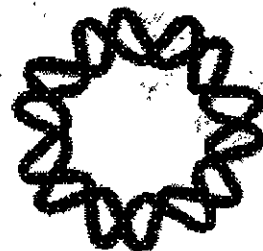




Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma
de México



03072.
7
2ij

**"Efecto de la configuración impulsor-difusor sobre
el cultivo tetrafásico de *Trichoderma harzianum*"**

T E S I S

que para obtener el grado de

Maestría en Biotecnología

presenta

José Antonio Rocha Valadez

0270622

Cuernavaca, Mor., 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Enrique Galindo, del Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Leobardo Serrano Carreón. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico del PUAL (proyecto 104.96), CONACyT (proyecto 0170P-B) y del IFS (proyecto E/2548-1), así como con la beca 93823 del CONACyT.

Índice general

	Página
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Nomenclatura	vii
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	5
2.1 Cultivos miceliares	5
2.1.1 Crecimiento filamentoso: complejidad y problemática	6
2.1.1.1 Reología	7
2.1.2 Métodos empleados para mejorar el mezclado y la transferencia de masa	10
2.1.3 Empleo y degradación de sustratos líquidos insolubles (aceites) en cultivo sumergido	11
2.2 Impulsores: diversidad y efecto sobre el mezclado	13
2.2.1 Impulsores (generalidades)	14
2.2.2 Impulsores de flujo radial	14
2.2.3 Impulsores de flujo axial	17
2.2.4 Combinación de impulsores en biorreactores	21
2.2.5 Interacción y mezclado entre fases líquidas inmiscibles	22
2.3 Transferencia de oxígeno en biorreactores	23
2.3.1 Suministro y consumo de oxígeno en biorreactores	23
2.3.2 Manipulación del área interfacial gas-líquido y su efecto sobre el k_{La} en cultivos filamentosos	26
2.4 Modelo de estudio: <i>Trichoderma harzianum</i>	29
3. Objetivos	31
4. Materiales y métodos	32
4.1 Materiales	32
4.1.1 Microorganismo	32
4.1.2 Obtención y conteo de esporas	32
4.1.3 Medios de cultivo	32
A) Medio para el desarrollo del inóculo	32
B) Medio de producción	32

4.1.4	Fermentaciones	33
4.1.4.1	Sistema de fermentación	33
4.1.4.2	Configuración y arreglo de los difusores e impulsores utilizados	35
	A) Configuración estándar	35
	B) Configuración difusor de anillo - sistema de flujo mixto	35
	C) Configuración difusor sinterizado - sistema de flujo mixto	35
4.1.4.3	Programa de control	35
4.2	Métodos analíticos	38
4.2.1	Evaluación del crecimiento micelial (biomasa)	38
4.2.2	Análisis de bióxido de carbono (CO ₂) en el gas efluente	38
4.2.3	Evaluación de las constantes de control	39
4.2.4	Estimación teórica de la potencia suministrada y calidad del mezclado en los sistemas de fermentación	40
4.2.5	Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) y de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO)	42
4.2.6	Determinación de la demanda específica de oxígeno (Q _{O₂})	44
4.2.7	Determinación de la concentración crítica de oxígeno (C _{crit})	45
5.	Resultados y discusión	46
5.1	Requerimiento mínimo y concentraciones limitantes de oxígeno disuelto en cultivos tetrafásicos	46
5.1.1	Concentración crítica de oxígeno (C _{crit})	46
5.1.2	Demanda específica de oxígeno (Q _{O₂})	48
5.1.3	Viabilidad del micelio a bajas concentraciones de oxígeno disuelto	50
5.2	Transferencia de oxígeno y parámetros de control de las tres configuraciones empleadas	52
5.2.1	Orden de reacción para la transferencia de oxígeno durante los cultivos tetrafásicos	52
5.2.2	Constantes de control y comportamiento dinámico de los sistemas	53
5.2.3	Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$)	55
5.2.4	Efecto de las configuraciones empleadas sobre los parámetros dinámicos y de control del proceso	56
5.3	Desempeño de las tres configuraciones en cultivos tetrafásicos a TOD constante	61
5.3.1	Respuesta microbiana y de control al emplear la configuración 5-ST	61
5.3.2	Respuesta microbiana y de control al emplear la configuración Anillo-SFM	63
5.3.3	Respuesta microbiana y de control al emplear la configuración Sinterizado-SFM	64
5.3.4	Efecto de la hidrodinámica sobre el crecimiento del hongo	67
5.4	Desempeño de las configuraciones estudiadas en cultivos tetrafásicos	72

6. Conclusiones y recomendaciones	74
6.1 Conclusiones	74
6.2 Recomendaciones	75
7. Bibliografía	76
Apéndices	83
A. Sistemas de primer orden	83
A.1 Generalidades	83
A.2 Características de los sistemas de primer orden	84
A.3 Determinación de la constante de tiempo en sistemas de fermentación	85

Índice de figuras

Figura		Página
2.1	Representación global de las interrelaciones entre morfología, reología del caldo e hidrodinámica y sus implicaciones sobre la productividad y condiciones del proceso.	7
2.2	Impulsores de flujo radial comúnmente empleados en biorreactores agitados.	15
2.3	Formación de las cavidades aireadas detrás de la paleta al airear.	17
2.4	Impulsores de flujo axial comúnmente empleados en biorreactores agitados.	18
2.5	Patrones de flujo generados en un sistema de flujo mixto (turbina radial e impulsor axial en la zona inferior y superior respectivamente), modelados a través de la técnica de dinámica de fluidos computacional.	21
2.6	Perfiles de concentración de oxígeno, así como las etapas desarrolladas durante su transferencia.	24
4.1	Esquema del sistema de control y adquisición de datos.	34
4.2	Diagrama esquemático de los impulsores y difusores empleados, así como de las dos fases líquidas (agua-aceite) presentes en el sistema.	36
4.3	Diagrama de flujo del programa de control.	37
4.4	Analizador de gases utilizado para evaluar la concentración de CO ₂ en el sistema.	39
4.5	Curva típica de reacción del proceso.	40
4.6	Determinación del $k_L a$ y de la VCO mediante la técnica dinámica.	43
4.7	Estimación del $k_L a$ utilizando diferenciales (dC/dt) obtenidas por la técnica dinámica.	43
4.8	Determinación de la C_{crit} , aplicando adicionalmente el criterio de la segunda derivada, según Stanbury y Whitaker (1984).	45
5.1	Evaluación de la concentración crítica de oxígeno (C_{crit}) en un cultivo típico de <i>Trichoderma harzianum</i> empleando la configuración Sinterizado-SFM.	47
5.2	Evaluación de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) en un cultivo tetrafásico de <i>Trichoderma harzianum</i> empleando la configuración Anillo-SFM.	48
5.3	Evaluación de la demanda específica de oxígeno (Q_{O_2}) en cultivos tetrafásicos de <i>Trichoderma harzianum</i> .	50
5.4	Viabilidad de <i>Trichoderma harzianum</i> respecto a bajas concentraciones de oxígeno disuelto en cultivos tetrafásicos.	51

5.5	Determinación experimental del orden de reacción para la transferencia de oxígeno empleando la configuración Sinterizado-SFM.	52
5.6	Caracterización dinámica de la configuración 5-ST a través de la respuesta transitoria de la TOD ante un cambio escalonado en el flujo de oxígeno.	53
5.7	Curva de respuesta transitoria empleada para determinar las constantes de control del sistema Sinterizado-SFM.	55
5.8	Determinación dinámica del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) empleando la configuración Anillo-SFM.	56
5.9	Tamaño típico de las burbujas de gas en agua (sin agitación).	59
5.10	Interacción entre fases en un sistema trifásico “aire-medio-aceite” (fase orgánica teñida con azul Sudan).	60
5.11	Desempeño de la configuración 5-ST a una TOD constante (10%) en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> .	62
5.12	Desempeño de la configuración Anillo-SFM a una TOD constante (10%) en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> .	63
5.13	Desempeño de la configuración Sinterizado-SFM a una TOD constante (10%) en cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> .	64
5.14	Separación de fases (aceite-medio) durante el cultivo empleando la configuración Sinterizado-SFM.	65
5.15	Interacción gas-líquido en un sistema trifásico “aire-medio-aceite” empleando un difusor sinterizado.	66
5.16	Cinética y velocidad de crecimiento en relación a la configuración en cultivos tetrafásicos de <i>Trichoderma harzianum</i> (las flechas indican la disminución de la TOD debido a la incapacidad del sistema para satisfacer la demanda de oxígeno).	68
5.17	Interacción entre fases a las 36 h del cultivo tetrafásico de <i>Trichoderma harzianum</i> empleando la configuración Anillo-SFM.	69
5.18	Evaluación de la producción específica de CO ₂ en cultivos tetrafásicos de <i>Trichoderma harzianum</i> .	70
5.19	Formación de zonas ‘muertas’ al final del cultivo tetrafásico (52 h) de <i>Trichoderma harzianum</i> empleando la configuración Anillo-SFM.	71
5.20	Cinéticas de crecimiento y de TOD en cultivos tetrafásico de <i>Trichoderma harzianum</i> en biorreactores de 1 y 10 L.	73

Indice de tablas

Tabla		Página
5.1	Evaluación de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) en cultivos tetrafásicos de <i>Trichoderma harzianum</i> .	49
5.2	Configuración y desempeño de los múltiples arreglos entre difusores e impulsores.	54

Nomenclatura

a	Area interfacial gas-líquido	[m ² /m ³]
a ₁	Coefficiente de ecuación diferencial	[-]
a ₀	Coefficiente de ecuación diferencial	[-]
B	Ancho de mampara	[m]
b	Coefficiente de ecuación diferencial	[-]
C _{crit}	Concentración crítica de oxígeno	[%]
C _g [*]	Concentración de oxígeno disuelto a la saturación del aire	[mmol O ₂ /L]
C _L	Concentración de oxígeno disuelto en el seno del líquido	[mmol O ₂ /L]
C ₁	Separación del impulsor inferior al fondo del biorreactor	[m]
C ₂	Separación entre impulsores	[m]
D	Diámetro del impulsor	[m]
D _d	Diámetro del difusor	[m]
dC/ dt	Velocidad global de transferencia de oxígeno	[mmol O ₂ /L•h]
E _n	Error actual	[%]
E _{n-1}	Error anterior	[%]
E _{n-2}	Error anterior a dos tiempos	[%]
Fl	Número de flujo	[-]
G	Función de transferencia	[-]
H _L	Altura del líquido en el biorreactor	[m]
H _{Ac}	Altura de la fase orgánica en el medio	[m]
h	Altura de la paleta de los impulsores	[m]
K	Índice de consistencia de la ley de la potencia	[Pa•s ⁿ]
K _C	Constante proporcional	[-]
k _{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	[h ⁻¹]
K _p	Ganancia del proceso	[-]
M	Magnitud del cambio de la variable manipulada	[%]
N	Velocidad de agitación	[s ⁻¹]
Na	Velocidad de transferencia de oxígeno	[mmol O ₂ /L•h]
n	Índice de flujo	[-]
O ₂ %	Flujo de oxígeno actual	[%]
O ₂ % _{n-1}	Flujo de oxígeno anterior	[%]
P	Potencia	[W]
P _o	Número de potencia	[-]
P/V	Potencia volumétrica	[W/L]

PID	Proporcional-Integral-Derivativo	[-]
Q_{O_2}	Demanda específica de oxígeno	[mmol O_2 / g _{cel} •h]
Re	Número de Reynolds	[-]
SFM	Sistema de flujo mixto	[-]
ST	Sistema de turbinas	[-]
s	Variable compleja	[-]
T	Diámetro del biorreactor	[m]
t	Tiempo	[h]
t_c	Tiempo de circulación	[s]
T_d	Tiempo muerto	[s]
TOD	Tensión de oxígeno disuelto	[%]
VCO	Velocidad de consumo de oxígeno	[mmol O_2 / L•h]
VRS	Velocidad máxima de respuesta del sistema	[%/ s]
VPCO ₂	Velocidad de producción de CO ₂	[mmol CO ₂ / L•h]
X	Concentración de biomasa celular	[g _{cel} / L]
Y_{O_2}	Rendimiento de oxígeno	[g _{cel} / mmol O_2]

Letras griegas

ϕ	Tiempo de control	[s]
γ	Velocidad de deformación	[s ⁻¹]
η	Viscosidad aparente	[Pa•s]
ρ_L	Densidad del medio	[kg/ m ³]
τ	Constante de tiempo	[s]
τ	Esfuerzo de corte	[Pa]
τ_a	Constante de tiempo aparente	[s]
τ_d	Constante derivativa	[s]
τ_i	Constante integral	[s]
τ_y	Punto de cedencia	[Pa]
μ	Velocidad específica de crecimiento	[h ⁻¹]
ω	Velocidad angular	[s ⁻¹]

Resumen

Los microorganismos miceliares desempeñan un papel de gran importancia en la industria de los bioprocesos para la producción de antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas y compuestos de aroma, entre otros. Recientemente, diversos estudios han permitido un mejor entendimiento de las relaciones entre la hidrodinámica, la transferencia de masa, el crecimiento y la productividad. Sin embargo, en la mayoría de estos reportes se excluye el uso de sustratos líquidos insolubles (aceites), compuestos frecuentemente utilizados como suplementos nutricionales o como fuente única de carbono. Estos compuestos originan que, además de las complicaciones reológicas propias de los cultivos miceliares, los sistemas se vuelvan sumamente heterogéneos, lo cual puede generar diversas limitaciones nutricionales. En este sentido, la manipulación de las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de oxígeno, a través del uso de diferentes configuraciones de impulsores y difusores de gas, constituye una buena alternativa para mejorar la eficiencia del proceso, promoviendo así una mejor interacción entre fases.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el desempeño de dos configuraciones de impulsores y tres difusores de gas sobre la cinética de crecimiento de *Trichoderma harzianum* en cultivos tetrafásicos (aire-micelio-medio-aceite) bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto.

Se utilizaron tres configuraciones: un sistema de 2 turbinas Rushton y un difusor de 5 orificios (5-ST); un sistema de flujo mixto (turbina Rushton y hélice marina) y un difusor de anillo con 8 orificios (Anillo-SFM); y el sistema de flujo mixto anterior en combinación con un difusor sinterizado (Sinterizado-SFM).

La concentración crítica de oxígeno, la demanda específica de oxígeno y la producción específica de CO₂, estimadas en la fase exponencial de crecimiento, fueron aproximadamente de 4% TOD (0.010 mmol O₂/L), 0.9 mmol O₂/g·h y 0.37 mmol CO₂/g·h, respectivamente. Para evitar la limitación de oxígeno durante el proceso, y así evaluar el desempeño de los diferentes difusores e impulsores estudiados sobre el crecimiento, las fermentaciones se controlaron a 10% TOD manipulando la presión parcial del oxígeno en el gas alimentado.

De manera general, la transferencia de oxígeno fue una función de la configuración utilizada. Así, el k_{La} del sistema Anillo-SFM duplicó su valor en relación al de 5-ST (25.6 vs 12.6 h⁻¹). Por un lado, el difusor de anillo aumentó el área de dispersión del gas en el medio; mientras que por otro, el SFM favoreció tanto al macromezclado como a la interacción entre fases. De igual manera, el difusor empleado en la configuración Sinterizado-SFM (único parámetro manipulado respecto al sistema Anillo-SFM) incrementó el área interfacial gas-líquido al reducir significativamente el tamaño de burbuja, generando el mayor k_{La} de los tres sistemas (51.8 h⁻¹).

El periodo "lag" y las velocidades de crecimiento observadas al utilizar las configuraciones 5-ST y Sinterizado-SFM fueron prácticamente las mismas (36 h y 0.19 ± 0.02 g/L·h). Sin embargo, la concentración de biomasa obtenida al emplear la configuración 5-ST fue substancialmente mayor que con el sistema Sinterizado-SFM (11.4 vs 6 g/L). Esto se debió probablemente a una limitación por sustrato carbonado, resultado de la formación de una emulsión aire-aceite en la superficie del caldo originada por el incremento en el área interfacial gas-líquido. Por el contrario, la configuración Anillo-SFM originó la mayor velocidad de crecimiento (0.37 g/L·h) y el periodo "lag" más corto, además de una concentración celular de 9.6 g/L. La hidrodinámica (patrones de flujo) generada por el sistema de flujo mixto mejoró la interacción entre fases y el macromezclado, los cuales a su vez influyeron sobre el crecimiento del hongo.

Este trabajo demuestra que en sistemas tan complejos (4 fases), el diseño del biorreactor requiere de un compromiso entre el mezclado y la transferencia de oxígeno para evitar limitaciones nutricionales (oxígeno y/o sustrato carbonado) durante el cultivo

Capítulo I

Introducción

El estudio de cultivos miceliares ha originado durante décadas gran interés en la comunidad científica e industrial debido a los múltiples productos de interés obtenidos (antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas, vitaminas y compuestos de aroma, entre otros; Mitard y Riba, 1988). Sin embargo, este interés se incrementó de manera notable durante los últimos años debido, principalmente, a la implementación y creación de nuevas y mejores herramientas para el estudio de las relaciones entre la hidrodinámica y la productividad de los cultivos (análisis de imágenes, reometría y medición de potencia en línea).

Los hongos filamentosos son organismos eucariotes inferiores, compuestos por filamentos ramificados (hifas) de pared celular rígida y gruesa (Gooday, 1995). En cultivo sumergido, a nivel macroscópico, los hongos desarrollan dos tipos de morfología extremas: filamentosa (micelio disperso) o agregados de hifas compactos semiesféricos (*pellets*), intermedias a éstas se presentan toda una serie de formas agregadas de micelio en suspensión.

En la mayoría de los procesos industriales que utilizan hongos filamentosos, el microorganismo crece en forma dispersa (Olsvik y Kristiansen, 1994). Así, a medida que avanza el proceso, la formación de redes tridimensionales, producto del crecimiento y de la interacción entre las delgadas, largas y ramificadas hifas, originan caldos altamente viscosos y no-Newtonianos, por lo que la transferencia de masa (oxígeno, nutrientes, etc.) y la homogeneidad se ven drásticamente limitadas. En estos casos, el uso de altas velocidades de agitación para disminuir tales limitaciones, especialmente la de oxígeno, es deseable. Sin embargo, el esfuerzo mecánico aplicado puede provocar daño celular en la hifa.

El oxígeno es sin duda alguna el elemento más difícil de suministrar en un cultivo miceliar, y por lo regular en cualquier cultivo sumergido, debido a la baja solubilidad que éste presenta y a los problemas difusionales que se incrementan conforme aumenta la viscosidad hacia el final de la fermentación. En diversos trabajos (Marten *et al*; 1996; Sargantanis y Karim, 1996) la transferencia de oxígeno ha representado el paso limitante hacia un mejor crecimiento y productividad, por lo que ha sido catalogada como uno de los problemas más comunes y difíciles de resolver en cultivos filamentosos (Nienow, 1990b; Galindo *et al*; 1996).

Sin embargo, la transferencia de oxígeno parece no ser el paso limitante inicial en cultivos filamentosos empleando sustratos insolubles (aceite, celulosa, harina), frecuentemente utilizados como suplementos nutricionales e incluso como fuente única de carbono en numerosos procesos industriales (Ison y Lilly, 1996). En estos casos, la lenta asimilación del sustrato por el hongo, comúnmente reflejado como un periodo “lag” prolongado, representa la reacción limitante, fenómeno que puede provocar limitaciones nutricionales considerables en el crecimiento al inicio del cultivo. Esta limitación se incrementa al emplear bajas velocidades de agitación (condición afrontada en la mayoría de los cultivos filamentosos) ya que el sistema pierde homogeneidad y la interacción sustrato-hongo se ve reducida, por lo que la degradación del sustrato hasta sus unidades monoméricas y posterior uso como fuente de carbono, requiere de más tiempo.

Esta problemática es especialmente compleja en sistemas que emplean aceites como fuente única de carbono, ya que los sistemas se vuelven sumamente heterogéneos debido a la integración de cuatro fases -medio de cultivo (fase acuosa), aceite (fase orgánica), hongo filamentosos (fase sólida) y aire (fase gaseosa)- y a las complicaciones reológicas propias de los cultivos miceliares. En este tipo de sistemas, la interacción aceite-hongo es drásticamente limitada debido a la separación de fases entre el aceite y el medio acuoso, causando la tendencia natural del aceite a emigrar hacia la superficie, limitando la interacción del micelio con el sustrato carbonado.

A pesar de que, frecuentemente, los problemas de transferencia de masa son producto de la heterogeneidad del sistema, es importante identificar la limitación inicial (transferencia de oxígeno o sustrato) ya que ésta regirá las condiciones iniciales de operación, así como las estrategias experimentales a seguir para minimizar dicha limitación. Dado que la transferencia de oxígeno resulta ser generalmente la limitación más importante durante un cultivo filamentosos, diversas estrategias han sido reportadas para mejorar su eficiencia (Vardar-Sukan, 1985), como son: presurización del sistema, incremento en la velocidad de agitación y aumento en el área de burbuja, entre otras. Por otro lado, si la limitante es la separación de fases (como suele ocurrir en sistemas empleando compuestos orgánicos; Pacek y Nienow, 1995), existen dos estrategias a seguir, el aumento en la velocidad de agitación y la manipulación de los patrones de flujo mediante diversos impulsores; donde el objetivo principal es favorecer el contacto entre fases (gas-líquido; líquido-líquido y líquido-sólido), mejorando así la transferencia de masa y la homogeneidad en el medio (Skelland y Ramsay, 1987).

Los impulsores y difusores empleados juegan un papel de gran importancia en éstos casos ya que determinan las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de oxígeno. De hecho, estudios recientes en cultivos filamentosos (Buckland *et al*; 1988; Bujalski *et al*; 1997) han

demostrado que la productividad y la transferencia de masa durante el proceso dependen en gran medida del mezclado y este a su vez del tipo de impulsor y difusor empleado.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de diversas configuraciones de impulsores y difusores sobre el mezclado y la transferencia de oxígeno, así como la repercusión individual de éstos en el crecimiento de *Trichoderma harzianum* a tensiones de oxígeno disuelto (TOD) constantes en un sistema multifásico complejo, empleando aceite de ricino como única fuente de carbono.

Además de las complicaciones que implica este sistema tetrafásico, el hongo filamentoso muestra una marcada sensibilidad al estrés hidrodinámico (Serrano-Carreón *et al*; 1997), por lo que los problemas reológicos (altas viscosidades generadas por el crecimiento) y de transferencia no pueden ser minimizados empleando estrategias comunes o triviales (aumento en la velocidad de agitación), complicando aún más las operaciones de mezclado y de transferencia conforme avanza el proceso.

Capítulo II

Antecedentes

2.1 Cultivos miceliares

Los microorganismos miceliares desempeñan un papel de gran importancia en la industria farmacéutica, alimentaria y de control biológico (Mitard y Riba, 1988; Treskatis *et al*; 1997). Desde el descubrimiento de la penicilina (1929), grandes avances científicos y tecnológicos se han registrado en el bioprocesamiento de cultivos miceliares. Actualmente, el análisis de imágenes, la reometría y la posibilidad de medir la potencia suministrada han permitido un mejor entendimiento de las relaciones entre la hidrodinámica, transferencia de oxígeno, crecimiento y la productividad en estos cultivos.

Los hongos filamentosos están compuestos por filamentos ramificados (hifas) de pared celular rígida y gruesa, compuesta a su vez de diversos polisacáridos fibrosos (quitina y β -glucano) y de algunas glicoproteínas. Su crecimiento en medio sólido es por lo regular radial, lo que permite mayor movilidad y flexibilidad a las hifas para explorar y aprovechar los diversos medios y sustratos en su entorno (Gooday, 1995).

Las características físicas que presentan los cultivos miceliares son diferentes a los obtenidos por otros cultivos microbianos (bacterias o levaduras) debido principalmente a la gran diversidad morfológica y fisiológica que desarrollan durante su crecimiento. En cultivo sumergido, los hongos presentan dos tipos de morfología extrema: *pellets* o agregados de hifas compactos semiesféricos, y micelio disperso o filamentosos.

La morfología miceliana más conveniente, desde el punto de vista operacional, es la de *pellet*, pues en los cultivos en que éstos predominan se observan caldos con características Newtonianas de baja viscosidad, donde las limitaciones difusionales hacia el centro del *pellet* representan la restricción principal de crecimiento. Así, la productividad de la mayoría de los *pellets* es inversamente proporcional a su tamaño (Wittler *et al*; 1986). Sin embargo, la mayoría de los procesos fermentativos miceliares crece en forma filamentosos (Olsvik y Kristiansen, 1994), provocando la formación de caldos altamente viscosos y no-Newtonianos, donde la transferencia de masa y la homogeneidad se ven drásticamente limitadas conforme avanza el proceso (Cui *et al*; 1998).

2.1.1 Crecimiento filamentoso: complejidad y problemática

Los caldos de fermentación son generalmente suspensiones heterogéneas de microorganismos, componentes del medio y diversos metabolitos y/o productos dispersos en un medio de cultivo. A diferencia de otros caldos, las propiedades reológicas de los cultivos filamentosos cambian en función del tiempo de fermentación debido principalmente al incremento en la masa celular, a los cambios morfológicos de las hifas y a las interacciones entre estas (Roels *et al*; 1974; Olsvik y Kristiansen, 1994).

Las hifas, usualmente largas, delgadas y ramificadas, se entrelazan debido a su elevada relación longitud/diámetro, formando así una complicada red tridimensional. El hecho de que estos microorganismos crezcan en forma tan dispersa, genera suspensiones altamente viscosas y reológicamente complejas con características propias de un fluido pseudoplástico (Nienow, 1990b), aún a concentraciones de biomasa relativamente bajas (Kemblowski y Kristiansen, 1986). Estas propiedades ocasionan graves problemas de mezclado en el medio, lo cual resulta en la generación de zonas “muertas” o mal mezcladas, en la reducción de la transferencia de masa y en la formación de gradientes en las concentraciones de nutrientes, metabolitos y tensiones de oxígeno disuelto (TOD), los cuales pueden llegar a ser críticos en cultivos de esta naturaleza (Treskatis *et al*; 1997).

Diversos estudios señalan que la reología de las suspensiones miceliarias, al igual que la productividad, depende de numerosos parámetros intrínsecos del microorganismo tales como la forma, el tamaño, la masa, la concentración, la flexibilidad y la composición de la pared celular de las hifas (Metz *et al*; 1979; Olsvik *et al*; 1993). De igual manera, múltiples reportes corroboran que estos parámetros pueden ser alterados mediante cambios en el volumen de operación, la concentración de oxígeno disuelto, la velocidad de agitación y el tipo de impulsor, entre otros (Jüsten *et al*; 1996; Cui *et al*; 1998). Por ello, las condiciones de operación ejercen un fuerte impacto sobre la morfología y las interacciones hifa-hifa y éstas a su vez sobre las propiedades reológicas de los cultivos.

Dado que las características morfológicas del micelio influyen notablemente sobre las propiedades reológicas del medio (Kristiansen y Olsvik, 1993), existe una marcada interdependencia entre la morfología y el funcionamiento de un biorreactor (Van Suidam y Dusseljee, 1987; Thomas, 1993). Así, la reología de los caldos influye notablemente en el desempeño de un fermentador, principalmente en sus características de mezclado y de transferencia de masa y calor (Jüsten *et al*; 1997) las cuales a su vez, y mediante un efecto

retroalimentado, afectan directamente al crecimiento, la morfología, la reología y la formación del producto (Makagiarsar *et al*; 1993; Bujalski *et al*; 1997).

Las diversas interrelaciones entre las características morfológicas de los caldos filamentosos y sus implicaciones sobre la productividad y condiciones del proceso, se resumen en la figura 2.1.

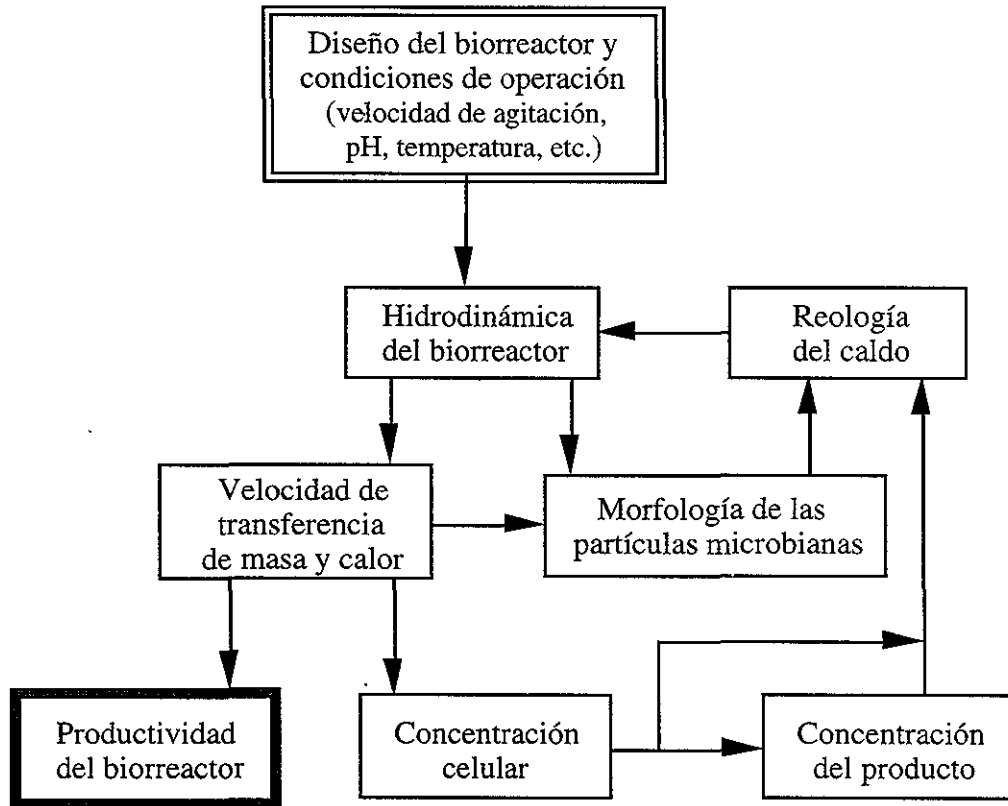


Figura 2.1- Representación global de las interrelaciones entre morfología, reología del caldo e hidrodinámica y sus implicaciones sobre la productividad y condiciones del proceso (adaptado de Galindo *et al*; 1996). Los re-cuadros, claro y oscuro, indican las variables de entrada y de salida del sistema.

