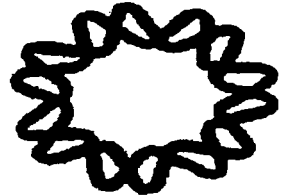


03088
2



Universidad Nacional Autónoma
de México



Instituto de Biotecnología

**Estudio de las dispersiones de aceite,
biomasa y aire en un sistema modelo de
fermentación tetrafásica**

T E S I S

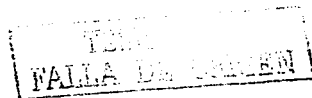
que para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

P r e s e n t a

María Soledad Córdova Aguilar

Cuernavaca, Morelos

Febrero 2003





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

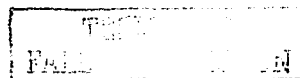
NOMBRE: MA. SOLEDAD
CORDOVA AGUILAR

FECHA: 14 FEBRERO 2003

FIRMA: [Firma manuscrita]

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Enrique Galindo, del Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Ciudad de Cuernavaca, Morelos, bajo su asesoría.

Para la realización de este trabajo se contó con el financiamiento de la DGAPA – UNAM, proyectos IN 119598 e IN 105500.



Indice general

página

	Indice de figuras	
	Indice de tablas	
	Nomenclatura	
	Resumen	1
	Abstract	2
1.	Introducción	3
2.	Marco general y antecedentes	5
2.1	<i>Mezclado</i>	5
2.2	<i>Dispersión líquido-líquido</i>	6
2.3	<i>Dispersión gas-líquido</i>	10
2.4	<i>Dispersión multifásica</i>	12
2.5	<i>Impulsores</i>	14
2.5.1	<i>Impulsores de flujo radial</i>	15
2.5.2	<i>Impulsores de flujo axial</i>	17
2.6	<i>Caracterización de las dispersiones</i>	19
2.7	<i>Análisis de imágenes</i>	24
3.	Objetivos	27
4.	Estrategia experimental	28
5.	Materiales y métodos	30
	<i>Fases continua, líquida dispersada y sólida</i>	30
	<i>Condiciones de mezclado y medición de potencia</i>	32
	<i>Dispersión de aceite, biomasa y aire</i>	35
	<i>Determinación del comportamiento de flujo</i>	36
	<i>Tensión superficial</i>	37
6.	Resultados y discusión	38
6.1.	<i>Caracterización macroscópica</i>	38
6.1.1	<i>Turbinas Rushton</i>	38
	<i>Sistema de dos fases</i>	38
	<i>Sistemas de tres fases</i>	40



Indice general

	<i>Sistema de cuatro fases</i>	41
	<i>Homogeneidad del sistema</i>	44
6.1.2	Impulsores InterMIG	46
	<i>Sistemas de tres fases</i>	46
	<i>Sistema de cuatro fases</i>	48
6.2	Caracterización microscópica	51
	<i>Efecto de la concentración de aceite</i>	53
6.2.1	Efecto de la viscosidad del sistema en la dispersión del aceite y del aire	58
	<i>Efecto de la concentración de biomasa como agente viscosificante</i>	58
	<i>Efecto del glicerol como agente viscosificante</i>	61
	<i>Efecto de la carboximetilcelulosa como agente viscosificante</i>	65
7.	Conclusiones	70
8.	Referencias	73
	Apéndice A	81
	Apéndice B	89



Indice de figuras

Figura		Página
1	Diagrama esquemático del tanque de mezclado usado para caracterizar la dispersión de aceite y biomasa	34
2	Diagrama esquemático del tanque de mezclado usado para caracterizar las dispersiones de aceite y aire a nivel microscópico	34
3	Arreglo experimental para caracterizar la dispersión de aceite y aire basado en análisis de imágenes	36
4	Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para concentraciones de aceite de ricino al 2 % (w/w) y al 15 % (w/w), con turbinas Rushton en sistemas de dos fases.	39
5	Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para concentraciones de aceite de ricino al 2 % (w/w) y al 15 % (w/w), con turbinas Rushton en sistemas de dos y tres fases.	40
6	Dispersión de aceite como función de la potencia volumétrica en sistemas de dos, tres y cuatro fases para las dos condiciones simuladas de la fermentación.	42
7	Dispersión de biomasa como función de la potencia volumétrica para condiciones de alto contenido de aceite/baja concentración de biomasa y bajo contenido de aceite/alta concentración de biomasa en sistemas de 4 fases.	44
8	Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para concentraciones de aceite de ricino al 2 % (w/w), con impulsores InterMIG en sistemas de dos y tres fases.	46
9	Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica en sistemas de tres fases comparando el desempeño de las turbinas Rushton con los impulsores InterMIG.	47
10	Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para concentraciones de aceite de ricino al 15 % (w/w), con impulsores InterMIG en sistemas de dos, tres y cuatro fases.	48

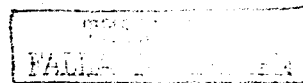


Indice de figuras

11	Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica en sistemas de cuatro fases comparando el desempeño de las turbinas Rushton con los impulsores InterMIG para ambas condiciones.	49
12	Dispersión de biomasa en función de la potencia volumétrica en sistemas de cuatro fases para ambas condiciones.	50
13	Gotas de aceite, burbujas de aire libres y atrapadas en aceite en sistemas de tres fases y cuatro fases.	53
14	Efecto de la concentración de aceite en el diámetro Sauter de las gotas de aceite y las burbujas en un sistema de tres fases.	54
15	Efecto de la concentración de aceite en el diámetro Sauter de las burbujas libres y atrapadas en aceite en un sistema de tres fases.	55
16	Distribución de volumen acumulado para las burbujas libres y atrapadas en aceite en un sistema de tres fases.	56
17	Efecto de la concentración de biomasa en el diámetro Sauter de las burbujas libres y atrapadas en aceite en un sistema de cuatro fases.	59
18	Proporción de burbujas atrapadas en aceite en un sistema de cuatro fases en función de la concentración de biomasa	60
19	Diámetro Sauter de las gotas, burbujas libres y burbujas dentro de aceite en un sistema modelo de tres fases con 10 % de aceite y a 200 rpm. Aireación = 0.25 vvm	61
20	Distribución de volumen acumulado para gotas en sistemas aireados con glicerol como agente espesante	63
21	Imágenes de gotas de aceite, burbujas de aire libres y atrapadas en aceite en sistemas con glicerol (fase acuosa-aceite-aire)	63
22	Tensión superficial de los diferentes sistemas con glicerol como agente espesante	64
23	Imágenes típicas de gotas de aceite, burbujas de aire libres y atrapadas en aceite en sistemas con CMC (fase acuosa-aceite-aire)	65

Indice de figuras

24	Distribución de volumen acumulado para gotas de aceite en sistema acuoso y con CMC	66
25	Distribución de volumen acumulado para burbujas libres (a) y burbujas dentro de gotas de aceite (b) en sistemas acuoso y con CMC	68



<i>Tabla</i>	Indice de tablas	<i>Página</i>
1	Tipos de diámetros promedio	22
2	Aceite y biomasa dispersos a $P = 0.2$ W/L	45
3	Comparación de los diámetros Sauter de gotas de aceite y burbujas de aire en los sistemas acuoso y con CMC	67



Nomenclatura

a	área interfacial de masa	$[\mu\text{m}^2]$
d_i	Diámetro de la gota o burbuja n, de la población	$[\mu\text{m}]$
d_{32}	Diámetro Sauter	$[\mu\text{m}]$
ϕ	Fracción volumétrica de la fase inmiscible	adimensional
K	Índice de consistencia (del modelo de la ley de la potencia)	$[\text{Pa s}^n]$
n	Índice de flujo (del modelo de la ley de la potencia)	adimensional
k_i	Coefficiente de transferencia de masa	$[\text{h}^{-1} \mu\text{m}^2]$
k_{ia}	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	$[\text{h}^{-1}]$
P/V	Potencia volumétrica	$[\text{kW}/\text{m}^3]$



Resumen

Muchos procesos de las industrias química, de alimentos y farmacéutica requieren de la dispersión y del mezclado eficiente de varias fases para satisfacer la demanda del microorganismo por el oxígeno y sustratos, con el fin de que éste desarrolle adecuadamente sus actividades metabólicas y tener con ello un proceso con alta productividad. El aroma frutal γ – decalactona (característico a durazno) es producido por *Trichoderma harzianum* en una fermentación aerobia donde se utiliza aceite de ricino como fuente de carbono. Este microorganismo es un hongo filamentosos que conforme va creciendo, provoca que el cultivo se vuelva más viscoso y, en consecuencia, se hace más difícil el proceso de homogenización de las fases involucradas: dos líquidas inmiscibles, una gaseosa y una sólida (biomasa), razón por la cual este proceso se utiliza como modelo de estudio para analizar los problemas de mezclado que ocurren en los biorreactores que involucran varias fases.

En este trabajo, la dispersión de las fases orgánica y gaseosa en medio acuoso se cuantificó por análisis de imágenes/microscopía en un tanque agitado mecánicamente. Asimismo, se caracterizó la dispersión del aceite de ricino y de la biomasa en función de la potencia volumétrica en sistemas modelo de dos, tres y cuatro fases, utilizando dos configuraciones de impulsores (turbinas Rushton e impulsores InterMIG) y simulando dos condiciones del proceso: al inicio, con alta concentración de aceite (15 %)/baja concentración de biomasa (1.4 g/L), y al final, con baja concentración de aceite (2 %)/alta concentración de biomasa (10.6 g/L). Las turbinas Rushton fueron más eficientes en la dispersión de aceite en ambas concentraciones de este componente. En el sistema con alta concentración de aceite (15 %), la presencia de aire y biomasa causa un efecto negativo en la dispersión de aceite y se observa el fenómeno de segregación, mientras que en el sistema con baja concentración de aceite, la presencia de biomasa favorece la dispersión del aceite, actuando como acarreador. Por el contrario, en el caso de los impulsores InterMIG, para ambas concentraciones de aceite, la presencia de aire no tuvo ningún efecto. La biomasa en el caso de 2 % de aceite funcionó como acarreador, mientras que en el sistema de 15 %, constituyó una barrera más para la homogeneidad del sistema.

Al cuantificar la dispersión del aceite y de la fase gaseosa a nivel microscópico se observó que hay burbujas dentro de las gotas de aceite, hasta en un 40 %. La presencia de biomasa disminuye el tamaño de gotas y burbujas y aumenta hasta tres veces el número de burbujas de aire dentro de las gotas de aceite. Conforme aumenta la concentración de micelio en el sistema, el tamaño de las gotas, así como el de las burbujas disminuye y la proporción de burbujas dentro de las gotas se incrementa. En los sistemas donde el glicerol o la carboximetilcelulosa (CMC) se utilizaron como agentes espesantes, también se observó una disminución significativa en el diámetro de las gotas de aceite y de las burbujas de aire además de que el número de burbujas atrapadas en el aceite fue hasta 4 veces mayor. En el sistema con CMC, el diámetro Sauter (d_{32}) tanto de las burbujas libres, como de las burbujas dentro de las gotas disminuyó entre 1.5 y 2.8 veces con respecto al sistema acuoso, respectivamente.

Dependiendo de la concentración de aceite y de biomasa, los resultados del análisis macroscópico señalan la existencia de una emulsión aire-aceite y la segregación de las fases. Los resultados del análisis microscópico indicaron la presencia de burbujas dentro de las gotas de aceite y fue posible visualizar claramente las interacciones de las fases líquida, gaseosa y biomasa dentro del tanque de mezclado y establecer que éstas interacciones son altamente complejas.

Abstract

Many processes in the chemical, food and pharmaceutical industries require an efficient dispersion and mixing of various phases to satisfy the microorganism demand for oxygen and substrates, so that it can adequately develop its metabolic activities and achieve a high productivity in the process. γ -decalactone (peach-like aroma) is produced by *Trichoderma harzianum* in an aerobic fermentation process where castor oil is used as the carbon source. This microorganism is a filamentous fungus that develops highly viscous broths making difficult the homogenization of the involved phases. In this quite complex process, four phases are usually involved: two immiscible liquid phases, one gaseous and one solid (biomass). This process has been chosen as a model to study and analyze the mixing problems that would affect bioreactors when various phases are involved.

Successful dispersion of the phases in a fermentation process is quite important and therefore it is relevant to analyze the role of all the factors associated with the growth of the microorganism and the different aspects of dispersion. Dispersion of the organic and gaseous phases in an aqueous medium was quantified by image analysis in a mechanically agitated tank. Castor oil and biomass dispersion was characterized as a function of the volumetric power drawn in model systems of two, three and four phases. Two impeller configurations were used (Rushton turbines and InterMIG impellers). Two stages of the fermentation process were simulated: the beginning (15 % oil and 1.4 g/L of mycelium) and the end (2 % oil and 10.6 g/L of mycelium). It was found that: a) Rushton turbines were more efficient than InterMIG impellers; b) the presence of air and biomass in the high oil concentration system (15 %) had a negative effect on oil dispersion and segregation was observed; c) the presence of biomass in the low oil concentration system (2 %) favored oil dispersion as biomass acted as carrier; d) air had no effect on dispersion when InterMIG impellers were used in both oil concentration systems.

The microscopic quantification of oil and gaseous phase dispersion revealed that: a) bubbles were trapped within oil drops up to 40 %; b) biomass presence reduced drops and bubbles size and increased up to threefold the number of bubbles trapped in oil drops; c) as mycelium concentration increased, oil drops and bubbles size decreased but the rate of bubbles in oil drops increased too; d) in systems where glycerol or carboxymethylcellulose were used, there was also a significant reduction in the drops and bubbles size and the proportion of bubbles trapped in oil drops was up to four times higher, as compared to aqueous systems.

The macroscopic analysis showed the presence of an air-oil emulsion and phases segregation, depending on the oil and biomass concentration. The microscopic analysis showed that bubbles were trapped in oil drops. Both results are very useful to visualize more clearly the interactions of the liquid, gaseous and solid phases in the mixing tank, which are highly complex and worthwhile to be observed and studied further.



1. Introducción

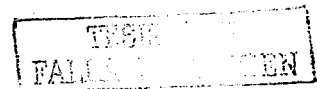
Muchos procesos de las industrias química, de alimentos y farmacéutica requieren de la dispersión de una fase inmiscible en una fase acuosa, la cual determina el área interfacial para la transferencia de masa y la productividad del proceso. Entre los líquidos inmiscibles que más se utilizan en diversos bioprocesos, como sustrato o como fase inmiscible para extraer, concentrar o eliminar efectos tóxicos, están los aceites. Tal es el caso de la producción de antibióticos y otros metabolitos liposolubles de interés comercial que se obtienen a partir de procesos de fermentación (Large *et al.*, 1998; Keudell *et al.*, 2000).

La dispersión de una fase inmiscible en una fase acuosa y la dispersión gas – líquido son operaciones muy importantes en diversos procesos químicos y en las fermentaciones aerobias, donde es necesario dispersar eficientemente el aire al cultivo para satisfacer la demanda de oxígeno y que el microorganismo desarrolle adecuadamente sus actividades metabólicas (Tattersson, 1991). En el caso de las fermentaciones aerobias con líquidos inmiscibles, se presentan ambos tipos de dispersión y la mezcla de dos fases líquidas y una gaseosa. La biomasa (fase sólida) por su parte complica la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. El proceso de producción de aromas frutales por *Trichoderma harzianum* (Serrano-Carreón *et al.*, 1997) es una fermentación aerobia donde se utiliza aceite de ricino como fuente de carbono y el microorganismo es un hongo filamentoso que conforme va creciendo, vuelve más viscoso el cultivo y, en consecuencia, se hace más difícil el proceso de homogenización de las fases involucradas. Esto implica un proceso de cuatro fases, hidrodinámicamente complejo, heterogéneo y altamente viscoso (Serrano-Carreón *et al.*, 1997) que fue utilizado como modelo de estudio para una mejor comprensión y evaluación de los problemas de mezclado que afectan a los biorreactores que involucran varias fases.

Introducción

La eficiencia de la dispersión de la fase inmisible (aceite), de la biomasa y de la fase gaseosa se evaluó en este sistema modelo en función del suministro de potencia, de la composición y características físico-químicas de la fase acuosa, del contenido de aceite, de la aireación y de la presencia y concentración de biomasa en el sistema, con respecto al grado de dispersión líquido-líquido, líquido-líquido-gas y líquido-líquido-gas-sólido. También se estudiaron variables que se pueden manipular en el reactor como la configuración de impulsores para mejorar el proceso de fermentación.

Con la información obtenida se busca entender las complejas interacciones entre las fases, obtener conclusiones sobre los mecanismos y fenómenos que se presentan durante la dispersión de aceite de ricino y del aire en un sistema de hasta cuatro fases y conocer de manera detallada el comportamiento del mezclado de las fases involucradas que afectan la productividad de cultivos como los de *Trichoderma harzianum*.



2. Marco general y antecedentes

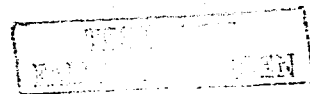
2.1. Mezclado

La operación de mezclado es ampliamente utilizada en todos los procesos que involucran cambios físicos y químicos. Es una de las operaciones unitarias más universales, ya que forma parte integral de casi todos los procesos de las industrias química, de alimentos, farmacéutica, papel, plástico, hule, petroquímica y mineral (Holland y Chapman, 1966). Prácticamente no existe industria en la que no esté presente el mezclado como parte fundamental de algún proceso (Treybal, 1980), si bien es cierto que gran parte del conocimiento generado alrededor de este tema se ha desarrollado en la industria química.

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). Dentro de esta definición está implícita la agitación mecánica, la cual se puede llevar a cabo mediante impulsores, dispositivos que promueven la dispersión de sólidos, líquidos o gases en líquidos, además de aumentar la transferencia de masa (Oldshue, 1983; Myers *et al.*, 1996).

En la práctica, las operaciones de mezclado se pueden utilizar para:

- Suspensión de sólidos
- Dispersión líquido-líquido con transferencia de masa
- Dispersión gas-líquido con transferencia de masa



➤ **Transferencia de calor**

En su mayoría son operaciones complejas, ya que involucran dos o más de estas aplicaciones simultáneamente. En los procesos biotecnológicos, la dispersión del gas en el seno del líquido (transferencia de oxígeno) y el contacto entre fases (homogeneidad), son los objetivos más importantes del mezclado, debido a los requerimientos metabólicos de oxígeno por parte de los microorganismos y a la formación de gradientes (oxígeno, pH, nutrientes) en el biorreactor. 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).

Prácticamente todas las fermentaciones involucran el mezclado de más de una fase. Las fermentaciones reológicamente más simples, como los cultivos de levaduras y bacterias, requieren de la dispersión del aire en una fase continua con el fin de transferir oxígeno y lograr la homogeneidad del caldo de cultivo. Cuando los microorganismos que se cultivan son hongos filamentosos, éstos crecen con morfologías complejas, provocando caldos altamente viscosos y no-newtonianos, donde la transferencia de masa y la homogeneidad del sistema son más complejas y limitadas conforme avanza el proceso (Cui *et al.*, 1998). Por otra parte, en muchas fermentaciones se usa aceite como fuente de carbono, fase extractiva o para mejorar la transferencia de masa. En estos bioprocesos, es necesario además, un contacto eficiente de las fases líquidas (Vardar-Sukan, 1998).

2.2. Dispersión líquido-líquido

Cuando dos líquidos inmiscibles se agitan, se crea un sistema en que las gotas de uno de los líquidos se dispersan en la fase continua del otro. Este tipo de sistemas es frecuente en las industrias química, de alimentos y farmacéutica. Se requiere de un eficiente contacto entre las dos fases y de aumentar



el área interfacial para que las reacciones y la transferencia de masa se lleven a cabo sin limitaciones (Tsouris *et al.*, 1996), lo cual se logra en general con agitación mecánica. En estos procesos es importante operar a una velocidad de agitación que permita que las dos fases estén bien mezcladas y que la fase dispersa esté completamente incorporada en la fase continua (Armenante y Huang, 1992).

