. Characterization of mixing in stirred tank bioreactors equipped with Rushton turbines. *Biotechnol. Bioeng.* **44** : 1013-1017.
- Picque, D. and Corrieu, G. 1988. New instrument for on-line viscosity measurement of fermentation media. *Biotechnol. Bioeng.* **31** : 19-23.
- Rau, U., Gura, E., Olszewski, E. and Wagner F. 1992. Enhanced glucan formation of filamentous fungi by effective mixing, oxygen limitation and fed-batch processing. *J. Incl. Microbiol.* **9** : 19-26.
- Raymond, Y., Morin, A., Cormier, F., Champagne, C. P. and Debeau, H. 1990. Physical factors influencing the production of strawberry aroma by *Pseudomonas fragi* grown in skim milk. *Biotechnol. Lett.* **12**, 12: 931-936.
- Raymond, Y., Morin, A., Champagne, C. P. and Cormier, F. 1991. Enhancement of fruity aroma production of *Pseudomonas fragi* grown on skim milk, whey permeate supplemented with C3-C7 fatty acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34** : 524-527.
- Reeslev, M., Jørgensen, B. B. and Jørgensen, O. B. 1995. A vibrating reed viscosimeter, sensitive to changes in the concentration of exopolysaccharide and mycelial biomass and to the morphology of the mycelium. *Biotechnol. Techn.* **6**, 3 : 191-196.
- 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.

## Bibliografía

- Reuss, M., Debus, D. and Zoll, G. 1982. Rheological properties of fermentation fluids. *Chem. Eng.* **381** : 233-236.
- Reuss, M. 1988. Influence of mechanical stress on the growth of *Rhizopus nigricans* in stirred bioreactors. *Chem. Eng. Technol.* **11** : 178-187.
- Rieger, F. and Novak, V. 1973. Power consumption of agitators in highly viscous non-Newtonian liquids. *Trans. Instn. Chem. Engrs.* **51** : 105-11
- Roels, J. A., Van Den Berg, J. and Voncken, R. M. 1974. Rheology of mycelial broths. *Biotechnol. Bioeng.*, **16** : 181-208.
- Sánchez L., A. D. 1991. Evaluación de varias configuraciones de impulsores en la fermentación para la producción de goma Xantana. Tesis en Ingeniería Química. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz.
- Sawinski, J., Havas, G. and Deak, A. 1976. Power requirements of anchor and helical ribbon impellers for the case of agitating Newtonian and pseudoplastic liquids. *Chem. Eng.Sci.* **31** : 507-509.
- See-Shown, L. S. 1989. A mechanistic study of highly viscous fermentations. Ph. D. Thesis. Massachusetts Institute of Technology. Boston, Massachusetts.
- Serrano-Carreón, L. 1992. Etude sur le metabolisme des lipides et la production de 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone par deux especes du genre *Trichoderma*. Thèse de Doctorat, de l' Université de Bourgogne., ENS, BANA, France.
- Serrano-Carreón, L., Hathout, Y., Bensoussan, M. and Belin, J.-M. 1992. Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnol. Lett.* **14**, 11: 1019-1024.
- Serrano-Carreón, L., Flores, C. and Galindo, E. 1997.  $\gamma$ -decalactone production by *Trichoderma harzianum* in a stirred bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **13**: 205-208.
- Shamlou, P. A. and Edwards, M. F. 1985. . Power consumption of helical ribbon mixers in viscous Newtonian and non-Newtonian fluids. *Chem. Eng.Sci.* **40**, 9: 1773-1781.
- Shuler, M. L. and Kargi, F. 1992. *Bioprocess Engineering. Basic concepts*. Prentice-Hall New Jersey.
- Smith, G. M. and Calam, C. T. 1980. Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnol. Lett.* **2**, 6 : 261-266.

- Smith, J. J., Lilly, M. D. and Fox, R. I. 1990. The effect of agitation on morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **35** :1011-1023.
- Solomons, G. L. 1980. Fermentor design and fungal growth. En: *Fungal Biotechnology*. Smith, J. E., Berry, D. R. and Kristiansen, B. (Eds). London, Academic Press. pp. 55-80.
- Tahara, S., Fujiwara, K. and Mizutani, J. 1973. Neutral constituents of volatiles in cultured broth of *Sporobolomyces odorus*. *Agric. Biol. Chem.* **37**, 12 : 2855-2861.
- Takahashi, K. Arai, K. and Saito, S. 1982. An extended power correlation for anchor and helical ribbon impellers. *J. Chem. Eng. Japan.* **15**, 1: 77-79.
- Tatterson, G. B. 1991. *Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks*. McGraw-Hill, Inc., New York.
- Tecante, C. A. 1991. Mass transfer in rheologically complex fluids in helical ribbon screw-agitated and aerated tank. Ph.D. Thesis. Université Laval, Québec, Canada.
- Tecante, A. and Choplin, L. 1993. Gas-liquid mass transfer in non-Newtonian fluids in a tank stirred with a helical ribbon screw impeller. *Can. J. Chem. Eng.* **71** : 859-865.
- Tucker, K. G. and Thomas, C. R. 1992. Mycelial morphology : the effect of spore inoculum level. *Biotechnol. Lett.* **14**, 11 : 1071-1074.
- Tucker, K. G. and Thomas, C. R. 1994. Inoculum effects on fungal morphology : shake flasks vs agitated bioreactors. *Biotechnol. Techn.* **8**, 3 : 153-156.
- Ujcová, E., Fencí, Z., Musílková, M. and Seichert, L. 1980. Dependence of release of nucleotides from fungi on fermentor turbine speed. *Biotechnol. Bioeng.* **22** : 237-241.
- Van Suijdam, J. C. and Metz, B. 1981. Influence of engineering variables upon the morphology filamentous molds. *Biotechnol. Bioeng.* **23** : 111-148.
- Vecht-Lifshitz, S. E., Magdassi, S. and Braun, S. 1990. Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Bioeng.* **35** :890-896.
- Velasco, D. 1994. Reología y mezclado de caldos de fermentación miceliales de interés industrial. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, UACPyP-CCH. UNAM. Cuernavaca, México.
- Warren, S. J., Keshavarz-Moore, E., Ayazi-Shamlou, P. and Lilly, M. D. 1995. Rheologies and morphologies of three actinomycetes in submerged culture. *Biotechnol. Bioeng.* **45** : 80-85.

## **Bibliografia**

**Welsh, W., Murray, W. D. and Williams, R. E. 1989. Microbial and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 9 : 105-169.**