2.1.1.1 Reología

La ciencia que estudia los fluidos y su deformación es conocida como reología. Diversos estudios empleando fluidos no-Newtonianos (pseudoplásticos, dilatantes, etc.) han demostrado que las propiedades de estos pueden ser descritas mediante la “Ley de la Potencia” o ley de Ostwald de Waele:

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

donde:

- τ = esfuerzo de corte (Pa)
- K = índice de consistencia ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)
- γ = velocidad de deformación (s^{-1})
- n = índice de flujo (-)

Una vez evaluados estos parámetros, la característica reológica del fluido puede ser deducida [pseudoplástico ($n < 1$) o dilatante ($n > 1$)], mientras que la viscosidad del caldo, propiedad física que caracteriza la resistencia a la deformación del fluido, es calculada a través de la siguiente ecuación.

$$\eta = \tau \cdot \gamma^{-1} \quad \text{donde: } \eta = \text{viscosidad (Pa}\cdot\text{s)}$$

La mayoría de los caldos miceliares son fluidos pseudoplásticos, la viscosidad decrece al aumentar la velocidad de deformación, por lo que sus características de flujo cambian en función de la posición que guarden respecto a la zona de impulsores (zonas de alta velocidad de deformación). Esto implica que el fluido tendrá una baja viscosidad en las zonas aledañas a los impulsores, producto del esfuerzo y movimiento que éstos ejercen sobre el medio. Por el contrario, en las zonas alejadas de éstos (cerca de las paredes del biorreactor), la velocidad de deformación aplicada al fluido será menor, originando un aumento notable en la viscosidad.

En cultivos miceliares, y a medida que la concentración celular aumenta, ocurren cambios significativos en el índice de consistencia (K) y en el índice de flujo (n). Existen ciertos casos extremos donde la concentración celular es tal, que el caldo anexo a la pared del biorreactor no presenta movimiento alguno. Este fenómeno prevalecerá hasta que se aplique la fuerza necesaria para que el flujo ocurra. Esta propiedad de flujo es denominado punto de cedencia (τ_y).

Las condiciones de operación ejercen un fuerte impacto sobre las características morfológicas de los hongos, los cuales a su vez afectan las propiedades reológicas del sistema. Empleando un reactor anular, el cual permite evaluar el efecto de una velocidad de deformación promedio (no reportada) sobre cultivos de *Aspergillus niger* ATCC 26036, Mitard y Riba (1988) señalan que la morfología miceliar depende en gran medida del esfuerzo de corte aplicado. Por un lado, el crecimiento en forma de *pellets* se favoreció al someter el cultivo a esfuerzos menores de 5 Pa; mientras que por otro, esfuerzos mayores generaron un cese en dicho crecimiento (*pellets*), incrementando simultáneamente la ramificación de los filamentos así como la resistencia de estos hacia el estrés mecánico (producto de la interacción entre hifas).

En caldos de *Cephalosporium acremonium* (Kim y Yoo, 1992), la concentración celular aumentó gradualmente hasta alcanzar su máximo alrededor de las 80 h. De igual manera, la viscosidad aparente se incrementó rápidamente hasta alcanzar su valor máximo a las 55 h y posteriormente disminuyó. Sin embargo, a pesar de que la biomasa a las 80 h fue similar al de las 55 h, las viscosidades estimadas en ambos casos fueron distintas entre si. Esto indica que existen otros factores diferentes a la concentración celular que influyen sobre la viscosidad, tales como la morfología, la ramificación del micelio o la rigidez de la hifa. Adicionalmente, los autores señalan que el índice de consistencia (K) se incrementó de manera no lineal conforme aumentó la concentración de biomasa.

Una observación similar fue reportada por Serrano-Carreón *et al.* (1997) en cultivos de *Trichoderma harzianum* empleando fermentadores de 10 L y aceite de ricino como fuente única de carbono. En dicho estudio se reporta una diferencia notable en la reología de los caldos, cuando estos se compararon a la misma concentración de biomasa, pero a diferentes edades de cultivo. Los autores atribuyen tal efecto a las características heterogéneas de las hifas durante el proceso, ya que a las 48 h el micelio presento hifas largas, delgadas y con ramificaciones, mientras que a las 96 h, estas presentaron un notable “hinchamiento” (atribuido a la acumulación lipídica en el interior de la célula), sugiriendo que la morfología de las hifas y no la concentración celular *per se* es responsable de las diferencias en las características reológicas del caldo.

En un estudio reciente, Jüsten *et al.* (1997) utilizando un procesador de imágenes, reportan que la morfología desarrollada por *Penicillium chrysogenum* en un cultivo sumergido depende tanto de la geometría y tamaño del impulsor, como de la velocidad de agitación aplicada. Empleando diversos impulsores, demostraron que la eficiencia del mezclado, al modificar la transferencia de masa y calor, rige el crecimiento y la morfología, los cuales a su vez influyen en la productividad de los cultivos. Tal conclusión fue corroborada al diseñar, en base a sus datos experimentales, un modelo estadístico de fragmentación para microorganismos filamentosos. Dicho modelo predijo adecuadamente los cambios morfológicos del micelio (medidos como el área proyectada promedio) generados a partir de las diversas potencias volumétricas (producto de los distintos impulsores y velocidades de agitación) al cual fue expuesto.

2.1.2 Métodos empleados para mejorar el mezclado y la transferencia de masa

A pesar de los problemas que origina la compleja reología de los caldos miceliarios, existen diversas alternativas reportadas para contender con dicha problemática. El fundamento común radica en mejorar la calidad del mezclado (y por lo tanto la homogeneidad y la transferencia de masa y/o calor) o en incrementar la concentración, presión parcial, del oxígeno en el sistema.

La dilución de los caldos miceliarios es un método comúnmente empleado en diversos estudios y en numerosos procesos industriales debido a su fácil aplicación y a su efecto inmediato sobre las propiedades reológicas de los caldos. Este método consiste en la adición de agua estéril o medio fresco al fermentador, intentando así disminuir la viscosidad y la pseudoplasticidad, originando una mejoría notable en el mezclado. En fermentaciones de *Nocardia lactamdurans*, agregando de 15 a 18% de agua al biorreactor se logró abatir la viscosidad por un factor que fue de 1.6 a 2.2, con lo que se obtuvieron incrementos en el $k_L a$ de hasta un 50% (Buckland *et al.*; 1988). Sin embargo, su uso actual es limitado, ya que esta mejoría sólo es temporal y a medida que la viscosidad y/o los valores del índice de consistencia aumenten, el periodo de duración de dicho efecto será más corto y menos eficiente (Kristiansen y Olsvik, 1993).

Otra alternativa comúnmente empleada es la de incrementar la velocidad de agitación conforme aumenta la viscosidad, ya sea al inicio o durante el cultivo, tratando así de mejorar la transferencia de masa y de minimizar la heterogeneidad en el sistema. Lejeune y Baron (1995) en su estudio empleando *Trichoderma reesei* en cultivos con lactosa señalan que la producción de celulasas fue afectada notoriamente por las condiciones de agitación imperantes en el sistema. La producción enzimática disminuyó drásticamente al someter el cultivo a condiciones extremas de agitación (150 y 400 RPM) debido a limitaciones de oxígeno, baja transferencia de oxígeno (150 RPM), y a un decremento en la velocidad de producción enzimática, alto esfuerzo mecánico aplicado (400 RPM); mientras que las máximas productividades fueron logradas a velocidades de agitación intermedias a estas (200 y 300 RPM). Por otro lado, Bujalski *et al.* (1997) reportan la generación de una morfología más productiva de ácido cítrico (*pellets* grandes y compactos con regiones anulares laxas) al incrementar gradualmente la velocidad de agitación en cultivos de *Aspergillus niger*. Los autores emplearon como criterio de manipulación observaciones del medio, las cuales se basaron en la exclusión de zonas “muertas” y en la apreciación general de fluido en movimiento. A pesar de las múltiples ventajas que presenta este método, el incremento en la velocidad de agitación es impráctico a nivel industrial debido a que los motores utilizados regularmente son de una o de dos velocidades como máximo; además de tener un uso limitado en cultivos miceliarios, ya que estos muestran una marcada sensibilidad al estrés mecánico.

Por otro lado, el aire (flujo de entrada) enriquecido con oxígeno puro ha sido empleado en diversos estudios de laboratorio (Marten *et al*; 1996) debido a que no altera las condiciones hidrodinámicas del biorreactor (la velocidad de agitación permanece constante). Generalmente, esta técnica es utilizada en cultivos filamentosos donde el oxígeno se vuelve el elemento limitante, ya que la concentración de oxígeno en el medio se incrementa gradualmente (conforme aumenta su presión parcial en el gas alimentado) mejorando así la transferencia de oxígeno en el sistema. Sin embargo, la incorporación del oxígeno puro al gas de entrada (aire) resulta incosteable en procesos industriales.

El uso y estudio de diversos impulsores en cultivos filamentosos es relativamente nuevo, ya que anteriormente las turbinas Rushton eran consideradas como estándar en los equipos industriales, debido a sus características de dispersión del gas y al poco entendimiento en cuestiones básicas de mezclado (Nienow, 1990b). Actualmente, el empleo de distintas configuraciones de impulsores ha permitido mejorar la dispersión y el tamaño de las burbujas de gas, así como la homogeneidad en el medio, además de incrementar la transferencia de masa y de calor a diferentes niveles de trabajo (laboratorio e industrial). El efecto de distintos impulsores y difusores sobre la productividad, transferencia de oxígeno y mezclado, así como los motivos de su mejoría se describen más adelante.

2.1.3 Empleo y degradación de sustratos líquidos insolubles (aceites) en cultivo sumergido

La elección de la fuente de carbono en cultivos miceliarios, al igual que en otros sistemas, depende regularmente del producto deseado y de su costo. A lo largo de numerosos estudios, una gran variedad de sustratos carbonados han sido empleados, los cuales abarcan desde sustratos solubles ordinarios (glucosa, sacarosa, etc.), hasta compuestos insolubles complejos (aceites, harinas, celulosa). A nivel industrial, comúnmente se utilizan sustratos insolubles complejos y de grado técnico, destacando el uso de estos en la producción de ácido cítrico (Millis *et al*; 1963), de enzimas (celulasas, pectinasas y lactasas, entre otras; Kristiansen y Bu' Lock, 1980) y en la industria farmacéutica y de antibióticos (Ratledge, 1977).

Los sustratos insolubles pueden ser clasificados en dos categorías: sólidos (celulosa, almidón, harinas) y líquidos (aceites), englobando este último una gran cantidad de sustratos no solubles empleados industrialmente. Los aceites han sido utilizados como suplementos nutricionales, o bien, como fuentes únicas de carbono, destacando el uso del ácido oleico, Tweens® y algunos aceites vegetales en cultivos de *Aspergillus niger* y *Rhizopus arrhizus*, los cuales fueron empleados para incrementar la productividad de ácido cítrico y fumárico a nivel matraz,

respectivamente (Millis *et al.*; 1963; Goldberg y Stieglitz, 1985). Por otro lado, estudios recientes demuestran que el metabolismo lipídico esta involucrado directamente en la biosíntesis de varios compuestos de aroma (lactonas). Bonnarme *et al.* (1997), empleando una gran diversidad de aceites vegetales como complementos nutricionales reportan la producción de la molécula 6 pentil- α -pirona en cultivos a nivel matraz de *Trichoderma* sp. De igual manera, Serrano-Carreón *et al.* (1997) demostró que el aceite de ricino, al ser utilizado como fuente única de carbono, estimuló la síntesis de γ -decalactona en cultivos lote (10 L) de *Trichoderma harzianum*.

El proceso de degradación de los sustratos insolubles requiere de una serie de etapas, donde la interacción entre los parámetros físicos (geometría del impulsor, dinámica del fluido, fenómenos de transporte) y biológicos (crecimiento, morfología, etc.) determinaran la eficiencia del proceso. En el caso específico de aceites (triglicéridos), estos tienen que ser hidrolizados inicialmente hasta glicerol y ácidos grasos libres a través de la acción de lipasas extracelulares secretadas al medio. Posteriormente, los ácidos grasos libres son transportados hacia el interior de la célula donde son degradados hasta monómeros de carbono, a través de la β -oxidación (Weete, 1980), los cuales se incorporan finalmente a las rutas metabólicas donde liberan su aporte energético. En este sentido, Ison y Lilly (1996) señalan que la interacción entre el aceite y el hongo es de gran importancia, ya que la síntesis de lipasas, así como su acción hidrolítica, dependen del contacto entre fases; por lo que una adecuada interacción es crucial para la inducción de las enzimas y posterior hidrólisis del aceite.

A pesar del amplio uso de aceites en la industria farmacéutica, empleados como precursores en la síntesis de antibióticos (Ratledge, 1977), existen relativamente pocos estudios en sistemas de esta naturaleza. Lo anterior debido, principalmente, a que el uso de aceites genera problemas de mezclado y de transferencia entre las diversas fases del sistema -medio de cultivo (fase acuosa), aceite (fase orgánica), hongo filamentoso (fase sólida) y aire (fase gaseosa)-, además de que las complicaciones reológicas de los cultivos miceliares dificultan aun más el proceso de hidrólisis. Sin embargo, se presume (Ison y Lilly, 1996) que la limitación inicial y principal paso limitante en este tipo de procesos reside en la separación inicial de fases (heterogeneidad) entre el aceite y el hongo.

2.2 Impulsores: diversidad y efecto sobre el mezclado

El mezclado es tal vez la más universal de todas las operaciones unitarias, ya que forma parte integral de todos los procesos químicos y bioquímicos (Holland y Chapman, 1966). De hecho, prácticamente no existe industria en la que no esté presente la agitación o mezclado como parte fundamental de algún proceso (Treybal, 1980). El mezclado tiene como fin el lograr alguno, o la combinación, de los siguientes objetivos:

- Optimizar la interacción entre las diversas fases (homogeneidad) presentes en un sistema.
- Dispersar un gas en el seno de un líquido en forma de pequeñas burbujas.
- Suspender en un fluido partículas sólidas.
- Acelerar el proceso de solubilización entre fases miscibles.
- Dispersar un líquido en otro no miscible con él, para lograr así una emulsión.

En este sentido, el mezclado puede definirse como la integración de dos o más porciones diferentes de un material, de manera que se alcance un nivel deseado de uniformidad física o química en el producto final (Holland y Chapman, 1966); o bien, como la distribución al azar de dos fases inicialmente separadas (McCabe y Smith, 1967).

En los procesos biotecnológicos, los objetivos más importantes del mezclado son la dispersión del gas en el seno del líquido (transferencia de oxígeno) y el contacto entre fases (homogeneidad), debido a los requerimientos metabólicos de oxígeno por parte de los microorganismos y a la frecuente formación de gradientes (oxígeno, nutrientes) en el bioreactor. En estos sistemas, el empleo de tanques agitados mecánicamente es común ya que favorece la interacción entre los fluidos, mejorando el contacto interfacial de los componentes (Tatterson, 1991). La agitación mecánica se lleva a cabo mediante elementos de agitación (impulsores), los cuales resultan altamente efectivos en la dispersión de sólidos, líquidos o gases en líquidos, provocando así buenos coeficientes de transferencia de masa, alta turbulencia y una adecuada interacción entre fases (Oldshue, 1983; Myers *et al.*; 1996).

2.2.1 Impulsores (generalidades)

Los impulsores han sido ampliamente utilizados en el mezclado debido a su versatilidad, extensa diversidad de diseños y a su facilidad de uso y manejo. Regularmente son montados sobre un eje movido por un motor, donde el tipo y cantidad dependen de la aplicación deseada, microorganismo empleado, condiciones de operación y de las dimensiones del tanque de trabajo (Treybal, 1980; Bakker *et al*; 1994).

Los impulsores desempeñan dos funciones esenciales en todo biorreactor:

- Dispersión de aire (transferencia de oxígeno).
- Eliminación y/o reducción de gradientes y zonas “muertas” (homogeneidad en el medio).

Irremediablemente, alguna de las funciones mencionadas generará limitaciones durante el proceso (paso limitante) y éste a su vez dependerá de las características reológicas de los caldos, de la escala de operación, de la demanda microbiana de oxígeno y de su sensibilidad al estrés mecánico (Nienow, 1990a).

En función de los patrones de flujo generados, los impulsores generalmente se clasifican en dos grandes grupos (Oldshue, 1983): los que proporcionan flujo radial con altos gradientes de deformación (idóneos para las dispersiones gas-líquido) y los de flujo axial, que producen bajas velocidades de deformación (adecuados para bombear fluidos). Dado que ambos grupos poseen ventajas y desventajas, se recomienda un análisis cuidadoso antes de su elección.

2.2.2 Impulsores de flujo radial

Los impulsores de flujo radial generan corrientes de flujo en dirección radial o tangencial (movimiento transversal y de rotación) con poco movimiento axial y altos gradientes de deformación; por lo que han sido considerados apropiados para dispersar diversos fluidos inmiscibles, tales como gas-líquido y líquido-líquido (Myers *et al*; 1996). La figura 2.2 esquematiza las turbinas de flujo radial comúnmente empleadas en biorreactores agitados mecánicamente.

La turbina Rushton (figura 2.2a), el impulsor más conocido y empleado tanto en la industria como en la investigación, pertenece a este grupo de impulsores. Esta turbina tuvo una gran aceptación en los procesos de mezclado debido a que resulta especialmente adecuada para

dispersar gases en líquidos (Nienow, 1990b). Esta capacidad de dispersión radica en la generación de altos gradientes de deformación detrás de las paletas del impulsor. Así, el disco de la turbina fuerza a la corriente de aire alimentada a pasar por la región de las paletas, zona de alta deformación, incrementando la turbulencia y el área interfacial de contacto entre las fases líquida y gaseosa, logrando un incremento en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}).

Sin embargo, recientemente se ha cuestionado su uso y efectividad en cultivos reológicamente complejos, especialmente en relación al pobre macromezclado generado en zonas alejadas de los impulsores y aledañas a las paredes del reactor (Buckland *et al*; 1988; Amanullah *et al*; 1998a). En tales publicaciones, los autores demostraron que el desempeño de los sistemas (evaluados como el k_{La} y la productividad específica, respectivamente) pueden ser correlacionados con el grado de homogeneidad imperante en el sistema. De esta manera, el uso de las turbinas se vió desfavorecida en relación a los impulsores axiales evaluados. A pesar de los altos gradientes de deformación generados por las turbinas Rushton, mismos que favorecen la formación de pequeñas regiones de excelente micromezclado, el resto de los impulsores evaluados mejoraron notablemente el macromezclado en el resto del sistema. Como resultado, se logró un aumento en la productividad específica.

Turbinas de flujo radial

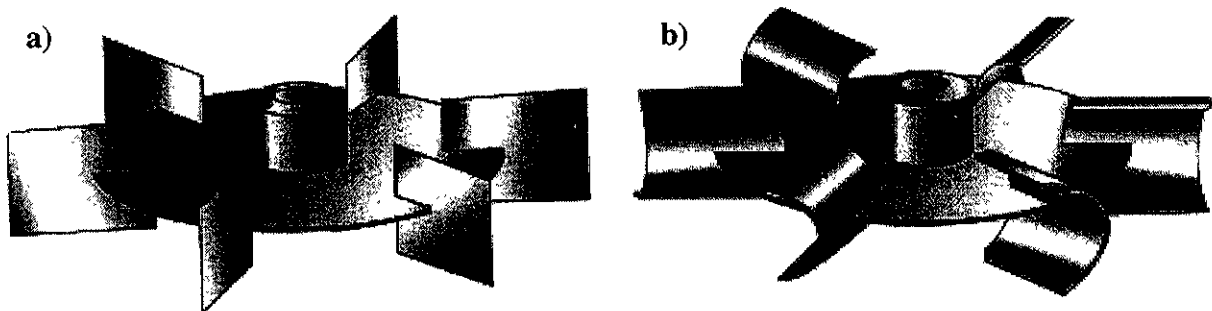


Figura 2.2- Impulsores de flujo radial comúnmente empleados en biorreactores agitados; (a) turbina Rushton; (b) turbina Scaba 6SRGT.

Dado lo anterior, diversos trabajos han investigado de manera más sistemática las posibles causas del pobre desempeño de las turbinas Rushton. Dichas evaluaciones se llevaron a cabo en sistemas donde las condiciones de operación fueron rigurosamente controladas (potencia suministrada, oxígeno disuelto, agitación, presión, pH, etc.), permitiendo esto una eficiente

evaluación de los diversos impulsores de manera independiente. Entre los múltiples desventajas reportadas (Myers *et al*; 1996; Nienow 1996) destacan:

- Los números de potencia son mayores (respecto a los impulsores axiales) debido a que una porción significativa de la potencia suministrada se disipa a través de vórtices en las regiones próximas a los impulsores.
- El fundamento de las turbinas resulta ser su principal desventaja al airear, ya que al generar los gradientes de deformación se favorece la formación de regiones de baja presión detrás de las paletas, mismas que atraen al gas alimentado (cavidades aireadas), provocando así una caída significativa en los consumos de potencia al incrementar la aireación (figura 2.3).
- Para compensar el alto número de potencia de las turbinas en relación a los sistemas axiales, y así mantener la potencia consumida (P) constante, se requiere disminuir, ya sea el diámetro o la velocidad de agitación; por lo que el mezclado, la dispersión del gas y la capacidad de bombeo se verán desfavorecidas.
- El flujo radial provoca la formación de zonas “horizontales” y/o compartimientos en el biorreactor debido a la poca interacción vertical (axial) entre los componentes del medio.
- Son considerados como impulsores de alto estrés hidrodinámico.

Estas aseveraciones engloban una gran cantidad de fluidos, ya que la principal diferencia en la dispersión de gases con fluidos de elevada viscosidad son las cavidades de aire más grandes y estables que se forman detrás de las paletas, mismas que se incrementan conforme aumenta la viscoelasticidad y las cuales resultan ser prácticamente independientes del flujo de aire. Como consecuencia, la aireación provoca mayores caídas de potencia en los fluidos viscosos, respecto a los de baja viscosidad, empleando velocidades de agitación similares (Nienow, 1990a).

Nienow y Ulbretch (1985) empleando las turbinas Rushton en fluidos viscosos reportan la formación de cavidades aireadas detrás de las paletas del impulsor, cuya forma y magnitud dependen de las propiedades reológicas y de la hidrodinámica del proceso (número de Reynolds y de Froude, viscoelasticidad, entre otros). Si el fluido es inelástico y sin punto de cedencia, las cavidades son similares a las observadas en fluidos de baja viscosidad, donde inicialmente se generan en la parte superior de las paletas y solo producen una ligera disminución en el consumo de potencia. En el caso de fluidos con punto de cedencia, las cavidades permanecerán adheridas a las paletas y el volumen de estas dependerá de la magnitud del punto de cedencia. Por otro lado, cuando el líquido es elástico, las cavidades son considerablemente mayores, por lo que concluyen que la capacidad de bombeo de las turbinas disminuye a medida que aumenta la pseudoplásticidad, el punto de cedencia y la viscoelasticidad.

De igual manera, Özcan *et al.* (1990) señalan que la potencia en fluidos Newtonianos viscosos bajo condiciones aireadas y utilizando turbinas Rushton disminuye hasta alcanzar un valor mínimo (el cual disminuye hasta por debajo de la mitad de su valor original). Esta caída coincide con la formación de cavidades de aire detrás de las paletas, las cuales crecen hasta alcanzar un tamaño máximo, mismo que depende de las condiciones de aireación, de la velocidad de agitación, así como de los números de Reynolds y de Froude.

Para minimizar tales defectos, el uso de la turbina Scaba SRGT (figura 2.2b) ha sido recomendada por varios autores (Myers *et al.*; 1996; Nienow, 1996). La turbina Scaba SRGT es relativamente nueva y su éxito radica en la sustitución de las paletas planas por paletas curvas y/o cóncavas hacia la dirección de rotación. Estas paletas reducen significativamente la región de baja presión, vórtices y las cavidades aireadas debido a la hidrodinámica generada, ocasionando números y caídas de potencia menores. Tales caídas en Po permiten incrementar la velocidad de agitación y/o aumentar el tamaño de los impulsores (diámetro), favoreciendo así el “manejo” del gas a la misma potencia suministrada. Incluso, Nienow (1990b) reporta que la potencia de estas turbinas no es influenciada por las condiciones de aireación al emplear fluidos Newtonianos de baja viscosidad. Sin embargo, la compartimentalización “horizontal” persiste debido al flujo radial generado.

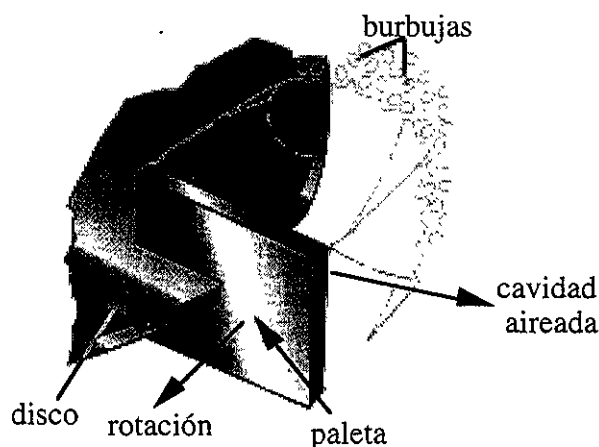


Figura 2.3- Formación de las cavidades aireadas detrás de la paleta al airear (Bakker *et al.*; 1994).

2.2.3 Impulsores de flujo axial

Los impulsores de flujo axial generan corrientes de flujo paralelo al eje de la flecha que gira (movimiento longitudinal), por lo que son considerados adecuados para generar flujo y/o movimiento (Galindo *et al.*; 1996). La figura 2.4 esquematiza los diversos impulsores de flujo axial empleados comúnmente en biorreactores agitados mecánicamente.

Impulsores de flujo axial

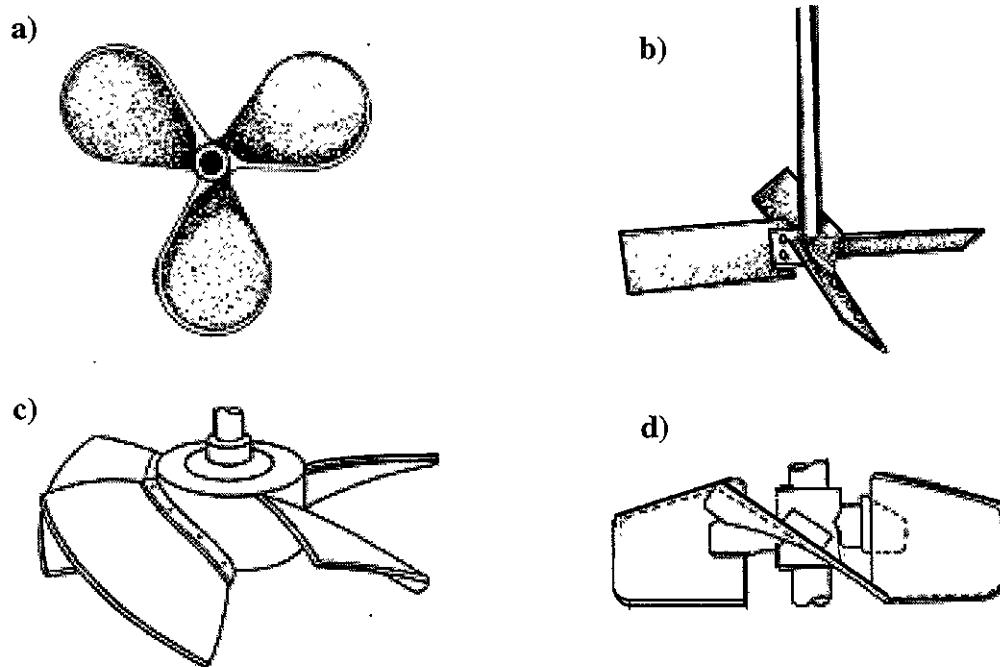


Figura 2.4- Impulsores de flujo axial comúnmente empleados en biorreactores agitados; (a) hélice o propela marina; (b) turbina con paletas inclinadas; y los impulsores “hydrofoil”: (c) Maxflo T; (d) Lightnin’ A315.

La mayoría de los impulsores axiales son empleados en sistemas donde se requiere mantener partículas en suspensión y a la vez dispersar aire (tratamiento de aguas residuales, cultivos filamentosos e hidrogenación de aceites vegetales, entre otros; Treybal, 1980). Recientemente se han empleado una gran variedad de diseños axiales tanto en la investigación como en la industria debido a sus características de flujo y mezclado, donde destaca la hélice o propela marina (figura 2.4a), la turbina con paletas inclinadas (figura 2.4b) y las turbinas “hydrofoil”: Prochem Maxflo T y Lightnin’ A315 (figuras 2.4c y d, respectivamente). Tales características se basan en la combinación de algunas de las siguientes cualidades (Myers *et al*; 1996; Nienow 1996):

- Mejor interacción entre fases (homogeneidad) debido a los patrones de flujo generados.
- Reducen notoriamente las regiones de baja presión, así como la formación de cavidades y/o vórtices aireados detrás de las paletas del impulsor (bajas caídas y números de potencia).
- Dado que las caídas de potencia son mínimas, la transferencia de masa y la capacidad de bombeo se mantienen relativamente constantes durante el proceso.

- Los bajos números de potencia generados permiten emplear impulsores con una alta relación diámetro del impulsor/ diámetro del tanque (D/T), así como altas velocidades de agitación, por lo que se pueden aplicar flujos de aire relativamente altos sin “inundar” el sistema.
- Son considerados como impulsores de bajo estrés hidrodinámico.

Por el contrario, algunas de las desventajas que presentan estos impulsores son:

- El rompimiento de las burbujas de gas es inadecuado (disminución del área interfacial gas-líquido), ya que los impulsores generan bajos gradientes de deformación.
- La oposición de flujos por parte de los impulsores (descendente) y del constante burbujeo (ascendente) genera frecuentemente cambios bruscos en los patrones de flujo del sistema, ocasionando inestabilidades y vibraciones dentro del biorreactor.

En su artículo de revisión, Nienow (1990b) reportó el desempeño de diferentes impulsores (turbinas radiales e impulsores axiales) en cultivos filamentosos de *P. chrysogenum* y *Streptomyces avermitilis*, empleando un biorreactor piloto (150 L). De acuerdo a su trabajo, el crecimiento filamentosos originó cambios drásticos en la reología de los caldos durante ambos procesos, lo cual generó caídas en la potencia (tanto en los impulsores axiales como radiales) ya que las cavidades de aire fueron más grandes y estables, independientemente del flujo de aire alimentado. En tales casos, los sistemas axiales empleados disminuyeron dicha problemática, en comparación con los sistemas de turbinas, debido a una mejoría en la homogeneidad del medio, producto de los patrones de flujo generados. Nienow concluye en su trabajo que la reología de los caldos modifica significativamente la potencia suministrada y la hidrodinámica, tanto en los sistemas radiales (turbinas Rushton y Scaba) como axiales (impulsores “hydrofoil”), y que los impulsores axiales mejoran el macromezclado del sistema (a través de los patrones de flujo).

Buckland *et al.* (1988), empleando organismos filamentosos (*S. avermitilis* y *N. lactamdurans*) en fermentadores de 800 L, demostraron que la transferencia de oxígeno puede ser mejorada al sustituir la turbina Rushton (flujo radial) por un impulsor axial “Prochem Maxflo T” de bajo número de potencia. Esta deducción fue obtenida al realizar una diferenciación y posterior análisis en las regiones de micro y macromezclado (regiones cerca y lejos de los impulsores, respectivamente). A pesar de que las turbinas Rushton generaron regiones de excelente micromezclado, el sistema axial compensó esta desventaja al emplear impulsores de mayor diámetro, generando así un mejor macromezclado en el resto del sistema.