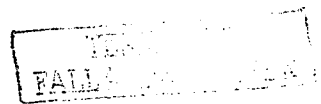
En los últimos veinte años se ha prestado mucha atención al uso de sistemas de dos fases líquidas. Estos sistemas pueden consistir de dos soluciones acuosas poliméricas, de una solución polimérica y una solución de sal o de una fase acuosa y otros líquidos inmiscibles o solventes tales como alcanos, alquenos, ésteres, alcoholes, éteres y perfluorocarbonos, entre otros (van Sonsbeek *et al.*, 1993).

La aplicación de solventes orgánicos en reacciones biocatalíticas o fermentaciones es una técnica muy útil para mejorar la disponibilidad de materiales poco solubles en agua y que, en algunos procesos, el producto puede ser tóxico para el microorganismo y/o enzimas (van Sonsbeek *et al.*, 1993; Kollmer *et al.*, 1999). Estos sistemas de dos fases líquidas, también se han aplicado en otros procesos biotecnológicos como en la producción de antibióticos (Elibol y Mavituna, 1997), el tratamiento de aguas residuales (Smith y Valsaraj, 1998), en la fermentación extractiva (Serrano-Carreón *et al.*, 2002), en la esterificación de ácidos grasos (Urata y Takaishi, 2001) y para mejorar la velocidad de suministro de oxígeno a la fase acuosa en los bioprocesos aeróbicos, donde el oxígeno puede ser un factor limitante. La utilización de dos fases líquidas puede influir en estos procesos de dos maneras diferentes. Primera, es posible airear una fase líquida y conducirla a través de la otra que contiene el biocatalizador. Segunda, puede formarse una emulsión y airearla para dispersar aire o aire enriquecido con oxígeno al sistema (van Sonsbeek *et al.*, 1993).



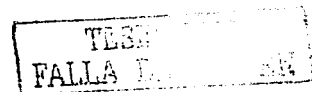
En las fermentaciones extractivas, se utilizan aceites y solventes orgánicos inmiscibles cuya selección depende de que el producto preferentemente se disuelva en el solvente (Mattiasson y Adlercreutz, 1987; King *et al.*, 1989). Un ejemplo es el proceso de producción del compuesto aromático 6-pentil- α -pirona, 6PP (aroma característico a coco) por el hongo *Trichoderma harzianum* (Serrano-Carreón *et al.*, 1997). Esta lactona es tóxica para *T. harzianum* y puede inhibir el crecimiento del hongo a concentraciones de 100 mg/L de 6PP (Prapulla *et al.*, 1992). Una alternativa es utilizar una segunda fase líquida en la cual la pirona sea soluble, evitando así la toxicidad. Un solvente líquido ideal es el aceite de ricino (Serrano-Carreón *et al.*, 1997), ya que también puede servir como fuente de carbono principal. A medida que la fermentación avanza, el aceite de ricino se consume. Al final del proceso, la pirona puede ser extraída de la fase de aceite, la cual esta altamente enriquecida con la 6PP. Otra propuesta en este proceso es el uso de n-hexadecano como fase extrayente, procedimiento que logra incrementar hasta nueve veces la concentración de 6PP en los cultivos con solvente con respecto a los cultivos sin solvente (Serrano-Carreón *et al.*, 2002).

Otro ejemplo es el uso de los perfluorocarbonos, los cuales funcionan como portadores de oxígeno, aprovechando la alta solubilidad del oxígeno en ellos, que puede ser hasta ocho veces más que en agua (Ju y Ho, 1989; Ho *et al.*, 1990). Se puede suministrar oxígeno a cultivos de *E. coli* a velocidades significativamente más altas con respecto a una columna de burbujeo convencional en la presencia del perfluorocarbono, lo cual se logra, además, con un menor consumo de energía (Damiano y Wang, 1985). Adicionando perfluorocarbono al caldo de fermentación es posible incrementar hasta cinco veces la producción de un antibiótico (Elibol y Mavituna, 1997) y en un sistema de perfluorocarbono saturado de oxígeno y medio acuoso con bacterias como fuente de



nutrientes, se ha logrado el crecimiento de nemátodos en una forma significativamente mayor al obtenido en el cultivo control limitado por oxígeno (Jewitt *et al.*, 1999).

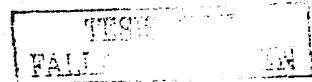
Por otra parte, los aceites han sido usados como fuente de carbono total (Rattledge, 1977) o parcial (Rols y Goma, 1991) para favorecer la producción de metabolitos secundarios, en la producción de lipasas (Dalmau *et al.*, 1998) y de biopolíesteres (Hazer *et al.*, 1998). En fermentaciones miceliarias es común el uso de aceites como fuente de carbono, lo cual presenta algunas ventajas, incluyendo sus propiedades como antiespumantes (Large *et al.*, 1998). Los aceites son componentes esenciales en la industria de los antibióticos (Elibol y Mavituna, 1997), mejoran la producción de compuestos solubles en aceites (Keudell *et al.*, 2000) y pueden servir como fase extrayente de metabolitos cuya producción se encuentra limitada por la toxicidad del propio metabolito que inhibe el crecimiento de la biomasa (Eiki *et al.*, 1988; Serrano-Carreón *et al.*, 2002). En otros procesos, se utiliza una fase acuosa con una bacteria sulfato-reductora como biocatalizador en contacto con una fase oleosa (Tsouris *et al.*, 1996). Asimismo, los aceites mejoran la producción de los polihidroxicanoatos de origen bacteriano (Tan *et al.*, 1997), de materiales liposolubles como la riboflavina, esteroides, coenzimas y algunos productos farmacéuticos (Vandamme, 1992) y contribuyen a la protección y estabilidad de productos obtenidos por cristalización, como en el caso de algunas macromoléculas biológicas (Chayen, 1999). Asimismo, se ha reportado que los aceites también mejoran la transferencia de oxígeno al lograr una mayor solubilidad del oxígeno en la fase aceitosa (Rols y Goma, 1991), lo cual se debe a una mayor solubilidad del oxígeno en aceites que en agua (Liu *et al.*, 1994), no obstante que para metabolizarlo, el microorganismo requiere más oxígeno que cuando consume carbohidratos (Stowell, 1987).



En las dispersiones líquido-líquido, el tamaño de las gotas es una medida del grado de dispersión del sistema y tiene un papel muy importante en la transferencia de masa (Shimizu *et al.*, 1999). La distribución del tamaño de las gotas está determinada tanto por la fracción de la fase dispersada, como por las propiedades de ambos fluidos (viscosidad, tensión superficial, hidrofobicidad), la relación entre las fases, el efecto de aditivos y dispersantes, la geometría del impulsor, la potencia aplicada al sistema, además de la tensión interfacial, de la geometría del sistema y de la energía provista al mismo (Tsouris *et al.*, 1996; Zhou y Kresta, 1998b). Asimismo, la distribución del tamaño de las gotas está también determinada por el equilibrio dinámico entre la ruptura y coalescencia de las gotas (Zhou y Kresta, 1998a). La presencia de surfactantes, electrolitos y algunos otros compuestos presentes en el medio de cultivo influyen también en la distribución del tamaño de las gotas (Kawase y Moo-Young, 1990), así como la presencia de partículas sólidas y las propiedades físicas de éstas (Ozkan *et al.*, 2000; Kawase *et al.*, 1997).

2.3. *Dispersión gas-líquido*

La dispersión gas – líquido es la operación unitaria que genera la dispersión de burbujas de gas en una fase líquida continua. Algunas operaciones industriales como la oxidación, la hidrogenación, el procesamiento de polímeros y las fermentaciones aerobias requieren del contacto de un gas con el líquido y la formación de una interfase para que las reacciones y la transferencia de masa se lleven a cabo. Sin embargo, en los cultivos sumergidos, se debe suministrar aire continuamente, ya que por su baja solubilidad en agua, el oxígeno es el elemento más difícil de abastecer al cultivo (Atkinson y Mavituna, 1991).



El gas, convencionalmente suministrado a través de difusores, es dispersado por agitación mecánica en forma de burbujas. El impulsor mecánico es el generador de burbujas más utilizado, con el cual las burbujas se rompen en más pequeñas, lo que incrementa el área de contacto entre las fases líquido-gas y se tiene una mayor relación área interfacial/volumen (Roman y Tudose, 1997). Las burbujas generadas ascienden y responden al patrón de flujo del líquido, creado también por el impulsor.

Por otra parte, la transformación del caldo de fermentación de los cultivos miceliares, desde uno con características newtonianas de baja viscosidad (al inicio del cultivo) hasta una suspensión de características no-newtonianas, de alta viscosidad y altamente fluidificada, lleva a una disminución notable de la homogeneidad y a la aparición de zonas muertas o mal mezcladas, con limitaciones en la transferencia de materia y calor. Estas zonas sin movimiento dan por resultado un pobre desempeño de la fermentación, caracterizado por bajos rendimientos y productividades.

Una manera de controlar la hidrodinámica del reactor consiste en variar la velocidad de agitación. Sin embargo, la aplicación de altos esfuerzos mecánicos puede dañar al microorganismo (Vardar-Sukan, 1985), principalmente a microorganismos filamentosos. Otras estrategias para mejorar la transferencia de oxígeno son: cambiar el tipo de impulsor utilizado o incrementar el área interfacial gas- líquido.

En las dispersiones gas-líquido, el área interfacial está directamente relacionada con el tamaño de la burbuja, lo cual está determinado por un equilibrio dinámico de ruptura y de coalescencia de las burbujas y por diversos parámetros físico-químicos y reológicos del fluido, hidrodinámicos y de



operación, tales como la velocidad de agitación, del flujo de gases y la geometría del impulsor y del tanque (Tatterson, 1991).

La distribución del tamaño de las burbujas también está determinada por la composición del medio (Buchholz *et al.*, 1979) y la presencia de microorganismos, metabolitos o proteínas producidas por el microorganismo o por lisis celular. Concentraciones muy bajas de electrolitos, surfactantes, alcoholes o aceites también tienen un efecto importante sobre el tamaño de las burbujas (Drogaris y Weiland, 1983). Un incremento en la viscosidad del sistema favorece la coalescencia y disminuye el $k_L a$ exponencialmente (Tuffile y Pinho, 1970). En aquellos bioprocesos donde hay un incremento en la viscosidad aparente (al generarse mayores concentraciones celulares) conforme avanza el proceso (Cui *et al.*, 1998), el tamaño de las burbujas se incrementa, hay mayor coalescencia entre ellas y el área superficial específica se reduce (Kawase *et al.*, 1997; Tuffile y Pinho, 1970).

2.4. *Dispersión multifásica*

La dispersión de varias fases está involucrada en varios procesos industriales como la hidrogenación, los cultivos miceliares y los procesos oxidativos y de flotación en el tratamiento de aguas residuales (Nienow *et al.*, 1986). La fermentación de *Pseudomonas oleovorans* para producir un biosurfactante es otro sistema multifásico, donde se utiliza n-octano como sustrato orgánico, el cual incrementa significativamente el coeficiente de transferencia de oxígeno (van der Meer *et al.*, 1992).

Por lo general, las fermentaciones con hongos filamentosos involucran dispersiones multifásicas y complejas (Jüsten *et al.*, 1996) y son ampliamente utilizadas para la producción de una gran variedad de metabolitos primarios y secundarios, entre los que se incluyen enzimas industriales y antibióticos

(Pazouki y Panda, 2000). En cultivos sumergidos, estos hongos pueden crecer como micelio disperso o como *pellets* (agregados de hifas densamente empacados), en función de los factores que afectan el crecimiento celular, su morfología y rendimiento (Nielsen, 1996). El crecimiento filamentoso aumenta la viscosidad del medio y el cambio en la morfología afecta el consumo de nutrientes y la velocidad del consumo de oxígeno (Cui *et al.*, 1998). Hacia el final del proceso, donde se producen los cambios más drásticos en los diversos parámetros físico-químicos (viscosidad, fuerza iónica), hidrodinámicos (zonas “muertas”) y de operación (caídas de potencia) de estos cultivos filamentosos, se reduce la capacidad de transferencia de masa (Nienow, 1990b; Galindo *et al.* 1996; Rocha-Valadez *et al.*, 2000), requiriendo entonces un mayor suministro de energía para mantener el mezclado y aireación adecuados (Pazouki y Panda, 2000).

Un ejemplo de cultivo miceliar que involucra el mezclado de varias fases es la producción de aromas frutales por *Trichoderma harzianum* (Bonnarme *et al.*, 1997). Este hongo filamentoso, en presencia de glucosa como fuente de carbono, produce la 6-pentil- α -pirona, 6PP, lactona con aroma a coco (Bonnarme *et al.*, 1997); mientras que en cultivos con aceite de ricino, se produce la γ -decalactona, compuesto con aroma a durazno (Serrano-Carreón *et al.*, 1997). Este proceso es hidrodinámicamente complejo, requiere del mezclado de cuatro fases: aceite de ricino, medio acuoso, micelio y aire, además de generar caldos viscosos no-Newtonianos, con problemas de heterogeneidad y de transferencia de oxígeno durante el proceso (Serrano-Carreón *et al.*, 1997). Se han reportado diversas estrategias para disminuir la heterogeneidad del sistema, incrementar la transferencia de oxígeno y mejorar las condiciones hidrodinámicas que afectan la producción de la γ -decalactona en biorreactores (Serrano-Carreón *et al.*, 1997; Godoy-Silva *et al.*, 1997; Rocha-Valadez *et al.*, 2000). En este trabajo, la fermentación de γ -decalactona se utiliza como modelo de estudio,

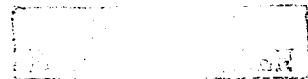
con el fin de analizar la dispersión de las fases inmiscible, gaseosa y biomasa en forma más detallada y obtener mayor información sobre el comportamiento del mezclado de las fases, los parámetros y mecanismos que afectan la dispersión y la productividad de los cultivos.

2.5. Impulsores

Entre las estrategias propuestas para controlar la hidrodinámica de estos cultivos complejos y disminuir las limitaciones por oxígeno está el modificar el tipo y/o diámetro del impulsor, para lo cual se debe analizar cuidadosamente la elección de los impulsores, ya que su eficiencia dependerá de las características del sistema, la reología del cultivo, el tipo de microorganismo y los requerimientos de agitación y aireación.

Los impulsores desempeñan dos funciones esenciales en todo biorreactor: dispersión de aire (transferencia de oxígeno) y la eliminación y/o reducción de gradientes y zonas "muertas" (homogeneidad en el medio). No obstante, durante el proceso, alguna de estas funciones puede estar limitada por las características reológicas de los caldos, la escala de operación, la demanda microbiana de oxígeno y la 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), recomendados para las dispersiones gas-líquido y los de flujo axial (que producen bajas velocidades de deformación) adecuados para bombear fluidos.

La potencia es una variable muy importante en los procesos de la ingeniería química y bioquímica para evaluar el desempeño del agitador. Se define como la cantidad de energía necesaria, en un



periodo de tiempo, para generar el movimiento del fluido dentro del biorreactor, tanque de mezclado o reactor químico, generalmente efectuado por agitación mecánica a través de impulsores. Es fuertemente dependiente de la hidrodinámica existente en el seno del reactor, la cual varía en función del tiempo de cultivo, de las características reológicas del cultivo, las condiciones de operación y de las características geométricas del tanque.

La potencia determina, en gran medida, la cantidad, calidad y costo del producto y de la operación del proceso. Por ello, es deseable que los procesos de mezclado se desarrollen eficientemente y se gaste el mínimo de energía para lograr el objetivo. La potencia también es utilizada como criterio de escalamiento, determina la transferencia de masa y calor, así como los tiempos de mezclado y de circulación (Charles, 1985). Comúnmente se le refiere como potencia volumétrica (P/V).

2.5.1. 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 dispersiones gas-líquido y líquido-líquido (Myers *et al.*, 1996).

La turbina Rushton, el impulsor más conocido y empleado tanto en la industria como en la investigación, pertenece a este grupo de impulsores. Esta turbina ha tenido 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. El disco de la turbina obliga a la corriente de aire



alimentada a pasar por la región de las paletas, zona de alta deformación, incrementando la turbulencia y al área interfacial de contacto entre las fases líquida y gaseosa, logrando un incremento en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno. Sin embargo, su uso y efectividad en cultivos reológicamente complejos ha sido muy cuestionado. El pobre mezclado generado en zonas alejadas de los impulsores y aledañas a las paredes del reactor ha demostrado que el uso de las turbinas Rushton es desfavorable en relación a otros impulsores evaluados, a pesar de los altos gradientes de deformación generados por estas turbinas, mismos que favorecen la formación de pequeñas regiones de excelente micromezclado (Buckland *et al.*, 1988; Amanullah *et al.*, 1998). Otro aspecto a considerar es que los números de potencia de estos impulsores son altos (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 (Myers *et al.*, 1996; Nienow, 1996). Al incrementar la aireación 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 (Nienow, 1996).

Por otra parte, el flujo radial provoca la formación de compartimientos en el biorreactor debido a la poca interacción vertical (axial) entre los componentes del medio, además de que los impulsores de este tipo son considerados impulsores de alto estrés hidrodinámico.

La dispersión de gases en fluidos de elevada viscosidad implica la formación de cavidades de aire más grandes y estables que se forman detrás de las paletas, mismas que se incrementan conforme aumenta la viscosidad y las cuales resultan ser prácticamente independientes del flujo de aire. Como consecuencia, la aireación provoca mayores caídas de potencia en los flujos viscosos, respecto a los de baja viscosidad, empleando velocidades de agitación similares (Nienow, 1990b).

La capacidad de bombeo de las turbinas disminuye a medida que aumenta la pseudoplasticidad, el punto de cedencia y la viscoelasticidad (Nienow y Ulbretch, 1985). Asimismo, la potencia suministrada en fluidos Newtonianos viscosos bajo condiciones aireadas y utilizando turbinas Rushton disminuye hasta alcanzar un valor mínimo, típicamente, alrededor de la mitad del valor obtenido sin aireación (Ozcan *et al.*, 1990).

2.5.2. 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 mayoría de los impulsores axiales son empleados en sistemas donde se requiere mantener partículas en suspensión y a la vez dispersar aire. Este es el caso del tratamiento de aguas residuales, cultivos filamentosos e hidrogenación de aceites vegetales, entre otros (Treybal, 1980). Una gran variedad de diseños axiales se ha empleado debido a sus características de flujo y mezclados, donde destaca la hélice o propela marina, la turbina con paletas inclinadas, los tipo "hydrofoil"; *Prochem Maxflo Tm* y los impulsores *InterMIG*. Tales características se basan en la combinación de algunas de las siguientes cualidades (Myers *et al.*, 1996; Nienow, 1996):

- Mejor interacción entre fases debido a los patrones de flujo generados.
- Reducción notoria de las regiones de baja presión, así como la formación de cavidades y/o vórtices aireados detrás de las paletas del impulsor (bajos 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.



Marco general y antecedentes

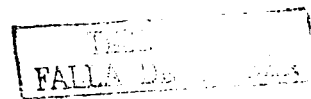
- Los bajos números de potencia generados permiten emplear impulsores con una alta relación diámetro del impulsor/diámetro del tanque (D/T), así como altas velocidades de agitación, por lo que se pueden aplicar flujos de aire relativamente altos sin “inundar” el sistema.
- Son considerados como impulsores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

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

- Bajo rompimiento de las burbujas de gas, lo que disminuye el área interfacial gas-líquido, debido a que los impulsores generan bajos gradientes de deformación.
- La oposición de flujos por parte de los impulsores (descendente) y del constante burbujeo (ascendente) generan frecuentemente cambios bruscos en los patrones de flujo del sistema, ocasionando inestabilidades y vibraciones dentro del biorreactor.

Con referencia en particular a los impulsores InterMIG deberá mencionarse que presentan un diseño de dos paletas, una interior y otra exterior, con inclinación en sentidos opuestos, lo cual les permite generar un patrón de flujo de tipo axial. Además, su relación de diámetros entre 0.6 y 0.9 les permite producir una disipación de energía uniforme y por lo tanto, homogenizar mejor que los impulsores radiales, teniendo tiempos de mezclado menores (Kipke, 1984). Este tipo de impulsor ha resultado apropiado para el mezclado en procesos que manejan viscosidades medias y altas, ya que proporciona una mejor transferencia de masa y calor. A nivel industrial, se ha implementado su uso en algunos procesos de fermentación, rindiendo beneficios por el significativo aumento en la productividad (Sittig, 1983; Kipke, 1984).

Los impulsores InterMIG se recomiendan en sistemas de dos fases (líquido-líquido o gas-líquido) para desarrollar condiciones de homogeneidad dentro del reactor. No obstante, para que la



dispersión se lleve a cabo eficientemente en estos sistemas, es necesario aplicar mayor energía que la aplicada por los impulsores radiales, para que la dispersión tenga lugar y se mantenga el equilibrio entre la coalescencia y la ruptura (Hentrich, 2000).

Nienow (1990b) comparó el desempeño de impulsores axiales con turbinas radiales en cultivos filamentosos de *P. chrysogenum* y *Streptomyces avermitilis*. El crecimiento filamentosos originó cambios drásticos en la reología de los caldos, lo cual generó caídas en la potencia ya que las cavidades de aire fueron más grandes y estables, independientemente del flujo de aire alimentado (Nienow, 1990b). En estos cultivos, los sistemas axiales fueron mejores para la homogeneidad del medio y el macromezclado del sistema, producto de los patrones de flujo generados.

2.6. Caracterización de las dispersiones

Una forma de caracterizar la dispersión multifásica en tanques agitados es medir la energía suministrada al fluido por medio de la agitación mecánica. Por muestreo es posible conocer el grado de dispersión de las fases y relacionarla con la potencia suministrada al fluido contenido en el tanque.

Sin embargo, estudiar las dispersiones desde este enfoque macroscópico, no reporta información sobre el área de transferencia de masa. A pesar de que las dispersiones líquido-líquido y gas-líquido son ampliamente utilizadas en procesos industriales, los estudios enfocados para cuantificar el área de transferencia de masa, especialmente aquellos donde se involucra una fase inmiscible y/o una fase sólida, son muy escasos.



Otra forma de medir el grado de dispersión de un sistema se lleva a cabo midiendo el tamaño de las gotas y de las burbujas (Dalmau *et al.*, 1998). El tamaño tanto de las gotas como de las burbujas proporciona información del área interfacial y está relacionado con la velocidad de transferencia de masa, así como con la velocidad de las reacciones que pueden ocurrir en el proceso (Podgórska y Baldyga, 2001).

Para estudiar la estructura de las dispersiones en forma más detallada (a un nivel microscópico) se ha utilizado la técnica de video/análisis de imágenes (Pacek *et al.*, 1994; Galindo *et al.*, 2000) con lo cual es posible tener información de la distribución de tamaños de gotas y/o burbujas en línea y sin interferir con los patrones de flujo de la dispersión, además de poder relacionar esta información con el área de transferencia de masa. Por ejemplo, en la producción de una lipasa extracelular por *Candida rugosa* en ácido oleico, que es también un proceso multifásico (Dalmau *et al.*, 1998) se observó que el tamaño de gota de aceite juega un papel muy importante en la productividad del mismo. Estos autores determinaron los tamaños de gotas de ácido oleico en función de la velocidad de agitación y encontraron que no obstante que los tamaños de gotas de ácido oleico son mayores, a bajas velocidades de agitación (300 rpm), se obtuvo una mayor producción de lipasa.

La forma más sencilla de representar la distribución de tamaños es en función de la densidad de probabilidad y se construye a través de una tabla de frecuencias y su histograma correspondiente. Las frecuencias pueden ser absolutas o relativas y se obtienen clasificando los tamaños de gotas/burbujas en los intervalos establecidos. Presentando los datos en forma de distribución acumulada de volumen, se puede observar la importancia de cada partícula y la forma en que el volumen total de la fase dispersa se distribuye en un eje de tamaños de gotas o burbujas. Aunque los



objetos pequeños (gotas/burbujas) abunden, sólo representan una pequeña parte del volumen total de la fase dispersa (Ramkrishna *et al.*, 1995).

La mayoría de las técnicas desarrolladas para determinar el tamaño de las gotas o burbujas en dispersiones se han utilizado para sistemas de dos fases (gas-líquido, líquido-líquido). Las que sólo determinan el área interfacial, proporcionan poca información sobre la dispersión, ya que es posible obtener valores similares del área interfacial para distribuciones de tamaños diferentes. El diámetro promedio es la cantidad convencional que caracteriza a un conjunto de gotas o burbujas y es un valor que proporciona información sobre la calidad de las dispersiones, ya que se toma en consideración el diámetro de burbujas/gotas del conjunto y el número de objetos que forman el conjunto de datos. La selección del tipo de diámetro promedio que mejor describa al conjunto de valores, depende del campo de aplicación (Tabla 1).

Entre las técnicas para determinar el diámetro de las gotas o burbujas están la medición de la transmisión de luz a través de una interfase (gas-líquido o líquido-líquido) (Rebelein y Blass, 1986) o a través de una sonda capilar de boro (Bae y Tavlarides, 1989); midiendo la diferencia de la velocidad de transmisión de una onda acústica en dos líquidos (Boyd y Varley, 1998); con un contador Coulter y la adición de materiales conductivos (Bae y Tavlarides, 1989) y por fotografía directa (Chen y Middleman, 1967; Coualoglou y Tavlarides, 1976). Algunos de estos métodos como los de transmisión de luz y reacción química sólo determinan el valor del área interfacial, mientras que las técnicas basadas en toma de muestra, perturban el flujo y rompen el equilibrio de rompimiento y coalescencia o modifican la distribución de tamaños. La aplicación de estas técnicas al sistema multifásico de la γ -decalactona no es adecuada, puesto que las gotas del aceite de ricino y

UNIVERSIDAD
FALTA

las burbujas de aire son de gran tamaño o sufren deformaciones al pasar por el capilar y modifican su tamaño real.

Tabla 1. Tipos de diámetros promedio (Bayvel y Orzechowski, 1993)

Diámetro promedio		Aplicación
Símbolo	Nombre	
d_{10}	Aritmético	Comparación simple entre sistemas dispersos
d_{20}	Superficie	Area superficial, fenómenos de superficie (e.g. absorción, vaporización)
d_{30}	Volumen	Control de volumen, fenómenos volumétricos
d_{21}	Superficie relativa	Desintegración de gotas, adsorción
d_{31}	Volumen relativo (Probert)	Evaporación, difusión molecular, combustión
d_{32}	Superficie-Volumen (Sauter)	Transferencia de masa y de calor
d_{43}	Masa (Broucker o Herdan)	Fraccionamiento de gotas, combustión

Entre los diámetros promedio considerados, el diámetro Sauter es el más utilizado, al relacionar el área interfacial (a) por unidad de volumen y el área para la transferencia de masa (Zhou y Kresta , 1998b). Sin embargo, el diámetro Sauter por sí sólo no puede caracterizar una dispersión, en vista de que es posible obtener un mismo valor del diámetro promedio para dispersiones con distribuciones de tamaños diferentes (Zhou y Kresta , 1998b). Por tanto, para un mejor entendimiento de las dispersiones, además de medir el diámetro promedio, se cuantifica toda la distribución de tamaños. El diámetro Sauter se obtiene a partir de mediciones del diámetro de gotas o burbujas. Por



definición, es mayor que el diámetro aritmético d_{10} y está altamente influenciado por las burbujas/gotas de mayor tamaño (Machon *et al.*, 1997).

El diámetro Sauter se define, para cualquier distribución de valores discretos de la siguiente manera:

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^3}{\sum_{i=1}^n d_i^2} \quad (1)$$

en donde, n es el número de objetos en la población, d_i es el diámetro de la gota o burbuja i en μm .

La relación entre el diámetro Sauter (d_{32}) y el área interfacial por unidad de volumen, a , es:

$$a = \frac{6\phi}{d_{32}} \quad (2)$$

Donde ϕ es la fracción volumétrica de la fase inmisible.

Para estimar el diámetro Sauter se utilizan algunas correlaciones donde se considera la energía de disipación, la densidad de la fase continua y la tensión superficial (gas-líquido) o interfacial (líquido-líquido) como función del mismo diámetro Sauter (Zhou y Kresta, 1998a). Sin embargo, tales correlaciones están desarrolladas bajo condiciones que generalmente no aplican para sistemas biológicos (que contienen microorganismos), ya que, como en el caso de cultivos miceliar, la biomasa modifica las propiedades reológicas del sistema. Además, debe considerarse la presencia de compuestos que modifican la tensión superficial, como proteínas y enzimas extracelulares. Por tanto, las técnicas más adecuadas para caracterizar dispersiones multifásicas, son las que presentan la cualidad de cuantificar la distribución de tamaños de gotas y burbujas, en presencia o no de sólidos. Tal versatilidad sólo la presentan las técnicas basadas en fotografía y en el procesamiento digital de imágenes por medio de una computadora.



2.7 Análisis de imágenes

Una imagen es la representación visual de un objeto o un grupo de objetos. El análisis cuantitativo de las imágenes empezó en la década de los 60's con mediciones manuales de los objetos (ver revisión de Brito-Albavera, 2001). Estas mediciones posteriormente se sistematizaron con el uso de una computadora. El análisis de imágenes en la caracterización de dispersiones ha sido usado desde hace muchos años para evaluar dispersiones gas-líquido y líquido-líquido, por medio del dimensionamiento manual de gotas o burbujas de fotografías tomadas en la pared del tanque (Chen y Middleman, 1967). Sin embargo, el análisis de fotografías de dispersiones es un método tedioso, que requiere de mucho tiempo para tomar fotografías, revelarlas y analizarlas. La técnica de procesamiento digital de imágenes consiste en una combinación del video y las técnicas computacionales, la cual facilita la cuantificación de los tamaños de gotas (Pacek *et al.*, 1994) y burbujas (Machon *et al.*, 1997).

Para que una imagen pueda ser procesada con una computadora, necesita ser digitalizada, es decir, convertida en una forma numérica. Para ello, se divide en una cuadrícula bidimensional. A cada pequeña región se le llama pixel. Cada pixel se reconoce por su posición en la cuadrícula y contiene la información de luminosidad y color correspondiente a ese punto de la imagen en *bits* (la menor cantidad de información reconocida por una computadora). Dependiendo de la resolución de la imagen es el número de *bits* que lo representan (ver revisión de Brito-Albavera, 2001).

Pacek *et al.* (1994) describieron una metodología para cuantificar gotas usando una técnica de análisis de imágenes/videograbación. Esta consistía en un estereomicroscopio que tenía acoplada



una cámara de video que enviaba su señal a una videogradora. Las imágenes grabadas se desplegaban en una computadora donde se medían las gotas manualmente. Machon *et al.* (1997), utilizando el mismo equipo, cuantificaron los tamaños de burbujas como función de la tensión superficial. Dalmau *et al.* (1998) midieron los tamaños de gotas de un sistema modelo de tres fases (medio acuoso, aceite y aire) para la producción de una lipasa. Recientemente, Galindo *et al.* (2000) demostraron la factibilidad de la técnica para estudiar dispersiones de hasta cuatro fases. El procesamiento de las imágenes es completamente digital a través de una cámara conectada a una tarjeta que captura las señales de video y las transfiere a la computadora, sin requerir un sistema de videogración. En colaboración con el Laboratorio de Imágenes del Centro de Investigaciones Aplicadas y Desarrollo Tecnológico - UNAM, se diseñaron algoritmos para obtener imágenes de calidad (Brito-Albavera, 2001; Taboada *et al.*, 2003). Bajo este mismo principio, en el laboratorio del Dr. Galindo se ha desarrollado equipo para llevar a cabo diversas investigaciones relacionadas con el tema de dispersiones multifásicas, particularmente aquellas involucradas en procesos de fermentación.

El análisis de imágenes en la caracterización de dispersiones permite obtener imágenes del experimento *en línea*, sin necesidad de una toma de muestra y la captura casi instantánea de imágenes de la distribución de tamaños de gotas. Ello permite un análisis cuantitativo de la dispersión, así como de la estructura de la misma, describiendo la presencia de burbujas en gotas, gotas en gotas, interacciones aceite-micelio-aire y también permite cambiar de magnificación rápidamente, para un análisis más detallado de distribuciones muy amplias (Brito-Albavera, 2001).

En los sistemas multifásicos de gran complejidad y con la presencia de la biomasa, el estudio de la interacción de las fases no ha sido sistemático y la información sobre la medición del tamaño de las



gotas o burbujas es muy limitada. Galindo *et al.* (2000) utilizaron el modelo de la fermentación de γ -decalactona y la técnica de análisis de imágenes para determinar las distribuciones de tamaños de gotas y burbujas como función de la concentración de aceite de ricino y de biomasa. Se observó un incremento en el tamaño de las gotas de aceite al incrementar la concentración de la fase dispersa en los sistemas medio acuoso-aceite y medio acuoso-aceite-aire. Tanto la presencia de biomasa como el incremento en la concentración de la misma en el sistema, originó una disminución en el tamaño de las gotas de aceite en ambos sistemas (con y sin aire). Otros estudios en el grupo de investigación se realizan para evaluar el efecto de otros parámetros en la dispersión del aceite de ricino y del aire, tales como la morfología miceliar del hongo (Lucatero, 2002) y la presencia de agentes tensoactivos (Pulido, 2003). Con el fin de tener información más detallada sobre los parámetros que influyen en la dispersión de la fase inmiscible y del aire y entender las complejas interacciones que ocurren entre las fases, en este trabajo, se caracterizaron las dispersiones líquido-líquido y líquido-gas por observaciones microscópicas de las gotas de aceite y de las burbujas de gas dispersas. Estas observaciones posteriormente se procesaron mediante análisis de imágenes como función de la viscosidad del sistema, generada por la presencia de biomasa o por la presencia de otros agentes espesantes en la fase acuosa del sistema. Asimismo, se caracterizó a nivel macroscópico la dispersión del aceite de ricino y de la biomasa en función de la potencia volumétrica en sistemas modelo de dos, tres y cuatro fases, utilizando dos configuraciones de impulsores (turbinas Rushton e impulsores InterMIG) y simulando dos condiciones del proceso: al inicio, con alta concentración de aceite (15 %)/baja concentración de biomasa (1.4 g/L), y al final, con baja concentración de aceite (2 %)/alta concentración de biomasa (10.6 g/L).



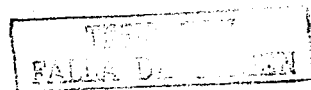
3. Objetivos

General

Analizar el comportamiento de las dispersiones de aceite, biomasa y aire en un sistema modelo de fermentación que involucra hasta cuatro fases

Objetivos particulares

- Desarrollar un fluido experimental modelo que simule las características de un cultivo de *Trichoderma harzianum* creciendo en un aceite vegetal.
- Caracterizar la dispersión del aceite y la biomasa –a nivel macroscópico– en sistemas modelo de complejidad creciente (agua-aceite, agua-aceite-aire, agua-micelio, agua-aceite-micelio, agua-aceite-aire-micelio), que simulen los problemas de mezclado líquido-líquido, líquido-gas y líquido-gas-sólido, en función de la potencia volumétrica.
- Caracterizar la dispersión del aceite y del aire en sistemas modelo a nivel microscópico y analizar la interacción de las burbujas de aire con el aceite de ricino, en presencia o no de micelio de *Trichoderma harzianum*.
- Determinar el grado de influencia de la viscosidad de la fase continua en la dispersión del aceite y la dispersión del aire.

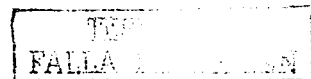


4. Estrategia experimental

Este trabajo forma parte de una línea de investigación del grupo del Dr. Galindo donde se ha desarrollado amplia experiencia en el mezclado de procesos de fermentación de reología compleja y alta viscosidad. Se utiliza como modelo de estudio, la fermentación de γ -decalactona con el fin de analizar la dispersión de la fases inmisible, gaseosa y biomasa en sistemas multifásicos y estudiar detalladamente las interacciones complejas entre las fases, así como evaluar la influencia de varios factores sobre el grado de dispersión líquido-líquido, líquido-líquido-gas y líquido-líquido-gas-sólido.

Se utilizó al caldo agotado de la fermentación de *Trichoderma harzianum* como fase acuosa y el micelio disperso de *Trichoderma*, obtenido a partir de cultivos de fermentador de 10 litros, tamizado y lavado para evaluar su efecto sobre la dispersión de la fase inmisible (aceite de ricino) y del aire. Para simular el efecto del incremento de la viscosidad durante la fermentación se modificó la viscosidad de la fase acuosa con un fluido newtoniano (glicerol) y otro no-newtoniano (CMC).

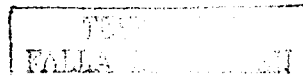
La dispersión del aceite y de la biomasa se caracterizó cuantificando la fracción de aceite y biomasa dispersada en el punto de muestreo (además de la potencia suministrada) en cada uno de los sistemas de dos fases (agua-aceite o caldo-aceite), tres fases (caldo-aceite-aire) y cuatro fases (caldo-aceite-biomasa-aire). Para esta caracterización se consideraron dos configuraciones de impulsores: turbinas Rushton e impulsores InterMIG y dos etapas de la fermentación: una etapa inicial, con alto contenido de aceite y baja concentración de biomasa y una etapa final, con bajo contenido de aceite y alta concentración de biomasa.



Asimismo, a nivel microscópico se evaluó el efecto de la concentración de biomasa y de la viscosidad de la fase continua sobre la dispersión de las fases orgánica y gaseosa, determinando los diámetros de las gotas de aceite y de las burbujas de aire por análisis de imágenes.

Los resultados de la caracterización macroscópica y microscópica de las dispersiones de la fase inmisible, gaseosa y biomasa se presentan en dos secciones. La primera sección corresponde a la caracterización de las dispersiones de aceite y biomasa a nivel macroscópico para los sistemas de dos, tres y cuatro fases. En la segunda sección se presenta la caracterización de las dispersiones de aceite y aire a nivel microscópico en función del contenido de aceite y la viscosidad del sistema, modificada por la presencia de biomasa, por un agente espesante newtoniano (como el glicerol) o por uno no-newtoniano (como la carboximetilcelulosa) en la fase acuosa.

Cabe señalar que la mayor parte de la caracterización macroscópica ha sido publicada en el *J. Chem. Technol. Biotechnol.* (Córdova-Aguilar, M.S., Sánchez, A., Serrano-Carreón, L. and Galindo, E. (2001) Oil and fungal biomass dispersion in a stirred tank containing a simulated fermentation broth, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76:1101-1106) y algunos aspectos de la caracterización microscópica han sido publicados en el *Can. J. Chem. Eng.* (Larralde-Corona, P., Córdova-Aguilar, M. S. and Galindo, E., (2002) Distribution of the free and oil-trapped air bubbles in simulated broths containing fungal biomass, *Can. J. Chem. Eng.* 80(5): Junio). Ambas publicaciones se incluyen en los apéndices A y B de este documento.



5. Materiales y Métodos

Fases continua, discontinua y sólida

Fase continua

La fase continua de los sistemas de dos fases (aceite-caldo), tres fases (aceite-caldo-aire) y cuatro fases (aceite-caldo-biomasa-aire) fue el caldo de cultivo agotado (filtrado), obtenido al final de la fermentación (ver más adelante). Su viscosidad y densidad fueron similares a las del agua y la tensión superficial fue de 62 mN/m (determinada con un Tensiómetro 20 de Fisher Scientific, USA). Algunos experimentos para caracterizar el mezclado líquido-líquido del aceite de ricino y la fase acuosa, se llevaron a cabo con agua destilada.

La fase continua en los sistemas para evaluar la dispersión de aceite y aire por análisis de imágenes y el experimento con carboximetilcelulosa (CMC, 0.6 % p/v), consistió en el medio de cultivo para *T. harzianum* (Serrano-Carreón *et al.*, 1997) utilizado previamente por Galindo *et al* (2000), cuya composición fue en g/L: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5, KH_2PO_4 , 7, NaHPO_4 , 2, MgSO_4 , 1.5, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.067, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0001 y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.008, ajustando el pH (5.6) con ácido fosfórico. Por otra parte, la fase continua de las soluciones para evaluar el efecto de la viscosidad en la dispersión de las fases orgánica y gaseosa consistió de agua destilada con glicerol (Fermont) en concentraciones de 5, 20, 60 y 75 % (p/v) que permitieron obtener soluciones con 1.12, 2, 20 y 40 cp.