Así mismo, Bujalski *et al.* (1997) reportan mejores productividades de ácido cítrico en cultivos de *A. niger* empleando un sistema axial de contraflujo (turbinas con paletas inclinadas a 28°)

operado a la misma velocidad en la punta del impulsor que las turbinas Rushton. Los autores observaron, a través de un procesador de imágenes, *pellets* grandes y compactos con regiones anulares laxas (morfología productiva) al emplear el sistema de contraflujo. Dicha morfología fue atribuida a las turbinas axiales utilizadas, las cuales mejoraron el macromezclado y la interacción entre fases (homogeneidad) debido a su capacidad de bombeo y a los flujos axiales generados.

Sin embargo, en repetidas ocasiones el aumento en el diámetro del impulsor no es suficiente para compensar el bajo número de potencia de éstos, por lo que no es posible una comparación efectiva entre ambos sistemas (*ejem.* suministrando la misma potencia específica). En estos casos, la velocidad de agitación se incrementa hasta igualar el parámetro de comparación deseado, lo que puede generar cambios morfológicos e incluso daño celular en la larga y delgada estructura de las hifas. Tal caso es reportado por Priede *et al.* (1995) en cultivos de *Fusarium moniliforme*, donde después de evaluar dos sistemas de impulsores (Rushton y axiales) a la misma potencia específica suministrada, concluyen que las mejores productividades fueron logradas con las turbinas Rushton. Esto debido a que el sistema axial (bajo número de potencia) requirió de casi el doble de agitación para mantener los valores de potencia específica similares en relación al sistema de turbinas, por lo que se incrementó el daño mecánico.

Una observación similar fue reportada por Jüsten *et al.* (1996) en cultivos de *P. chrysogenum*. En su estudio, los autores demostraron que la morfología miceliar (micelio disperso y/o agregados) no solo depende de la velocidad de agitación, sino también de la frecuencia a la que el micelio se ve expuesto a un alto estrés mecánico y al tipo de impulsor (geometría y diámetro) empleado. Para concluir lo anterior, los autores desarrollaron una función basada en la velocidad específica de disipación de energía en la zona de impulsores y en la frecuencia de circulación del micelio en éstas zonas. Dicha expresión correlacionó bien con los datos experimentales (aún a diferentes escalas) y señala que el daño mecánico (medido como la longitud total promedio de las hifas y como el área proyectada promedio) se incrementa conforme aumenta la velocidad de agitación o cuando el tamaño (volumen) del tanque utilizado disminuye, ya que en ambos casos se favorece la circulación del micelio a través de la región de los impulsores (los tiempos de circulación se reducen). De igual manera, el uso de impulsores axiales (bajo P_o) causó mayor daño al micelio (respecto a los radiales) debido a las altas velocidades de agitación requeridas para mantener constante el parámetro de potencia por unidad de volumen (P/V). Sin embargo, estos estudios fueron realizados fuera del fermentador, en un sistema sin aireación y empleando caldos diluidos; es decir, bajo condiciones inusuales en este tipo de cultivos.

2.2.4 Combinación de impulsores en biorreactores

En diversas ocasiones, el empleo de un solo impulsor no es suficiente para satisfacer todos los requerimientos de mezclado necesarios en un proceso. Ante esta situación, el uso de un impulsor adicional sobre la misma flecha resulta altamente efectivo para abatir tal problemática. Sin embargo, la elección de los impulsores debe ser cuidadosamente analizada, ya que su eficiencia dependerá de las características intrínsecas del sistema (reología, agitación, microorganismo, aireación, etc.).

El empleo de dos impulsores axiales genera frecuentemente problemas de transferencia de oxígeno en el medio debido a una marcada disminución del área interfacial gas-líquido (burbujas grandes), además de múltiples problemas de vibración en el reactor (Nienow, 1990a). De igual manera, el uso de dos turbinas radiales desfavorece la interacción entre los componentes del medio, por lo que regularmente se presentan fuertes problemas de compartimentalización y de gradientes entre las diferentes zonas (Nienow, 1996). Esta compartimentalización puede ser eliminada al sustituir la turbina radial superior por un impulsor axial, tal configuración, comúnmente denominada sistema de flujo mixto, es ampliamente utilizada en sistemas biológicos (Nienow, 1990b; Bakker *et al*; 1994). Dicha configuración combina las ventajas de dispersión y del incremento en el área interfacial de contacto (turbinas) con un aumento del flujo y/o movimiento (impulsor axial); provocando así la reducción de gradientes y una subsecuente mejoría en las condiciones de homogeneidad de los diversos elementos nutricionales debido, principalmente, a los patrones de flujo generados (figura 2.5).

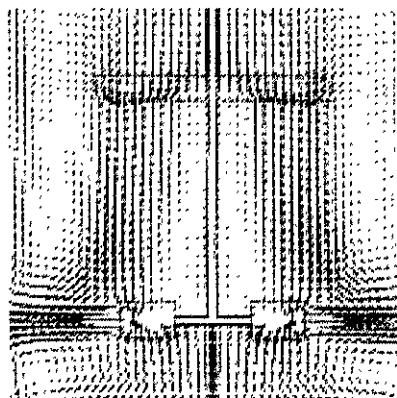


Figura 2.5- Patrones de flujo generados en un sistema de flujo mixto (turbina radial e impulsor axial en la zona inferior y superior respectivamente), modelados a través de la técnica de dinámica de fluidos computacional (Bakker *et al*; 1994). Las zonas claras y oscuras representan zonas de baja y alta velocidad, respectivamente.

El éxito de la configuración de flujo mixto se basa en el hecho de que tal combinación permite mejorar las características de mezclado y de transferencia de oxígeno, ambas fundamentales en cualquier biorreactor. De esta manera, Nienow (1984) reporta que la combinación entre las turbinas Rushton-paletas inclinadas (45°) origina un mezclado eficiente y efectivo en fluidos altamente viscosos (caldos conteniendo goma xantana). Por otro lado, Myers *et al.* (1994) redujeron por debajo de la mitad los tiempos de mezclado en fluidos Newtonianos y no Newtonianos, en relación a los sistemas de flujo radial estudiados, al emplear un sistema de flujo mixto.

2.2.5 Interacción y mezclado entre fases líquidas inmiscibles

El proceso de mezclado se complica aún más cuando se emplean más de tres fases, o cuando los elementos de una misma fase son inmiscibles entre sí (*ejem.* agua-aceite), siendo esta última una de las condiciones más difíciles de resolver. Tal problemática es comúnmente afrontada en la industria química (operaciones de extracción y emulsión; Skelland y Moeti, 1989) y en diversos procesos farmacéuticos y biotecnológicos (Armenante y Abu-Hakmeh, 1994).

El agitar dos líquidos inmiscibles origina el fenómeno de “dispersión entre dos fases líquidas”, resultado del continuo rompimiento y coalescencia de los elementos del medio. Dicho rompimiento es debido principalmente a los múltiples esfuerzos disruptivos generados en el seno del medio (fluctuaciones de presión turbulentas y esfuerzos de deformación), mientras que la coalescencia depende de las fuerzas turbulentas, tensión superficial, viscosidad y densidad. La interacción entre fases dependerá entonces de las propiedades físicas de los fluidos, así como de la fracción volumétrica, hidrodinámica e hidrofobicidad de las fases dispersas (Pacek y Nienow, 1995). Todas estas interacciones influirán sobre la productividad de un proceso (Armenante y Huang, 1992), ya que el pobre contacto entre fases reducirá el área interfacial de contacto y, por consiguiente, disminuirá la velocidad de transferencia de masa (oxígeno, nutrientes, etc.) en el sistema.

La transferencia de masa y la homogeneidad de un sistema pueden ser favorecidas al modificar la hidrodinámica del medio (Skelland y Ramsay, 1987), ya sea mediante el uso de agentes tensoactivos (reducen la coalescencia y la tensión superficial), al manipular el área interfacial gas-líquido (tamaño de burbuja) y/o al modificar el tipo y cantidad de impulsores (las turbinas radiales dispersan mejor y a menor velocidad de agitación diversos fluidos inmiscibles). Sin embargo, el método tradicionalmente empleado para mejorar la transferencia de masa y la homogeneidad en sistemas con dos líquidos inmiscibles “velocidad mínima de agitación para la

dispersión efectiva líquido-líquido” consiste en incrementar la velocidad de agitación hasta eliminar las múltiples gotas y aglomerados de un fluido particular en la zona inferior y superior del medio (Skelland y Ramsay, 1987; Armenante y Huang, 1992).

La elección de la estrategia empleada, al igual que su eficacia, dependerá de los diversos parámetros intrínsecos del sistema, tales como las características físico-químicas del medio (viscosidad, densidad, etc.) y la capacidad del equipo disponible (diversidad de impulsores y difusores). En casos donde se empleen microorganismos, la eficacia dependerá de sus necesidades metabólicas (oxígeno y nutrientes), de su sensibilidad al estrés hidrodinámico y de la tolerancia de estos hacia el uso de agentes tenso-activos y/o detergentes.

2.3 Transferencia de oxígeno en biorreactores

Los objetivos más importantes de un biorreactor, aunque no los únicos, son la dispersión del gas en el seno del líquido (transferencia de oxígeno) y una adecuada interacción entre fases (mezclado) debido a los requerimientos metabólicos de oxígeno por parte del microorganismo. Sin embargo, la transferencia de oxígeno parece ser la limitación más severa en cultivos microbianos. De hecho, varios autores señalan a este fenómeno como el responsable de generar limitaciones hacia mayores concentraciones celulares y/o mejores productividades (Sargantanis y Karim, 1996; Cui *et al*; 1998).

2.3.1 Suministro y consumo de oxígeno en biorreactores

El oxígeno es sin duda alguna el elemento más difícil de abastecer en cultivos sumergidos debido a su baja solubilidad en agua (alrededor de 10 ppm empleando aire a 1 atm. y a temperatura ambiente; Atkinson y Mavituna, 1991), por lo que debe suministrarse continuamente mediante aireación. El aire y/o gases empleados se adicionan al medio a través de un difusor colocado debajo del impulsor inferior, permitiendo esto una mejor dispersión del gas. Sin embargo, debido a la baja solubilidad del oxígeno y a las múltiples barreras físicas que debe atravesar el gas, frecuentemente se generan gradientes de este elemento en el medio, lo cual puede causar serias limitaciones en los cultivos.

La figura 2.6 muestra las etapas implicadas en la transferencia de oxígeno hacia el seno del líquido (basado en la absorción del oxígeno desde la fase gaseosa hasta la fase líquida) y de éste al microorganismo.

Etapa:

- 1.- Transferencia difusional desde el seno de la burbuja hasta la superficie líquida.
- 2.- Disolución en el líquido.
- 3.- Difusión del oxígeno desde la superficie líquida de la burbuja hacia el seno del líquido.
- 4.- Una vez disuelto, este debe ser distribuido en todo el biorreactor.
- 5.- Transferencia difusional a través de la superficie líquida que rodea la célula.

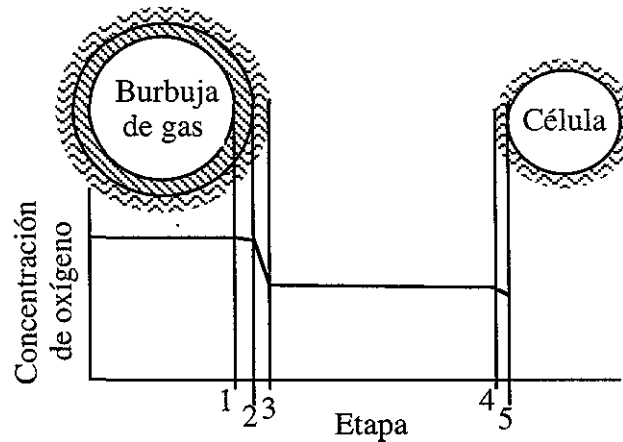


Figura 2.6- Perfiles de concentración de oxígeno, así como las etapas desarrolladas durante su transferencia.

Se ha demostrado (Vardar-Sukan, 1986) que el paso limitante en el mecanismo de transferencia de oxígeno recide, principalmente, en la etapa 3 (difusión desde la superficie líquida hacia el seno de este), ya que la transferencia es directamente proporcional a la fuerza motriz dada por los gradientes de concentración entre fases, e inversamente proporcional al espesor de la película líquida que rodea la burbuja. Así, al incrementar el espesor de la película, la transferencia de oxígeno disminuye drásticamente debido a que aumenta la resistencia a la difusión.

La velocidad de transferencia de masa puede ser expresada de la siguiente manera:

$$\text{Velocidad de transferencia de masa} = \text{Coeficiente de transferencia de masa} \cdot \text{área} \cdot \text{fuerza directriz} \quad (2-1)$$

Sustituyendo los diversos parámetros intrínsecos de los sistemas aireados en la ecuación general de transferencia (Bailey y Ollis, 1986), se obtiene la ecuación de transferencia de oxígeno:

$$N_a = k_L a (C_g^* - C_L) \quad (2-2)$$

donde:

N_a = velocidad de transferencia de oxígeno [mmol O_2 / L•h]

k_L = coeficiente de transferencia de masa en la fase líquida [m/ h]

a = área interfacial gas-líquido [m^2/ m^3]

$k_L a$ = coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [h^{-1}]

C_g^* = concentración de oxígeno disuelto a la saturación del aire [mmol O_2 / L]

C_L = concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo [mmol O_2 / L]

Para evitar que un cultivo microbiano este limitado por oxígeno, la velocidad de transferencia (N_a) debe ser siempre superior (o por lo menos igual) a la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) de los microorganismos, la cual dependerá del consumo específico y de la concentración celular. La concentración de oxígeno bajo la cual empieza la limitación se conoce como concentración crítica de oxígeno (C_{crit}). Concentraciones de oxígeno disuelto por debajo de este valor originan disminuciones en la velocidad específica de consumo, además de alterar el metabolismo del organismo. La VCO de cualquier microorganismo puede ser descrita mediante la siguiente ecuación:

$$VCO = Q_{O_2} \cdot X \quad (2-3)$$

donde:

VCO = velocidad de consumo de oxígeno [mmol O_2 / L•h]

Q_{O_2} = demanda específica de oxígeno [mmol O_2 / $g_{cel} \cdot h$]

X = concentración de biomasa [g_{cel} / L]

La VCO se incrementa de manera notable durante la fase exponencial de crecimiento en cultivos lote debido al aumento en la concentración celular (Ec. 2-3). A su vez, la velocidad global de transferencia (Ec. 2-4) puede ser mejorada al manipular algunas de las variables de operación y de diseño en el sistema, logrando así que la resistencia principal al flujo de oxígeno (grosor de la película líquida) sea minimizada (Vardar-Sukan, 1986).

$$dC_L / dt = N_a - VCO = [k_L a (C_g^* - C_L)] - [Q_{O_2} \cdot X] \quad (2-4)$$

donde:

dC_L / dt = velocidad global de transferencia de oxígeno [mmol O_2 / L•h]

2.3.2 Manipulación del área interfacial gas-líquido y su efecto sobre el k_La en cultivos filamentosos

Dado que la transferencia de oxígeno es regularmente el paso limitante en diversos procesos, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) influye determinantemente sobre la productividad de un biorreactor, ya que refleja la capacidad de éste para transferir oxígeno (Bailey y Ollis, 1986). Se han reportado diversas correlaciones empíricas para predecir su valor, tanto para fluidos Newtonianos (agua con o sin iones), como para no-Newtonianos (soluciones de CMC). La forma general de este tipo de correlaciones puede describirse de la siguiente manera:

$$k_La \propto (P_g/V)^\alpha (V_s)^\beta (\eta)^{-\gamma} \quad (2-5)$$

donde:

P_g/V = potencia volumétrica suministrada [kW/ m³]

V_s = velocidad superficial del gas [m/ s]

η = viscosidad del medio [kg/ m³]

los valores de los exponentes α , β y γ dependerán de las condiciones específicas de diseño y de operación del sistema evaluado.

Para el caso específico de fluidos de baja viscosidad, el término η puede ser descartado de la ecuación 2-5 ya que su valor es cercano al del agua (no afecta significativamente el k_La calculado); mientras que para fluidos viscosos no-Newtonianos (soluciones con polímeros, cultivos filamentosos, etc.) dicho término es de vital importancia. De hecho, Nienow (1984) en su trabajo empleando soluciones de CMC reporta que el k_La disminuye en forma proporcional a la raíz cuadrada de la viscosidad. Asimismo, el autor propone que la relación entre el k_La y las variables de operación puede ser descrita por la ecuación 2-6.

$$k_La \propto (P_g/V)^{0.66} (Q_G)^{0.34} (\eta_a)^{-0.45} \quad (2-6)$$

donde:

Q_G = aireación [vvm]

η_a = viscosidad aparente [Pa • s]

Esto último señala que durante los cultivos filamentosos, la agitación y la aireación tienen pesos específicos diferentes, especialmente al inicio y al final del cultivo (mínima y máxima viscosidad respectivamente). Por otro lado, es importante mencionar que de acuerdo a la ecuación 2-5, la geometría del impulsor no altera *per se* el valor de k_La , sino que es la potencia aplicada por el.

Se han reportado diversas estrategias para mejorar este parámetro, las cuales se basan en la manipulación de las variables de la ecuación de transferencia (Ec. 2-2), así como de cambios en los parámetros de operación y de diseño (tipo de impulsor, agitación, etc.). Para incrementar su valor, se recomienda emplear alguna de las siguientes alternativas (Vardar-Sukan, 1985):

- a) aumentar la velocidad de agitación
- b) cambiar el tipo y/o diámetro del impulsor
- c) enriquecimiento del aire con oxígeno puro
- d) diluir el caldo de fermentación (casos de alta viscosidad)
- e) incrementar el área interfacial gas-líquido
- f) disminuir la temperatura (incrementa la solubilidad del oxígeno)
- g) aumentar la presión total del sistema

A pesar de las múltiples alternativas expuestas, no todas cumplen y/o satisfacen los requerimientos de un cultivo microbiano, mucho menos las de un cultivo filamentosos (cultivos reológicamente complejos y sensibles al estrés hidrodinámico). Dos de estas alternativas (f y g) tienen un uso restringido, ya que su rango de operación es limitado por las propias características intrínsecas del equipo y de los sistemas biológicos empleados. De igual manera, la estrategia "d" es poco empleada actualmente debido a que su periodo de duración es cada vez más corto y menos eficiente. Por otro lado, el punto "c" requiere de una infraestructura especial (controladores de flujo y gases), misma que resulta poco viable, económicamente, en procesos industriales. De las últimas tres alternativas (a, b y e), regularmente solo los puntos e y b (ésta última descrita en la sección anterior) son empleadas en sistemas filamentosos, ya que la aplicación de altos esfuerzos mecánicos (estrategia "a") pueden dañar al microorganismo.

El área interfacial gas-líquido forma parte integral del $k_L a$ (Ec. 2-1 y 2-2) y se refiere al área total de contacto entre la fase líquida y el gas suministrado, por lo que al generar pequeñas burbujas, el área total de contacto entre ambas fases aumentará modificando directamente el $k_L a$. El área interfacial puede ser favorecida al emplear un difusor apropiado (diámetro de orificio pequeño) o al reducir el tamaño de las burbujas a través de los impulsores (altas velocidades de agitación), logrando así un incremento en el $k_L a$.

En el caso del uso de los impulsores, estos deben emplearse a potencias volumétricas adecuadas para promover tanto el crecimiento filamentosos (bajo estrés hidrodinámico), como el rompimiento de las burbujas, mismas que serán arrastradas hasta la punta del impulsor donde el área interfacial específica será mayor. Al utilizar bajas potencias volumétricas (como es el caso

de los cultivos miceliares), sólo una mínima porción del gas alimentado ejercerá un impacto sobre el área interfacial debido a que el gas "inundará" al impulsor (producto de la baja velocidad de agitación aplicada), disminuyendo su efecto sobre el $k_L a$ (Treybal, 1980).

Por otro lado, el tamaño de burbuja puede ser manipulada para satisfacer los requerimientos de transferencia propios del sistema. El tamaño inicial dependerá del diámetro de orificio, del flujo de gas y de la densidad del líquido, entre otros. Además, la modificación de tamaño no provoca daño alguno a los microorganismos (Tattersson, 1991). A pesar de lo anterior, la manipulación del tamaño de orificio, así como de la geometría del difusor es poco común, ya que estos son proporcionados por el fabricante en conjunto con el biorreactor, por lo que su diseño dista mucho del óptimo para cada caso particular.

Generalmente, solo tres tipos de difusores son empleados en los diversos bioprocesos: el de anillo, el de punto y el sinterizado o poroso. Los dos primeros son los más comunes debido a su diseño práctico y sencillo (McFarlane y Nienow, 1995), mientras que el último, a pesar de generar mejores valores de $k_L a$ (Oldshue, 1983) tiene uso solo a nivel laboratorio. Esto se debe principalmente a diversos problemas originados a partir del diminuto tamaño de burbuja (altas caídas de presión y problemas de espuma), además de que los pequeños orificios [en el orden de micras (μm)] tienden a "taponearse". Se recomienda introducir el gas por debajo del impulsor inferior a través de un difusor de anillo con un diámetro igual o ligeramente más pequeño que el del impulsor ($0.8 D$) y con los orificios hacia la parte superior (Oldshue y Conelly, 1977). Este difusor es recomendado sobre el de punto, ya que el burbujeo proveniente del anillo cubre una mayor área del impulsor facilitando el contacto y posterior rompimiento de las burbujas con las paletas (Bakker *et al*; 1994).

La transferencia de oxígeno se vuelve un problema complejo y de gran importancia en los cultivos filamentosos debido a las altas viscosidades generadas por el crecimiento ramificado. Se sabe que a medida que aumenta la viscosidad, el $k_L a$ decrece exponencialmente (Tuffile y Pinho, 1970) debido a que el tamaño de burbuja en el medio tiende a incrementarse (la viscosidad favorece la coalescencia entre estas), además de generar un aumento notable en el acanalamiento de las burbujas, reduciendo el área interfacial gas-líquido y el tiempo de contacto entre fases (*hold up*), respectivamente (Vardar-Sukan, 1986). Esta problemática reduce la capacidad de transferencia hacia el final del proceso, etapa donde se producen los cambios más drásticos en los diversos parámetros físico-químicos (viscosidad, fuerza iónica, etc.), hidrodinámicos (zonas "muertas" y aglomeración del micelio en los accesorios) y de operación (caídas de potencia) de los sistemas filamentosos (Nienow, 1990b, Galindo *et al*; 1996).

2.4 Modelo de estudio: *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum es un hongo filamentoso productor de diferentes compuestos de interés como lactonas (ésteres cíclicos) y algunas enzimas (celulasas), entre otros. Recientemente, Bonnarme *et al.* (1997) y Serrano-Carreón *et al.* (1997) demostraron que el hongo es capaz de producir lactonas a partir de diversos sustratos (*ejem.* glucosa y algunos aceites vegetales), las cuales poseen un gran potencial industrial, tanto en el área alimentaria como en la farmacéutica (compuestos de aroma).

T. harzianum produce dos lactonas características (γ -decalactona y 6-pentil- α -pirona) y su producción depende de la composición del medio de cultivo. En cultivos con glucosa como fuente de carbono se ha reportado la producción de la 6-pentil- α -pirona, una lactona con aroma a coco; mientras que en cultivos con aceite de ricino, la producción de la γ -decalactona (compuesto con aroma a durazno) es evidente (Flores, 1995). Por otra parte, el proceso es sumamente complejo, ya que además de la reología desarrollada por el crecimiento filamentoso (formación de caldos viscosos no-Newtonianos) involucra el mezclado de cuatro fases inmiscibles (aceite de ricino, medio acuoso, micelio y aire), incrementando así los problemas de heterogeneidad y de transferencia de oxígeno durante el proceso. Una primera estrategia para disminuir dicha problemática fue la de incrementar la velocidad de agitación. Sin embargo, el crecimiento y la producción de aroma se inhibieron, aún a potencias volumétricas relativamente bajas (0.2 W/L), debido a la sensibilidad del micelio al estrés mecánico (Serrano-Carreón *et al.*; 1997).

Estudios recientes (Godoy-Silva *et al.*; 1997) demostraron que los aspectos hidrodinámicos son particularmente importantes en este cultivo miceliar, ya que tanto el crecimiento celular como la producción de los metabolitos secundarios (lactonas) dependen de las condiciones ambientales en el biorreactor. En cultivos realizados a condiciones de bajo estrés mecánico y sin limitación de oxígeno (utilizando un impulsor helicoidal y difusores sinterizados) el crecimiento del hongo fue mayor que al emplear un sistema de alto estrés hidrodinámico (turbinas Rushton y difusor de punto). Adicionalmente, la producción de lactonas fue inversamente proporcional a la concentración celular, ya que las máximas productividades fueron logradas empleando las turbinas Rushton, sistema donde la concentración de biomasa fue menor. No obstante, los autores no concluyen si el aumento en la producción de lactonas fue debido a las condiciones de alto estrés mecánico o a las bajas concentraciones de oxígeno en el sistema, las cuales tal vez limitaron el crecimiento, favoreciendo así la diferenciación celular y la subsecuente producción del metabolito secundario.

De acuerdo a los múltiples reportes expuestos, es evidente que la problemática principal de los sistemas trifásicos miceliars reside en la compleja reología desarrollada por los caldos (producto del crecimiento ramificado), mismos que propician graves problemas de mezclado, reducción en la transferencia de masa y la formación de gradientes en el medio. Tal problemática se agudiza al emplear sustratos líquidos insolubles (aceites), ya que el complejo sistema trifásico se vuelve tetrafásico -medio de cultivo (fase acuosa), aceite (fase orgánica), aire (fase gaseosa) y hongo filamentosos (fase sólida)- incrementando aún más los problemas de transferencia y de mezclado, además de favorecer la separación de fases debido a la tendencia natural del aceite a emigrar hacia la superficie del medio acuoso. Para reducir tales efectos, frecuentemente se incrementa, de manera empírica, la velocidad de agitación de los sistemas. Sin embargo, la mayoría de los cultivos miceliars muestra una marcada sensibilidad al estrés hidrodinámico, por lo que nuevas estrategias deben ser evaluadas hacia favorecer la interacción entre fases y mejorar el crecimiento microbiano en sistemas complejos (*ejem.* manipulando diversas variables de operación, como la geometría y el tamaño de impulsores y difusores).

La complejidad del proceso de producción de γ -decalactona por *Trichoderma harzianum* (alta viscosidad, sensibilidad al estrés mecánico y cuatro fases inmiscibles) lo hace interesante como sistema modelo para el estudio de las interacciones entre la hidrodinámica y la productividad en cultivos miceliars. Asimismo, la infraestructura y el diseño experimental de los pocos estudios realizados a la fecha, en sistemas miceliars complejos, no permiten diferenciar las limitaciones nutricionales (pobre interacción aceite-hongo) de las limitaciones por oxígeno (baja transferencia de oxígeno en el medio), por lo que es necesario un estudio más concluyente en este aspecto.

Capítulo III

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el desempeño de dos configuraciones de impulsores y tres difusores de gas sobre la cinética de crecimiento de *Trichoderma harzianum* en cultivos tetrafásicos bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto.

Objetivos específicos

- a) Evaluar los requerimientos mínimos y concentraciones limitantes de oxígeno disuelto en cultivos tetrafásicos de *Trichoderma harzianum*.
- b) Evaluar los parámetros de control de la tensión de oxígeno disuelto para cada una de las configuraciones a estudiar.
- c) Evaluar la influencia de las configuraciones de difusores (anillo, sinterizado y 5 orificios) e impulsores, flujo axial y radial, sobre la cinética de crecimiento y la respiración de los cultivos de *Trichoderma harzianum* en un medio tetrafásico.

Capítulo IV

Materiales y métodos

4.1 Materiales

4.1.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Trichoderma harzianum* obtenida, en forma liofilizada, del International Mycological Institute (IMI 206040). La cepa se preservó en tubos de ensayo (*slants*) en medio de Agar de Dextrosa y Papa (PDA, Bioxon) a 4 °C, resemebrándose mensualmente.

4.1.2 Obtención y conteo de esporas

De la cepa preservada, se inoculó 1 cm² del medio sólido sobre una caja Petri con medio fresco, de manera que exista amplio contacto entre las células y el medio de cultivo. La caja se incubó a 29 °C durante 96 horas. Las esporas obtenidas se recuperaron con 2 mL de solución salina (NaCl 0.9% con Tween 40 al 0.05%). El conteo de esporas se llevó a cabo en una cámara de Neubauer, utilizando el objetivo 40 x de un microscopio (Nikon Alphaphot, modelo 2452).

Para el desarrollo del inóculo se utilizó una concentración de 5×10^3 esporas/mL. La suspensión preparada se adicionó en forma estéril al medio de inóculo.

4.1.3 Medios de cultivo

La concentración de cada uno de los componentes esta dada en gramos/ litro (g/L).

A) Medio para el desarrollo del inóculo (medio rico):

Extracto de malta, 20; glucosa, 10.

B) Medio de producción:

Aceite de ricino, 150; (NH₄)₂SO₄, 8.53; KH₂PO₄, 7.0; Na₂HPO₄, 2.0; MgSO₄•7H₂O, 1.5; CaCl₂•2H₂O, 0.0671; FeCl₃•6H₂O, 0.008; y ZnSO₄•7H₂O, 0.0001.

Las sales de los medios se disolvieron en agua destilada y posteriormente se ajustó el pH a 5.6 con NaOH (2N). Una vez ajustado el pH, se adicionó el aceite de ricino y se esterilizó el medio en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

4.1.4 Fermentaciones

Los inóculos se desarrollaron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio rico, los cuales se incubaron durante 72 h a 29 °C en una incubadora agitada mecánicamente (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) a 200 rpm. Los inóculos se transfirieron posteriormente en condiciones estériles al fermentador de trabajo, el cual contenía el medio de producción. La relación volumétrica de inoculación fue 1: 9.

4.1.4.1 Sistema de fermentación

Los cultivos se llevaron a cabo en un biorreactor Virtis de 1 litro ($T = 0.1m$) con soporte (Omniculture), el cual permitió manipular la velocidad de agitación y controlar la temperatura del medio. La corriente de gas alimentada fue filtrada a través de una filtro de 0.22 μm de poro (Advantec, JP020). El oxígeno disuelto y el pH se monitorearon mediante electrodos esterilizables, polarográfico y de cristal respectivamente, ambos Ingold (Ingold Electrodes Inc.) conectados a un amplificador de TOD (modelo 170) y a un transmisor/ controlador de pH (modelo 2300), también Ingold. El biorreactor fue equipado con tres configuraciones diferentes de impulsores-difusores, los cuales se describen con detalle en la próxima sección.

La concentración de bióxido de carbono (CO_2) en el gas efluente se monitoreó a través de un analizador de gases (Columbus Instruments International Corp; modelo 180C). El equipo está constituido por una bomba de muestreo, un analizador infrarojo (modelo 1410) y un convertidor (amperes/ volts) del cual sale la señal al sistema de adquisición.