Fase discontinua

La fase orgánica dispersa en todos los casos fue aceite de ricino, grado alimenticio (Aldrich Chemical Co.). La densidad del aceite fue de 960 g/L y la viscosidad fue de 560 cp a 26° C. La

condición inicial de la fermentación de *T. harzianum* implica una alta concentración de aceite y una baja concentración de biomasa correspondiente al inóculo. Por el contrario, la condición final de la fermentación implica una baja concentración de aceite, al ser hidrolizado y consumido como fuente de carbono por el microorganismo y una alta concentración de biomasa. De ahí que las concentraciones de aceite seleccionadas fueron 15 % (p/v) y 2 % (p/v) para simular las condiciones inicial y final de la fermentación, respectivamente. El aceite de ricino de las muestras se cuantificó por doble extracción con n-hexano, utilizando 5 ml de n-hexano en la primera extracción y 3 ml en la segunda extracción. El n-hexano se evaporó a temperatura ambiente. Los tubos de ensayo prepesados con la fracción de aceite se secaron a peso constante a 80° C (12 –18 h) y se cuantificaron por gravimetría. La dispersión de aceite se definió como la cantidad (g/L) y el porcentaje de aceite en la fase acuosa en forma dispersa.

El efecto de la concentración de aceite en las dispersiones de la fase orgánica y del aire se evaluó utilizando concentraciones de 2, 5, 10 y 15 % (v/v) de aceite de ricino y para los experimentos con CMC y glicerol, se utilizó al 10 % (v/v).

Fase sólida

Se utilizó el hongo filamentoso *Trichoderma harzianum* IMI 206040 en todos los casos. Las concentraciones fueron 1.4 g/L y 10.6 g/L de micelio fresco, simulando las condiciones inicial y final de la fermentación, respectivamente. Otras concentraciones de biomasa fueron 0.5, 2 y 5 g/L, cuya morfología fue la de micelio disperso, similar a la utilizada por Galindo *et al.* (2000). La morfología del micelio disperso fue determinada en un sistema de análisis de imágenes formado por una cámara CCD (Nikon color, KP-D50) montada en un microscopio (Nikon Optiphot –2) acoplado a una computadora con el programa comercial *Image Pro Plus 4.1* (Media Cybernetics, MD, EUA).

ELITE SYSTEM

El micelio tuvo un diámetro promedio de 280 μm (promedio de las longitudes de trazos a través del centro de gravedad del micelio) y una porosidad de 0.7 (densidad de objeto).

Producción de biomasa

El procedimiento para obtener la biomasa de *T. harzianum* utilizada en los sistemas donde se evaluaron las dispersiones de aceite y aire fue como lo describen Galindo *et al.* (2000), mientras que para los experimentos de dispersión de la biomasa como función de la potencia volumétrica en los sistemas de tres (aceite-caldo-biomasa) y cuatro fases (aceite-caldo-aire-biomasa), la producción del inóculo y la composición del medio de fermentación fueron similares a las reportadas anteriormente por Serrano-Carreón *et al.* (1997), sustituyendo la fuente de carbono (aceite de ricino) por glucosa. Se realizó una fermentación en un fermentador de 350 L para producir el micelio. El fermentador ($T = 0.69$ m) está equipado con dos turbinas Rushton ($D/T = 0.43$) y sondas para pH y oxígeno disuelto. El cultivo se controló a 29 °C. La velocidad de agitación fue de 1.083 s^{-1} y la velocidad del flujo de aire fue de 1 vvm. El pH se mantuvo a 5.6 por adición automática de NaOH (2N). El micelio se cosechó después de 96 h de cultivo y el caldo de cultivo agotado se filtró a través de gasa, se colectó y almacenó a 4 °C para utilizarse posteriormente como fase acuosa. La biomasa recuperada fue resuspendida en el caldo agotado a las concentraciones seleccionadas. La biomasa se cuantificó por peso seco como se ha reportado anteriormente (Serrano-Carreón *et al.*, 1997).

Condiciones de mezclado y medición de potencia

Los experimentos para caracterizar la dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica en sistemas de dos fases (aceite-caldo o aceite-agua), de tres fases (aceite-caldo-aire) y la dispersión de biomasa en sistemas de cuatro fases (aceite-caldo-biomasa-aire), se llevaron a cabo en un tanque de



mezclado de 10 L, montado en un dinamómetro de cojinete neumático (Reséndiz *et al.*, 1991), utilizando como configuración de impulsores, tres turbinas Rushton ($D/T = 0.33$) y tres impulsores InterMIG ($D/T = 0.52$). La figura 1 muestra un diagrama esquemático del tanque de mezclado usado para esta parte del trabajo. La aireación fue de 1.0 vvm y la velocidad de agitación se varió de 1 a 6.5 s^{-1} .

La caracterización de las dispersiones de aceite y aire se llevó a cabo en un tanque de mezclado de vidrio de 0.21 m de diámetro interno y una altura de 0.24 m, con cuatro deflectores y una turbina Rushton ($D/T = 0.33$) localizada a 0.10 m con respecto al fondo del tanque (figura 2), operando a una velocidad de agitación de 3.33 s^{-1} y acoplado a un sistema de adquisición y análisis de imágenes. Este sistema ha sido descrito en detalle por Brito-Albavera (2001) (figura 3) y consiste en un estereomicroscopio triocular (Olympus SZ1145ESD) conectado a una cámara de video de alta resolución (Hitachi KP-D50, color NTSC digital), que utiliza una fuente de luz estroboscópica (EG & G Optoelectronics, modelo MVS-2600) y un circuito de sincronización que acopla la señal de la cámara al encendido de la lámpara. La luz estroboscópica es conducida al interior del tanque de mezclado a través de una sonda de fibra óptica (Metas, UK) sumergible de 1 m de longitud y un diámetro de salida de luz de 0.4 mm.

Por medio de este sistema es posible capturar imágenes del interior del tanque y medir el diámetro de las gotas o burbujas, utilizando las herramientas del programa comercial *Image-Pro Plus v.4.1* (Media Cybernetics, USA) y los algoritmos específicos que se desarrollaron para el procesamiento de las imágenes (Taboada *et al.*, 2003).



En todos los experimentos, la temperatura interior del tanque y de la chaqueta se mantuvo en 29 °C mediante un baño de recirculación (Polyscience, México).

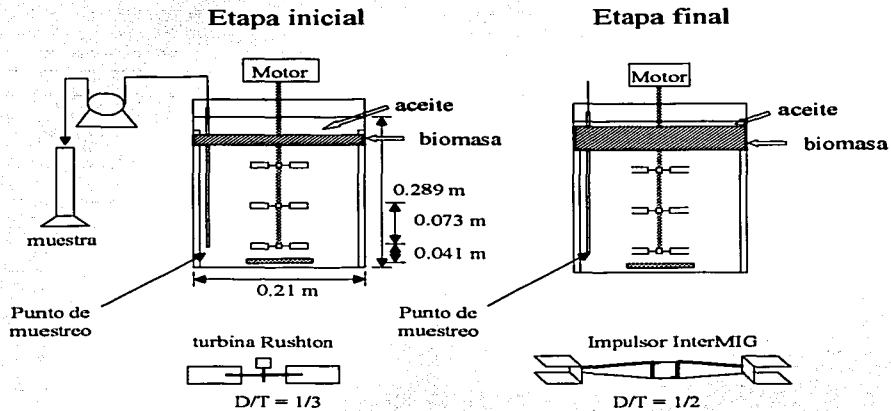
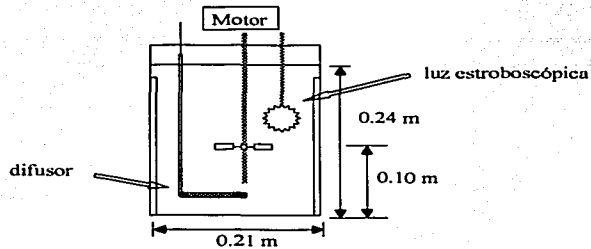


Figura 1. Diagrama esquemático del tanque de mezclado usado para caracterizar la dispersión de aceite y biomasa (cuando estuvo presente) en función de la potencia volumétrica en sistemas de dos, tres y cuatro fases.



TRIP
FALLA DE

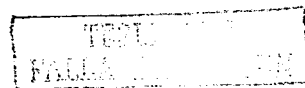
Figura 2. Diagrama esquemático del tanque de mezclado usado para caracterizar las dispersiones de aceite y aire a nivel microscópico

Cuando el sistema fue aireado se usó un flujo de aire de 0.25 vvm. En el caso de los experimentos en los que se usaron soluciones de CMC, el tanque y el impulsor fueron similares al equipo usado anteriormente por Galindo *et al.* (2000), con un tanque de vidrio de 0.15 m de diámetro (T) y 0.118 m de altura del líquido, dando un volumen de 2 L, equipado con una turbina Rushton ($d = 0.07$ m), colocada a 0.06 m del fondo del tanque. La temperatura fue controlada a 26 °C con una chaqueta de agua. El aire fue suministrado por un difusor sinterizado de acero inoxidable, colocado debajo del impulsor. El flujo de aire se fijó a 0.25 vvm y la velocidad de agitación a 4.16 s⁻¹.

Dispersión de aceite, biomasa y aire

Para caracterizar la dispersión de aceite y biomasa en función de la potencia volumétrica en sistemas de dos, tres y cuatro fases se tomaron muestras de 10 ml para cada velocidad de mezclado utilizando una bomba peristáltica para determinar las fracciones de aceite y de biomasa (cuando estaba presente) en el punto de muestreo, el cual estaba localizado frente al impulsor inferior (figura 1).

Por otra parte, la dispersión de las fases orgánica y gaseosa en medio acuoso se cuantificó evaluando el diámetro de las gotas de aceite o de las burbujas de aire, contando un mínimo de 500 objetos por muestra (error <10 %). Prácticamente en todas las imágenes se observaron objetos esféricos. Su volumen fue entonces calculado usando su diámetro, el cual se consideró como el de una esfera. La medición de las burbujas y gotas en el plano medio entre los deflectores se efectuó 30 minutos después de iniciado el experimento para poder llegar a un equilibrio de las fases.



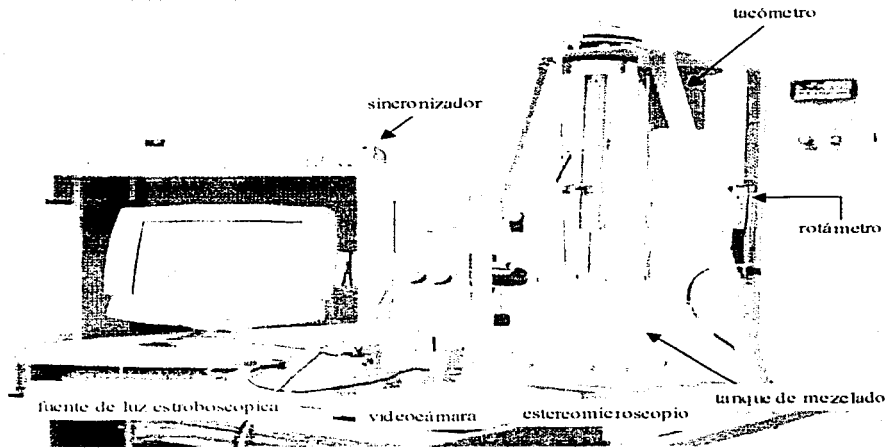


Figura 3. Arreglo experimental para caracterizar la dispersión de aceite y aire basado en análisis de imágenes.

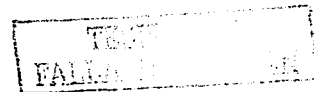
Determinación del comportamiento de flujo

Las evaluaciones reológicas de las suspensiones de micelio se llevaron a cabo bajo el régimen laminar utilizando un impulsor helicoidal (Bongenaar *et al.*, 1973; caracterizado y calibrado según Godoy-Silva, 1998, adaptado a un reómetro Rheomat 120 (Contraves, Zurich, Suiza) operando a 29 ° C. Los datos de las suspensiones de micelio (γ , 0.1 – 500 s⁻¹) se ajustaron al modelo de ley de potencia ($r^2 = 0.9971$) como lo han descrito Brito de la Fuente *et al.* (1996). Los valores de K fueron 0.015 y 0.082 Pa • sⁿ para las suspensiones de micelio de 1.4 y 10.6 g/L, respectivamente. Los índices de comportamiento del flujo fueron de 0.21 y 0.16, respectivamente. Las propiedades reológicas de las suspensiones de micelio fueron estables durante los experimentos de mezclado y después de los mismos.

Las viscosidades del caldo agotado y de las soluciones de glicerol y CMC se determinaron con el dispositivo de cilindros concéntricos DIN 125 (en cm, $d = 2.5$, $h = 4.5$; $D = 2.7$, $H_1 = 15$), acoplado al reómetro *Rheomat 120* (Contraves, Zurich, Suiza) operando a 29°C . El valor de K fue de $0.11 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ y de $n = 0.768$ para la solución de CMC. Las soluciones de glicerol de 5, 20, 60 y 75 % (p/v) utilizadas tuvieron 1.12, 2, 20 y 40 cp de viscosidad (γ , $0.1 - 800 \text{ s}^{-1}$)

Tensión superficial

La tensión superficial de las soluciones utilizadas en todo el trabajo se midió utilizando el método del anillo (du Nouy) reportado por Clarkson *et al.* (1999), en un tensiómetro marca Fisher (Modelo 20), calibrado previamente de acuerdo al manual suministrado por el fabricante y comparando con la tensión superficial del agua (67 mN/m). Los valores experimentales se corrigieron por el factor de corrección 0.925 calculado para el diámetro del anillo de platino-iridio utilizado (5.915 cm).



6. Resultados y discusión

6.1. Caracterización macroscópica

6.1.1. Turbinas Rushton

Sistemas de dos fases

Dispersión de aceite

En un primer acercamiento para caracterizar la dispersión del aceite de ricino, en un sistema de dos fases, se utilizó agua destilada como fase continua. Sin embargo, en la fermentación, la fase acuosa inicialmente consiste de una solución rica en sales que se va modificando conforme avanza el proceso, debido a los diversos compuestos producidos y excretados al caldo por *T. harzianum* durante el cultivo, v.g. enzimas hidrolíticas y otras proteínas (Peberly, 1994). Por lo tanto, para simular las características de un cultivo de *Trichoderma harzianum*, se utilizó como fase acuosa al caldo de cultivo agotado filtrado y obtenido al final de una fermentación de *Trichoderma harzianum*. En la figura 4 se observa que la dispersión de aceite fue mejor en los sistemas caldo - aceite que en los sistemas agua - aceite (15 y 2 % de aceite), para $P/V < 0.3$ W/L. La composición de la fase acuosa tiene un efecto complejo sobre la dispersión de aceite (Chen y Middleman, 1967) y la presencia del aceite tiene su efecto sobre la tensión superficial del sistema. Asimismo, las proteínas y los otros productos metabólicos excretados al medio por *T. harzianum*, presentes en el caldo agotado actúan como agentes surfactantes, al igual que el aceite y disminuyen la tensión superficial de los sistemas caldo-aceite (hasta 62 mN/m), lo cual contribuye a una mejor dispersión del aceite en estos sistemas, al requerir menor energía. Por otra parte, estos metabolitos también estabilizan las dispersiones de aceite en los sistemas caldo-aceite (May *et al.*, 1998), como se ha reportado en otros sistemas (Prins y van't Riet, 1987).



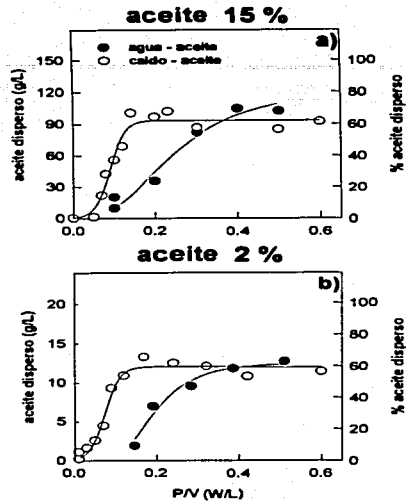


Figura 4. Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para concentraciones de aceite de ricino al 2 % (w/w) y al 15 % (w/w), con turbinas Rushton en sistemas de dos fases. Agua - aceite (●);caldo - aceite (○).

A potencias mayores a 0.3 W/L se observó que la dispersión es independiente de la potencia aplicada. Un incremento de la turbulencia en el sistema favorece una mayor dispersión de la fase inmisible y un aumento en el área de transferencia. Bajas potencias favorecen la coalescencia de la fase orgánica y por tanto la separación de las fases. En otros sistemas, incluso donde la fase orgánica es un solvente se ha observado que la productividad específica del metabolito aumenta conforme la potencia es mayor. La dispersión de la fase orgánica es más eficiente al disminuir el tamaño de gotas y por tanto aumentar el área entre las fases (Armenante y Huang, 1992; Pacek et al., 1998). Al obtener una mejor dispersión de aceite en los sistemas caldo-aceite, los experimentos subsecuentes

de la caracterización macroscópica se realizaron con el caldo agotado de la fermentación. Estos resultados obtenidos del análisis macroscópico se complementan con los obtenidos en el análisis microscópico, que se explican en la siguiente sección.

Sistemas de tres fases

Aceite-caldo-aire

Como se muestra en la figura 5, la presencia de la tercera fase (aire) en el sistema caldo - aceite tuvo diferentes efectos sobre la dispersión de aceite.

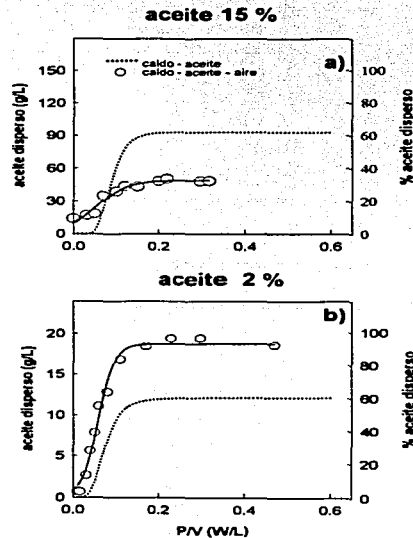


Figura 5. Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para concentraciones de aceite de ricino al 2 % (w/w) y al 15 % (w/w), con turbinas Rushton en sistemas de dos y tres fases. Caldo - aceite (.....) y caldo - aceite - aire (O).



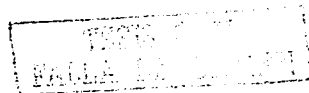
En el sistema con 15 % de aceite, la aireación tuvo un efecto negativo en la dispersión de aceite (figura 5 a). El alto contenido (15 %) de aceite permanece en la parte superior y la presencia del aire promueve la formación de una emulsión aire – aceite en la parte superior del reactor, lo que hace difícil la interacción entre las fases inmiscibles y favorece la separación de las mismas. Por el contrario, cuando el aceite se encuentra a una baja concentración (2 %) (figura 5 b), éste es fácilmente dispersado y por tanto, las fases líquidas son homogéneas en el reactor.

La emulsión aire – aceite ha sido observada también en la fermentación del cultivo de *Trichoderma harzianum* (Rocha-Valadez *et al.*, 2000), lo cual aparentemente controla la interacción de las fases y el nivel de homogeneidad en el sistema. Galindo *et al.*, (2000) reportó que la introducción de aire al sistema incrementa el tamaño de gotas de aceite debido principalmente a la introducción de burbujas en el interior de las gotas de aceite y a la caída de potencia suministrada al sistema. Estos resultados se corroboran con el análisis microscópico, que se presenta en la siguiente sección. La presencia de las burbujas de aire que están atrapadas dentro de las gotas de aceite (Galindo *et al.*, 2000) hace evidente que el aire está en contacto con el sustrato inmiscible (aceite de ricino); sin embargo, las implicaciones en la transferencia de oxígeno son muy diferentes al mecanismo convencional de transferencia del oxígeno, ya que transferir oxígeno de una burbuja al aceite (560 mPa) es muy diferente al de una burbuja a la fase acuosa (1 mPa), lo que posiblemente favorece la separación de las fases líquidas y modifica la disponibilidad del sustrato en el sistema de fermentación.