El oxígeno disuelto se reporta, en todos los casos, como porcentaje de saturación (% TOD) con respecto al aire en agua a 29 °C y aproximadamente 0.83 atm. de presión. La señal amplificada (electrodos) al igual que la obtenida por el convertidor (analizador de gases) fue adquirida y almacenada en una computadora Macintosh II SI a través de una tarjeta de interfase Mac ADIOS APO (GW Instruments); simultáneamente a la adquisición, estas señales fueron desplegadas “en línea” sobre la pantalla de la computadora durante el proceso.

El pH se controló a 5.6 ± 0.2 , mediante la adición automática de NaOH (2N) con una bomba peristáltica (Cole-Parmer, modelo 7014-20) utilizando el algoritmo “On/ Off” (encendido/ apagado) del mismo transmisor/ controlador.

El control de la tensión de oxígeno disuelto (TOD) se realizó en base a las señales generadas por el amplificador de oxígeno, empleando para su control un algoritmo convencional PID (descrito en la siguiente sección). De acuerdo a los valores adquiridos, el sistema toma acción de control, el cual consiste básicamente en manipular la composición de los gases en la mezcla alimentada a través de dos controladores de flujo másico (oxígeno y nitrógeno) Brooks 5850E, ambos con una capacidad máxima de 1000 mL/ min.

Las condiciones iniciales del cultivo fueron las siguientes: velocidad de agitación 200 rpm, temperatura 29 °C, aireación 1 vvm y volumen de trabajo 1 L. Se muestreó a diferentes tiempos por lo que el volumen final osciló entre 0.8 y 0.82 L. La figura 4.1 muestra un esquema global del sistema de fermentación.

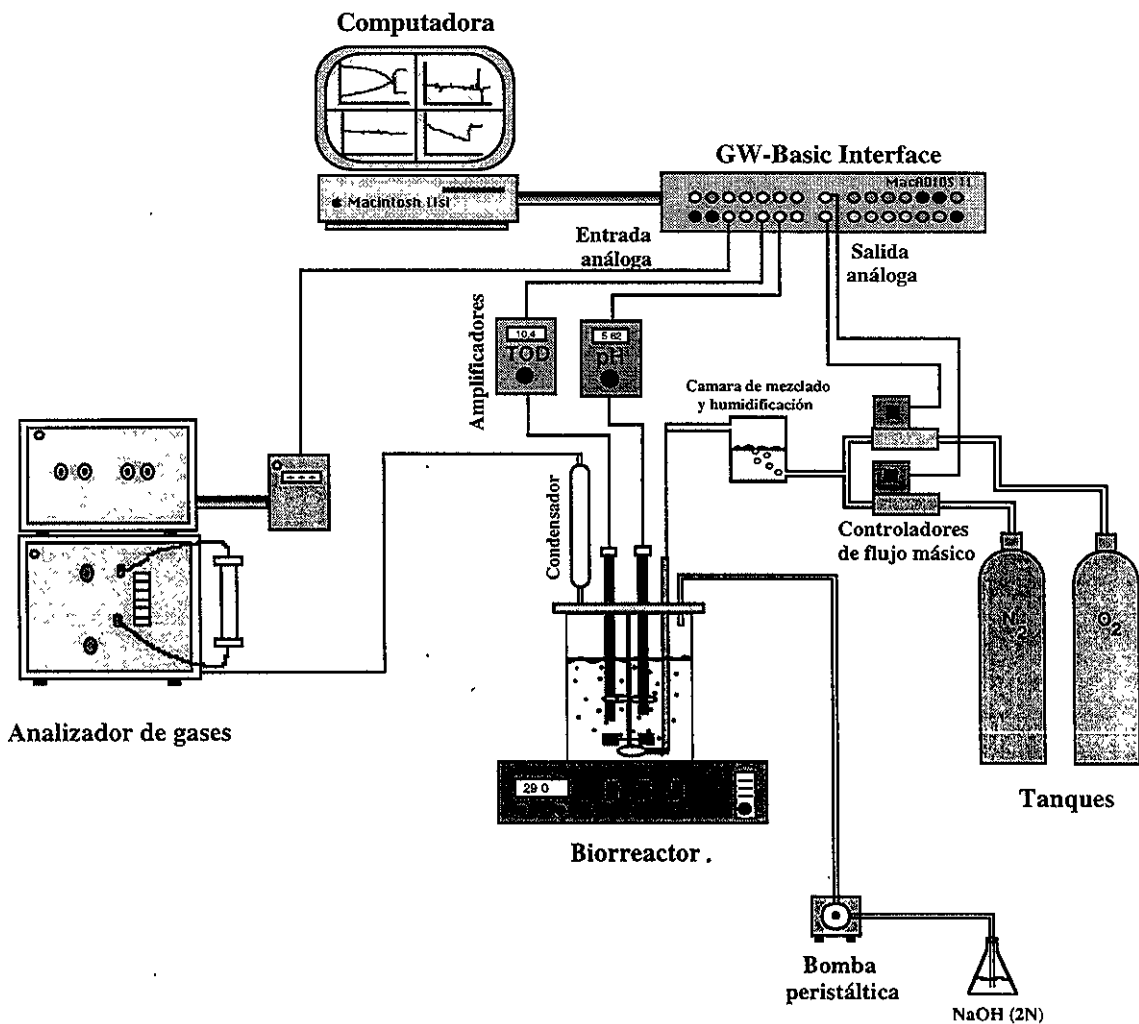


Figura 4.1- Esquema del sistema de control y adquisición de datos (adaptado de Aguilar-Aguila *et al*; 1993).

4.1.4.2 Configuración y arreglo de los difusores e impulsores utilizados.

El biorreactor fue equipado con tres configuraciones diferentes de impulsores-difusores (construidos en acero inoxidable), tratando así de satisfacer los múltiples requisitos de mezclado y de transferencia de oxígeno en el sistema tetrafásico.

- A) Configuración estándar: Este sistema es el incluido en el equipo original del biorreactor (equipo de fábrica). Consiste de un difusor de 5 orificios de *ca.* 1 mm de diámetro en combinación con un sistema de turbinas (ST), dos turbinas Rushton ($D = 0.49T$), el cual generó un flujo radial y burbujas relativamente grandes en el medio. Dicha configuración se denominará como 5-ST en el resto del manuscrito.
- B) Configuración difusor de anillo - sistema de flujo mixto: Este sistema ha sido recomendado por diversos autores para ser empleado en procesos que utilicen sistemas biológicos (Bakker *et al*; 1994; Nienow, 1996), especialmente en aquellos cuyo crecimiento genere caldos reológicamente complejos (Nienow, 1990b). Dicha configuración consta de una turbina Rushton ($D = 0.49T$) y una hélice marina ($D = 0.65T$) en la parte inferior y superior respectivamente, sistema de flujo mixto (SFM); además de un difusor de anillo, el cual contiene 8 orificios de *ca.* 0.8 mm de diámetro.
- C) Configuración difusor sinterizado - sistema de flujo mixto: Este sistema se construyó con el fin de mejorar los fenómenos de transferencia y de mezclado en el biorreactor. Por un lado, la transferencia de oxígeno se mejoró al disminuir substancialmente el tamaño de burbuja, a través de un difusor sinterizado (dos cilindros sinterizados, con un tamaño de poro de *ca.* 20 μm ; Waters Chromatography); mientras que por otro, el sistema de flujo mixto (previamente descrito) disminuyó los problemas de mezclado y de recirculación del sustrato orgánico (aceite) en el sistema.

La figura 4.2 muestra esquemáticamente los impulsores y difusores empleados, así como su arreglo en el biorreactor (configuración difusor de Anillo-SFM).

4.1.4.3 Programa de control

El programa utilizado para controlar y adquirir los datos del proceso fue escrito en Microsoft Quick-Basic y se divide en dos partes (Aguilar-Aguila *et al*; 1993). La primera consiste en la introducción de los datos de fermentación y de control, proporcionados por el usuario; mientras

que en la segunda se realizan el resto de las subrutinas (leer, almacenar, controlar y desplegar datos). Para el presente trabajo, dicho programa fue modificado y adaptado para las necesidades propias del estudio.

La subrutina de control de la TOD se basa en un algoritmo convencional proporcional-integral-derivativo (PID) cuyo diagrama de bloques se muestra en la figura 4.3. De esta forma, el programa de control compara el valor de oxígeno deseado o “setpoint” con la lectura del sensor polarográfico. De acuerdo a esta diferencia o “error” se establece la acción de control, en la cual, los controladores de flujo másico cambian la composición del gas alimentado, aumentando o disminuyendo los flujos individuales de oxígeno y nitrógeno (variables manipuladas) pero manteniendo el flujo total constante (1 vvm). Los valores del tiempo de control y de almacenamiento (figura 4.3) fueron de 120 y 180 s, respectivamente.

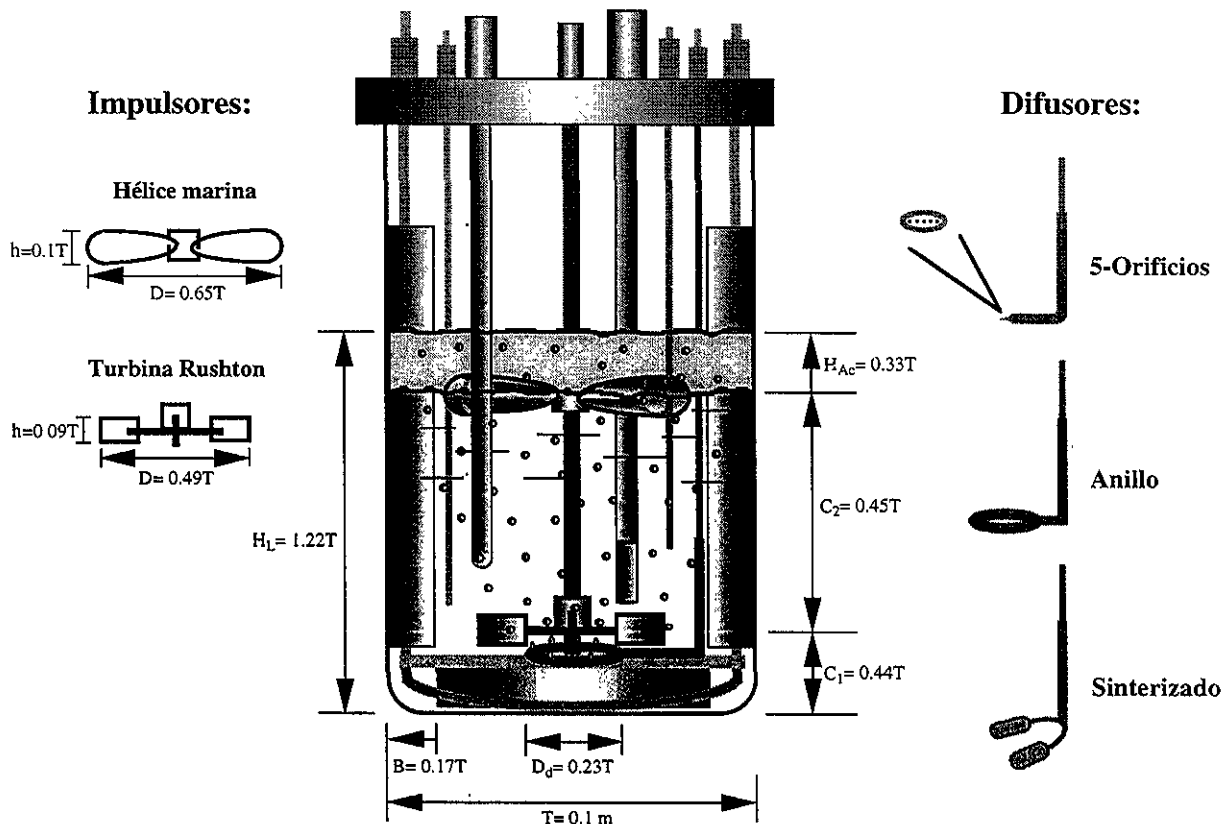


Figura 4.2- Diagrama esquemático de los impulsores y difusores empleados, así como de las dos fases líquidas (agua-aceite) presentes en el sistema.

La forma discretizada del algoritmo PID utilizado esta dado por la ecuación 4-1.

$$O_2\% = O_2\%_{n-1} + K_C [(1 + \phi/\tau_i + \tau_d/\phi) E_n - (1 + 2\tau_d/\phi) E_{n-1} + (\tau_d/\phi) E_{n-2}] \quad (4-1)$$

donde:

$O_2\%$	= flujo de oxígeno actual	[%]	K_C	= constante proporcional	[-]
$O_2\%_{n-1}$	= flujo de oxígeno anterior	[%]	τ_i	= constante integral	[s]
E_n	= error actual	[%]	τ_d	= constante derivativa	[s]
E_{n-1}	= error anterior	[%]	ϕ	= tiempo de control	[s]
E_{n-2}	= error anterior a dos tiempos	[%]			

El algoritmo PID ejecutara la acción de control (incrementar gradualmente la presión parcial del oxígeno en la mezcla de gases alimentada) durante el proceso, hasta llegar a un punto donde la TOD disminuirá por debajo del "setpoint" deseado debido a que la demanda de oxígeno será mayor que la concentración suministrada (aún alimentando oxígeno puro). Este fenómeno es común en cultivos que presentan una gran demanda de oxígeno o en aquellos cuya concentración celular es alta.

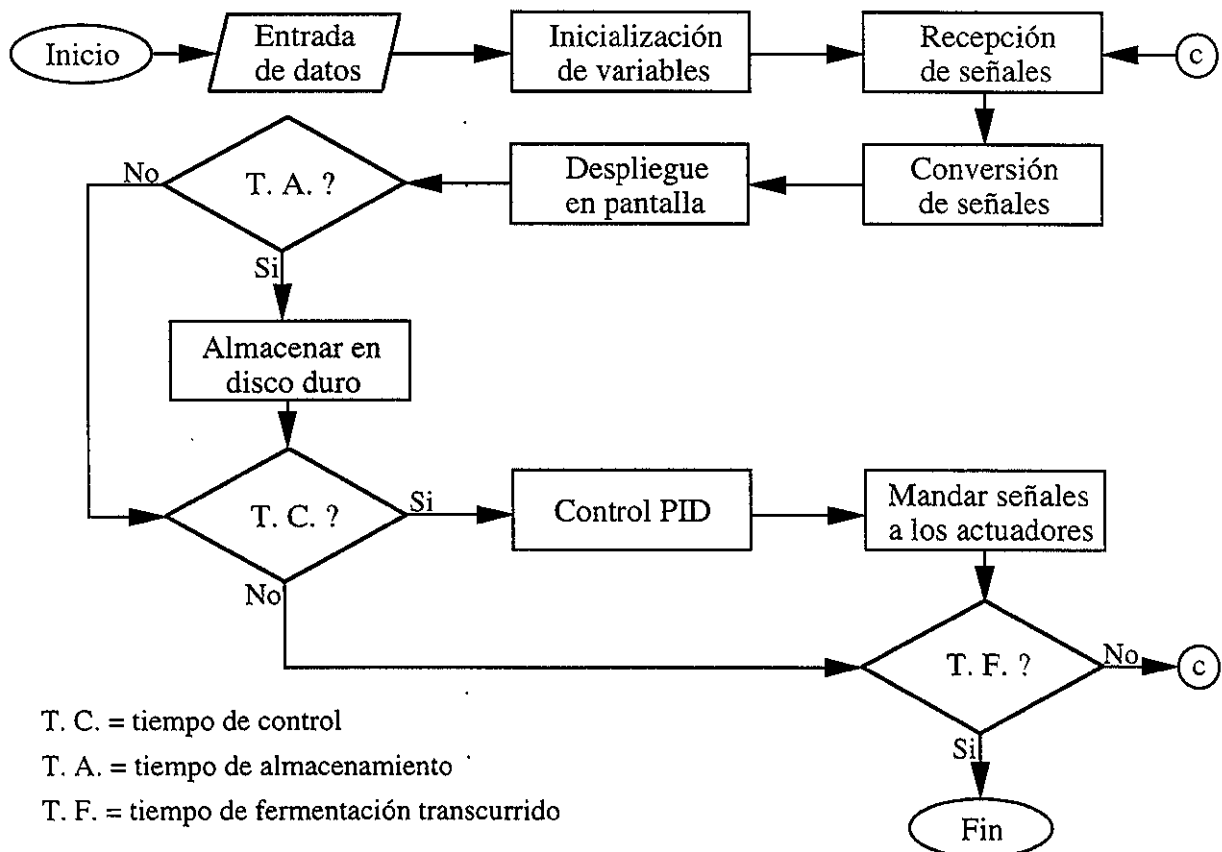


Figura 4.3- Diagrama de flujo del programa de control (De León, 1996).

4.2 Métodos analíticos

4.2.1 Evaluación del crecimiento micelial (biomasa)

El crecimiento micelial se evaluó mediante la determinación gravimétrica de la biomasa (peso seco). Se pesaron aproximadamente 10 g de caldo de cultivo y se adicionaron 10 mL de solución salina (0.9%) para lavar el micelio. La suspensión se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 min en una ultracentrífuga Beckman (modelo J2HS). El sobrenadante se decantó empleando una bomba de vacío para eliminar el aceite suspendido en la capa superior. El proceso anterior se realizó 3 veces para minimizar interferencias en la determinación gravimétrica. El micelio se filtró al vacío sobre una membrana Millipore (0.45 μm) previamente tarada. La muestra se secó a 80 °C en un horno (Hoffman-Pinther & Bosworth, modelo HA223) hasta la obtención de un peso constante (aproximadamente 24 h).

4.2.2 Análisis de bióxido de carbono (CO₂) en el gas efluente

El análisis de CO₂ en el gas efluente se realizó utilizando un analizador infrarrojo (Columbus Instruments International Corp; modelo 1410), bajo el siguiente procedimiento:

- a) El analizador se encendió 4 horas antes de su uso.
- b) Se suministró al analizador una mezcla de gases con la concentración mínima y máxima de CO₂ que puede ser detectado por éste (0% y 1.1% de CO₂ en una mezcla con oxígeno, utilizando los controladores de flujo másico ya descritos) a un flujo, presión y temperatura constante (0.5 L/ min, 14.7 PSIA y 70 °F, respectivamente). Durante el suministro de tales concentraciones, se ajustaron los valores obtenidos en la señal análoga de salida con las concentraciones de CO₂ conocidas mediante el uso de un multímetro digital (Otto, MIC-16H). Las lecturas están dadas en porcentaje.
- c) El proceso anterior se realizó 3 o 4 veces, hasta que la señal análoga de salida corresponda con la concentración de CO₂ aplicada.
- d) Calibrado el equipo, el sistema se conectó a la salida de gases (línea de venteo) del biorreactor.

Para su análisis, los gases deben de estar extentos de humedad, por lo que ésta fue eliminada mediante un sistema de enfriamiento (condensador; figura 4.1) y una trampa de humedad, la cual empleó Mg(ClO₄)₂ como agente anhidrido (figura 4.4).

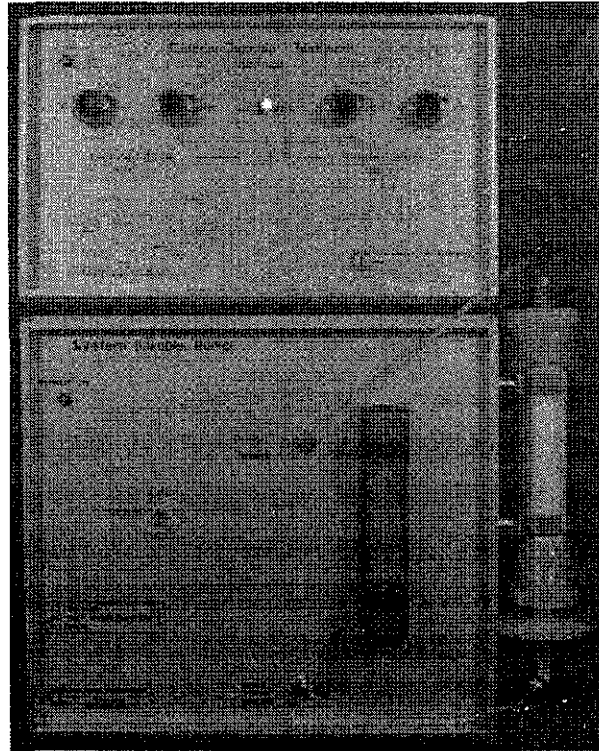


Figura 4.4- Analizador de gases utilizado para evaluar la concentración de CO₂ en el sistema.

4.2.3 Evaluación de las constantes de control

Las constantes de control (K_C , τ_i y τ_d) se determinaron a través del método de la curva de reacción del proceso y para estimar su valor se utilizó el criterio de Ziegler-Nichols (Bushell, 1988). Este método se basa en medir la respuesta transitoria de la variable medida (% TOD), con respecto al tiempo, al introducir un cambio escalonado de magnitud M en la variable manipulada (flujo de oxígeno). La figura 4.5 muestra una curva típica de reacción del proceso. A partir de dicha curva se estimaron las constantes de control PID, las cuales se definen como:

$$\tau_i = 2 \cdot T_d \quad (4-2)$$

$$\tau_d = T_d / 2 \quad (4-3)$$

$$S^* = VRS / M \quad (4-4)$$

$$K_C = 1.2 / (T_d \cdot S^*) \quad (4-5)$$

donde:

T_d [tiempo muerto]: tiempo en que la tangente intersecta a la recta del estado cuasiestable de la variable medida (% TOD).

VRS [velocidad máxima de respuesta del sistema]: pendiente de la tangente en el punto de inflexión de la curva de reacción.

M [magnitud del cambio]: magnitud del cambio de la variable de entrada (flujo de oxígeno).

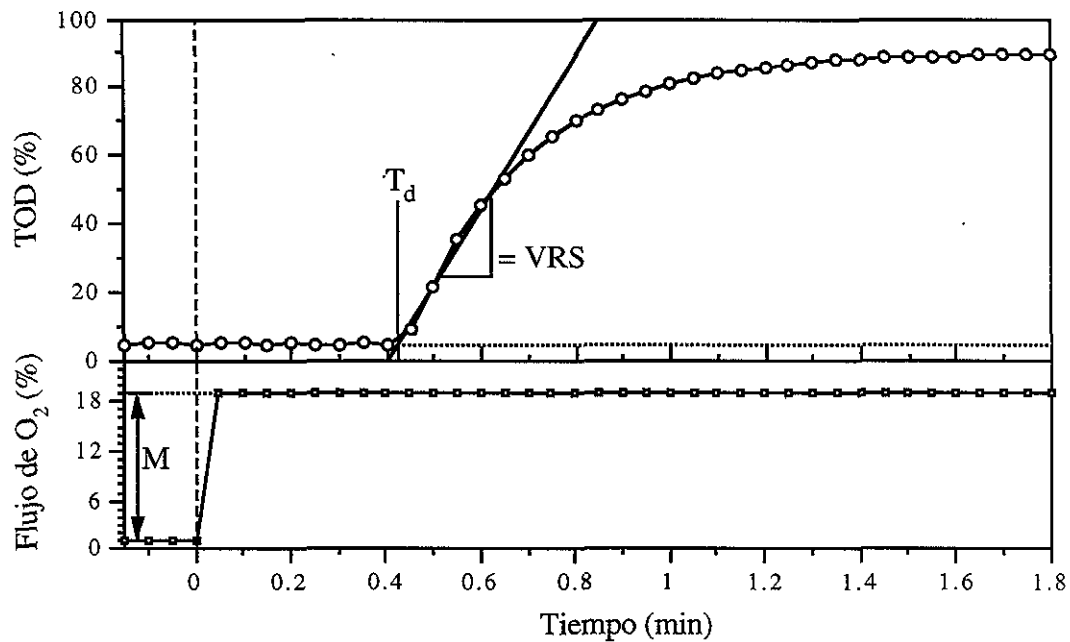


Figura 4.5- Curva típica de reacción del proceso.

4.2.4 Estimación teórica de la potencia suministrada y calidad del mezclado en los sistemas de fermentación

La estimación teórica del consumo de potencia de las dos configuraciones de impulsores (SFM y ST) se llevó a cabo utilizando los números de potencia (Po) reportados por Jüsten *et al.* (1996) para impulsores de geometría similar al del presente trabajo. En su estudio, los autores evaluaron la potencia (P) a través de mediciones en el torque (Ec. 4-6) bajo condiciones no gaseadas.

$$Po = M \omega / \rho_L N^3 D^5 \quad (4-6)$$

donde:

Po = número de potencia [-]

ρ_L = densidad del medio [kg/m^3]

M = torque [$N \cdot m$]

N = velocidad de agitación [s^{-1}]

ω = velocidad angular [s^{-1}]

D = diámetro del impulsor [m]

Utilizando dicha ecuación, se reporta un Po de 4.22 para la turbina Rushton (4.8 cm de diámetro y 6 paletas) y de 0.55 para la propela marina (6.0 cm de diámetro y 3 paletas). A partir de éstos valores se calculó la potencia suministrada (Ec 4-7) para cada caso particular (turbina Rushton y propela marina), asumiendo la densidad y viscosidad del agua (1,000 kg/m³ y 0.001 Pa•s, respectivamente).

$$P = Po \rho_L N^3 D^5 \quad (4-7)$$

donde:

P = potencia [watts]

La potencia de los elementos de flujo (impulsores) utilizados se suman y posteriormente se divide entre el volumen total de trabajo. El valor obtenido se reporta como potencia volumétrica (P/V).

El tiempo de circulación (t_c) de los sistemas empleados se calculó de acuerdo a la ecuación 4-8 (Smith *et al*; 1990). Este valor proporciona información sobre la frecuencia con que pasa una partícula discreta a través de una región determinada dentro del biorreactor.

$$t_c = V_L / Fl N D^3 \quad (4-8)$$

donde:

t_c = tiempo de circulación [s]

V_L = volumen de trabajo [m³]

Fl = número de flujo [-]

Los valores del Fl fueron obtenidos, al igual que en el caso anterior, a partir de los datos generados por Jüsten *et al.* (1996). Los autores reportan un Fl de 0.81 para la turbina Rushton y 0.60 para la propela marina (ambas previamente descritas). Es importante mencionar que estas fueron estimadas a partir de los Po calculados, es decir, bajo condiciones no gaseadas y asumiendo las propiedades del agua. En este sentido, los valores estimados tendrán validez únicamente al inicio del cultivo (condiciones similares a la del agua), ya que los t_c varían con las propiedades reológicas de los caldos (Anderson *et al*; 1982).

Por otro lado, la estimación del número de Reynolds (Re) se realizó a partir de la ecuación 4-9, asumiendo, nuevamente, la densidad y viscosidad del agua.

$$Re = \rho_L N D^2 / \mu \quad (4-9)$$

donde:

Re = número de Reynolds [-]

μ = viscosidad [Pa•s]

4.2.5 Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) y de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO)

El k_La y la VCO se estimaron "en línea" durante el proceso utilizando el método dinámico, el cual es altamente representativo y confiable en la determinación de ambos parámetros (Atkinson y Mavituna, 1991).

El método dinámico se basa en la ecuación 4-10 y en una concentración celular conocida. Dicha técnica utiliza la respuesta transitoria de un electrodo de oxígeno disuelto para medir los cambios en la concentración de TOD al suspender y reiniciar la aireación en un proceso dado. La secuencia del método es la siguiente:

- a) El cambio de la TOD respecto al tiempo en un cultivo microbiano cualquiera esta dado por la siguiente ecuación:

$$dC / dt = Na - VCO \quad (4-10)$$

o bien,

$$dC / dt = [k_La (C_g^* - C_L)] - [Q_{O_2} \cdot X] \quad (4-11)$$

donde:

dC / dt = velocidad global de transferencia de oxígeno [mmol O₂/ L•h]

Na = velocidad de transferencia de oxígeno [mmol O₂/ L•h]

VCO = velocidad de consumo de oxígeno [mmol O₂/ L•h]

k_La = coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno [h⁻¹]

C_g^* = concentración de oxígeno disuelto a la saturación del aire [mmol O₂/ L]

C_L = concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo [mmol O₂/ L]

Q_{O_2} = demanda específica de oxígeno [mmol O₂/ g_{cel}•h]

X = concentración de biomasa [g_{cel}/ L]

- b) En un proceso fermentativo aerobio, se suspende la entrada de aire al sistema manteniendo constante la presión en el cabezal y en el medio, en esta situación:

$$- dC / dt = VCO \quad (4-12)$$

- c) Se grafica el decremento de la concentración de oxígeno contra el tiempo (figura 4.6) y se determina la VCO a partir de la pendiente de la gráfica.
- d) Antes de que C_L disminuya por debajo de la C_{crit} (concentración crítica de oxígeno) se reinicia de nuevo la aeración (figura 4.6) y se grafica C_L contra el tiempo; en este momento, la ecuación $-dC / dt$ (Ec. 4-12) regresa a su forma original (Ec. 4-10).

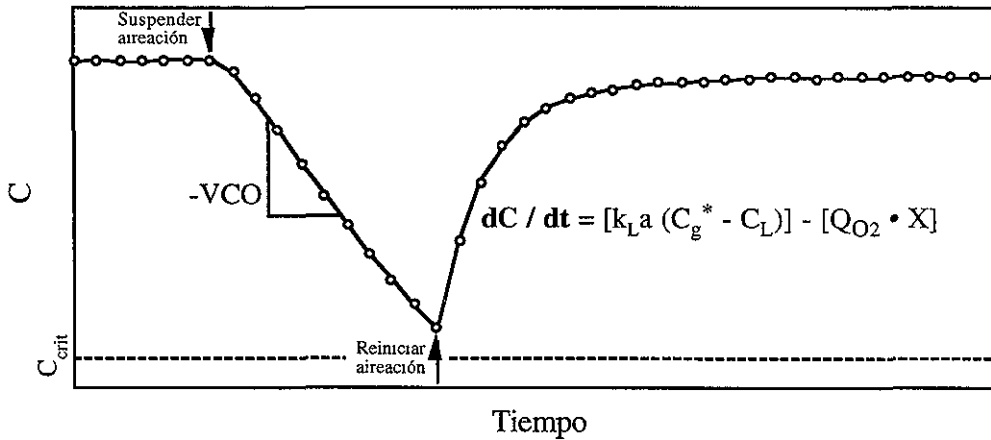


Figura 4.6- Determinación del $k_L a$ y de la VCO mediante la técnica dinámica.

- e) Rearreglando la ecuación 4-11 y calculando dC / dt a partir del incremento en la TOD al airear, se obtiene:

$$C_L = C_g^* - 1/k_L a [(dC / dt) + (Q_{O_2} \cdot X)] \quad (4-13)$$

- f) Graficando C vs $[(Q_{O_2} \cdot X) + (dC / dt)]$ se genera una figura (como la 4.7), en donde la pendiente de la línea recta es igual a $-1/k_L a$.

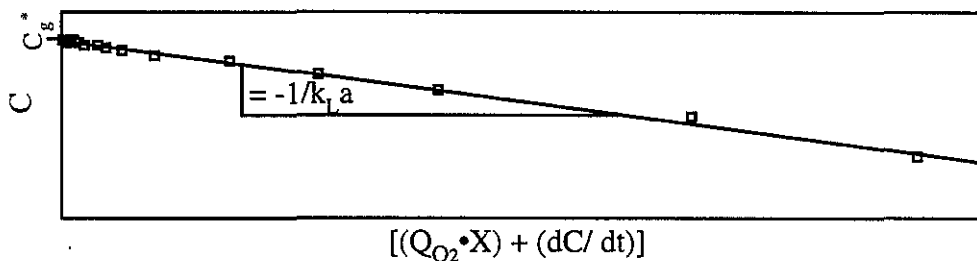


Figura 4.7- Estimación del $k_L a$ utilizando diferenciales (dC/dt) obtenidas por la técnica dinámica.

Las determinaciones de $k_L a$ y VCO se llevaron a cabo a utilizando las tres configuraciones de difusores-impulsores previamente descritas, empleando aire como gas alimentado (1 vvm) y bajo las condiciones de cultivo ya mencionadas.

4.2.6 Determinación de la demanda específica de oxígeno (Q_{O_2})

La VCO (determinada en la sección anterior) representa la cantidad de oxígeno consumido por un cultivo microbiano en un cierto tiempo; además, es un indicativo de la actividad metabólica durante la fermentación. Las ecuaciones 2-3 y 4-11 señalan que la VCO depende directamente de la demanda específica de oxígeno (Q_{O_2}) así como de la concentración celular (X), ambas dependientes del tipo de organismo, de la fase del cultivo y del ambiente en que se desarrolla la fermentación (Atkinson y Mavituna, 1991).

En este sentido, la VCO ha sido también descrita de acuerdo a la ecuación 4-14, en donde los diversos parámetros intrínsecos de cada sistema se incorporan a la estimación de esta.

$$VCO = (\mu / Y_{O_2}) \cdot X \quad (4-14)$$

donde:

Y_{O_2} = rendimiento de oxígeno [$g_{cel} / mmol O_2$]

μ = velocidad específica de crecimiento [h^{-1}]

Q_{O_2} = primer término de la ecuación 4-14 [μ / Y_{O_2}]

De acuerdo a la ecuación 4-14, el valor de la Q_{O_2} puede considerarse constante en el transcurso de la fase exponencial de crecimiento, ya que durante esta etapa, tanto μ como Y_{O_2} permanecen constantes (Bailey y Ollis, 1986). Esta dependencia ha sido utilizada por diversos autores (Pirt, 1975; Singh, 1996) para correlacionar la concentración de biomasa y la VCO a través de un parámetro constante, al menos durante la etapa exponencial, como es la Q_{O_2} .

La Q_{O_2} puede ser calculada a partir de la pendiente formada por la caída de la TOD en la técnica dinámica. La pendiente obtenida será igual a $-Q_{O_2} \cdot X$ y una vez calculada la concentración celular (X), al momento de la evaluación, solo restará sustituir su valor para obtener Q_{O_2} . Por otro lado, si se cuenta con múltiples estimaciones de la VCO se puede estimar un valor más representativo y/o global del Q_{O_2} en el sistema. En este caso, se grafican las VCO estimadas contra sus respectivas concentraciones celulares (biomasa) y se determina la Q_{O_2} a partir de la pendiente de la gráfica.

4.2.7 Determinación de la concentración crítica de oxígeno (C_{crit})

La estimación de la concentración crítica de oxígeno (C_{crit}) se realizó a través de la técnica descrita por Stanbury y Whitaker (1984), aplicando adicionalmente el criterio de la segunda derivada. Esta técnica es similar a la empleada en la sección anterior (suspender momentáneamente la aireación y seguir la caída del oxígeno disuelto), con la excepción de que la aireación se reinicia hasta que la TOD descendente en la gráfica TOD vs t pierde linealidad. El punto donde ésta desviación ocurre, es el valor aproximado de la C_{crit} . En este sentido, la segunda derivada (d^2C/dt^2) permite estimar el punto donde la VCO del organismo es más afectada (C_{crit}), ya que representa el punto donde la pérdida de linealidad, producto del cambio entre pendientes, de la función original es más significativa (figura 4.8). Es importante señalar que esta técnica es solo una aproximación del valor puntual de C_{crit} , por lo que los valores obtenidos deben ser empleados con cierta reserva.

La determinación de la C_{crit} se realizó con la configuración difusor sinterizado-SFM, tratando así de eliminar cualquier posible limitación que pudiera interferir en dicha evaluación (transferencia de oxígeno, zonas muertas, etc.). Esta se llevó a cabo durante la fase exponencial de crecimiento, etapa donde el consumo de oxígeno es constante; además, a este tiempo (50 h) se evitan posibles efectos secundarios inherentes al agotamiento de la fuente de carbono ya que ésta aún no resulta limitante.

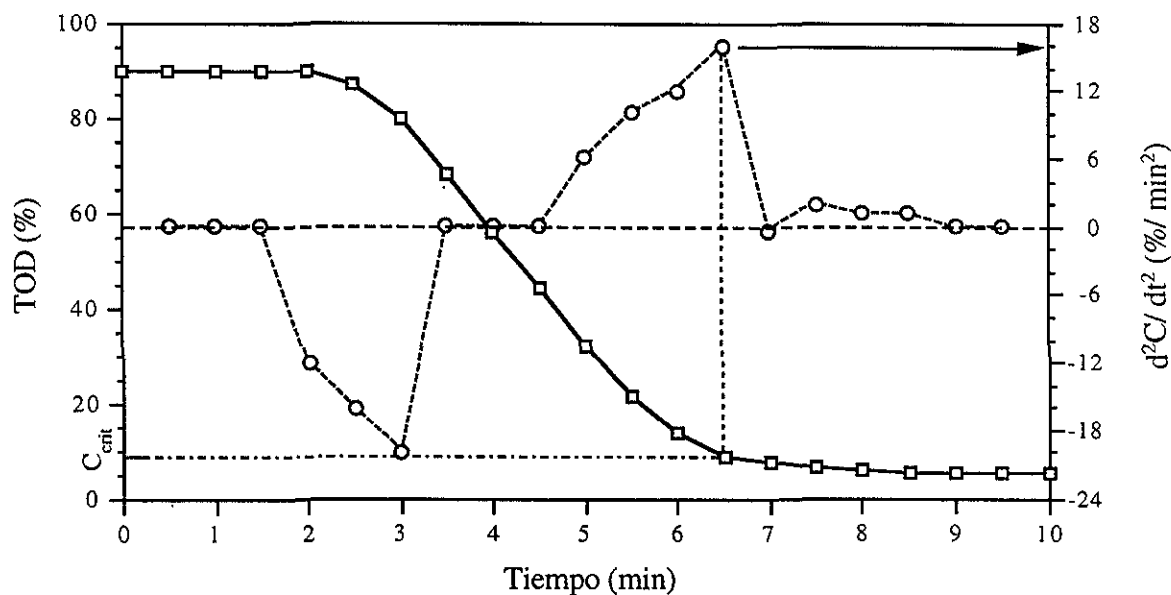


Figura 4.8- Determinación de la C_{crit} , aplicando adicionalmente el criterio de la segunda derivada, según Stanbury y Whitaker (1984).

Capítulo V

Resultados y discusión

5.1 Requerimiento mínimo y concentraciones limitantes de oxígeno disuelto en cultivos tetrafásicos

Con el fin de evitar la limitación de oxígeno durante el proceso, y así separar el efecto individual de los parámetros manipulados (difusores-impulsores) sobre el crecimiento, las fermentaciones se realizaron a TOD constante, empleando para esto el sistema de control y adquisición de datos ya descrito (sección 4.1.4.1). Para garantizar lo anterior, se determinó inicialmente la demanda específica de oxígeno (Q_{O_2}), la concentración crítica de oxígeno (C_{crit}) y la viabilidad del micelio a bajas TOD, tales parámetros engloban, de manera general, los requerimientos mínimos y concentraciones limitantes de oxígeno en cualquier cultivo microbiano.

5.1.1 Concentración crítica de oxígeno (C_{crit})

El parámetro encargado de evaluar la sensibilidad de un microorganismo en relación a la concentración de oxígeno en el sistema es la concentración crítica de oxígeno (C_{crit}) y representa la cantidad mínima de oxígeno disuelto que un organismo requiere para llevar a cabo todas sus funciones metabólicas y fisiológicas esenciales.

La determinación experimental de la C_{crit} se realizó mediante la técnica descrita por Stanbury y Whitaker (1984), empleando adicionalmente el criterio de la segunda derivada (sección 4.2.7). La figura 5.1 muestra la evaluación de la C_{crit} a las 50 h (fase exponencial de crecimiento) de un cultivo típico de *Trichoderma harzianum*, utilizando la configuración Sinterizado-SFM y aceite de ricino como fuente de carbono.

El valor máximo obtenido al resolver la segunda derivada (d^2C/dt^2) de la ecuación inicial (TOD vs tiempo) fue de 7 %/min². Este valor señala el intervalo donde la VCO del hongo fue más afectada (desviación pronunciada en la caída del oxígeno disuelto) ya que, por definición, indica un cambio drástico en la velocidad de consumo. El uso de este criterio resultó en un valor de 3.6% para la TOD crítica.

El valor de la C_{crit} obtenida en dos experimentos independientes (aplicando los criterios y metodologías ya descritas) fue de aproximadamente 4% TOD (0.010 mmol O_2 / L). Este valor es razonable tomando como referencia la C_{crit} reportada por Atkinson y Mavituna (1991) para el hongo filamentoso *P. chrysogenum* (evaluada a 30 °C), el cual fue de 0.009 mmol O_2 / L (3.6% TOD).

Por otra parte, Marten *et al.* (1996), aplicando esta misma técnica en fermentaciones piloto (10 L) de *Trichoderma reesei*, reportaron una C_{crit} de 15% TOD en cultivos con celulosa como fuente de carbono (sustrato insoluble) y bajo condiciones de cultivo similares a las del presente trabajo (28 °C y 250 rpm). A pesar de estas similitudes, la C_{crit} estimada por Marten *et al.* fue casi cuatro veces mayor (15% vs 4% TOD), lo cual puede ser atribuido a la morfología de *pellets* desarrollada durante el proceso, ya que ésta regularmente genera limitaciones difusionales de oxígeno, y de otros nutrientes, hacia dentro del *pellet*. Esta problemática se agudiza al emplear velocidades de agitación relativamente bajas (como en su caso), por lo que la concentración de oxígeno en el seno del líquido (C_{crit}) debe ser mayor para contrarrestar y/o reducir los gradientes de oxígeno hacia su interior, lo cual puede explicar el alto valor de C_{crit} reportada.

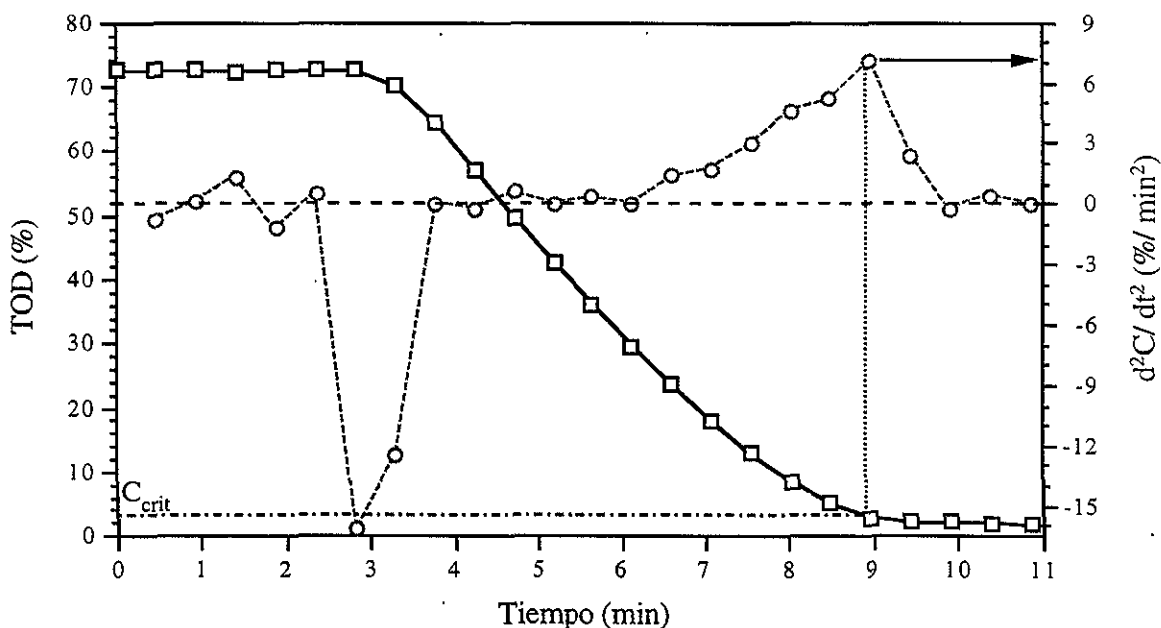


Figura 5.1- Evaluación de la concentración crítica de oxígeno (C_{crit}) en un cultivo típico de *Trichoderma harzianum* empleando la configuración Sinterizado-SFM.

5.1.2 Demanda específica de oxígeno (Q_{O_2})

La demanda específica de oxígeno (Q_{O_2}) es un parámetro intrínseco de cada microorganismo y representa la cantidad de oxígeno que requiere un gramo de biomasa para su consumo durante un cierto periodo de tiempo. Adicionalmente, permite estimar en conjunto con la velocidad de consumo de oxígeno, la concentración de biomasa “en línea” durante ciertas etapas del cultivo (sección 4.2.6). Para estimar su valor, fue necesario calcular inicialmente la velocidad de consumo de oxígeno (VCO), así como la concentración celular (X) al momento de la evaluación, ya que su valor depende de ambas variables (Ec. 2-3).

La determinación experimental de la VCO se realizó mediante la técnica dinámica (sección 4.2.5). La figura 5.2 muestra la evaluación de la VCO a las 34 h (fase exponencial de crecimiento) en un cultivo tetrafásico de *T. harzianum*, utilizando la configuración Anillo-SFM y aceite de ricino como fuente de carbono.

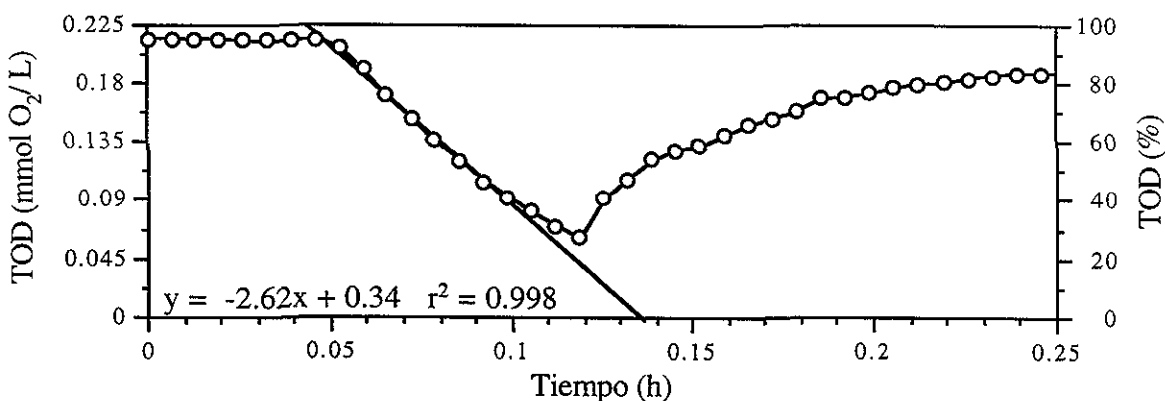


Figura 5.2- Evaluación de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) en un cultivo tetrafásico de *Trichoderma harzianum* empleando la configuración Anillo-SFM.

De acuerdo a la figura 5.2, la pendiente generada a partir de la caída de la TOD, al suspender la aireación, fue de $-2.62 \text{ mmol O}_2/\text{L}\cdot\text{h}$, valor absoluto que representa el consumo de oxígeno por parte del hongo. De igual manera, la concentración de biomasa calculada al momento de la evaluación fue de aproximadamente 3.1 g/L , correspondiente a una Q_{O_2} de $0.85 \text{ mmol O}_2/\text{g}\cdot\text{h}$.

Los valores de VCO y de biomasa del resto de las configuraciones se estimaron de manera similar, obteniendo así un valor más representativo de la Q_{O_2} . Asimismo, la estimación de la Q_{O_2} en la fase exponencial de crecimiento representa la máxima demanda de oxígeno por parte del hongo y a la vez genera un valor constante debido a que los valores de μ y de Y_{O_2} no

cambian (sección 4.2.6). Los resultados se presentan en la tabla 5.1. Es importante mencionar que el consumo de oxígeno, analizado a través de la velocidad de producción de CO₂ (siguiente sección), respecto a la concentración de biomasa fue similar durante todos los cultivos, independientemente de la configuración empleada. En consecuencia, los datos de consumo pueden ser comparados entre sí.

La figura 5.3 muestra la evaluación de la Q_{O₂} al graficar los valores estimados de VCO contra sus respectivas concentraciones celulares (tabla 5.1). Como se puede observar, los puntos originan una pendiente que se ajusta bien a los datos experimentales ($r^2 = 0.97$), además de generar una ecuación cuya ordenada al origen es cercano a cero (valor esperado). De acuerdo a lo anterior, se reporta un valor de 0.9 mmol O₂/ g•h como Q_{O₂} máxima en cultivos tetrafásicos de *T. harzianum* empleando la técnica dinámica. Este valor es relativamente bajo tomando como referencia algunos otros valores de Q_{O₂} reportados para hongos filamentosos como son 2.0 y 3.6 mmol/ g•h para *Trichoderma viride* y *Penicillium chrysogenum*, respectivamente (Pirt, 1975; Atkinson y Mavituna, 1991). Esta discrepancia se debió probablemente a los sustratos empleados. En este caso particular se utilizó un sustrato complejo, insoluble y de lenta degradación (aceite de ricino) como fuente única de carbono, mientras que en los dos casos reportados se empleó glucosa (sustrato soluble ordinario de rápida degradación) la cual fue fácilmente metabolizada. Esto último seguramente favoreció el crecimiento de ambos hongos, con lo que se incrementó la velocidad de crecimiento (μ) y en consecuencia la demanda y el consumo de oxígeno en el medio (Q_{O₂} y VCO).

Difusor	Configuración de impulsores	Tiempo de muestreo (h)	Fase del cultivo	Biomasa (g/L)	VCO estimada (mmol O ₂ /L•h)
Anillo	Rushton-Propela	34	exponencial	3.1	2.62
5-Orificios	Rushton-Rushton	43	exponencial	2.1	1.96
Sinterizado	Rushton-Propela	46	exponencial	2.8	2.47

Tabla 5.1- Evaluación de la velocidad de consumo de oxígeno (VCO) en cultivos tetrafásicos de *Trichoderma harzianum*.

Por otro lado, Amanullah *et al.* (1998b) en un estudio reciente empleando *Xanthomonas campestris* reporta que la técnica dinámica al ser aplicada en cultivos reológicamente complejos puede provocar una subestimación de la Q_{O₂} debido a que la alta viscosidad impide el libre ascenso de las pequeñas burbujas hacia la superficie, quedando retenidas estas en el medio. Esta subestimación fue más pronunciada en la fase estacionaria (etapa de máxima producción de goma xantana), ya que la viscosidad del medio se incrementó significativamente en relación a la

fase exponencial de crecimiento. Así, los valores estimados durante la fase estacionaria, mediante la técnica dinámica, fueron tres veces menores que los calculados a través de un balance de oxígeno (análisis de gases); mientras que los evaluados en la fase exponencial (baja viscosidad) generaron estimaciones similares entre ambos métodos, corroborando la influencia de la viscosidad sobre la técnica de evaluación.

Sin embargo, el bajo valor aquí reportado ($0.9 \text{ mmol O}_2/\text{g}\cdot\text{h}$) no parece ser un subestimación de la Q_{O_2} , ya que la viscosidad generada durante los cultivos tetrafásicos de *T. harzianum* son ordenes de magnitud menores a los generados por los cultivos de *X. campestris* (Serrano-Carreón *et al*; 1997). Así, los problemas asociados con la viscosidad, respecto al método de evaluación, pueden ser descartados.

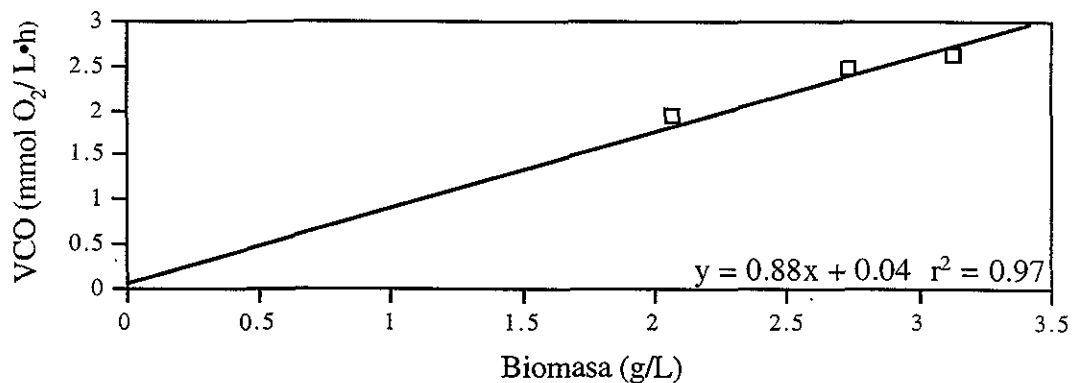


Figura 5.3- Evaluación de la demanda específica de oxígeno (Q_{O_2}) en cultivos tetrafásicos de *Trichoderma harzianum*.

5.1.3 Viabilidad del micelio a bajas concentraciones de oxígeno disuelto

Diversos estudios señalan la dificultad de controlar la TOD en cultivos filamentosos debido a la compleja morfología desarrollada. De hecho, la problemática generada ha provocado que los pocos estudios reportados empleen sistemas en donde la TOD no es realmente “controlada”, es más bien mantenida por encima de un valor preestablecido (Lejeune y Baron, 1995; Marten *et al*; 1996) originando fuertes fluctuaciones de oxígeno en el medio. El control del proceso se complica aún más al incorporar la fase inmisible (aceite), por lo que la presencia de oscilaciones se vuelve un fenómeno inevitable. En este sentido, dado que se pretende evaluar únicamente el efecto de los parámetros hidrodinámicos manipulados sobre el crecimiento, es necesario establecer inicialmente si la presencia de ciertos periodos de bajas concentraciones de oxígeno (inferiores a la C_{crit}) afectaría el crecimiento del hongo. Sin embargo, a la fecha no existen

reportes previos respecto a la capacidad de *T. harzianum* para crecer y reproducirse (viabilidad) después de ser sometidos a caídas bruscas y/o a concentraciones bajas de oxígeno, por lo que se decidió estudiar estos aspectos.

La figura 5.4 muestra los resultados del estudio donde se evaluó la viabilidad de *T. harzianum* a tensiones bajas de oxígeno. La fermentación presentó dos etapas. En la primera (0- 60 h), la concentración de oxígeno en el medio se mantuvo controlada a tensiones inferiores a 5% TOD; mientras que en la segunda, el “setpoint” se incrementó hasta 50% TOD (60- 86 h), tratando así de favorecer el crecimiento (figura 5.4b). De acuerdo a la figura 5.4c, la TOD al inicio del cultivo (12- 60 h) fue de aproximadamente 1% (concentración inferior a la C_{crit}), por lo que el organismo probablemente se encontraba limitado por oxígeno durante este periodo. La figura 5.4a corrobora lo anterior, ya que la concentración de biomasa fue prácticamente constante durante las primeras 60 h (bajas tensiones de oxígeno). Contrario a lo observado en la primera etapa, la segunda (60- 84 h) favoreció la actividad metabólica del microorganismo debido al incremento de la TOD en el medio, originando el crecimiento del hongo hacia el final de la fermentación (concentración máxima de biomasa de 4.2 g/L a las 84 h).

Dado lo anterior, se puede afirmar que *T. harzianum* permanece viable aún después de ser expuesto a bajas concentraciones de oxígeno disuelto (1% TOD) en cultivos tetrafásicos.

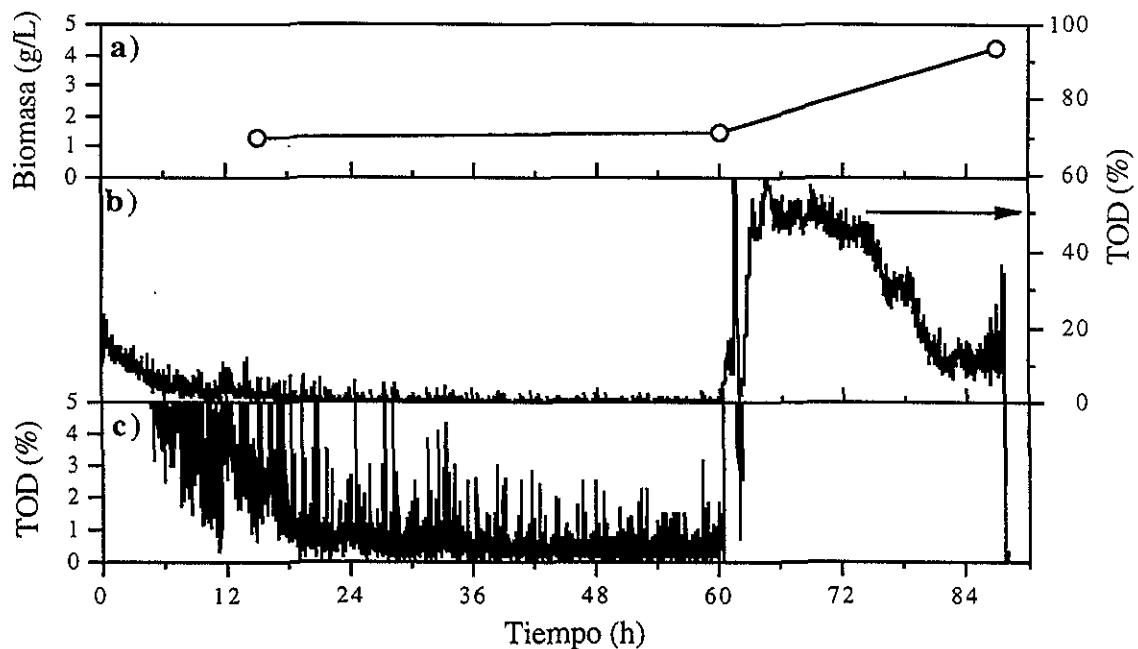


Figura 5.4- Viabilidad de *Trichoderma harzianum* respecto a bajas concentraciones de oxígeno disuelto en cultivos tetrafásicos: (a) Cinética de crecimiento; (b) Perfil de la TOD durante el cultivo; (c) Detalle de la TOD.

5.2 Transferencia de oxígeno y parámetros de control de las tres configuraciones empleadas

Las condiciones de operación utilizadas durante esta sección fueron: velocidad de agitación 200 rpm, temperatura 29 °C, pH 5.6 ± 0.2 y aire como gas alimentado a un flujo de 1 vvm.

5.2.1 Orden de reacción para la transferencia de oxígeno durante los cultivos tetrafásicos

El orden de reacción, en este caso específico para la transferencia de oxígeno, señala el orden de la ecuación diferencial necesaria para modelar la respuesta transitoria de la variable medida (% TOD) ante alguna perturbación (Apéndice A.1). Para determinar experimentalmente el orden de reacción de las tres configuraciones empleadas, se graficó $[C(t) - C(\infty)] / [C(0) - C(\infty)]$ vs tiempo, a partir de los datos generados por la curva de respuesta ante un cambio escalonado en el flujo de oxígeno (variable manipulada).

La figura 5.5 muestra la evaluación del orden de reacción de la configuración Sinterizado-SFM. Se observa que la curva obtenida sigue la tendencia de un sistema de primer orden (Apéndice A), ya que ésta es prácticamente una línea recta (función lineal del tiempo), característica de los sistemas de este tipo. Es importante señalar que las curvas obtenidas a partir de las otras dos configuraciones utilizadas fueron similares a la figura 5.5, por lo que todas las configuraciones evaluadas presentaron un comportamiento de primer orden.

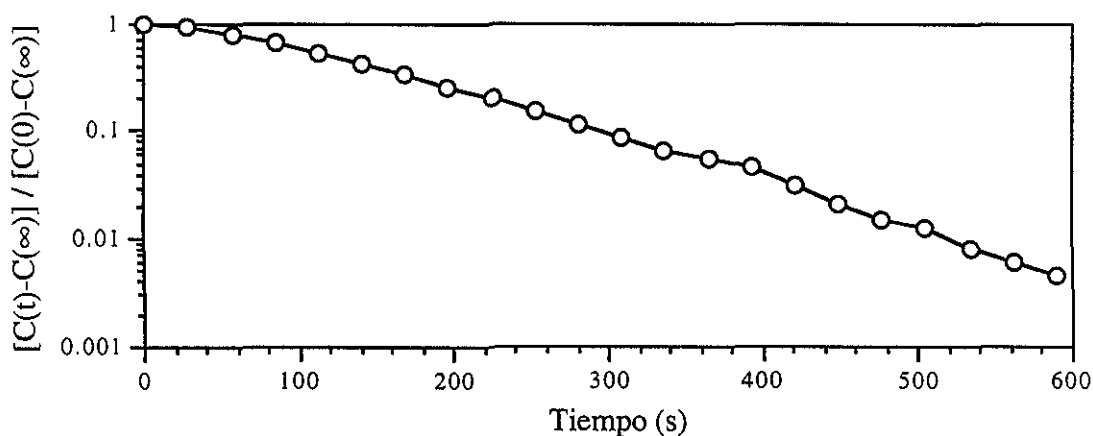


Figura 5.5- Determinación experimental del orden de reacción para la transferencia de oxígeno empleando la configuración Sinterizado-SFM.

5.2.2 Constantes de control y comportamiento dinámico de los sistemas

Una vez evaluado el orden de reacción para la transferencia de oxígeno, el siguiente paso consistió en caracterizar los parámetros dinámicos de las tres configuraciones (constante de tiempo, tiempo muerto, etc.), así como en calcular sus respectivas constantes de control (ganancia, constante integral y derivativa). La evaluación de tales parámetros es importante en el control de un proceso, ya que el comportamiento dinámico es el resultado de los diversos fenómenos presentes en el sistema (transferencia de oxígeno en el medio, respuesta del electrodo, retraso por el transporte del gas en la tubería, etc.), mientras que las constantes de control “afinan” y amplifican la respuesta ante alguna perturbación. Dado que ambos parámetros dependen de las características intrínsecas del proceso (aireación, agitación, geometría de impulsores y/o difusores) y del organismo empleado (consumo de oxígeno, velocidad específica de crecimiento), la evaluación de éstos se llevó a cabo en cada una de las configuraciones utilizadas durante el estudio (la dinámica de los sistemas es diferente para cada caso particular).

La figura 5.6 muestra la curva de respuesta transitoria ante un cambio escalonado en el flujo de oxígeno, del cual se evaluó la dinámica de transferencia de oxígeno de la configuración 5-ST. En este y en todos los casos, el uso de la ecuación A-8 (eliminación del tiempo muerto; Apéndice A.2) fue necesario para determinar la constante de tiempo del sistema, ya que las tres configuraciones presentaron un comportamiento de primer orden. Por otro lado, el tiempo se normalizó en todos los casos, haciendo $t=0$, el tiempo donde se inicio el cambio escalonado.