Sistema de cuatro fases

Dispersión de aceite

En los sistemas con cuatro fases, la presencia de biomasa fresca ocasiona efectos diferentes sobre la dispersión de aceite. En el sistema de 15 % (w/w), con 1.4 g/L (figura 6 a), se observa una drástica caída en la dispersión de aceite. Este efecto negativo se debe la presencia de la biomasa y el aceite en la parte superior, lo que vuelve más difícil de dispersar a la mezcla de aire-aceite y no permite la interacción entre las fases inmiscibles. Por tanto, se acentúa la segregación de las fases inmiscibles.



Por el contrario, la adición de biomasa fresca (10.6 g/L) al sistema de 2 % (w/w) de aceite favoreció considerablemente la dispersión del aceite (figura 6 b). La presencia de biomasa permite que un mayor porcentaje de aceite se disperse, debido a que el aceite se adhiere al micelio y el área de contacto biomasa/aceite es mayor. Probablemente con la presencia de alta concentración de biomasa, la colisión de las gotas de aceite y el micelio se favorece (Large *et al.*, 1998) lo cual permitiría incrementar el acceso del sustrato al microorganismo y reducir el paso limitante inicial de los cultivos en sustratos inmiscibles.

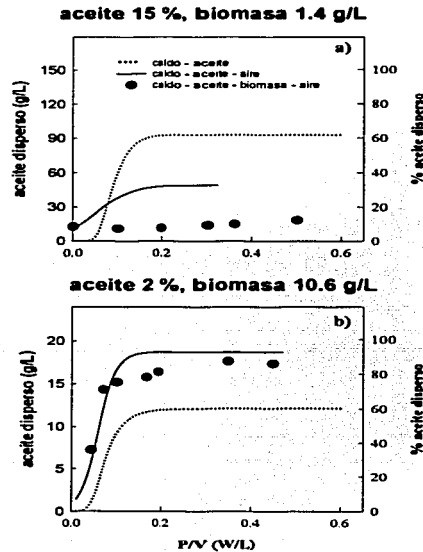


Figura 6. Dispersión de aceite como función de la potencia volumétrica en sistemas de dos, tres y cuatro fases para las dos condiciones simuladas de la fermentación. Aireación = 1 vvm. Caldo - aceite (.....), caldo - aceite - aire (- - -) y caldo - aceite - biomasa - aire (●).

Asimismo, el micelio puede atrapar algunas burbujas de aire y reducir la coalescencia de las mismas (Galindo *et al.*, 2000), lo cual en general mejora considerablemente la dispersión de aceite. Se ha reportado que la coalescencia de las burbujas de aire disminuye en presencia de partículas sólidas (Nienow *et al.*, 1986), debido al fenómeno de adhesión de la mayor parte de las partículas a las burbujas, quedando algunas aún suspendidas en la fase acuosa. En un trabajo paralelo a éste (Lucatero, 2002), donde se evaluó el efecto de la concentración y la morfología miceliar sobre las dispersiones de aceite y aire, se observó -en varias de las imágenes capturadas- la adhesión del micelio disperso a las burbujas de aire e incluso a las gotas de aceite, lo cual corrobora el efecto positivo de la biomasa en la dispersión del aceite.

Dispersión de biomasa

Con respecto a la dispersión de biomasa como función de la potencia volumétrica, en el sistema de cuatro fases (aceite-caldo-biomasa-aire) con alto contenido de aceite (15 %) y baja concentración de biomasa (1.4 g/L) (figura 7 a), se observa una dispersión menor del 30 % del total. En contraste, para el sistema de aceite 2 % y biomasa 10.6 g/L, se obtiene que la dispersión fue mayor del 80 % del total a P/V mayor de 0.2 W/L (figura 7 b). La baja cantidad de biomasa dispersada en el sistema de alto contenido de aceite coincide con lo observado con la dispersión de aceite y en la fermentación, donde al principio del proceso (alto contenido de aceite y baja concentración de biomasa), la segregación controla la dispersión de aceite y biomasa, mientras que al final del proceso, la alta concentración de biomasa dispersada es el factor que facilita la dispersión de aceite, funcionando como acarreador, logrando una mejor dispersión de la fase inmiscible.



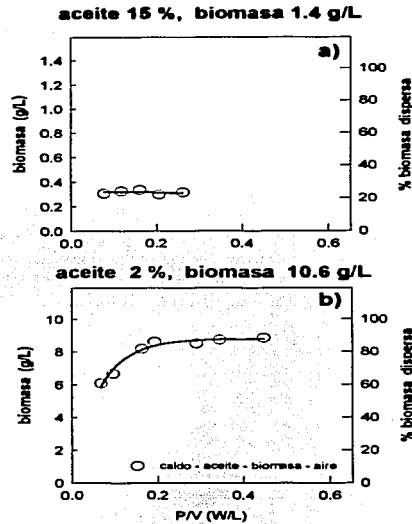


Figura 7. *Dispersión de biomasa como función de la potencia volumétrica para condiciones de alto contenido de aceite /baja concentración de biomasa y bajo contenido de aceite/ alta concentración de biomasa en sistemas de cuatro fases. Aireación = 1 vvm.*

Homogeneidad del sistema

El grado de dispersión de aceite y de biomasa indica la homogeneidad del sistema. En la Tabla 2 se muestran los niveles de dispersión de aceite y biomasa obtenidos con turbinas Rushton, a P/V = 0.2 W/L, condición a partir de la cual se observó que la dispersión es independiente de la potencia aplicada.



Resultados y discusión

En un sistema de dos fases se dispersa 65 % del aceite total en ambas condiciones: inicial y final. Al introducir la aireación, en las condiciones de inicio (15 % de aceite), la dispersión del aceite disminuye a la mitad (con respecto al sistema no aireado), mientras que en la etapa final (2 %), el aceite disperso es hasta del 90 %.

En los sistemas de cuatro fases, al principio del cultivo (aceite alto/biomasa baja), en donde la relación en peso aceite/biomasa es de 107, sólo el 8 % (referido a la proporción homogénea) del aceite total y 20 % de la biomasa presente se logra dispersar y por tanto se observa la segregación del sistema. Al final del cultivo (relación aceite/biomasa de 2), a pesar de la complejidad reológica (debida al mayor contenido de biomasa), la homogeneidad de las fases es considerablemente mayor que la que ocurre al principio de la fermentación: hasta el 81 % del aceite total y 83 % de la biomasa total, detectado en el punto de muestreo.

Tabla 2. Aceite y biomasa dispersos a $P = 0.2$ W/L

		aceite 15 %, biomasa 1.4 g/L		
		dos fases	tres fases	cuatro fases
		caldo - aceite	caldo - aceite - aire	caldo - aceite - biomasa - aire
aceite	(g/L)	98	48	12
disperso	(%)	65	32	8
biomasa	(g/L)			0.28
dispersa	(%)			20
		aceite 2 %, biomasa 10.6 g/L		
		dos fases	tres fases	cuatro fases
		caldo - aceite	caldo - aceite - aire	caldo - aceite - biomasa - aire
aceite	(g/L)	13	18	16.2
disperso	(%)	65	90	81
biomasa	(g/L)			8.8
dispersa	(%)			83



6.1.2. Impulsores InterMIG

Sistemas de tres fases

La dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para los sistemas de dos y tres fases (15 % y 2 %) fue menor al 20 % del aceite total, utilizando impulsores InterMIG (IMIG) (figura 8). Además, el perfil de dispersión fue similar para los sistemas de dos y tres fases, lo que indica que la aireación no tuvo ningún efecto en la dispersión. La dispersión de aceite depende del desempeño del impulsor (Armenante y Huang, 1992); sin embargo, los impulsores de flujo radial se han reportado mejores para la dispersión de fases inmiscibles que los impulsores axiales (Myers *et al.*, 1996).

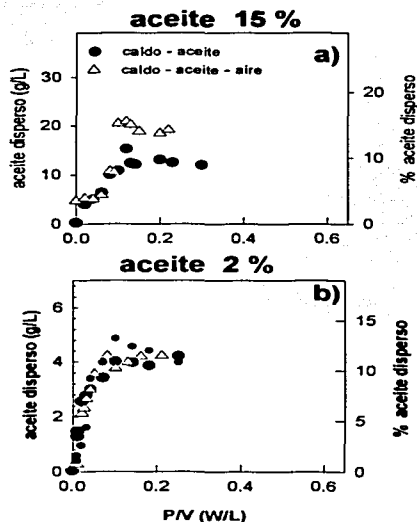


Figura 8. Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para concentraciones de aceite de ricino al 2 % (w/w) y al 15 % (w/w), con impulsores InterMIG en sistemas de dos y tres fases. Caldo - aceite (●) y caldo - aceite - aire (△).



Los resultados obtenidos con este tipo de impulsor son consistentes con lo reportado. No obstante, los resultados no coinciden con lo reportado por Sittig (1983) y Kipke (1984), quienes recomiendan el uso de estos impulsores en sistemas de dos fases para proporcionar una mejor transferencia de masa, por su diseño y diámetro mayor con un desempeño más suave y un patrón de flujo axial más definido. En nuestro caso, se encontró que los impulsores InterMIG no mejoraron la dispersión del aceite independientemente de la concentración utilizada. Al comparar a una P/V constante de 0.2 kW m^{-3} , se aprecia que las turbinas Rushton alcanzaron mayor dispersión de aceite que los impulsores InterMIG para ambas concentraciones de aceite evaluadas (figura 9).

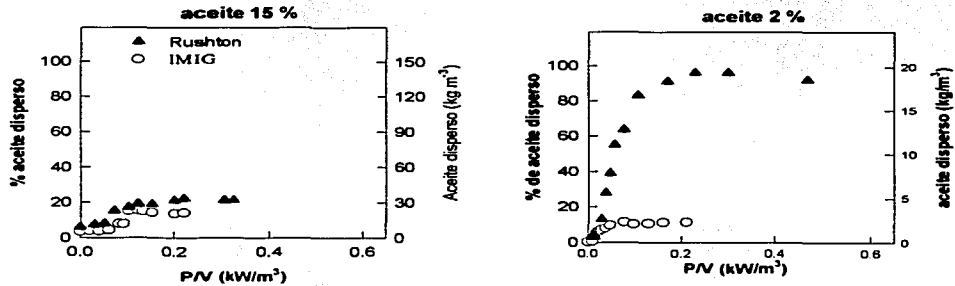


Figura 9. Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica en sistemas de tres fases comparando el desempeño de las turbinas Rushton (▲) con los impulsores InterMIG (○) para ambas condiciones: aceite 15 % / biomasa 1.4 g/L, y aceite 2 % / biomasa 10.6 g/L.

Deberá notarse que para el caldo con bajo contenido de aceite, las turbinas Rushton dispersan prácticamente todo el aceite a $P/V \geq 0.2 \text{ kW m}^{-3}$; sin embargo, en términos de aceite dispersado (kg m^{-3}), la cantidad dispersada fue menor a 20 kg m^{-3} , para ambos contenidos de aceite.



Sistema de cuatro fases**Dispersión de aceite**

La presencia de biomasa en el sistema del 15 % de aceite no causó ningún efecto sobre la dispersión de aceite (figura 10a). Mientras que en el sistema de 2 % de aceite y 10.6 g/L de micelio, la biomasa

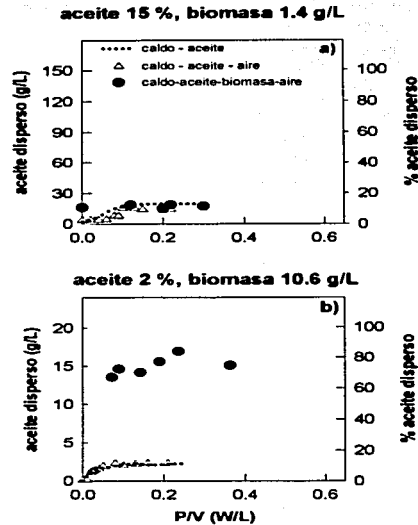
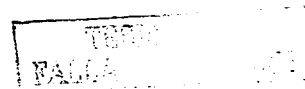


Figura 10. Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica para concentraciones de aceite de ricino al 15 % (w/w) y al 2 % (w/w), con impulsores InterMIG en sistemas de dos, tres y cuatro fases. Caldo – aceite (.....); caldo – aceite – aire (Δ) y caldo – aceite – biomasa – aire (●).

tuvo un efecto positivo sobre la dispersión del aceite. Con los impulsores InterMIG también se observó una segregación significativa de las fases inmiscibles para el sistema de alta concentración



de aceite/bajo contenido de biomasa, como la observada con las turbinas Rushton (figura 11a). En ambos sistemas, el perfil de dispersión de biomasa fue similar para ambas configuraciones de impulsores (figura 11).

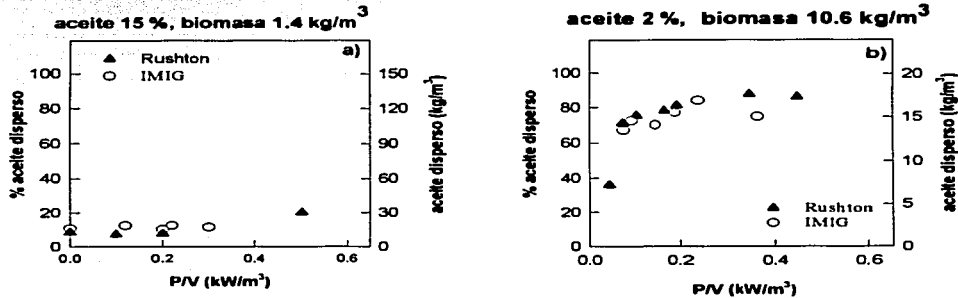


Figura 11. Dispersión de aceite en función de la potencia volumétrica en sistemas de cuatro fases comparando el desempeño de las turbinas Rushton (\blacktriangle) con los impulsores InterMIG (\triangle) para ambas condiciones: aceite 15 % / biomasa 1.4 g/L y aceite 2 % / biomasa 10.6 g/L.

Dispersión de la biomasa

Para el sistema de 15 % de aceite /biomasa 1.4 g/L, la dispersión de biomasa fue menor al 30 % del total (figura 12a). En contraste, en el sistema de bajo contenido de aceite/alta concentración de biomasa, la dispersión de biomasa fue mayor al 70 % del total a $P/V > 0.2 \text{ kW m}^{-3}$ (figura 12b). La poca cantidad de biomasa dispersada en el sistema de alto contenido de aceite confirma que, al principio del proceso, la segregación controla la dispersión de aceite y biomasa, mientras que al final del proceso, la alta concentración de biomasa dispersada es el factor que facilita la dispersión de aceite.

Los impulsores interMIG tienen un patrón de flujo primordialmente axial, el cual promueve un mezclado vertical (Kipke, 1984) y se han reportado como muy eficientes para el mezclado de caldos muy viscosos (Sittig, 1983), pero no efectivos para mezclar fases inmiscibles (Myers *et al.*, 1996). En el sistema con alto contenido de aceite, la presencia del aceite y biomasa en la parte superior hacen muy difícil la dispersión del aceite.

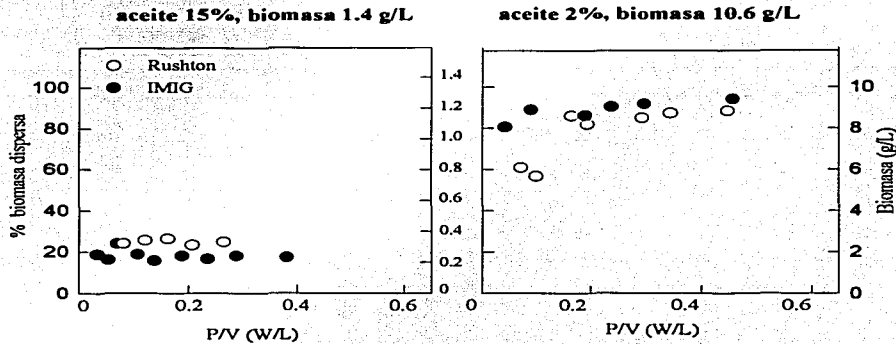


Figura 12. Dispersión de biomasa en función de la potencia volumétrica en sistemas de cuatro fases para ambas condiciones: aceite 15 % / biomasa 1.4 g/L y aceite 2 % / biomasa 10.6 g/L. Turbinas Rushton (▲), impulsores InterMIG (△).

La biomasa y el aceite forman dos barreras que no permiten un mezclado eficiente, a la vez que hay un desempeño muy limitado por parte del impulsor InterMIG. Cuando el contenido de aceite es 2 % y la biomasa es 10.6 g/L, la biomasa favorece la dispersión de aceite, ya que el micelio podría estar actuando como acarreador, como también sucede en el sistema mezclado con turbinas Rushton.

La biomasa determina las propiedades reológicas del caldo, el cual se vuelve sumamente viscoso y no-newtoniano conforme avanza el proceso, dando por resultado zonas muertas de mezclado y con transferencia de masa limitada. Al principio de la fermentación, se observa una fuerte segregación de las fases inmiscibles (Rocha-Valadez *et al.*, 2000) pero a medida que el contenido de aceite se consume y la biomasa aumenta (hacia el final del proceso), la segregación de las fases líquidas inmiscibles es menos evidente. Por lo tanto, durante las primeras etapas del cultivo, se requiere una dispersión efectiva del aceite para la utilización del sustrato. Al proseguir el cultivo, el contenido de aceite disminuye (ya que *Trichoderma harzianum* lo consume) pero al final de la fermentación, la compleja reología desarrollada por el crecimiento miceliar, requiere de una mejor dispersión del gas para poder evitar la limitación de oxígeno.

6.2. Caracterización microscópica

En los sistemas de hasta cuatro fases con altas concentraciones de aceite (15 %), la presencia de pequeñas burbujas dentro de la fase inmiscible permite la formación de una emulsión aire-aceite, que junto con la biomasa promueven la segregación de las fases del sistema y no se logra un mezclado homogéneo. Galindo *et al.* (2000) observaron que la presencia de biomasa en el sistema originó una disminución significativa de los tamaños de las gotas de aceite y de las burbujas de aire, además de reportar la presencia de burbujas de aire atrapadas dentro de las gotas de aceite. Un análisis más detallado de la dispersión permite visualizar la interacción entre el microorganismo con las fases y la interacción entre éstas y así caracterizar en forma más precisa el comportamiento de las dispersiones y determinar que parámetros les afectan.

TESIS CON
FALLA DE ORDEN

Diversos factores afectan la dispersión de aceite y de aire, incluyendo las condiciones hidrodinámicas del sistema y las características físico-químicas (tensión superficial, viscosidad) del fluido o por la presencia de una fase sólida (biomasa). Algunos autores han buscado simular los sistemas de fermentación multifásica, donde se involucra micelio disperso, utilizando soluciones transparentes de polímero (McFarlane y Nienow, 1995) y de esa forma estudiar el efecto del incremento en la viscosidad sobre la dispersión de la fase inmisible y la gaseosa, no obstante que no se trata de sistemas similares.

La dispersión del aceite de ricino y del aire se evaluó a nivel microscópico en un sistema modelo utilizando micelio disperso en concentraciones de 0.5, 2 y 5 g/l, así como glicerol como un fluido newtoniano y con una solución de CMC como un fluido no- newtoniano. La caracterización microscópica de un sistema de fermentación es muy complejo y se requiere de mejoras en óptica y luz, para aproximarse la proceso real.

En la figura 13 se muestran imágenes que ilustran las gotas de aceite, las burbujas libres y las burbujas dentro de las gotas de aceite de las dispersiones de aceite y de aire en medio acuoso que se observan a través del microscopio. Se puede notar la diferencia entre las gotas de aceite y las burbujas, al presentar éstas últimas un perfil esférico muy bien definido, ser de color oscuro y con un centro brillante. Asimismo, como lo reportaron Galindo *et al.* (2000) y Lucatero (2002), se ha confirmado que algunas burbujas quedan atrapadas dentro de gotas de aceite. Este fenómeno se detalla más adelante en este trabajo, en vista de que la presencia de biomasa y de agentes espesantes en la fase acuosa aumenta la proporción de burbujas dentro de las gotas de aceite.

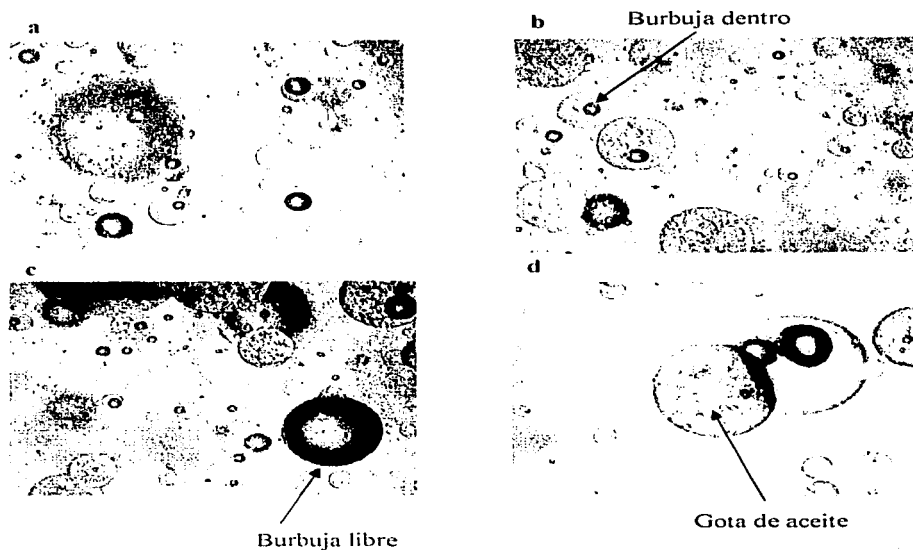


Figura 13. Gotas de aceite, burbujas de aire libres y atrapadas en aceite en: (a, b y c) sistema de tres fases (medio-aceite-aire) y (d) sistema de cuatro fases (medio-aceite-aire-micelio).

Efecto de la concentración de aceite

En la figura 14 se presenta el efecto de la concentración de aceite en el tamaño de las gotas y las burbujas de aire. En el caso de las gotas de aceite, el diámetro se incrementa conforme el contenido de aceite aumenta, mientras que el diámetro de las burbujas de aire disminuye, como lo reportó Galindo *et al.* (2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

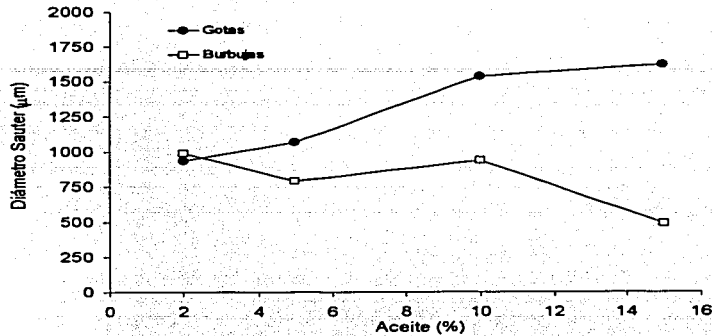


Figura 14. Efecto de la concentración de aceite en el diámetro Sauter de las gotas de aceite y las burbujas en un sistema de tres fases (medio-aceite-aire).

Además de medir el diámetro de las burbujas de aire, se analizó la proporción de burbujas libres en la fase acuosa y aquellas burbujas dentro de las gotas de aceite. Se observó que conforme se incrementa el contenido de aceite en el sistema, el diámetro Sauter de las burbujas libres, disminuye y el de las burbujas dentro de gotas de aceite, aumenta (figura 15).

Dentro del intervalo de concentración de aceite analizado (2 a 15 %), se observa que conforme se incrementa el contenido de aceite, la distribución de tamaños de las burbujas libres se mueve hacia la derecha (figura 16), comparada con la distribución de tamaños observada para las burbujas dentro de gotas de aceite. Asimismo, se puede observar que la diferencia entre los diámetros de las burbujas libres y las atrapadas en aceite es mínima con el contenido de 15 % de aceite, situación que también se observa en la figura 15. En todos los casos, las burbujas dentro de gotas fueron más pequeñas (280-600 µm) que las burbujas libres (800-1000 µm).



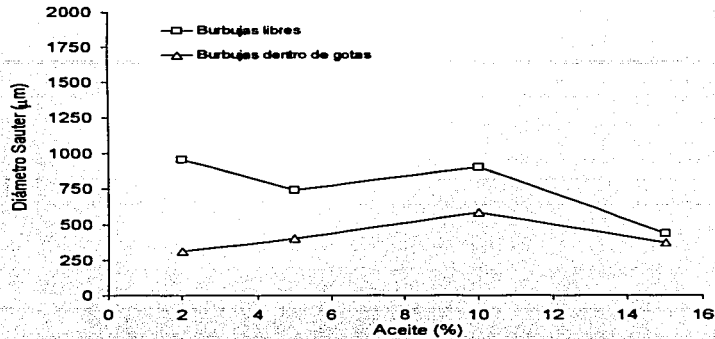


Figura 15. Efecto de la concentración de aceite en el diámetro Sauter de las burbujas libres y atrapadas en aceite en un sistema de tres fases (medio-aceite-aire).

Dentro del intervalo de concentración de aceite analizado (2 a 15 %), se observa que conforme se incrementa el contenido de aceite, la distribución de diámetros de las burbujas dentro de gotas de aceite es más variable, lo que involucra una gama más amplia y una mayor dispersión de tamaños (figura 16), comparada con la distribución de tamaños de las burbujas libres observada, la cual se conserva más uniforme.

Por otra parte, para todos los casos dentro del intervalo de concentración de aceite estudiado, las burbujas dentro de gotas fueron más pequeñas (280–600 µm) que las burbujas libres (800–1000 µm). Asimismo, conforme aumenta el contenido de aceite, la proporción de burbujas dentro de gotas se incrementa. Sólo el 9 % del número total de burbujas de aire se encontraron dentro de las gotas de

TESTEADO
TALLERES

aceite en la concentración más baja de aceite analizada (2 %), mientras que con 5 % de aceite se observó una proporción máxima del 42 % de burbujas dentro de gotas.

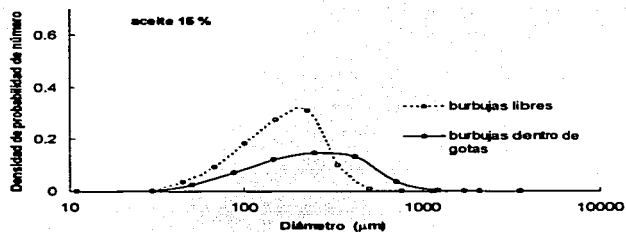
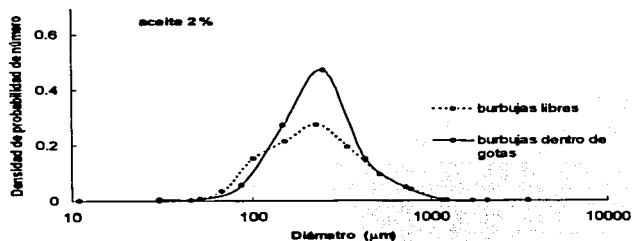
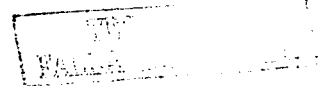


Figura 16. Distribución de las burbujas libres y atrapadas en aceite en un sistema de tres fases (medio-aceite-aire) con 2 y 15 % de aceite.

Como lo reportan Galindo *et al.* (2000), conforme se aumenta la concentración de aceite, hay un incremento en el diámetro Sauter de las gotas de aceite y una disminución en el tamaño de las burbujas de aire. Al introducir aire al sistema, hay una caída de potencia debida a la aireación, se forma una emulsión aire-aceite y se favorece la segregación de las fases, como se presentó en la sección anterior. La disminución de potencia es determinante en la distribución de tamaños de las

fases dispersas (Tsouris *et al.*, 1996) y en la introducción de burbujas en las gotas de aceite. Sin embargo, el tamaño promedio de las burbujas no depende únicamente de la potencia suministrada, sino también de las propiedades coalescentes del sistema, que a su vez, dependen de las propiedades fisicoquímicas de la fase acuosa (densidad, viscosidad, tensión superficial), por lo que el comportamiento coalescente del sistema es difícil de predecir. En sistemas con baja concentración de aceite, el tamaño de las burbujas se incrementa, conduciendo a un área interfacial menor y una disminución en la transferencia de oxígeno. En emulsiones de ácido oleico-agua, el k_L inicialmente disminuye y luego se incrementa al aumentar la fracción (v/v) de aceite en el sistema. A bajas concentraciones de ácido oleico se presenta una acumulación de éste en la interfase gas-líquido comportándose como una barrera para la difusión del oxígeno.

Altas concentraciones de aceite (vg 20 %) mejoran la transferencia de oxígeno (Rols y Goma, 1991), lo cual se debe a una mayor solubilidad del oxígeno en aceites que en agua (Liu *et al.*, 1994; Rols y Goma, 1991). Liu *et al.* (1994) probaron aceite de manteca de cerdo, aceite de olivo y aceite de ricino para mejorar la transferencia de oxígeno en cultivos de levadura, logrando incrementar el k_{LA} . En la producción de butanodiol por *A. aerogenes* se mejoró la capacidad de transferir el oxígeno y el k_{LA} se incrementó 1.48 veces utilizando 19 % v/v de aceite de soya (Rols y Goma, 1991). Es posible que el mecanismo de este fenómeno tenga que ver con la interacción del aire con el aceite y a modificaciones en la superficie de las gotas por esta interacción. La disminución del diámetro Sauter de las burbujas permite una mejor transferencia del oxígeno y aumentar el área interfacial, lo que permite que -en los procesos fermentativos- el microorganismo tenga mayor acceso al oxígeno y se favorezca la productividad. Otros mecanismos que puede explicar esta mejor transferencia de oxígeno son la disminución en la movilidad de las burbujas (viscosidad del aceite) o que la tensión superficial del sistema disminuya.



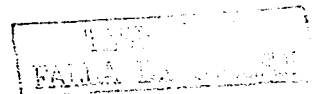
Los compuestos surfactantes incrementan la coalescencia y reducen la transferencia de oxígeno; sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado una relación cuantitativa entre estos factores y se ha sugerido que el aceite podría estar actuando en la interfase gas-líquido como agente activo a la superficie, bajando la tensión superficial de la fase acuosa y aumentando el área interfacial de la fase gaseosa (Morao *et al.*, 1999).

Al ser el oxígeno más soluble en aceite que en agua, las gotas de aceite localizadas en la interfase (entre la fase acuosa y el gas), pueden incrementar el oxígeno en esa capa, o bien, que la fase oleosa puede actuar como un intermediario activo para el transporte de oxígeno de las burbujas de gas al agua, de tal manera que el mecanismo implicado en la mejora de la transferencia de oxígeno podría ser la formación de una capa de aceite como una película delgada en la interfase gas-líquido (Rols y Goma, 1991).

6.2.1. Efecto de la viscosidad del sistema en la dispersión del aceite y del aire

Efecto de la concentración de biomasa como agente espesante

La presencia de biomasa en el sistema causó una disminución pronunciada en el tamaño de las burbujas dentro y fuera de las gotas de aceite a una concentración de 0.5 g/L (figura 17). Esta disminución fue mayor para las burbujas libres que para las burbujas dentro de gotas de aceite, no obstante que una vez que se presentó esta disminución, no se observaron diferencias importantes en el tamaño de las burbujas dentro de gotas con respecto al tamaño de las burbujas libres ($d_{32} = 400 \mu\text{m}$).



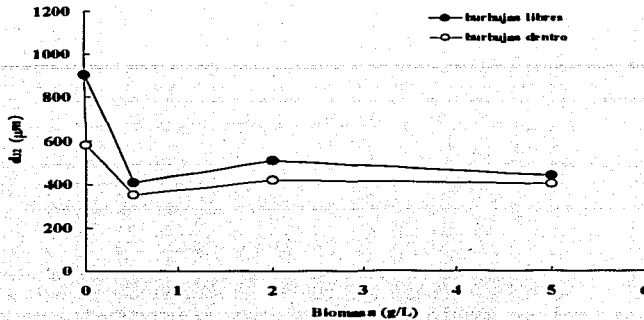


Figura 17. Efecto de la concentración de biomasa en el diámetro Sauter de las burbujas libres y atrapadas en aceite en un sistema de cuatro fases (medio-aceite-aire-biomasa).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Galindo *et al.* (2000), quienes señalan que el diámetro Sauter (a una concentración de 10 % de aceite) de las burbujas totales disminuye conforme aumenta la concentración de biomasa. La presencia de biomasa también tiene un efecto sobre la proporción de burbujas dentro de gotas de aceite, incrementándose hasta tres veces con respecto al sistema de tres fases (figura 18). Pero una vez presente la biomasa, la proporción de burbujas dentro de las gotas de aceite no cambia a pesar de que se incremente la concentración de biomasa. El mecanismo del fenómeno no se explica totalmente, no obstante que se asocia con un incremento en la frecuencia de las colisiones entre las burbujas y la superficie sólida (micelio), lo cual promueve el rompimiento de las burbujas o inhibe la coalescencia. Esto se ha demostrado en otros sistemas de tres fases (Nienow *et al.*, 1986; Kawase *et al.*, 1997), donde al aumentar la concentración de biomasa, la coalescencia disminuye.

Por su parte, Lucatero (2002) también encontró que conforme aumenta la concentración de micelio disperso, la proporción de burbujas dentro de las gotas se incrementó del 40 % al 75 %. A una

concentración de biomasa de 0.2 g/L, el diámetro Sauter de las burbujas libres disminuyó a la mitad (de 820 a 420 μm). Asimismo, observó la adhesión del micelio a las burbujas de aire e incluso a las de aceite. Esta interacción inhibe la coalescencia de las burbujas, hecho similar al que sucede cuando se utilizan partículas sólidas (Nienow *et al.*, 1986), las cuales tienden más a adherirse a las burbujas que a permanecer suspendidas en la fase acuosa, modificando la distribución de tamaño de las burbujas (Kawase *et al.*, 1997).

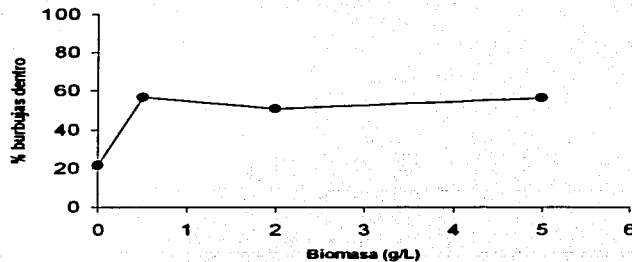


Figura 18. Proporción de burbujas atrapadas en aceite en un sistema de cuatro fases (medio-aceite-aire-biomasa), en función de la concentración de biomasa.

La alta proporción de las burbujas atrapadas dentro de las gotas de aceite explicarían porqué el uso de aceites para mejorar la transferencia de oxígeno en los procesos multifásicos de fermentación (Rols y Goma, 1991; Ho *et al.*, 1990; Ju y Ho, 1989).

Efecto del glicerol como agente espesante

En un sistema modelo con fase continua a diferentes viscosidades (diferentes concentraciones de glicerol) se evaluó la dispersión del aceite de ricino y del aire a nivel microscópico. En la figura 19 se presenta el efecto de la viscosidad de la fase continua sobre el diámetro Sauter de las gotas. Es notable el hecho de que un ligero incremento en la viscosidad del sistema, promueva una reducción significativa del diámetro de gotas y burbujas. Este fenómeno es similar al que se presenta en el sistema con biomasa (ver figura 17).

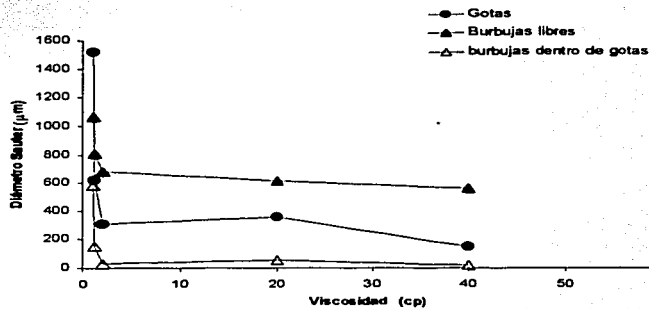


Figura 19. Diámetro Sauter de las gotas, burbujas libres y burbujas dentro de aceite en un sistema modelo de tres fases con 10 % de aceite y a 200 rpm. Aireación = 0.25 vvm

Conforme se incrementa la viscosidad del sistema, hay una disminución significativa en los tamaños de gotas y burbujas, fenómeno similar al del caso en que la viscosidad estuvo determinada por la presencia de micelio disperso (Galindo *et al.*, 2000; Lucatero, 2002). El diámetro de las gotas de aceite disminuye de 700 µm (1.2 cp) a 200 µm (40 cp). Cuando se introduce aire, el diámetro de las gotas disminuye a 300 µm y el de las burbujas de aire disminuye paulatinamente conforme aumenta la viscosidad de la fase continua (figura 20).

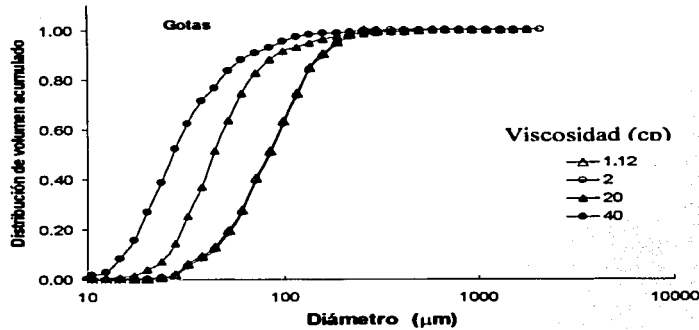


Figura 20. Distribución de volumen acumulado para gotas de aceite en sistemas aireados con glicerol como agente espesante.

El aumento en la viscosidad de la fase continua disminuye la eficiencia de mezclado, lo cual dificulta la ruptura de las burbujas que salen del difusor, de manera que éstas ascienden rápidamente, disminuyendo la transferencia de oxígeno. Un aumento mínimo en la viscosidad del sistema, disminuye el tamaño de burbujas en el sistema, lo cual puede deberse a que las burbujas de aire no se mueven lo suficiente para poder coalescer. Esto se puede observar en las imágenes con glicerol a las diferentes viscosidades 1.12, 2, 20 y 40 cp (figura 21) y más adelante en las imágenes con CMC (figura 23).

En la figura 21 se ilustran algunas imágenes que corresponden a las diferentes viscosidades por la presencia del glicerol, donde se observa menor nitidez conforme aumenta la concentración de glicerol y las gotas de aceite se distinguen poco de la fase acuosa debido a la similitud en la

refracción de la luz entre el glicerol y el aceite. Para la mayor viscosidad en el sistema (40 cp), se tienen gotas más difusas pero las burbujas se observan muy claramente.

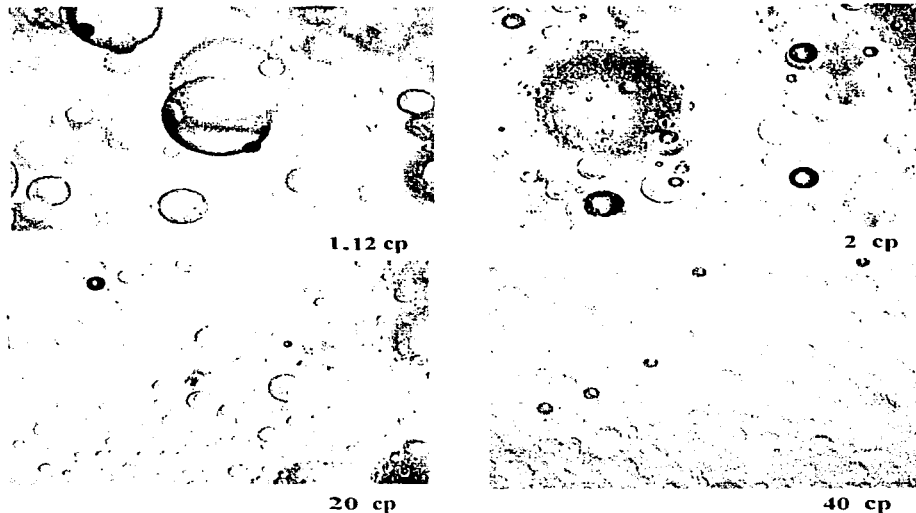


Figura 21. Imágenes de gotas de aceite, burbujas de aire libres y atrapadas en aceite en sistemas con glicerol (fase acuosa-aceite-aire).