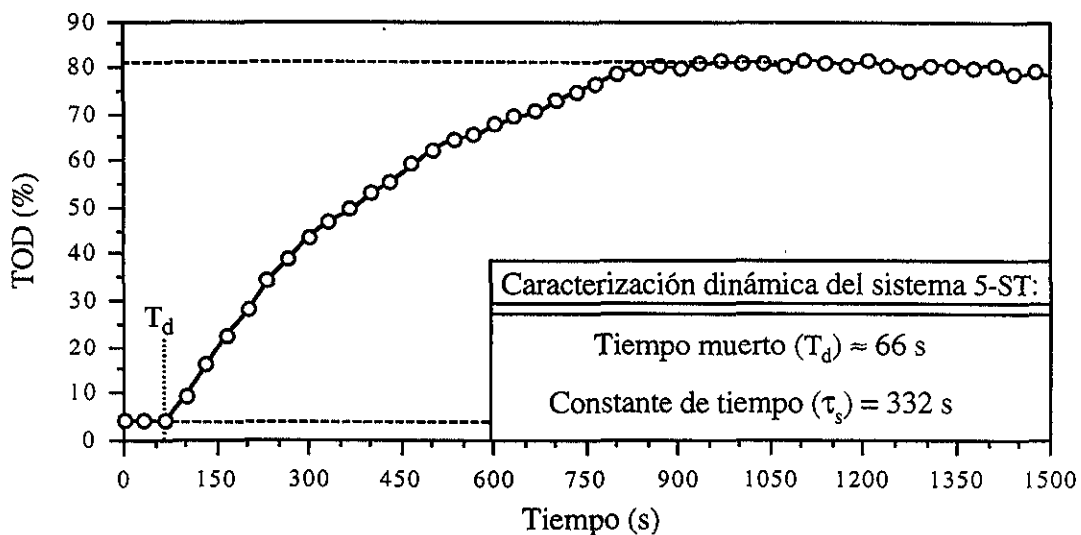


Figura 5.6- Caracterización dinámica de la configuración 5-ST a través de la respuesta transitoria de la TOD ante un cambio escalonado en el flujo de oxígeno.

Para evaluar los parámetros dinámicos de las tres configuraciones, fue necesario determinar inicialmente el tiempo muerto (T_d) de los procesos. De acuerdo a la figura 5.6, se observa que la respuesta transitoria del sistema no fue inmediata, ya que existe un T_d de aproximadamente 66 s. Utilizando el criterio de los sistemas de primer orden y aplicando la ecuación A-8 (Apéndice A.2), se obtiene un valor de 332 s para la constante de tiempo (τ_s) del sistema 5-ST. De igual manera y aplicando los mismos criterios se determinó el resto de las τ_s , obteniendo valores de 157 y 72 s en los sistemas Anillo-SFM y Sinterizado-SFM, respectivamente (tabla 5.2).

Por otro lado, las constantes de control (ganancia, τ_i y τ_d) fueron estimadas de acuerdo a la sección 4.2.3. La estimación de éstas depende directamente de la VRS, la cual, para este caso específico, indica la velocidad global de transferencia de oxígeno (dC/dt) más alta que puede lograr el sistema bajo ciertas condiciones y del tiempo muerto del proceso, por lo que fue necesaria su evaluación previa.

La figura 5.7 muestra una curva típica de respuesta empleada para determinar las constantes de control a partir de la configuración Sinterizado-SFM con células presentes en el biorreactor. Esta figura muestra la estimación de la VRS mediante el cálculo de la pendiente en el punto de inflexión (TOD vs t) y a través de una técnica más puntual, la cual consiste en graficar la relación del incremento en la TOD (Δ TOD) y el incremento en el tiempo (Δ t) vs tiempo (h). La primera evaluación (figura 5.7a) originó una pendiente de 0.766 %/s tomando en cuenta cuatro puntos de la curva exponencial; mientras que la segunda (figura 5.7b) muestra el incremento de la VRS desde cero (inicio) hasta un máximo de aproximadamente 0.8 %/s a las 0.025 h, valor similar al estimado anteriormente.

En este caso particular, el cambio en la variable manipulada (flujo de oxígeno) fue de 20%, generando una ganancia de 0.6 para el sistema Sinterizado-SFM (Ec. 4-5). De igual manera, el T_d fue de aproximadamente 54 s, lo que originó una constante integral y diferencial de 108 y 27 s. La tabla 5.2 muestra las constantes de control, así como las VRS del resto de las configuraciones.

Difusor	Configuración de impulsores	P/V ^a (W/L)	Tiempo de cultivo (h)	$k_L a$ (h^{-1})	τ_s (s)	VRS (%/s)	Ganancia	τ_i (s)	τ_d (s)
5-Orificios	Rushton-Rushton	0.09	36	12.6	332	0.0846	3.5	132	33
Anillo	Rushton-Propela	0.07	30	25.6	157	0.1438	2.8	116	29
Sinterizado	Rushton-Propela	0.07	28	51.8	72	0.7656	0.6	108	27

^a Estimado para las condiciones iniciales del cultivo (sección 4.2.4)

Tabla 5.2- Configuración y desempeño de los múltiples arreglos entre difusores e impulsores.

Es importante señalar que tanto la VRS, como las constantes de control determinadas (tabla 5.2) son las adecuadas para las condiciones específicas evaluadas y estas se mantendrán vigentes mientras los parámetros y características físicas del sistema permanezcan constantes.

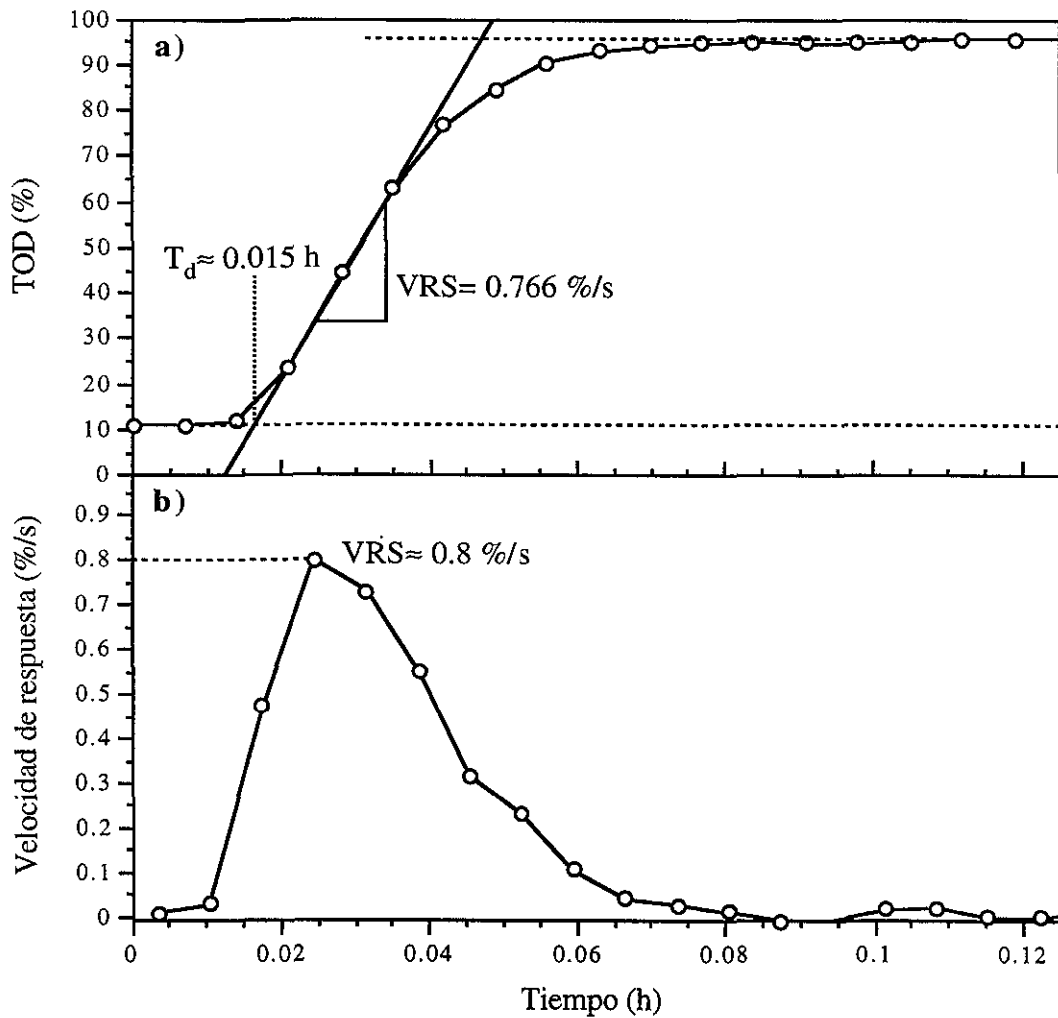


Figura 5.7- Curva de respuesta transitoria empleada para determinar las constantes de control del sistema Sinterizado-SFM.

5.2.3 Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$)

De acuerdo a la determinación de τ_s en sistemas de fermentación (Apéndice A.3), el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) puede ser definido como el inverso de la constante de tiempo del sistema ($1/\tau_s$). Sin embargo, diversos autores (Bailey y Ollis, 1986; Atkinson y Mavituna, 1991) recomiendan preferentemente la medición directa del $k_L a$ mediante un balance de oxígeno y/o de la técnica dinámica al utilizar sistemas fermentativos, ya que estos valores son

más representativos -éstas estimaciones se basan en una serie de datos (balance de masa o en los diversos valores generados a partir de la curva TOD vs t) y no en un solo punto como es el caso de τ_s .

La figura 5.8 muestra la determinación experimental del k_La a través de la técnica dinámica (sección 4.2.5) empleando la configuración Anillo-SFM. Idealmente, la curva obtenida a partir de graficar TOD vs dC/dt (velocidad global de transferencia) debe ser una recta. Sin embargo, se observan ciertas desviaciones experimentales, las cuales no resultan trascendentales ya que los coeficientes de correlación de los tres sistemas evaluados oscilaron entre 0.99 y 0.90.

El k_La obtenido para la configuración Anillo-SFM fue de aproximadamente 25.6 h^{-1} , valor ligeramente superior al obtenido a partir del inverso de la constante de tiempo del sistema ($1/\tau_s = 22.9 \text{ h}^{-1}$). Tal similitud entre estimaciones se presentó por igual en el resto de las configuraciones (tabla 5.2). De hecho, la mayor diferencia se presentó en el sistema 5-ST con tan solo un 16.6% de diferencia ($12.6 \text{ vs } 10.8 \text{ h}^{-1}$), por lo que el método de evaluación, en este caso particular, no repercutió significativamente sobre el valor calculado.

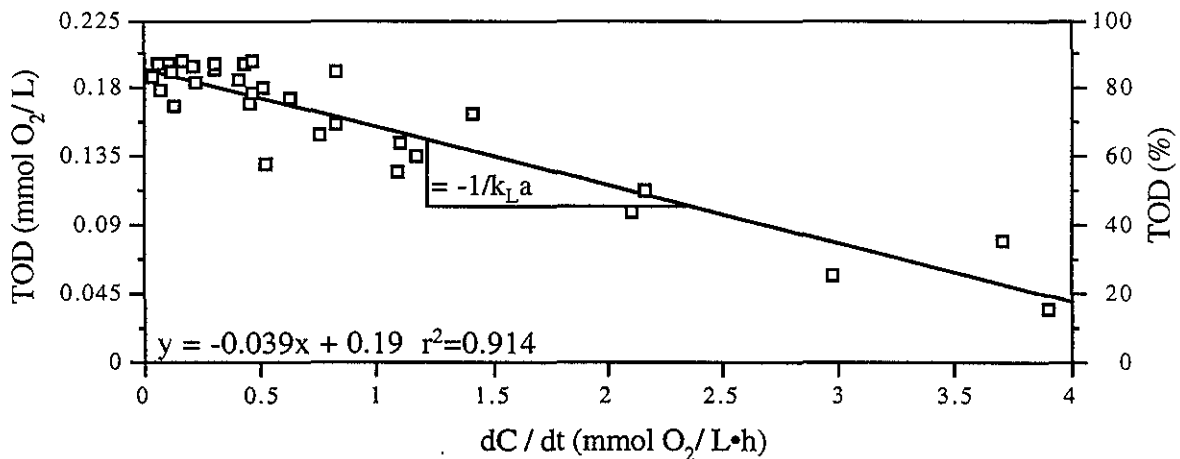


Figura 5.8- Determinación dinámica del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La) empleando la configuración Anillo-SFM.

5.2.4 Efecto de las configuraciones empleadas sobre los parámetros dinámicos y de control del proceso

Dado que las características físicas y de operación de los sistemas de primer orden rigen la dinámica de los procesos, la VRS, y en consecuencia la ganancia, dependerán a su vez de las propiedades intrínsecas del sistema. Esto se observa claramente en la tabla 5.2, donde se resumen los resultados de los tres sistemas estudiados. Es importante mencionar, para efectos

comparativos entre configuraciones, que las evaluaciones reportadas en dicha tabla se realizaron al inicio de la etapa exponencial de crecimiento, en un periodo que comprendió entre las 28 y 36 h de cultivo, tratando así de evaluar los parámetros en cuestión bajo condiciones fisiológicas y de biomasa similares.

De acuerdo a los resultados, la configuración 5-ST presentó los valores de k_{La} y VRS más bajos de los tres sistemas evaluados (tabla 5.2). Por un lado, la dispersión de aire se vió desfavorecida debido al gran tamaño de burbuja (figura 5.9a) y a la pobre recirculación del gas en el sistema, originando que las burbujas ascendieran de manera casi inmediata. Este fenómeno ocasionó la formación de burbujas coalescentes y de corto tiempo de residencia (disminuyendo el área interfacial de contacto y el “hold-up”), provocando así la pobre capacidad de transferencia de oxígeno reportada (12.6 h^{-1}). Asimismo, los patrones de flujo generados por el sistema de turbinas (ST) probablemente redujeron la interacción entre las diversas fases del medio, ya que la recirculación de éstas, y el macromezclado en general, se vió desfavorecido (figura 5.10a).

El empleo de la configuración Anillo-SFM provocó una importante mejoría en el k_{La} y en la VRS, ya que prácticamente duplicó ambos valores respecto al sistema 5-ST (tabla 5.2). Dicho incremento se debió al sistema de dispersión empleado (turbina Rushton- hélice marina) y al tamaño y distribución de las burbujas generadas. Por un lado, el tamaño de burbuja se redujo (figura 5.9b), incrementando el área interfacial de contacto gas-líquido y por consiguiente el k_{La} ($25.6 \text{ vs } 12.6 \text{ h}^{-1}$). Por otro lado, Oldshue (1983) y Nienow (1990b) señalan que, aparte del área interfacial gas-líquido, otros factores influyen sobre el k_{La} y la VRS, tales como la intensidad de agitación, el tamaño y geometría de los impulsores (estos últimos englobados en la potencia volumétrica) y la hidrodinámica (patrones de flujo). Así, la configuración de impulsores que genere la mayor potencia volumétrica (P/V) incrementara ambos parámetros del proceso. Sin embargo, este no fue el caso en el presente estudio, ya que la P/V calculada para las condiciones iniciales del cultivo (sección 4.2.4) fueron aproximadamente de 0.07 y 0.09 W/L para el SFM y ST, respectivamente. Esto sugiere que, en sistemas tan complejos y heterogéneos como el presente, el macromezclado (producto de la acción del bombeo de los impulsores) tiene una mayor repercusión sobre el k_{La} y la VRS que el micromezclado (zona bien mezclada cerca de los impulsores); observación similar a la expuesta por Buckland *et al.* (1988) y Nienow (1990b) en cultivos filamentosos empleando diversas configuraciones (axiales y radiales) de impulsores. De acuerdo a lo anterior, se presume que la combinación entre impulsores, a través de favorecer el macromezclado (figura 5.10b) y mejorar la recirculación de las burbujas en el medio, al igual que el aumento en el área dispersa del gas (tamaño y posicionamiento de los orificios a lo largo del anillo; 5.9b) son los responsables de la mejoría observada en la tabla 5.2.

Los mejores resultados, en cuanto a transferencia de oxígeno se refiere, se obtuvieron con la configuración Sinterizado-SFM. Esto se debió al difusor sinterizado empleado (único parámetro manipulado en relación al sistema Anillo-SFM), el cual, a través de la generación de una gran cantidad de pequeñas burbujas (figura 5.9c), provocó un notable aumento en el área interfacial gas-líquido. Este incremento se reflejó sobre los valores de k_{La} y VRS estimados (tabla 5.2), los cuales a su vez redujeron la ganancia (0.6), corroborando la eficiencia del sistema para transferir oxígeno. Sin embargo, se observó una ligera separación entre la fase orgánica (aceite de ricino) y la fase acuosa, aún empleando el sistema de flujo mixto (figura 5.10c).

Los resultados anteriores reflejan claramente la superioridad de la configuración Sinterizado-SFM sobre los otros dos evaluados, por lo que este sistema puede considerarse como el mejor disponible en cuanto a transferencia de oxígeno se refiere.

Por otro lado, las constantes integral y diferencial (τ_i y τ_d) de las tres configuraciones evaluadas fueron similares debido a que el T_d de los tres sistemas fue prácticamente el mismo (varió entre 54 y 66 s). Tal similitud se debió a que se utilizó la misma infraestructura (controladores de flujo másico, electrodos, tubería, cámaras de humidificación y mezclado, etc.) en todas las evaluaciones.

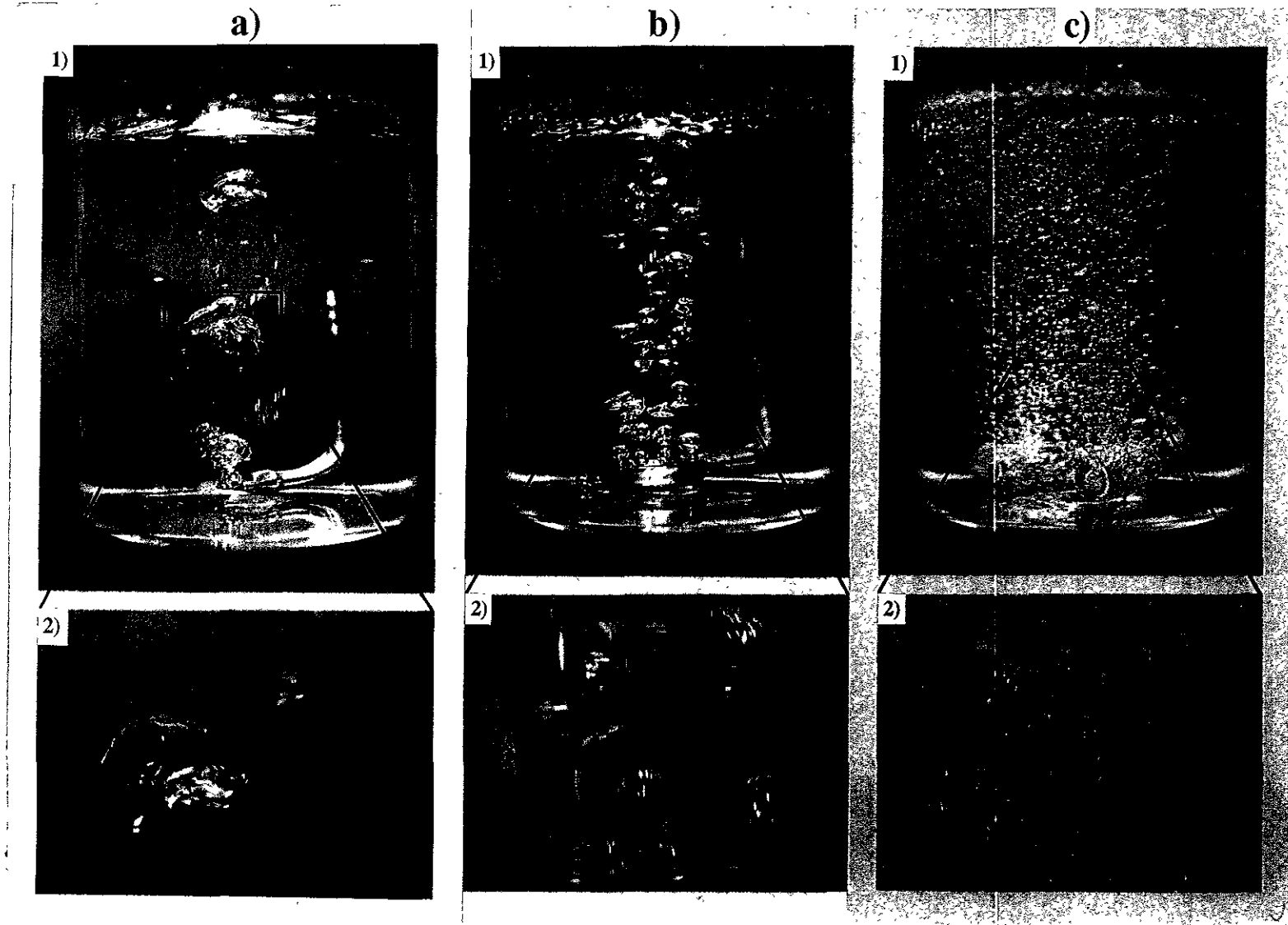


Figura 5.9- Tamaño típico de las burbujas de gas en agua (sin agitación) empleando el difusor: a) 5 Orificios; b) Anillo; c) Sinterizado: 1) Vista general; 2) Acercamiento. Esta figura pretende ilustrar las diferencias en el tamaño de las burbujas como una función del tipo de difusor empleado y no necesariamente representa el tamaño de éstas a las condiciones reales del cultivo (sistema aireado y agitado).

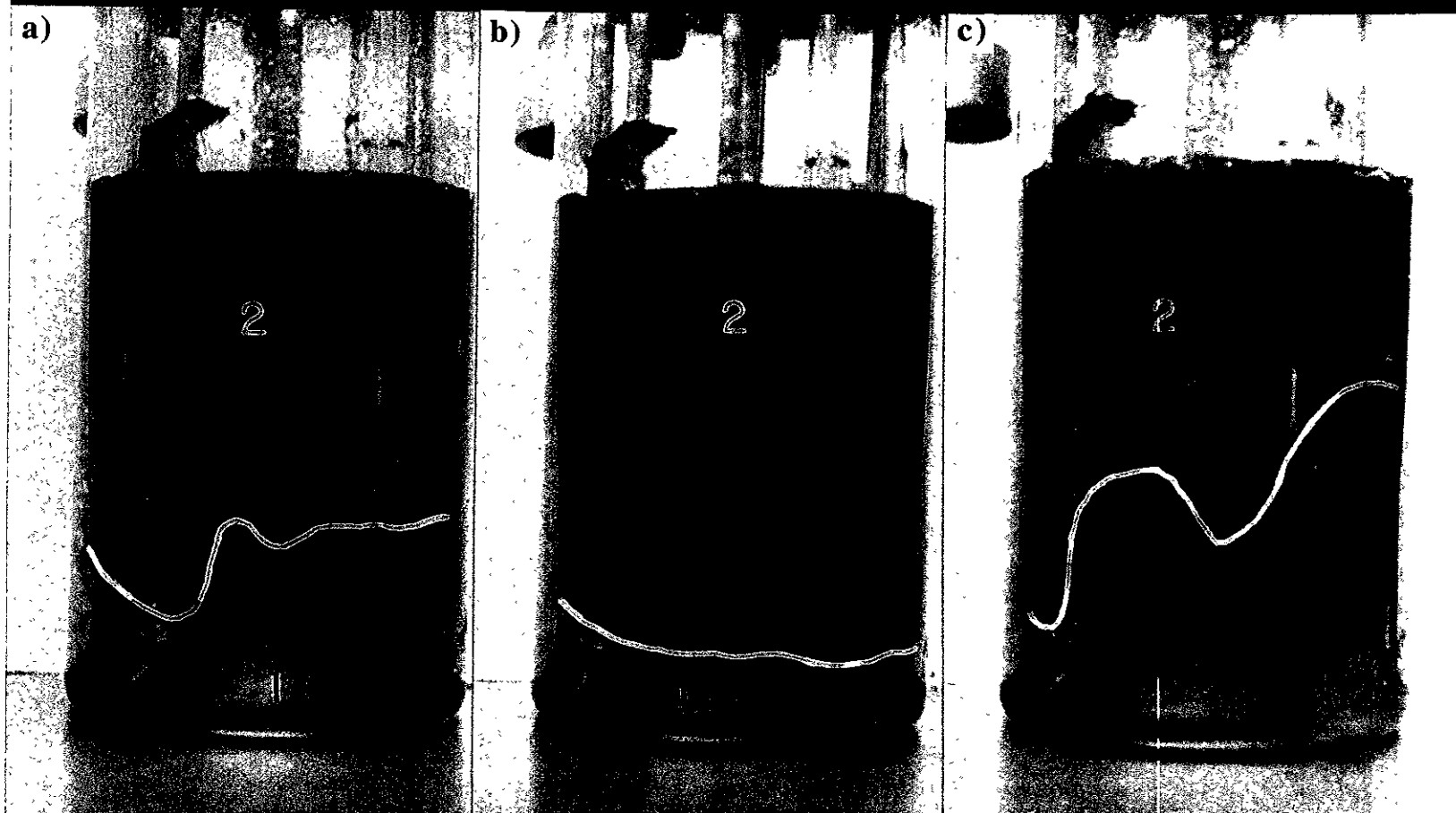


Figura 5.10- Interacción entre fases en un sistema trifásico “aire-medio-aceite” (fase orgánica teñida con azul Sudan) empleando la configuración: a) 5-ST; b) Anillo-SFM; c) Sinterizado-SFM: 1) Zona de pobre interacción medio-aceite; 2) Zona de buena interacción medio-aceite.

5.3 Desempeño de las tres configuraciones en cultivos tetrafásicos a TOD constante

Para evaluar el efecto individual de los parámetros de diseño manipulados (configuración de difusores e impulsores) sobre las cinéticas de crecimiento, se realizaron fermentaciones a TOD constante. A pesar de que esta estrategia de control ha sido ampliamente utilizada en sistemas bacterianos (Lee *et al*; 1991; Sargantanis y Karim, 1996), pocos trabajos han sido reportados en hongos filamentosos debido a sus cambiantes propiedades reológicas (producto de la compleja morfología desarrollada), originando fuertes fluctuaciones de oxígeno en el medio. Además de la problemática que esto implica, es importante recordar que la complejidad del sistema se incrementa al emplear aceite de ricino como fuente de carbono, por lo que el control del proceso es difícil y la presencia de ciertas fluctuaciones en el control de la TOD es inevitable. Para evitar posibles limitaciones de oxígeno debido a estas fluctuaciones, se aplicó un “setpoint” constante de 10% TOD en todas las fermentaciones realizadas, tratando así de mantener la TOD muy por encima de la C_{crit} (4% TOD).

5.3.1 Respuesta microbiana y de control al emplear la configuración 5-ST

La figura 5.11 muestra la cinética de crecimiento y la velocidad de producción de CO_2 ($VPCO_2$), así como el control de la TOD durante el cultivo al emplear el sistema 5-ST. El tiempo total de fermentación fue de 86 h, ya que después de este tiempo la limitación por oxígeno fue evidente (figura 5.11b). El cultivo muestra inicialmente la presencia de una fase “lag” (0- 36 h) y posteriormente una etapa de crecimiento (36- 86 h), en la cual se alcanzó una concentración máxima de biomasa de 11.4 g/L a las 86 h de cultivo. Por otro lado, la evolución de la $VPCO_2$ correlacionó bien con la concentración de biomasa, generando un valor de 4.5 mmol $CO_2/L \cdot h$ al final de la fermentación (figura 5.11a).

Esta configuración generó el peor control de los tres sistemas evaluados (desviación estándar más alta respecto al “set point” deseado) ya que en ciertas etapas del cultivo, la TOD mostró una gran desviación respecto al “setpoint”, producto de fuertes fluctuaciones (“picos” desde 1% hasta 65% TOD), mientras que en otras (38- 60 h), el control fue muy bueno (figura 5.11b). Esta observación coincide con diversos trabajos (Lee *et al*; 1991; Sargantanis y Karim, 1996), en los cuales se demostró que el valor idóneo de las constantes de control dependen de la etapa de crecimiento en que se encuentra el cultivo (especialmente entre la fase “lag” y exponencial). Así, los autores reportan fuertes oscilaciones en el control de la TOD ante cambios en la concentración celular o en el consumo de oxígeno.

5.3.2 Respuesta microbiana y de control al emplear la configuración Anillo-SFM

La figura 5.12 muestra la evolución de biomasa, la $VPCO_2$ y el control de la TOD durante la fermentación que emplea la configuración Anillo-SFM. Se observa que, tanto la cinética de crecimiento, como la $VPCO_2$ presentaron un comportamiento similar al cultivo anterior (5-ST), alcanzando una $VPCO_2$ de $3.6 \text{ mmol CO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$ al final de la fermentación y una concentración máxima de biomasa de 9.6 g/L (figura 5.12a). Sin embargo, la duración de la fase "lag", al igual que el tiempo de cultivo durante el cual se controló la TOD fue menor. Las causas de esta reducción se discutirán con detalle en la siguiente sección.

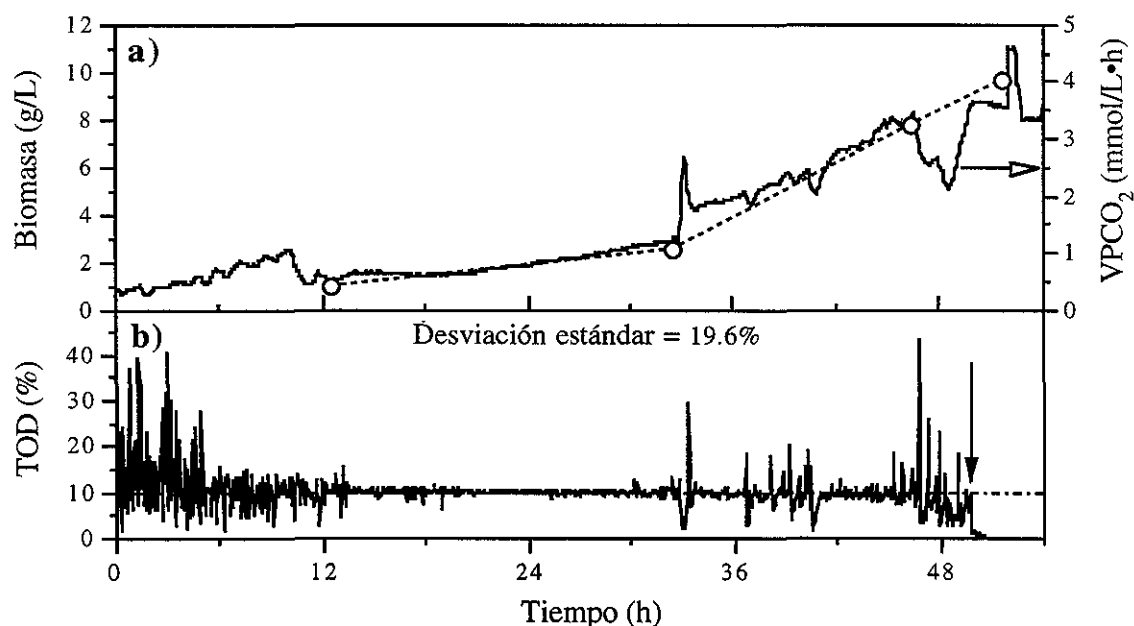


Figura 5.12- Desempeño de la configuración Anillo-SFM a una TOD constante (10%) en cultivos de *Trichoderma harzianum*: a) Evolución de la biomasa y de la velocidad de producción de CO_2 ($VPCO_2$); b) Control de la TOD durante el cultivo (la flecha negra indica la disminución de la TOD debido a la incapacidad del sistema para satisfacer la demanda de oxígeno).