En los sistemas viscosos, prevalece el mecanismo de coalescencia, por lo que se generan gotas y burbujas más grandes. Sin embargo, las burbujas de mayor tamaño no siguen los patrones de flujo del impulsor (Roman y Tudose, 1997) y tienden a ascender por el centro del tanque, con lo que se provoca la segregación de las fases, como se observó en los sistemas de 15 % de aceite y 1.4 g/L de biomasa (análisis macroscópico), en la fermentación de *Trichoderma harzianum* (Rocha-Valadez *et al.*, 2000) y lo observó Lucatero (2002). Una fase continua viscosa produce una distribución muy amplia de tamaños de gotas y burbujas (Shimizu *et al.*, 1999), lo cual permite que las gotas y

burbujas muy pequeñas sigan el patrón de flujo del impulsor y se concentren en la pared del tanque y sean cuantificadas por la sonda de luz (por su posición dentro del tanque) y así explicar la disminución significativa de los diámetros Sauter de las gotas y de las burbujas en los sistemas con glicerol y la segregación de las fases.

Otro parámetro a considerar es la tensión superficial de los sistemas con glicerol (figura 22), ya que es posible que influya en forma combinada con la viscosidad de la fase acuosa en la generación de diámetros muy pequeños.

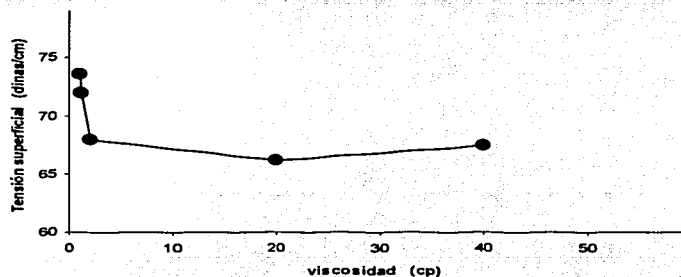


Figura 22. Tensión superficial de los diferentes sistemas con glicerol como agente espesante.

Esta disminución en la tensión superficial del sistema (73 dinas/cm a 67 dinas/cm) modificó el comportamiento coalescente y favoreció la dispersión de la fase inmisible, al obtenerse diámetros de gotas menores a los observados en sistemas sin glicerol; no obstante que la tensión superficial y el diámetro Sauter no correlacionan. Por otra parte, esta misma disminución en la tensión superficial tiene que ver con el incremento en la proporción de burbujas dentro de las gotas de aceite observado y por tanto con la permeabilidad del oxígeno en la interfase aceite-aire.

Efecto de la carboximetilcelulosa (CMC) como agente espesante

Se utilizó CMC como agente espesante en una solución de 0.6 % ($K = 0.11 \text{ Pa s}^n$ y $n = 0.768$) para simular la viscosidad del sistema por la presencia de biomasa, es decir, con un comportamiento no-newtoniano y así evaluar la dispersión del aceite de ricino y del aire en el sistema modelo.

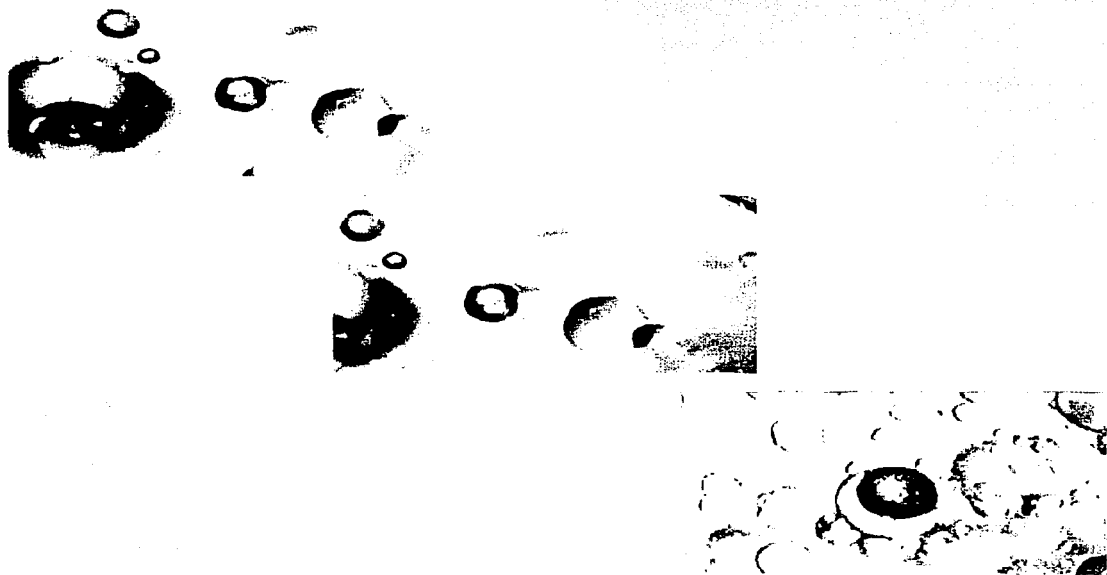


Figura 23. Imágenes típicas de gotas de aceite, burbujas de aire libres y atrapadas en aceite en sistemas con CMC (fase acuosa-aceite-aire).

Algunas imágenes de estas determinaciones se presentan en la figura 23, donde también se observa mayor nitidez y contraste entre los dos fluidos (aceite y fase continua con CMC) por lo que las gotas de aceite y las burbujas se pueden observar mejor que con glicerol, a pesar de tener una viscosidad aparente mayor (56 cp , $\gamma = 18 \text{ s}^{-1}$).

El 90 % de las gotas de aceite tuvo un diámetro de $800 \mu\text{m}$ en el sistema acuoso y de $400 \mu\text{m}$ de diámetro en el sistema con CMC (figura 24). El diámetro Sauter de las gotas de aceite fue de $1526 \mu\text{m}$ en el sistema acuoso y de $348 \mu\text{m}$ en el sistema con CMC. Cuando el sistema fue aireado, el d_{32} de las gotas fue de $360 \mu\text{m}$. Al incrementar la viscosidad aparente de la fase acuosa se disminuyó el diámetro a la mitad, como se observó en los sistemas con glicerol y también en los sistemas estudiados por Galindo *et al.* (2000) y Lucatero (2002) con micelio disperso.

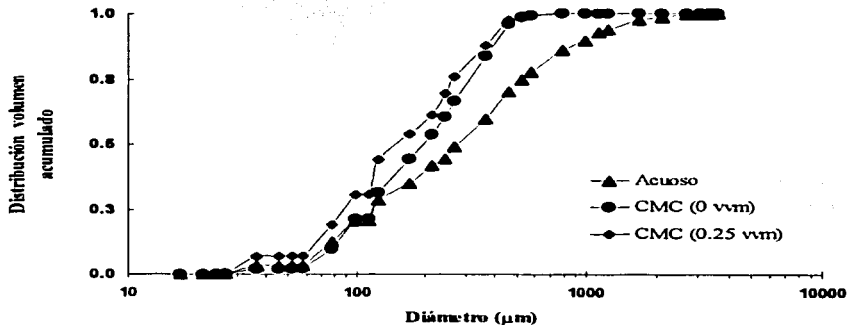


Figura 24. Distribución de volumen acumulado para gotas de aceite en sistema acuoso y con CMC.

El diámetro Sauter de las burbujas libres disminuyó tres veces con respecto al sistema acuoso, observándose el mismo efecto en las burbujas dentro de las gotas (Tabla 3). Asimismo, como se observó previamente, en presencia de biomasa (Galindo *et al.*, 2000) y con el sistema con glicerol, muchas de las burbujas de aire se encuentran dentro de las gotas de aceite. Un parámetro que pudiera determinar esta disminución sería el suministro de potencia al sistema. Sin embargo, las mediciones realizadas en este trabajo indicaron que bajo las condiciones de agitación (3.33 rps), la potencia no mostró cambios significativos (0.25 kW/m³) respecto a los obtenidos en sistemas acuosos, como lo reporta también Lucatero (2002).

Tabla 3

Comparación de los diámetros Sauter de gotas de aceite y burbujas en los sistemas acuoso y con CMC

	D_{Sauter} (μm)
Gotas en Acuoso	1526
Gotas en CMC-sin-aire	348
Gotas en CMCconAire	358
Burb.libres Acuoso	902
Burb.libres CMC	326
Burb-en-Gotas Acuoso	581
Burb-en-Gotas CMC	205

Comparando el suministro de potencia de los tres sistemas con agentes espesantes (micelio, glicerol y CMC) encontramos que los datos de potencia no son significativamente diferentes y, por lo tanto, la disminución de los diámetros no podría ser atribuible a este parámetro. Es posible que con el cambio en la viscosidad del sistema, como ya se señaló en la sección anterior (con glicerol o micelio disperso), no se favorezca la coalescencia de las burbujas y por tanto no se forman burbujas grandes.

El 90 % de las burbujas de aire libres en el medio acuoso tiene un diámetro de 400 μm , mientras que en presencia de CMC, el diámetro disminuyó a 220 μm (figura 25a). En ambos sistemas (acuoso y con CMC) el diámetro de las burbujas dentro de gotas fue similar (400 μm) como se observa en la figura 25b.

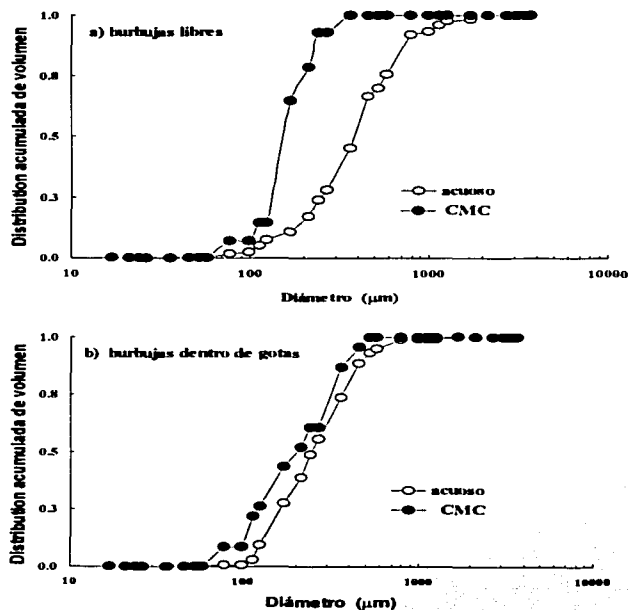
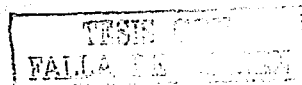


Figura 25. Distribución de volumen acumulada para burbujas libres(a) y burbujas dentro de gotas de aceite (b) en sistemas acuoso y con CMC.



El aumento de la viscosidad en la fase continua favorece la introducción de más burbujas en el aceite, fenómeno que también se ha observado cuando la viscosidad del sistema aumenta por la presencia de biomasa (Lucatero, 2002) y de glicerol (ver sección anterior).

Algunos estudios sobre el efecto de la viscosidad de la fase dispersa (Calabrese *et al.*, 1986) han demostrado que la distribución de tamaños de las gotas se modifica por la coalescencia en el sistema, (aunque siempre se dan los dos mecanismos: coalescencia – ruptura) y por tanto hay mayores tamaños de gotas y burbujas, las cuales difícilmente siguen el patrón de flujo del impulsor (Roman y Tudose, 1997) y tienden a ascender por el centro del tanque de mezclado. Este fenómeno se conoce como “acanalamiento” de las burbujas grandes, el cual podría ser la causa de la poca cantidad de burbujas por imagen (figuras 22 y 23) al incrementar la viscosidad con glicerol o CMC. Este fenómeno también lo reporta Lucatero (2002), en presencia de micelio disperso.

La proporción de burbujas dentro de gotas se incrementa entre 40 y 60 % cuando la viscosidad aparente del sistema aumenta por la presencia de CMC (56 cp, $\gamma = 18 \text{ s}^{-1}$). Esto implica una mayor proporción de aire en la fase inmisible, lo que podría confirmar resultados obtenidos en otros trabajos donde se reporta que los aceites aumentan la transferencia de oxígeno y se obtienen mayores productividades (Elibol y Mavituna, 1997; Rols y Goma, 1991; Ho *et al.*, 1990; Ju y Ho, 1989). Cuando hay biomasa presente en el sistema, la viscosidad aparente del mismo aumenta (27 a 50 cp, $\gamma = 18 \text{ s}^{-1}$), disminuye el diámetro de las burbujas y se incorpora mayor cantidad de aire al aceite (Lucatero, 2002).

7. Conclusiones

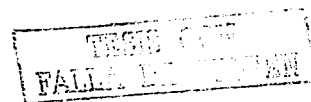
La aireación y la presencia de biomasa tienen un efecto negativo en la dispersión de aceite en los sistemas con alto contenido de aceite (15 %) con la formación de una emulsión aire-aceite y la separación de las fases, mientras que en el sistema de bajo contenido de aceite (2 %) y alta concentración de biomasa (10.6 g/L), esta biomasa actúa como acarreador y la aireación favorece la dispersión del aceite. La interacción del aceite con la biomasa y la interacción del aire con el aceite observadas a nivel microscópico señalan la presencia de pequeñas burbujas dentro de la fase inmisible, lo cual coincide con lo observado a nivel macroscópico al introducir aire al sistema y la formación de la emulsión aire-aceite, que junto con la biomasa promueven la segregación de las fases del sistema por lo que no se logra un mezclado homogéneo. Al introducir aire al sistema, hay una caída de potencia, lo cual determina la distribución de tamaños de las fases dispersas y la introducción de burbujas en las gotas de aceite. Esto explica la segregación observada tanto en la caracterización macroscópica como en el proceso de fermentación.

Un incremento mínimo en la viscosidad, por la presencia de biomasa o de algún agente espesante, disminuye significativamente el tamaño de las gotas y de las burbujas y se incrementa la proporción de burbujas dentro de las gotas, lo que puede implicar una mayor cantidad de oxígeno en la fase oleica. Este fenómeno tiene que ver directamente con la composición de la fase acuosa, la presencia de compuestos surfactantes que modifican la tensión superficial del sistema y el que las burbujas de aire no tienen la movilidad suficiente para poder coalescer. En el caso de la presencia de biomasa, además se presenta la adhesión del micelio a las burbujas de aire e incluso a las de aceite, lo que también inhibe la coalescencia de las burbujas. La disminución del diámetro Sauter de las burbujas de aire permite una mayor área interfacial y por tanto, en los procesos fermentativos el



Conclusiones

microorganismo tiene mayor acceso al oxígeno y esto favorece la productividad del proceso. El aumento de la proporción de burbujas atrapadas dentro de las gotas de aceite sugiere que hay una mayor proporción de aire en la fase oleica, lo cual tiene efecto sobre la transferencia de oxígeno y justifica la preferencia que se ha dado a la utilización de aceites en este tipo de procesos para incrementar la productividad. Nuestro esfuerzo estuvo encaminado a tener más información sobre las interacciones que se dan entre las fases líquido-gas-microorganismo así como en el análisis sistemático del comportamiento de las dispersiones de aire, aceite y biomasa en estos sistemas multifásicos.



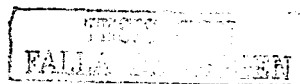
8. Perspectivas

La caracterización macroscópica y microscópica de las dispersiones de aceite, aire y biomasa en el sistema modelo de hasta cuatro fases (utilizado en este trabajo), permitió identificar que la interacción entre las gotas de aceite, las burbujas de aire y la biomasa es muy compleja y que posiblemente existan modificaciones en la superficie de las gotas y de las burbujas relacionadas con la composición química de las fases involucradas, la tensión superficial y el comportamiento coalescente del sistema. La inspección microscópica de la inclusión de burbujas dentro de las gotas de aceite permitió la identificación de gotas multifásicas. No son conocidos los mecanismos que conducen a la formación de estas estructuras complejas; sin embargo, existe una tendencia significativa a incluir más burbujas de aire dentro de las gotas de aceite en presencia de agentes espesantes o biomasa, lo cual puede modificar la transferencia de oxígeno. Los siguientes análisis están encaminados a caracterizar estas gotas multifásicas y definir las condiciones en que se forman.

Se identificaron mecanismos complejos de transferencia de masa diferentes a los descritos anteriormente, por lo que es necesario continuar con los estudios de dispersión con el propósito de explicar este tipo de mecanismos de transferencia que se han venido observando.

Por otra parte, se recomienda analizar la dispersión de aceite y aire a potencias mayores a la utilizada en este trabajo, con otras configuraciones de impulsores y observar las dispersiones de aceite y aire en diferentes puntos del tanque utilizando varias sondas de fibra óptica acopladas a la sonda de luz estroboscópica, lo que permitiría tener imágenes de las distintas partes del sistema multifásico sin importar lo heterogéneo del mismo. Para lo cual es necesario modificar las condiciones de luz y de óptica, de manera que sea factible adquirir imágenes más claras y con posibilidad de procesar. Estas

adecuaciones y técnicas desarrolladas se pueden aplicar al estudio de otros sistemas con líquidos inmiscibles, vg. la producción de 6-pentil- α -pirona por *Trichoderma harzianum* en un sistema de fermentación extractiva con *n*-hexadecano.



9. Referencias

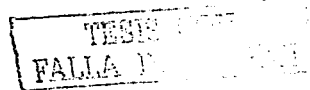
- Amanullah, A., Serrano-Carreón, L., Castro, B., Galindo, E. and Nienow, A. W. (1998) The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **57**(1): 95-108.
- Armenante, P.M. and Huang Y.T. (1992) Experimental determination of the minimum agitation speed for complete liquid-liquid dispersion in mechanically agitated vessels, *Ind. Eng. Chem. Res.* **31**:1398-1406.
- Atkinson, B. and Mavituna, F. (1991) Stoichiometric aspects of microbial metabolism, Microbial activity, Gas-liquid mass transfer. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, Second Edition*, Stockton Press, USA, Chap. 10, 11, 12 y 13.
- Bae, J.H. and Tavlarides, L.L. (1989) Laser capillary spectrophotometry for drop-size concentration measurements. *AIChE J.* **7**: 1073-1084.
- Bayvel, L. and Orzechowski, Z. (1993) Liquid atomization. In: Chigier N. (Ed.). *Combustion: an International Series*, Taylor and Francis, pp. 123-158.
- Bongenaar, J.J.T.M., Kossen, N.W.F., Metz, B. and Meijboom, F.W. (1973) A method for characterizing the rheological properties of viscous fermentation broths. *Biotechnol. Bioeng.* **15**: 201-206.
- Bonnarme, P., Dijan, A., Latrasse, A., Féron, G., Ginies, C., Durand, A. and Le Queré, J.L. (1997) Production of 6-pentyl- α -pironone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J. Biotechnol.* **56**: 143-150.
- Boyd, J.W.R. and Varley, J. (1998) Sound measurements as a means of gas-bubble sizing in aerated agitated tanks. *AIChE J.* **44**(8): 1731-1739.
- Brito-Albavera, T. (2001) Montaje de un arreglo experimental para la evaluación (mediante análisis de imágenes) de dispersiones multifásicas en fermentaciones. Tesis de licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Brito-de la Fuente, E., Nava, J.A., Medina, L., Ascanio G. and Tanguy, P. (1996) On the use of helical ribbon based viscosimetry for the determination of flow curves, In: *Rheology XII*, Ait-Kadi, J.M.D.F. Jaws and M.C. Williams (Eds), Canadian Group of Rheology, pp. 672 -673.