Por otro lado, el control de la TOD fue bueno en general (la desviación estándar refleja que la TOD permaneció cerca del "setpoint") debido al macromezclado generado por el SFM, así como a la buena transferencia de oxígeno del sistema respecto al 5-ST; las cuales influyeron para que las constantes de control utilizadas mantuvieran un buen control de la TOD durante gran parte del proceso. De hecho, solo dos pequeños periodos de oscilaciones, en relación a la configuración anterior, fueron observados. El primero (0- 12 h) se debió al tiempo de estabilización requerido por el sistema y el segundo (33- 46 h) a perturbaciones externas (muestreo) y/o a variaciones en los patrones de flujo (resultado del crecimiento del hongo). La figura 5.12b corrobora lo

anterior, ya que las mayores fluctuaciones (“picos” superiores a 25% TOD) corresponden con el muestreo (círculos en la figura 5.12a), mientras que las restantes oscilaciones se presentaron durante el crecimiento celular (observado como un incremento en la evolución de biomasa y de la $VPCO_2$). Dado lo anterior, es evidente que este sistema mantuvo la TOD del proceso por encima de la C_{crit} del microorganismo.

5.3.3 Respuesta microbiana y de control al emplear la configuración Sinterizado-SFM

El mejor control (desviación estándar de solo 7.9 %) así como el menor tiempo de estabilización fue obtenido con el sistema Sinterizado-SFM (figura 5.13), producto de su alta capacidad de transferencia de oxígeno. El control exhibido refleja la eficiencia del sistema para mantener las condiciones del proceso relativamente homogéneas a lo largo de la fermentación.

Sin embargo, a pesar del buen control de la TOD, la fermentación en la que se empleó éste sistema generó la menor concentración de biomasa (6 g/L) de las tres configuraciones evaluadas. Después de la 64 h de cultivo, el hongo cesó de crecer posiblemente como consecuencia de algún tipo de limitación. Por un lado, la posibilidad de una limitación por oxígeno puede ser descartada, ya que la TOD en el medio se mantuvo constante y por encima de la C_{crit} . Por otro lado, el diminuto tamaño de burbujá (generado por el difusor sinterizado) provocó la separación entre el sustrato orgánico y la fase acuosa, aún cuando se utilizó el SFM. Esta separación entre fases favoreció la formación de una emulsión aire-aceite en la superficie del caldo (figura 5.14), ocasionando una pobre interacción entre la fase sólida y líquida (hongo-aceite) del medio. Así, es probable que el hongo detuviera su crecimiento debido a una limitación por sustrato carbonado.

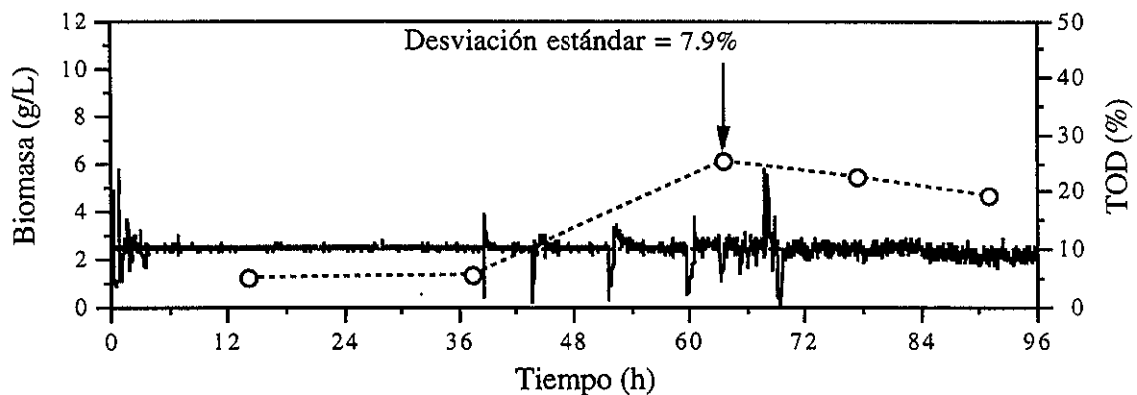


Figura 5.13- Desempeño de la configuración Sinterizado-SFM a una TOD constante (10%) en cultivos de *Trichoderma harzianum*: Evolución de la biomasa y control de la TOD durante el cultivo (la flecha indica el cese en el crecimiento del hongo debido probablemente a una limitación por sustrato carbonado).

Esta separación entre fases ha sido observada por varios autores en sistemas, aire-agua-aceite (Armenante y Abu-Hakmeh, 1994) y recientemente en aire-micelio-medio-aceite (Galindo *et al.*; 1999). En este sentido, Galindo *et al.* (1999) utilizando un sistema tetrafásico complejo en un biorreactor de 2 L, equipado con una turbina Rushton ($D/T = 0.5$) y un difusor sinterizado (0.25 vvm), operado a 250 rpm, señala que una porción significativa del gas alimentado se incorpora a la fase orgánica. El autor, empleando una técnica microscópica de video, observó la presencia de múltiples burbujas de gas dentro del aceite, y sugiere que este fenómeno se originó a partir de las gotas de aceite, las cuales rodearon y posteriormente englobaron las burbujas de aire, “atrapándolas” finalmente en su interior (figura 5.15). La incorporación del aire en las gotas de aceite ocasionó, al detener la aireación y agitación, que éstas ascendieran más rápido a la superficie (debido a la disminución en la densidad de éstas), confirmando la incorporación del gas en el aceite. Esta observación se presentó por igual en un sistema trifásico “aire-medio-aceite”, en el cual se excluyó el micelio.

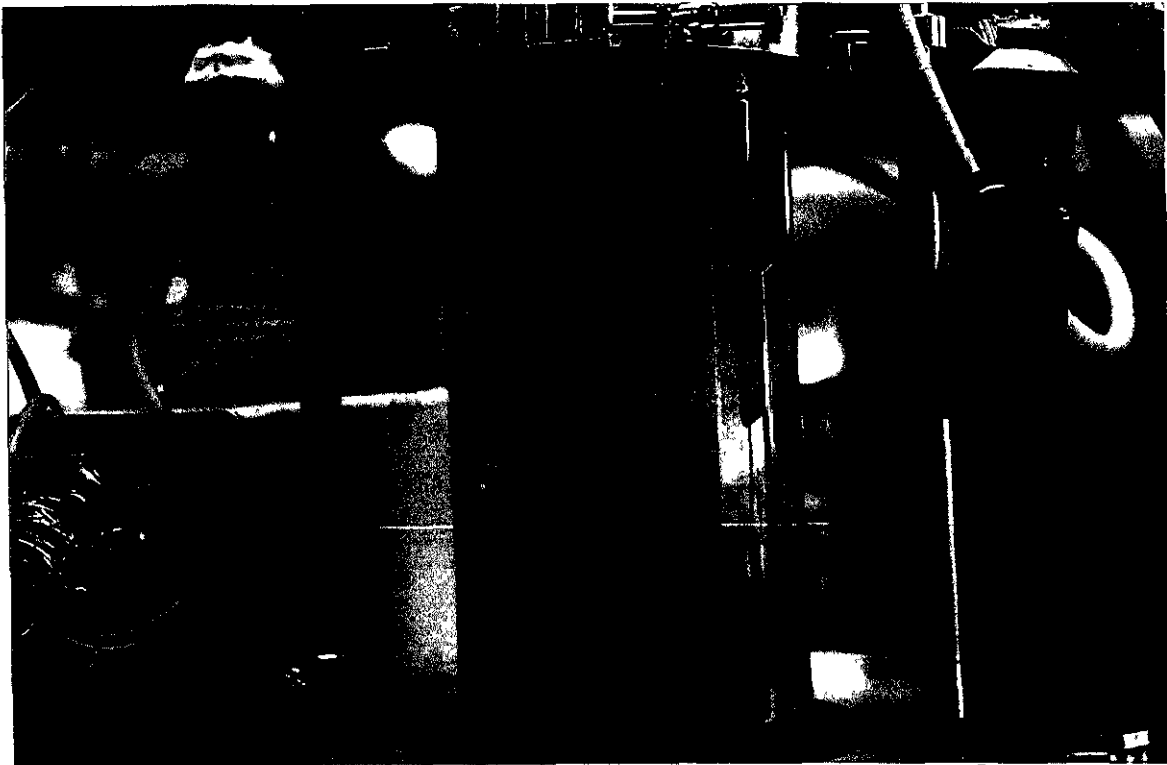


Figura 5.14- Separación de fases (aceite-medio) durante el cultivo empleando la configuración Sinterizado-SFM.

Es importante señalar que la aireación utilizada en el presente estudio fue mayor (1 vvm) a la utilizada por Galindo *et al.* (0.25 vvm). Así, la probabilidad de que las burbujas de gas se incorporen al aceite será mayor, favoreciendo la formación de la emulsión aire-aceite en la superficie del caldo (separación de fases); y en consecuencia, incrementando la posibilidad de una limitación por sustrato carbonado.

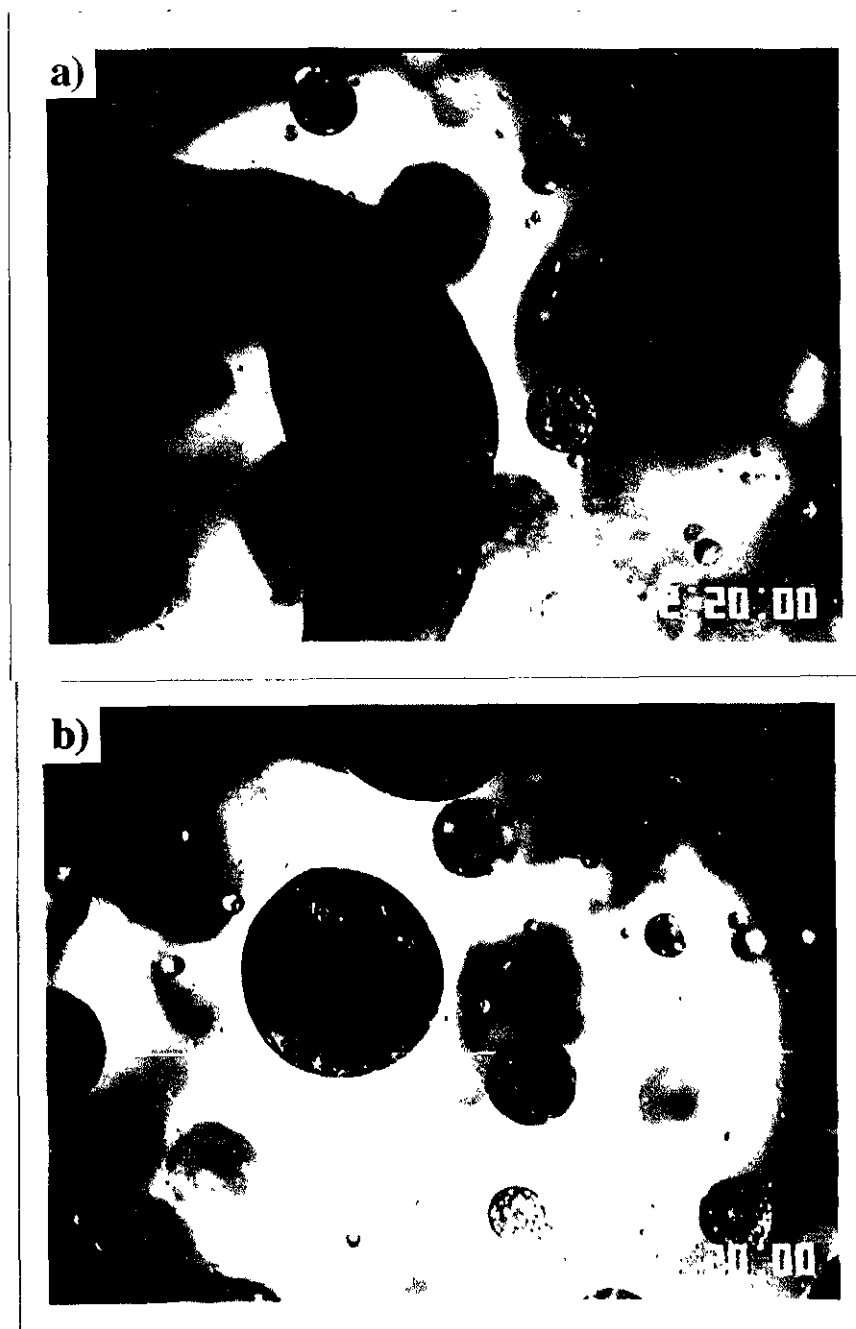


Figura 5.15- Interacción gas-líquido en un sistema trifásico “aire-medio-aceite” empleando un difusor sinterizado (Galindo *et al.*; 1999): a) Incorporación de las burbujas de gas al aceite de ricino; b) Burbujas de gas “atrapadas” dentro de las gotas de aceite.

5.3.4 Efecto de la hidrodinámica sobre el crecimiento del hongo

Las características de mezclado pueden ser correlacionadas con diversos parámetros tales como, tiempo de circulación (t_c), tiempo de mezclado (t_m) y número de Reynolds (Re). El t_m se define como el tiempo necesario para alcanzar un cierto grado de homogeneidad en el medio ante alguna perturbación; mientras que el t_c es un parámetro que proporciona información sobre la frecuencia con que pasa una partícula discreta a través de una región determinada dentro del biorreactor. De esta manera, mientras más pequeño sea el valor de t_c , más rápida será la circulación del organismo y de los diversos nutrientes (sustrato, oxígeno, sales, etc.) en el medio, generando tiempos de mezclado menores (t_m es proporcional al t_c ; Nienow 1990b). Recientemente, Singh *et al.* (1986) demostraron que el t_m en tanques agitados menores a 1 m³ de volumen depende del Re (la turbulencia imperante en el sistema rige los tiempos de mezclado y de circulación) y este a su vez de las características del sistema de flujo (agitación) y del medio de cultivo (viscosidad).

Dado la anterior y considerando lo reportado por Ison y Lilly (1996), el paso limitante en estos cultivos reside en la separación inicial de fases entre el aceite y el hongo, es lógico suponer que el crecimiento del microorganismo será afectado por la configuración empleada. Así, el sistema que genere el menor t_c y/o t_m favorecerá el crecimiento del hongo. En este sentido, el t_c y el Re de las dos configuraciones de impulsores utilizadas (SFM y ST) fueron evaluadas asumiendo las condiciones iniciales del cultivo (densidad y viscosidad del agua; sección 4.2.4). El t_c calculado para el SFM fue menor en relación al ST (2.5 vs 3.2 s), debido probablemente a los patrones de flujo, axial y radial, generados. Además, el Re calculado (11,000 y 8,000 para el SFM y ST respectivamente) corrobora que la turbulencia, y por lo tanto la interacción entre fases, será mejor al utilizar el SFM; lo cual es trascendental hacia el final del cultivo, etapa donde los t_c y t_m aumentan debido a la reducción en el Re (producto del incremento en la viscosidad del medio). No obstante, es importante recordar que dichas estimaciones serán válidas únicamente al inicio del cultivo, etapa donde las condiciones del medio son similares a las del agua. La figura 5.16 muestra el efecto de la configuración de difusores e impulsores sobre las cinéticas de crecimiento a 10% TOD, así como las velocidades de crecimiento ($g/L \cdot h$) del hongo.

La fermentación en donde se empleó la configuración Sinterizado-SFM presentó la menor concentración de biomasa (6 g/L). Sin embargo, antes del cese (64 h), se observó una cinética de crecimiento muy similar a la que presentó el sistema 5-ST. De hecho, la fase “lag” y la velocidad de crecimiento de ambas configuraciones fueron prácticamente las mismas (36 h y 0.19 ± 0.02 g/L·h respectivamente), lo que corrobora que no existieron cambios significativos en la cinética del cultivo antes de esta limitación (figura 5.16).

La configuración 5-ST originó fuertes fluctuaciones y un mal control de la TOD en el medio debido, principalmente, al flujo radial generado a partir de las turbinas Rushton empleadas. La pobre interacción entre fases, además de afectar el control de la TOD, influyó notablemente sobre el periodo “lag” observado (figura 5.16), ya que los sistemas que exhibieron ciertos problemas de heterogeneidad al inicio del cultivo (5-ST y Sinterizado-SFM) presentaron una prolongada fase “lag” (alrededor de 36h). Una vez transcurrida esta fase, el crecimiento micelial fue considerable, alcanzando una concentración máxima de biomasa de 11.4 g/L y una velocidad de crecimiento de 0.21 g/L·h.

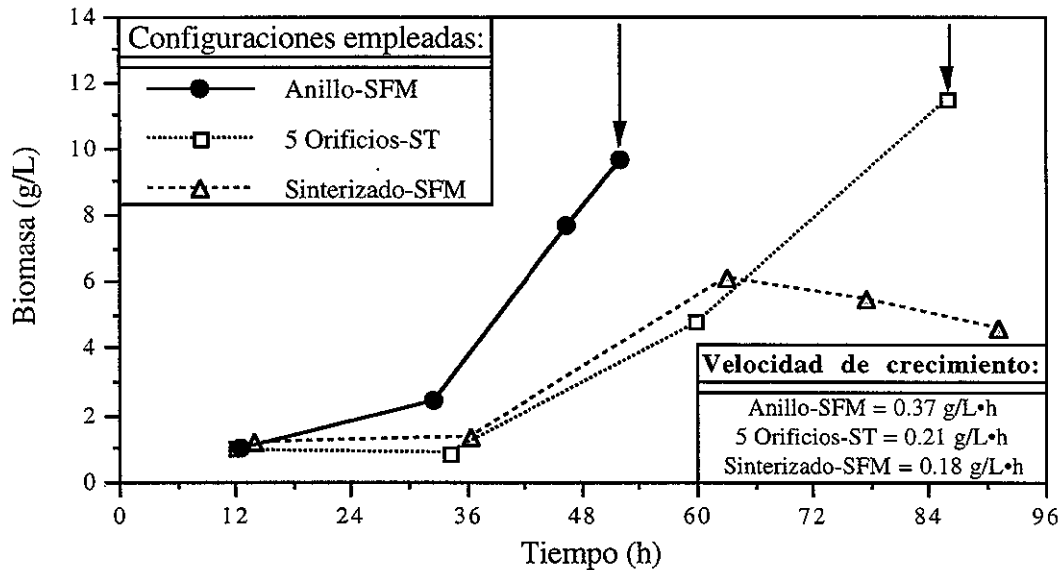


Figura 5.16- Cinética y velocidad de crecimiento en relación a la configuración en cultivos tetrafásicos de *Trichoderma harzianum* (las flechas indican la disminución de la TOD debido a la incapacidad del sistema para satisfacer la demanda de oxígeno).

Por otra parte, la configuración Anillo-SFM generó los mejores resultados (con respecto al resto de los sistemas evaluados), ya que la velocidad de crecimiento prácticamente se duplicó (0.37 vs 0.19 ± 0.02 g/L·h) mientras que el periodo “lag” se redujo notablemente (figura 5.16). Estos resultados fueron seguramente producto del compromiso entre el área interfacial generada (tamaño y dispersión de las burbujas) y del buen mezclado entre las diversas fases del medio (figura 5.17). Por un lado, el sistema de flujo mixto, además de favorecer la homogeneidad, mejoró la recirculación del caldo en el biorreactor, lo cual es de vital importancia al inicio del cultivo, ya que la mayoría del gas alimentado, al no ser consumido por la baja concentración de biomasa inicial interacciona y/o se incorpora preferencialmente con el aceite. Esto último puede llegar a provocar ciertas limitaciones por falta de sustrato carbonado en el medio debido a que la dispersión aire-aceite es favorecida sobre la sólido-líquido (hongo-aceite). De igual manera, es probable que la mejor interacción entre fases (especialmente la sólido-líquido) haya originado

una reducción en la fase “lag”, ya que la homogeneidad imperante favoreció la síntesis de lipasas así como su acción hidrolítica (ambas dependen del contacto entre fases; Ison y Lilly, 1996). Así, tanto la hidrólisis y subsecuente degradación del aceite, como la disponibilidad de los ácidos grasos libres fue mejorada, facilitando su consumo y acelerando la velocidad de crecimiento del micelio. Por otro lado, la transferencia de oxígeno generada fue suficiente para satisfacer los requerimientos del micelio, incluso hacia el final de la fermentación (la TOD se mantuvo por encima de la C_{crit}), etapa donde el consumo de oxígeno es mayor y donde la interacción aire-medio-hongo cobra mayor importancia debido a las múltiples limitaciones de transferencia inherentes a la formación de zonas “muertas” y a la compleja reología desarrollada.

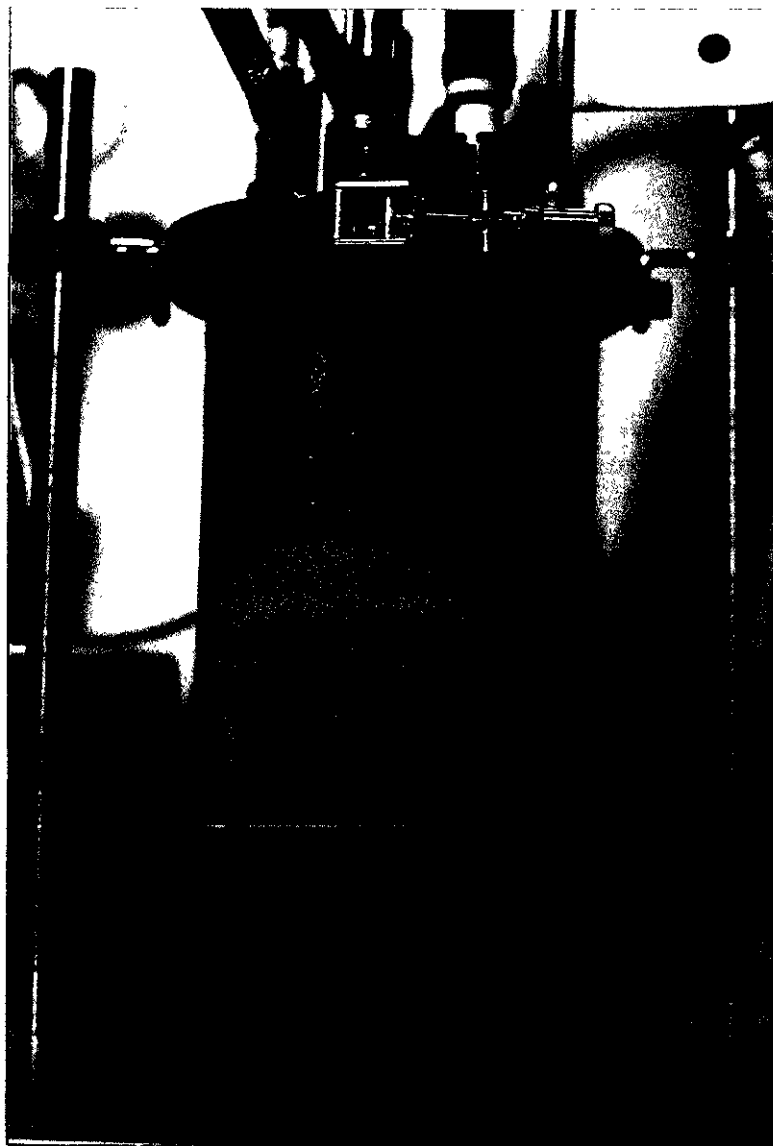


Figura 5.17- Interacción entre fases a las 36 h del cultivo tetrafásico de *Trichoderma harzianum* empleando la configuración Anillo-SFM.

Los resultados señalan que las velocidades de crecimiento observadas pueden ser asociadas con la capacidad de la configuración para promover la interacción entre fases (mezclado). La figura 5.16 ilustra lo antes expuesto, ya que la máxima velocidad de crecimiento ($0.37 \text{ g/L}\cdot\text{h}$) fue obtenida con el sistema Anillo-SFM, mientras que las velocidades del resto de las configuraciones fueron substancialmente inferiores, además de ser prácticamente las mismas ($0.19 \pm 0.02 \text{ g/L}\cdot\text{h}$).

Por otro lado, los efectos observados en el crecimiento del hongo serán validos solo mientras los requerimientos de oxígeno en el cultivo sean cubiertos (TOD por encima de la C_{crit}). Para lograr esto, el sistema de control, a través del algoritmo de control, incrementa gradualmente la presión parcial del oxígeno en la mezcla de gases alimentada (sección 4.1.4.3), hasta llegar a un punto donde ésta no será suficiente para satisfacer los requerimientos del microorganismo (aún suministrando oxígeno puro). Lo anterior sugiere que la limitación por oxígeno sucederá primero en aquellos cultivos que generen la mayor concentración de biomasa (la demanda de oxígeno se incrementa). Sin embargo, este no fue el caso en el presente trabajo (figura 5.16), ya que la TOD disminuyó primero al emplear la configuración Anillo-SFM, a pesar de generar una menor concentración celular (9.6 g/L) que la fermentación que utilizó el sistema 5-ST (11.4 g/L). Esta limitación sugiere que el consumo de oxígeno de este último fue menor; o bien, que el $k_L a$ en el primer proceso (configuración Anillo-SFM) se redujo notablemente durante la fermentación. La primera suposición (menor consumo de oxígeno) es poco probable, ya que ambos cultivos se encontraban en plena fase exponencial (etapa donde el consumo de oxígeno es relativamente constante). Además, la producción específica de CO_2 (evaluada a partir de la VPCO_2 y de la concentración de biomasa; figura 5.18) fue similar en ambos casos (aproximadamente de $0.37 \text{ mmol CO}_2/\text{g}\cdot\text{h}$), indicando el mismo estado metabólico del micelio.

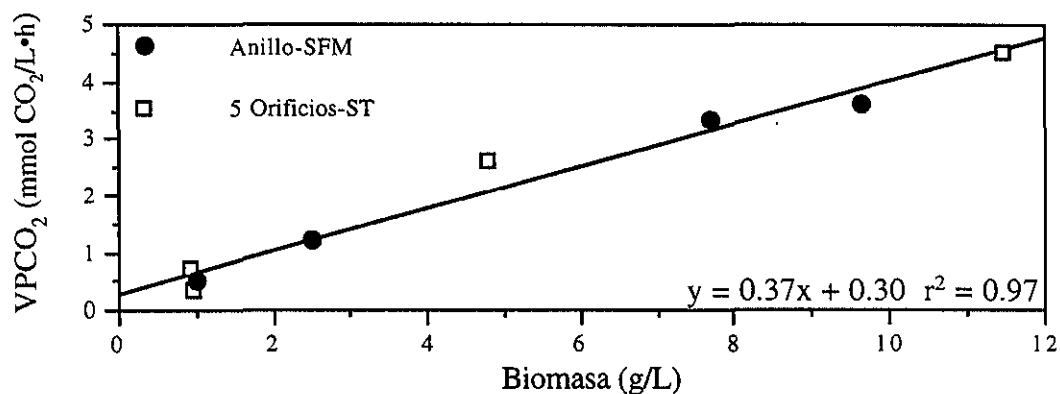


Figura 5.18- Evaluación de la producción específica de CO_2 en cultivos tetrafásicos de *Trichoderma harzianum*.

Diversos trabajos señalan que los sistemas de alto estrés hidrodinámico (sistema de turbinas) regularmente ocasionan rompimiento y/o daño celular en las hifas; mientras que los ambientes de bajo estrés, como los generados por los sistemas axiales, originan hifas largas y ramificadas (Jüsten *et al*; 1996). Esto último favorece el entrelazamiento e interacción hifa-hifa, lo cual a su vez genera un notable aumento en la viscosidad de los caldos (Olsvik *et al*; 1993). Asimismo, el aumento en la viscosidad favorece el “acanalamiento” del aire a través del biorreactor (Vardar-Sukan, 1985), además de ocasionar un aumento en el tamaño de las burbujas generadas (disminuyendo el área interfacial gas-líquido y el “hold-up”), reduciendo notablemente el $k_L a$ en el sistema. Es probable que un efecto similar al descrito se haya presentado durante el cultivo con la configuración Anillo-SFM, ya que la formación de zonas “muertas” (figura 5.19) fue mayor en relación al resto de las fermentaciones, lo cual podría explicar la prematura disminución de la TOD en el cultivo:

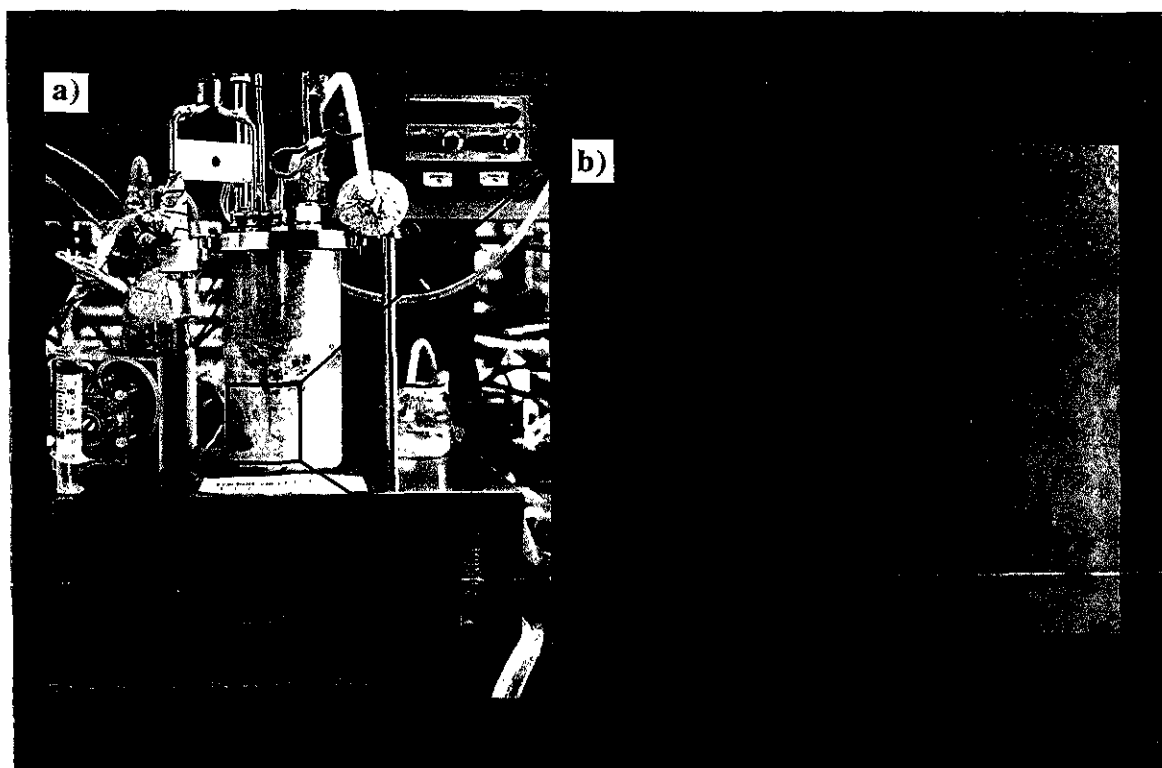


Figura 5.19- Formación de zonas “muertas” al final del cultivo tetrafásico (52 h) de *Trichoderma harzianum* empleando la configuración Anillo-SFM: a) Vista general; b) Acercamiento.

5.4 Desempeño de las configuraciones estudiadas en cultivos tetrafásicos

Recientemente, Godoy-Silva *et al.* (1997) evaluaron el efecto de diversas configuraciones de impulsores-difusores a potencias volumétricas similares (alrededor de 0.056 W/L) sobre el crecimiento y productividad en cultivos tetrafásicos de *T. harzianum*, utilizando biorreactores de 10 L y aceite de ricino como fuente única de carbono. Los autores emplearon tres diferentes sistemas, tratando así de abarcar un amplio rango de condiciones hidrodinámicas (patrones de flujo, estrés mecánico, etc.) en el medio como son, alto estrés hidrodinámico (turbinas Rushton y un difusor de orificio o punto), mezclado de contraflujo (impulsores InterMIG y un difusor de punto) y bajo estrés mecánico combinado con una alta capacidad de transferencia de oxígeno (impulsor helicoidal y difusor sinterizado).

La figura 5.20 muestra las cinéticas de crecimiento (a) y el seguimiento de la TOD (b) durante los cultivos empleando los sistemas de alto y bajo estrés hidrodinámico. El primero consta de tres turbinas Rushton y un difusor de punto (73.2 y 1 mm de diámetro respectivamente), mientras que el segundo contiene 4 cilindros sinterizados (diámetro de poro de *ca.* 20 μm) como difusor y un impulsor helicoidal (190 mm). Los cilindros sinterizados se utilizaron para incrementar el $k_L a$ en el medio, ya que el rompimiento de las burbujas de gas en estos sistemas es generalmente inadecuado debido a los bajos gradientes de deformación generados, así como a las bajas velocidades de agitación aplicadas (producto del elevado número de potencia del impulsor). Además, se incluyen las cinéticas de crecimiento y de TOD de las configuraciones Anillo-SFM y 5-ST del presente trabajo.

Se observa que, tanto el periodo “lag” como las velocidades de crecimiento, y por consecuencia la evolución de la biomasa, reportados por Godoy-Silva *et al.* (1997) durante las primeras 72 h (periodo en donde la TOD del cultivo se mantuvo por encima de la C_{crit}) fueron similares a la de la fermentación empleando la configuración 5-ST. Esta similitud se refleja en las velocidades de crecimiento estimadas, las cuales fueron de 0.14, 0.17 y 0.21 g/L·h para los sistemas Punto-Rushton, Sinterizado-Helicoidal y 5-ST, respectivamente (figura 5.20a). Lo anterior señala que las configuraciones utilizadas por Godoy-Silva *et al.* (1997) probablemente exhibieron, al igual que el sistema 5-ST, ciertos problemas de heterogeneidad al inicio (fase “lag”) y durante la etapa de crecimiento, lo cual pudo ser debido al sustrato orgánico utilizado, al crecimiento filamentoso y/o al aumento en la escala de trabajo (10 L).

Por otro lado, la morfología que presentó el hongo al utilizar la configuración Sinterizado-Helicoidal fue de *pellets*, misma que fue atribuida a las condiciones de bajo estrés mecánico al que fue sometido. De acuerdo a la figura 5.20, la fermentación muestra inicialmente una fase “lag” seguida de una etapa de crecimiento, en la cual se alcanzó una concentración máxima de biomasa de 11.0 g/L a las 97 h de cultivo. Sin embargo, a pesar de que la TOD en el medio de cultivo se mantuvo siempre por encima de la C_{crit} (4%), la concentración de biomasa disminuyó drásticamente después de la 97 h (datos no presentados) debido, probablemente, a problemas de tipo difusional hacia dentro del *pellet* (oxígeno y/o fuente de carbono).

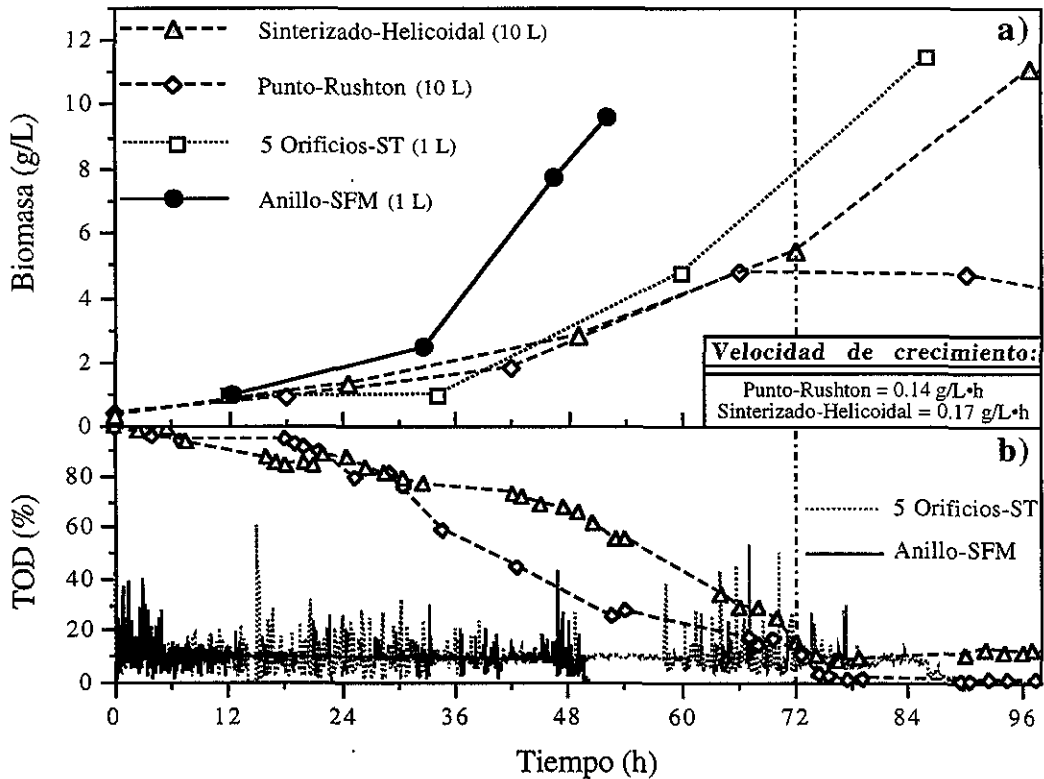


Figura 5.20- Cinéticas de crecimiento (a) y de TOD (b) en cultivos tetrafásicos de *Trichoderma harzianum* en biorreactores de 1 L (este trabajo) y 10 L (Godoy-Silva *et al.*, 1997).

Por su parte, el sistema Anillo-SFM redujo notablemente el periodo “lag” y además duplicó la velocidad de crecimiento (0.37 g/L·h) en relación al resto de las configuraciones utilizadas, tanto en biorreactores de 1 L como de 10 L (figura 5.20). Dado lo anterior, se presume que, en cultivos tetrafásicos no limitados por oxígeno, la configuración impulsor-difusor, a través de mejorar el macromezclado (interacción entre fases) y de reducir la formación de la emulsión aire-aceite, afecta el crecimiento de *T. harzianum* debido probablemente a una mayor disponibilidad (homogeneidad) del sustrato carbonado en el medio de cultivo.

Capítulo VI

Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- La concentración crítica de oxígeno (C_{crit}) en cultivos tetrafásicos de *Trichoderma harzianum* fue de aproximadamente 4% TOD.
- *Trichoderma harzianum* permanece viable (es capaz de crecer y reproducirse) aún después de ser expuesto a bajas concentraciones de oxígeno disuelto (1%) durante un periodo de 48 h.
- La demanda específica de oxígeno máxima ($Q_{O_2 max}$) y la producción específica de CO_2 , estimadas durante los cultivos fueron de 0.9 mmol $O_2/g \cdot h$ y 0.37 mmol $CO_2/g \cdot h$.
- Las tres configuraciones evaluadas exhibieron un comportamiento de primer orden para la transferencia de oxígeno.
- El área interfacial gas-líquido (tamaño de burbuja), producto del diámetro de orificio del difusor, modificó la homogeneidad en los cultivos tetrafásicos a través de favorecer o limitar la formación de la emulsión aire-aceite.
- El sistema de flujo mixto (turbina Rushton y hélice marina) favoreció la interacción entre fases y la recirculación del aceite en el caldo debido al retromezclado generado.
- Las mejores condiciones para el crecimiento de *Trichoderma harzianum*, en cultivos tetrafásicos no limitados por oxígeno, fueron aquellas que promovieron la homogeneidad y recirculación del aceite (SFM) en conjunto con las que limitaron la formación de la emulsión aire-aceite (difusor de 5 orificios o de anillo).

6.2 Recomendaciones

- No utilizar difusores que generen burbujas muy pequeñas en cultivos que utilicen aceites, ya que una porción significativa del gas alimentado se incorpora a la fase orgánica, provocando la formación de una emulsión aire-aceite en la superficie del caldo.
- Emplear sistemas de mezclado que combinen las ventajas de las turbinas radiales (dispersión e incremento del área interfacial de contacto) con aquellos que presentan las mejores condiciones para el manejo de fluidos de viscosidad alta (impulsores de proximidad).
- Con la finalidad de reducir los problemas de heterogeneidad en el medio (separación de fases), es conveniente realizar estudios en cuanto al posible uso de aceites emulsificados en los cultivos.
- Emplear diferentes constantes PID (ganancia, τ_i y τ_d) para el control del oxígeno disuelto durante el proceso -dependiendo de la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo-; o bien, utilizar un sistema de control adaptativo.

Capítulo VII

Bibliografía

- Aguilar-Aguila, A; Valentinotti, S; Galindo, E; y Ramírez, O. T. Desarrollo de un sistema amigable y versátil para adquisición de datos y control de biorreactores. *Biotechnología* (México), **1993**, 3(5/6): S130-S139.
- Amanullah, A; Serrano-Carreón, L; Castro, B; Galindo, E; and Nienow, A. W. The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **1998a**, 57(1): 95-108.
- Amanullah, A; Tuttiett, B; and Nienow, A. W. Agitator speed and dissolved oxygen effects in xanthan fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **1998b**, 57(2): 198-210.
- Anderson, C; LeGrys, G. A; and Solomons, G. L. Concepts in the design of large-scale fermenters for viscous culture broths. *Int. Chem. Eng.*, **1982**, 37: 43-49.
- Armenante, P. M; and Huang, Y. T. Experimental determination of the minimum agitation speed for complete liquid-liquid dispersion in mechanically agitated vessels. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1992**, 3(5): 1398-1406.
- Armenante, P. M; and Abu-Hakmeh, E. A. A novel method for the experimental determination of the minimum agitation speed for complete liquid-liquid dispersion in agitated liquid-liquid-gas systems. *Trans. IChemE.*, **1994**, 72(A): 677-685.
- Atkinson, B; and Mavituna, F. Stoichiometric aspects of microbial metabolism, Microbial activity, Gas-liquid mass transfer. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, second edition*, Stockton Press, USA, **1991**, Cap. 3, 4 y 9.
- Bailey, J. E; and Ollis, D. F. Transport phenomena in bioprocess systems, Design and analysis of biological reactors. *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill, **1986**, Cap. 8 y 9: 457-657.
- Bakker, A; Smith, J. M; and Myers, K. J. How to disperse gases in liquids. *Chem. Eng.*, **1994**, 101(12): 98-104.

- Bonnarme, P; Djian, A; Latrassé, A; Féron, G; Giniés, C; Durand, A; and Le Quéré, J-L. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J. Biotechnol.*, **1997**, 56: 143-150.
- Buckland, B. C; Gbewonyo, K; DiMasi, D; Hunt, G; Westerfield, G; and Nienow, A. W. Improved performance in viscous mycelial fermentations by agitator retrofitting. *Biotechnol. Bioeng.*, **1988**, 31: 737-742.
- Bujalski, W; Cox, P. W; Thomas, C. R; Nienow, A. W; Priede, M. A; and Viesturs, U. E. Mixing in fungal (*A. niger*) fermentations using dissimilar impeller systems. *Procc. 4th International Conference on Bioreactor & Bioprocess Fluid Dynamics*, A. W. Nienow (Ed.), Edinburgh, UK, **1997**: 9-25.
- Bushell, M. E. Computers in fermentation technology. *Progress in Industrial Microbiology*, **1988**, 25: 1-46.
- Cui, Y. Q; van der Lans, R. G. J. M; and Luyben, K. Ch. A. M. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **1998**, 57(4): 409-419.
- De León, A. Diseño y caracterización de un simulador de gradientes de oxígeno disuelto: Aplicación al proceso de producción de penicilino acilasa por *Escherichia coli* recombinante. *Tesis de Maestría, Posgrado en Biotecnología*, UACPyP-CCH, **1996**, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Flores, C. Producción de aromas frutales por *Trichoderma harzianum*: Aspectos microbiológicos y del proceso. *Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería*, **1995**, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Galindo, E; Velasco, D; y Sánchez A. Reología y mezclado de caldos de fermentación de alta viscosidad. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*, E. Galindo (Ed.), **1996**: 167-178.
- Galindo, E; Pacek, A. W; and Nienow, A. W. The behavior of oil drops and air bubble size distributions in a fermentation system involving up to four phases. Manuscrito en preparación, **1999**.

- Godoy-Silva, R. D; Serrano-Carreón, L; Ascanio, G; and Galindo, E. Effect of impeller geometry on the production of aroma compounds by *Trichoderma harzianum*. *Procc. 4th International Conference on Bioreactor & Bioprocess Fluid Dynamics*, A. W. Nienow (Ed.), Edinburgh, UK, **1997**: 61-72.
- Goldberg, I; and Stieglitz, B. Improved rate of fumaric acid production by Tweens® and vegetable oils in *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **1985**, 27: 1067-1069.
- Gooday, G. W. The dynamics of hyphal growth. *Mycol. Res.*, **1995**, 99(4): 385-394.
- Holland, F. A; and Chapman, F. S. *Liquid Mixing and Processing in Stirred Tanks*, Reinhold, New York, **1966**, Cap. 1 y 2: 1-108.
- Ison, A. P; and Lilly, M. D. The utilisation of lipids during industrial fermentations. *Abstract Book, 10th International Biotechnology Symposium*, Sydney, Australia, **1996**: 26.
- Jüsten, P; Paul, G. C; Nienow, A. W; and Thomas, C. R. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 52(6): 672-684.
- Jüsten, P; Paul, G. C; Nienow, A. W; and Thomas, C. R. A population balance model for fragmentation of filamentous micro-organisms. *Procc. 4th International Conference on Bioreactor & Bioprocess Fluid Dynamics*, A. W. Nienow (Ed.), Edinburgh, UK, **1997**: 217-236.
- Kemblowski, Z; and Kristiansen, B. Rheometry of fermentation liquids. *Biotechnol. Bioeng.*, **1986**, 28: 1474-1483.
- Kim, E. Y; and Yoo, Y. J. Analysis of broth rheology with cell morphology in *Cephalosporium* fermentation. *Biotechnol. Techniques*, **1992**, 6(6): 501-506.
- Kristiansen, B; and Bu' Lock, J. D. Developments in industrial fungal biotechnology. *Fungal Biotechnology*, J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristiansen (Ed.), Academic Press, **1980**: 203-224.
- Kristiansen, B; and Olsvik, E. S. Rheology of filamentous fermentation broths. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1993**, 53:207-209.
- Lee, S. C; Hwang, Y. B; Chang, H. N; and Chang, Y. K. Adaptive control of dissolved oxygen concentration in a bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.*, **1991**, 37: 597-607.

- Lejeune, R; and Baron, G. V. Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1995**, 43: 249-258.
- Makagiansar, H. Y; Ayazi Shamlou, P; Thomas, C. R; and Lilly, M. D. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioproc. Eng.*, **1993**, 9: 83-90.
- Marten, M. R; Velkovska, S; Khan, S. A; and Ollis, D. F. Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnol. Prog.*, **1996**, 12(5): 602-611.
- McCabe, W. L; and Smith, J. C. Ágitación y mezclado de fluidos. *Operaciones básicas de Ingeniería Química*, Reverté, España, **1967**, Cap. 9: 251-285.
- McFarlane, C. M; and Nienow, A. W. Studies of high solidity ratio hydrofoil impellers in aerated bioreactors: Parts 1 and 2. *Biotechnol. Prog.*, **1995**, 11: 601-618.
- Metz, B; Kossen, N. W. F; and van Suijdam, J. C. The rheology of mould suspensions. *Adv. Biochem. Eng.*, **1979**, 11: 103-156.
- Millis, N. F; Trumphy, B. H; and Palmer, B. M. The effect of lipids on citric acid production by *Aspergillus niger* mutants. *J. Gen. Microbiol.*, **1963**, 30: 365-379.
- Mitard, A; and Riba, J. P. Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnol. Bioeng.*, **1988**, 32: 835-840.
- Myers, K. J; Fasano, J. B; and Bakker, A. Gas dispersion using mixed high-efficiency/disc impeller systems. *Procc. 8th European Conference in Mixing*, IChem E Symposium series, **1994**, 136: 65-72.
- Myers, K. J; Reeder, M; Bakker, A; and Rigden, M. Agitating for success. *Chem. Eng.*, **1996**, 620: 39-42.
- Nienow, A. W. Mixing studies on high viscosity fermentation processes-xanthan gum. *World Biotechnology Report*, Europe, Online (London), **1984**, Vol. 1: 293-304.
- Nienow, A. W; and Ulbretch, J. J. Gas-liquid mixing and mass transfer in high viscosity liquids. *Mixing of Liquids by Mechanical Agitation*, J. J. Ulbrecht and G. K. Patterson (Ed.), Gordon and Breach, New York, **1985**: 203-237.

- Nienow, A. W. Gas dispersion performance in fermenter operation. *Chem. Eng. Progress*, **1990a**, 86(2): 61-71.
- Nienow, A. W. Agitators for mycelial fermentations. *TIBTECH*, **1990b**, 8: 224-234.
- Nienow, A. W. Gas-liquid mixing studies: a comparison of Rushton turbines with some modern impellers. *Trans. IChemE.*, **1996**, 74(A): 417-423.
- Oldshue, J. Y; and Conelly, F. L. Gas-liquid contacting with impeller mixers. *Chem. Eng. Prog.*, **1977**, 73(3): 85-89.
- Oldshue, J. Y. General theory; Liquid-liquid mass transfer; Gas-liquid mass transfer. *Fluid Mixing Technology*, McGraw-Hill, **1983**, Cap. 1, 12 y 13: 1-23; 243-277.
- Olsvik, E; Tucker, K. G; Thomas, C. R; and Kristiansen, B. Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, 42(9): 1046-1052.
- Olsvik, E; and Kristiansen, B. Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnol. Adv.*, **1994**, 12: 1-39.
- Özcan, N. G; Decloux, M; and Bruxelmane, M. Effect of viscosity on cavity formation and power characteristics of an agitated aerated Newtonian fluid. *Trans. Inst. Chem. Eng.*, **1990**, 68(A): 63-68.
- Pacek, A. W; and Nienow, A. W. A problem for the description of turbulent dispersed liquid-liquid systems. *Int. J. Multiphase Flow*, **1995**, 21(2): 323-328.
- Pirt, S. J. *Principles of Microbe and Cell Cultivation*, Blackwell, London, **1975**.
- Priede, M. A; Vanags, J. J; Viesturs, U. E; Tucker, K. G; Bujalski, W; and Thomas, C. R. Hydrodynamic, physiological, and morphological characteristics of *Fusarium moniliforme* in geometrically dissimilar stirred bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, 48(3): 266-277.
- Ratledge, C. Fermentation substrates. *Ann. Rep. Ferment. Procc.*, **1977**, 1: 49-71.
- Roels, J. A; Van Den Berg, J; and Voncken, R. M. The rheology of mycelial broths. *Biotechnol. Bioeng.*, **1974**, 16: 181-208.

- Sargantanis, I. G; and Karim, M. N. Effect of oxygen limitation on β -lactamase production. *Biotechnol. Prog.*, **1996**, 12(6): 786-792.
- Serrano-Carreón L; Flores, C; and Galindo, E. γ -Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in stirred bioreactors. *Biotechnol. Prog.*, **1997**, 13(2): 205-208.
- Singh, V; Henster, W; Fuchs, R; and Constantinides, A. On-line determination of mixing parameters in fermentors using pH transients. *Procc. Int. Conference on Bioreactor & Bioprocess Fluid Dynamics*, Cambridge, BHRA The Fluid Engineering Centre, Cranfield, **1986**: 231-256.
- Singh, V. On-line measurement of oxygen uptake in cell culture using the dynamic method. *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, 52(3): 443-448.
- Skelland, A. H. P; and Ramsay, G. G. Minimum agitator speeds for complete liquid-liquid dispersions. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1987**, 26(1): 77-81.
- Skelland, A. H. P; and Moeti, L. T. Effects of surface active agents on minimum impeller speeds for liquid-liquid dispersion in baffled vessels. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **1989**, 28(1): 122-127.
- Smith, J. J; Lilly, M. D; and Fox, R. I. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **1990**, 35: 1011-1023.
- Stanbury, P; and Whitaker, A. *Principles of Fermentation Technology*, Pergamon Press, Oxford, UK, **1984**.
- Tatterson, G. B. Mixing geometries; Gas dispersion in agitated tanks. *Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks*, McGraw-Hill, **1991**, Cap. 1 y 6: 1-18; 417-526.
- Thomas, C. R. Image analysis of filamentous fermentation broths. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **1993**, 56(2): 204-207.
- Treskatis, S-K; Orgeldinger, H. W; and Gilles, E. D. Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol. Bioeng.*, **1997**, 53(2): 191-201.
- Treybal, R. E. Equipo para las operaciones gas-líquido; Absorción de gases. *Operaciones de Transferencia de Masa, 2a. ed.*, McGraw-Hill, **1980**, Cap. 6 y 8: 157-246; 306-377.

- Tuffile, C; and Pinho, F. Determination of oxygen-transfer coefficients in viscous *Streptomyces* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **1970**, 12: 849-971.
- Van Suidam, J. C; and Dusseljee, P. J. B. *Physical Aspects of Bioreactor Performance*, W. Crueger (Ed.), **1987**: 107-120.
- Vardar-Sukan, F. Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors. Part I: Operating variables affecting mass transfer. *Process Biochem.*, **1985**, 20: 181-184.
- Vardar-Sukan, F. Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors. Part II: Design variables. *Process Biochem.*, **1986**, 5: 40-44.
- Weete, J. D. *Lipid Biochemistry of fungi and other organisms*, J. D. Weete and J. W. Darrell (Ed.), Plenum Press, New York, **1980**.
- Wittler, R; Baumgartl, H; Lübbers, D. W; and Schügerl, K. Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnol. Bioeng.*, **1986**, 28: 1024-1036.

Apéndices

A. Sistemas de primer orden

A.1 Generalidades

El orden de reacción de los sistemas señala el orden de la ecuación diferencial necesaria para modelar la salida o respuesta transitoria de estos ante alguna perturbación, los cuales pueden ser de primer (Ec. A-1) o de segundo (Ec. A-2) orden.

$$a_1 dC/ dt + a_0 C = b F(t) \quad (A-1)$$

$$a_2 d^2 C/ dt^2 + a_1 dC/ dt + a_0 C = b F(t) \quad (A-2)$$

Los sistemas de primer orden (Ec. A-1) se dividen a su vez en dos grupos dependiendo de la respuesta de salida, misma que se refleja sobre el valor de a_0 . Si la respuesta presenta un comportamiento exponencial [$a_0 \neq 0$ (Ec. A-3)] se les denomina “sistemas con retraso de primer orden” o “sistemas con retraso exponencial de transferencia” (Ec. A-5). Por otro lado, si la respuesta es lineal [$a_0 = 0$ (Ec. A-4)] se les conoce como puramente capacitivos (Ec. A-6).

$$(a_1/a_0) dC/ dt + C = (b/a_0) F(t) \quad (A-3)$$

$$dC/ dt = (b/a_1) F(t) \quad (A-4)$$

Aplicando la transformada de Laplace a las ecuaciones A-3 y A-4 respectivamente, se obtiene:

$$G(s) = K_p / \tau S + 1 \quad (A-5)$$

$$G(s) = K'_p / S \quad (A-6)$$

donde:

- s = variable definida en el plano de los números complejos
- G = función de transferencia para los sistemas de primer orden
- τ = constante de tiempo del sistema [a_1/a_0]
- K_p = ganancia del proceso con retraso exponencial de transferencia [b/a_0]
- K'_p = ganancia del proceso puramente capacitivo [b/a_1]

La mayoría de los procesos de primer orden exhiben un comportamiento con retraso exponencial de transferencia (Ec. A-5) debido a que la instrumentación empleada (electrodos, controladores de flujo másico, etc.) presenta este mismo tipo de respuesta. La figura A.1 muestra una curva de respuesta exponencial típica ante un cambio escalonado.

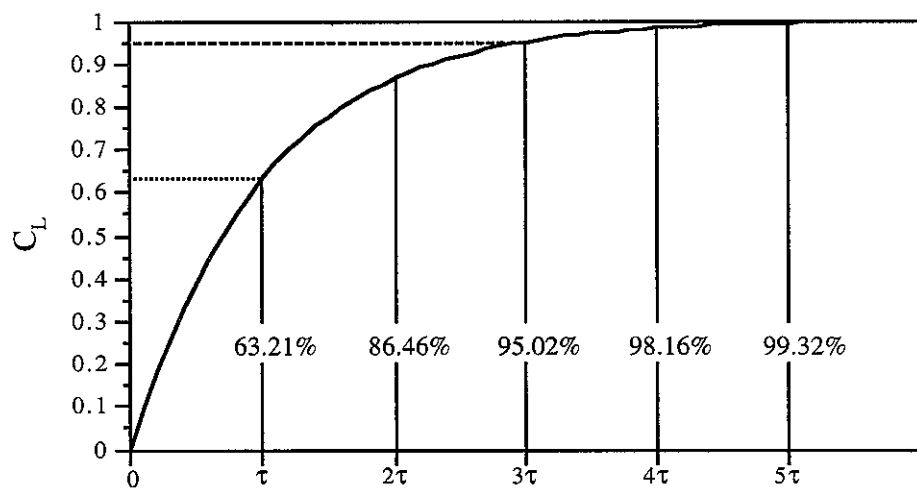


Figura A.1- Curva de respuesta típica de un sistema de primer orden con retraso exponencial de transferencia ante un cambio escalonado (adaptado de De León, 1996).

Para determinar experimentalmente si un sistema es o no de primer orden, los valores obtenidos -a partir de la curva de respuesta del sistema ante una perturbación tipo escalón- se grafican en papel semilogarítmico $[C(t) - C(\infty)] / [C(0) - C(\infty)]$ vs tiempo. Si la curva obtenida es una línea recta, el sistema es de primer orden.

A.2 Características de los sistemas de primer orden

Los sistemas de primer orden con retraso exponencial de transferencia se caracterizan por:

- 1.- El someter estos sistemas ante una perturbación de tipo escalón origina la formación de una curva de respuesta transitoria a la salida (figura A.1), misma que cambia gradualmente hasta alcanzar un nuevo estado estacionario.
- 2.- La respuesta transitoria de cualquier sistema ante cambios escalonados -incorporando la función escalón unitario- puede expresarse a través de la ecuación A-7, la cual resulta de normalizar ($K_p = 1$), resolver (fracciones parciales) y aplicar la antitransformada de Laplace a la ecuación A-5.

$$C(t) = 1 - e^{-t/\tau} \quad \text{para } t \geq 0 \quad (\text{A-7})$$

- 3.- La constante de tiempo (τ) de estos sistemas indica la dinámica del proceso, mientras más pequeño sea su valor, más rápida será la respuesta.
- 4.- La constante de tiempo del proceso (τ) será igual al tiempo que tarda en alcanzar el 63.21% de su variación total (figura A.1), esto se demuestra sustituyendo el valor de “t” ($t = \tau$) en la ecuación A-7.
- 5.- Para obtener la constante de tiempo del sistema (Ec. A-8), es necesario eliminar el tiempo muerto (T_d) de la constante de tiempo aparente (τ_a), ya que este último toma en cuenta tanto la curva de respuesta del sistema como otros eventos dinámicos del proceso (*ejem.* retraso por transporte del gas en la tubería, respuesta del electrodo, etc.).

$$\tau_s = \tau_a - T_d \quad (\text{A-8})$$

- 6.- Matemáticamente (Ec. A-7), el estado estacionario sólo se alcanza tras un tiempo infinito [$C(\infty)$]. Sin embargo, una estimación razonable de la respuesta transitoria es el “tiempo de respuesta del sistema”, el cual se refiere al tiempo que tarda en alcanzar el 95% de la respuesta final, es decir tres constantes de tiempo (figura A.1).
- 7.- La pendiente de la curva de respuesta decrece monótonicamente desde su máximo en $t = 0$, hasta cero en $t = \infty$.

A.3 Determinación de la constante de tiempo en sistemas de fermentación

De acuerdo a la ecuación 2-4, el balance de oxígeno en un fermentador esta dado por:

$$dC_L/dt + k_L a C_L + VCO = k_L a C_g^* \quad (\text{A-9})$$

Dado que el tiempo de evaluación es generalmente corto, se puede asumir que la VCO -durante el periodo de estimación- es constante; y dividiendo entre $k_L a$ se obtiene:

$$(1/k_L a) dC_L/dt + C_L = C_g^* \quad (\text{A-10})$$

Ecuación similar a la obtenida por aquellos sistemas de primer orden que presentan un retraso exponencial de transferencia (Ec. A-3). Para tales condiciones, la ecuación de salida ante un cambio escalonado (sección anterior) puede ser expresada como:

$$C_L = C_g^* (1 - e^{-k_L a t}) \quad (\text{A-11})$$

De la ecuación anterior, es evidente que el k_L es igual al inverso de la constante de tiempo (Ec. A-7). Sin embargo, es importante señalar que la constante de tiempo empleada debe tomar en cuenta solo la curva de respuesta transitoria y no el resto de los eventos dinámicos (Ec. A-8). En este sentido, la ecuación A-11 se transforma a:

$$C_L = C_g^* (1 - e^{-t/\tau_s}) \quad (\text{A-12})$$

donde el k_L del proceso será igual al inverso de la constante de tiempo del sistema ($1/\tau_s$).