- Buchholz, H., Adler, I. and Schügerl, K. (1979) Investigation of the structure of two-phase flow model-media in bubble column bioreactors. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 135 – 145.
- Buckland, B.C., Gbewonyo, K., DiMasi, D., Hunt, G., Westerfield, G. and Nienow, A.W. (1988) Improved performance in viscous mycelial fermentations by agitator retrofitting. *Biotechnol. Bioeng.* **31**: 737-742.
- Calabrese, R.V., Chang, T.P.K and Dang, P.T. (1986) Drop break up in turbulent stirred-tank contactors. Part 1: Effect of dispersed-phase viscosity. *AIChE J.* **32** (4): 657 –666.
- Charles, M. (1985) Fermentation design and scale up. In: *Comprehensive Biotechnology*, M. Moo-Young (Ed.), Pergamon Press, Vol. 2, pp. 57 – 75.
- Chayen, N.E. (1999) Crystallization with oils: a new dimension in macromolecular crystal growth. *J. Crystal Growth* **196**:434-441.
- Chen, H.T. and Middleman, S. (1967) Drop size distributions in agitated liquid-liquid. systems. *AIChE J.* **13**(5): 989-998.
- Clarkson, J.R., Cui, Z.F. and Darton, R.C. (1999) Protein denaturation in foam II, *J. Colloid Interface Sci.* **215**: 333 – 338
- Coulaloglou, C.A. and Tavlarides, L.L. (1976) Drop size distributions and coalescence frequencies of liquid-liquid dispersions in flow vessels. *AIChE J.* **22**(2): 289-297.
- Cui, Y.Q., van der Lans, R.G.J.M. and Luyben, K. Ch.A.M. (1998) Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **57**(4): 409-419.
- Dalmau E., Sánchez, A., Montesinos, J.L., Valero, F., Lafuente, F.J. and Casas, C. (1998) Study of a drop size frequencies in a microbial growth system with an aqueous-organic medium: lipase production from *Candida rugosa*. *J Biotechnol* **59**: 183-192.
- Damiano, D. and Wang, S.S. (1985) Novel use of perfluorocarbon for supplying oxygen to aerobic submerged cultures. *Biotechnol. Lett.* **7**:81-86.
- Drogaris, G. and Weiland, P. (1983) Coalescence behaviour of gas bubbles in aqueous solutions of n-alcohols and fatty acids. *Chem. Eng. Sci.*, **38**, (9):1501-1506.
- Eiki, H., Gushima, H., Saito, T., Ishida, H., Oka, Y. and Osono, T. (1988) Product inhibition and its removal on josamycin fermentation by *Streptomyces narbonensis*. *J. Ferment. Technol.* **66**: 559-565.

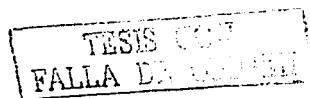
- Elibol, M. and Mavituna, F. (1997) Characteristics of antibiotic production in a multiphase system. *Process Biochem.* **32** (5): 417-422.
- Galindo, E., Pacek, A.W. and Nienow, A.W. (2000). Study of drop and bubble sizes in a simulated mycelial fermentation broth up to four phases. *Biotechnol. Bioeng.* **69**(2): 213 – 221.
- Galindo, E., Arguello, M.A., Velasco, D., Albiter, V. and Martinez, A. (1996) A comparison of cavern development in mixing a yield stress fluid by Rushton and InterMIG impellers, *Chem. Eng. Technol.* **19**: 315-323.
- Godoy-Silva, R.D., Serrano-Carreón, L., Ascanio, G. and Galindo, E. (1997) Effect of impeller geometry on the production of aroma compounds by *Trichoderma harzianum*, *Procc. 4th Int. Conf. on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics*, BHR Group, Eds., Edinburgh, U.K., **25**, 61-72.
- Godoy-Silva, R.D. (1998) Efecto de la geometría del impulsor sobre el crecimiento, reología y producción de aromas por *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido. Tesis de Maestría en Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hazer, B., Torul, O., Borcakli, M., Lenz, R.W., Fuller, R.C. and Goodwin, S.D. (1998) Bacterial production of polyesters from free fatty acids obtained from natural oils by *Pseudomonas oleovorans*. *J. Environ. Polymer Degrad.* **6** (2): 109-113.
- Hentrich, P. (Ed) (2000) Ekato Handbook of mixing technology. EKATO Rühr-und Mischtechnik GmbH, Germany, pp. 17, 83,84.
- Ho, C.S., Ju, L. and Baddour, R.F. (1990) Enhacing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of n-hexadecane. *Biotechnol. Bioeng.* **36**: 1110-1118.
- Holland, F.A. and Chapman, F.S. (1966) *Liquid and Mixing Processing in Stirred Tanks*, Reinhold, New York, Chap. 1, 2, pp.1-108.
- Jewitt, N.; Anthony, P.; Lowe, K.C. and de Pomerai, D.I. (1999) Oxygenated perfluorocarbon promotes nematode growth and stress-sensitivity in a two-phase liquid culture system. *Enzyme Microb. Technol.* **25**:349-356.
- Ju, L. K. and Ho, C.S. (1989) Oxygen diffusion coefficient and solubility in n-hexadecane. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**:1221-1224.
- Justen, P., Paul, G.C., Nienow, A.W. and Thomas, C.R. (1996) Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.* **52**: 672-684.



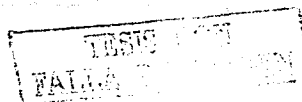
- Kawase, Y. and Moo-Young, M. (1990) The effect of antifoam agents on mass transfer in bioreactors. *Biopr. Eng.* **5**:169-173.
- Kawase, Y., Araki, T., Shimizu, K. and Miura H. (1997) Gas-liquid mass transfer in three-phase stirred tank reactors: Newtonian and non-Newtonian fluids. *Can. J. Chem. Eng.* **75**: 1159–1163.
- Keudell, K.C., Huang, J.K., Wen, L., Klopfenstein, W.E., Bagby, M.O., Lanser, A.C., Plattner, R.D., Peterson, R.E. and Weisleder, D. (2000) Fatty acids enhanced tubermycin production by *Pseudomonas* strain 2HS. *Microbios* **102** (401): 27-38.
- King, A.T., Mulligan, B.J. and Lowe, K.J. (1989) Perfluorochemicals and cell culture. *BioTechnology* **7**:1037-1042.
- Kipke, K. D. (1984) Fluid loadings on different impeller types, *Chemie-Technik* **13**, (8): 46–51.
- Kollmer, A., Schmid, A., Rudolf von Rohr, P.H. and Sonnleitner, B. (1999) On liquid-liquid mass transfer in two-liquid-phase fermentations. *Biopr. Eng.* **20**: 441-448.
- Large, K.P., Ison, A.P. and Williams, D.J. (1998) The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biotechnol.* **63**: 111-119.
- Liu, H.S., Chiung, W.C. and Wang, Y.C. (1994) Effect of lard oil, olive oil and castor oil on oxygen transfer in an agitated fermentor. *Biotechnol. Techniques* **8**: 17-20.
- Lucatero, S. (2002) *Dispersión de aceite y aire en presencia de micelio disperso y pellets de Trichoderma harzianum*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mayo 2002.
- Machon, V., Pacek, A.W. and Nienow, A.W. (1997) Bubble sizes in electrolyte and alcohol solutions in a turbulent stirred vessel. *Trans. Inst. Chem. Eng.* **75**: 339-348.
- Mattiasson, B. and Adlercreutz, P. (1987) Perfluorochemicals in biotechnology. *TIBTECH.* **5**:250-254.
- May, K., Jeelani, S.S.K. and Hartland, S. (1998) Influence of ionic surfactants on separation of liquid-liquid dispersions, *Colloids Surfaces, A: Physicochem. Eng. Aspects* **139**: 41 – 47
- McFarlane, C.M. and Nienow, A.W. (1995) Studies on high solidity ratio hydrofoil impellers in aerated bioreactors: Parts 1 and 2. *Biotechnol. Prog.*, **11**: 601-618.
- Morao, A., Maia, C.I., Fonseca, M.R.M., Vasconcelos, J.M.T., Alves, S.S. (1999) Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters. *Biopr. Eng.* **20**: 165 – 172.



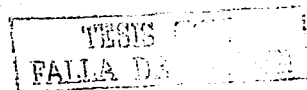
- Myers, K.J., Reeder, M., Bakker, A. and Rigden, M. (1996) Agitating for success. *Chem. Eng.*, **620**: 39-42.
- Nielsen, J. (1996) Modelling the morphology of filamentous microorganisms. *TIBTECH*, **14**:438-443.
- Nienow, A.W. (1990a) Gas dispersion performance in fermenter operation. *Chem. Eng. Prog.*, **86**(2): 61-71.
- Nienow, A.W. (1990b) Agitators for mycelial fermentations, *TIBTECH*, **8**:224 - 334.
- Nienow, A.W. (1996) Gas-liquid mixing studies: a comparison of Rushton turbines with some modern impellers. *Trans. I. Chem. E.* **74**(A):417-423.
- Nienow, A.W. and Ulbrecth, J. J. (1985) Gas-liquid mixing and mass transfer in high viscosity liquids. *Mixing of Liquids by Mechanical Agitation*, J.J. Ulbrecth and G.K. Patterson (Eds.), Gordon and Breach, New York, USA, pp. 203-237.
- Nienow, A.W., Konno, M. and Bujalski, W. (1986) Studies on three-phase mixing: a review and recent results. *Chem. Eng. Res. Des.* **64**: 35-42.
- Oldshue, J. Y. (1983) General theory, Liquid-liquid mass transfer, Gas-liquid mass transfer. *Fluid Mixing Technology*, McGraw-Hill, Chap. 1, 12 and 13, pp. 1-23; 243-277.
- Ozcan, N.G.; Decloux, M; and Bruxelmane, M. (1990) Effect of viscosity on cavity formation and power characteristics of an agitated aerated Newtonian fluid. *Trans. Inst. Chem.. Eng.*, **68**(A): 63-68.
- Ozcan, O., Calimili, A., Berber, R. and Oguz, H. (2000) Effect of inert solid particles at low concentrations on gas-liquid mass transfer in mechanically agitated reactors. *Chem. Eng. Sci.* **55**:2737-2740.
- Pacek, A. W., Mann, C.C. and Nienow, A.W. (1998) On the Sauter mean diameter and size distributions in turbulent liquid/liquid dispersions in a stirred vessel. *Chem. Eng. Sci.* **53**(11): 2005-2011.
- Pacek, A.W., Moore, I.P.T., Nienow, A.W. and Calabrese, R.V. (1994) Video technique for measuring dynamics of liquid-liquid dispersion during phase inversion. *AIChE J.*, **40**:1940-1949.
- Pazouki, M. and Panda, T. (2000) Understanding the morphology of fungi. *Biopr. Eng.* **22**:127-143.
- Peberly, J.F. (1994) Protein secretion in filamentous fungi-trying to understand a highly productive black box. *TIBTECH*. **12**: 50 - 57.



- Podgorska, W. and Baldyga, J. (2001) Scale-up effects on the drop size distribution of liquid-liquid dispersions in agitated vessels. *Chem. Eng. Sci.* **56**: 741-746.
- Prapulla, S.G., Karanth, N.G., Engel, K.H. and Tressel, L. (1992) Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma viride*. *Flavour and Fragrance J.* (7): 231 – 234.
- Prins, A. and van't Riet, K. (1987) Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer. *TIBTECH.* **5**: 296 – 301.
- Pulido, N. (2003) Dispersión de fases y transferencia de oxígeno en un sistema modelo de fermentación multifásica conteniendo proteína soluble. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ramkrishna, D., Sathyagal, A. and Narsimhan, G. (1995) Analysis of dispersed -phase systems: fresh perspective. *AIChE J.* **41**(1):35-44.
- Rattledge, C. (1977) Fermentation substrates. *Ann. Rep. Ferment. Proc.* **1**: 49-71.
- Rebelein, F. and Blass, E. (1986) A measuring technique for drop diameters in the mm-range in liquid-liquid dispersions. *ISEC* **86**, pp. 387-395.
- Reséndiz, R., Martínez, A., Ascanio, G. and Galindo, E. (1991) A new pneumatic bearing dynamometer for power input measurement in stirred tanks. *Chem. Eng. Technol.* (14): 105 – 108.
- Rocha-Valadez, J.A., Galindo, E. and Serrano-Carreón, L. (2000). Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. *Biopr. Eng.* **23**: 403 – 410.
- Rols, J.L. and Goma, G. (1991) Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil-in-water dispersions. *Biotechnol. Lett.* **13**(1):7-12.
- Roman, R.V. and Tudose, R.Z. (1997) Studies of transfer processes in mixing vessels: power consumption of the modified Rushton turbine agitators in three-phase systems. *Biopr. Eng.* **17**:307-316.
- Serrano-Carreón, L., Balderas-Ruiz, K., Galindo, E. and Rito-Palomares, M. (2002) Production and biotransformation of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**:170-174.
- Serrano-Carreón, L., Flores, C. and Galindo, E. (1997) γ -Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in a stirred bioreactor. *Biotechnol. Prog.*, **13**: 205-208.

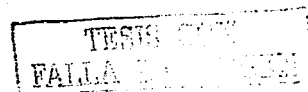


- Shimizu, K., Minekawa, K., Hirose, Y. and Kawase, Y. (1999) Drop breakage in stirred tanks with Newtonian and no-Newtonian fluid systems. *Chem. Eng. J.* **72**: 117-124.
- Sittig, W. (1983) Fermentation reactors, *Chem. Tech.* (October): 606-613.
- Smith, J.S. and Valsaraj, K.T. (1998) The promise of solvent sublation. *Chem. Eng. Prog.* **94**(5):69-77.
- Stowell, J.D. (1987) The application of oils and fats in an antibiotic process. In: *Carbon Substrates in Biotechnology*. Stowell, J.D., Beardsmore, A.J., Keevil, C.W. and Woodward, J.R. (Eds.) Oxford, ERL, pp. 139-159.
- Taboada, B., Larralde, P., Brito-Albavera, T., Vega-Alvarado, L., Díaz, R., Galindo, E. and Corkidi, G. (2003) Images acquisition of multiphase dispersions in fermentation processes. *Instrumentation & Development* (en prensa).
- Tan, I.K.P., Sudesh Kumar, K., Theanmalar, M., Gan, S.N. and Gordon III, B. (1997) Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:207-211.
- Tatterson, G.B. (1991) Gas dispersion in agitated tanks. In: *Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks*, McGraw-Hill, USA, pp. 417-529.
- Treybal, R.E. (1980) Equipo para las operaciones gas-líquido; Absorción de gases. *Operaciones de Transferencia de Masa*, 2ª. ed., McGraw-Hill, Caps. 6 y 8: 157-246; 306-377.
- Tsouris, C., Lizama, H.M., Spurrier, M.A., Takeuchi, T.L. and Scott, T.C. (1996) Hydrodynamics of bioreactor systems for liquid-liquid contacting. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57/58**: 581-592.
- Tuffile, C. and Pinho, F. (1970) Determination of oxygen-transfer coefficients in viscous *Streptomyces* fermentations. *Biotechnol. Bioeng.* **12**: 849
- Urata, K. and Takaishi, N. (2001) A perspective on the contribution of surfactants and lipids toward "Green Chemistry": present states and future potential. *J. Surf. Deterg.* **4** (2):191-200.
- van der Meer, A.B., Beenackers, A.A.C.M., Burghard, R., Mulder, N.H. and Fok, J.J. (1992) Gas/liquid mass transfer in a four-phase stirred fermentor: effects of organic phase hold-up and surfactant concentration. *Chem. Eng. Sci.* **47**:2369-2374.
- van Sonsbeek, H.M., Beefink, H.H. and Tramper, J. (1993) Two-liquid phase bioreactors. *Enzyme Microb. Technol.* **15**(10):722-729.



Referencias

- Vandamme, E.J. (1992) Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **53**(4):313-327.
- Vardar-Sukan, F. (1985) Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors. Part I: Operating variables affecting mass transfer: *Process Biochem.* **20**-181-184.
- Vardar-Sukan, F. (1998) Foaming: consequences, prevention and destruction. *Biotechnol. Adv.* **16**(5/6): 913-948.
- Zhou, G. and Kresta, S.M. (1998a) Evolution of drop size distribution in liquid-liquid dispersions for various impellers. *Chem. Eng. Sci.* **53**: 2099-2113.
- Zhou, G. and Kresta, S.M. (1998b) Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. *Chem. Eng. Sci.*, **53**: 2063-2079.

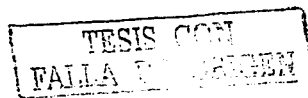


Apéndice A

Oil and fungal biomass dispersión in a stirred tank containing a simulated fermentation broth:

Córdova-Aguilar, M.S., Sánchez , A., Serrano-Carreón, L. and Galindo, E. (2001) *J. Chem. Technol.*

***Biotechnol.* 76 (11): 1101 – 1106.**



Oil and fungal biomass dispersion in a stirred tank containing a simulated fermentation broth

Ma Soledad Córdova-Aguilar, Adriana Sánchez, Leobardo Serrano-Carreón and Enrique Galindo*

Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250, México

Abstract: The production of γ -decalactone by the filamentous fungus *Trichoderma harzianum* involves four phases (oil–water–air–mycelium) and its dispersion is crucial during fermentation. Oil and biomass (when present) dispersion, as a function of the volumetric power drawn (P/V), was characterized, in two; three- and four-phase systems agitated with Rushton turbines. *Trichoderma harzianum* mycelium was used as the solid phase in the four-phase system. Two stages of the fermentation were simulated: the beginning (15% oil and 1.4 kg m^{-3} of mycelium) and the end (2% oil and 10.6 kg m^{-3} of mycelium). In the two-phase system, the use of exhausted broth achieved higher oil dispersions at low P/V values as compared with distilled water. Aeration decreased the oil dispersion for the high-oil system, but enhanced oil dispersion for the low-oil system. Compared with the P/V used in the actual fermentation (0.2 kW m^{-3}), a high segregation of the system was observed for the high-oil/low-biomass system, due to the difficulty of mixing the thick oil–air emulsion present at the top of the tank. The system simulating the end of the fermentation reached almost complete homogeneity of oil and biomass, a phenomenon due to the high biomass/oil ratio and the biomass acting as an oil carrier.
© 2001 Society of Chemical Industry

Keywords: four-phase system; oil dispersion; *Trichoderma harzianum*

NOTATION

D	Impeller diameter (m)
K	Consistency index (Pas ⁿ)
n	Power law index (dimensionless)
P	Power (kW)
T	Vessel diameter (m)
V	Volume (m ³)

1 INTRODUCTION

Most fermentation processes involve multiphase mixing. Aerobic fermentation of filamentous organisms covers a wide range of industrially important biological processes where the solid phase becomes hydrodynamically important.¹ Fermentations are particularly complex when the carbon source or another nutrient is immiscible in water as in antibiotic production,² where oils have been widely adopted as the main or supplementary carbon source, because they improve process yields. Furthermore, it has been claimed that oils protect fragile microorganisms,³ possess natural antifouling properties, are cheaper than other carbon sources (ie carbohydrates)⁴ and reduce the concentration of some inhibitory metabolites present in the culture medium.⁵ Oils also enhance the production of

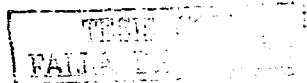
lipid-soluble materials,⁶ lipases,⁷ biopolyesters⁸ and other products³ such as riboflavin and citric acid. The use of a water-immiscible liquid phase has been useful for complex biotransformations⁹ such as those for the purification of oil-contaminated water, fossil fuel desulfurization and production of biosurfactants.

In processes involving mycelial organisms, the fermentation broth may become highly viscous and rheologically complex and the solid phase (biomass) can significantly restrict oxygen transfer.¹⁰ Bulk liquid mixing of these viscous non-Newtonian broths is complex¹¹ and productivity may be affected by the level of agitation, which influences liquid–liquid and gas–liquid dispersion and ultimately determines the interfacial area for mass transfer of oxygen and other nutrients.

Trichoderma harzianum is a filamentous fungus able to produce γ -decalactone (which has a peach-like aroma) when castor oil is the carbon source.¹² As biomass increases during cultivation, *T. harzianum* develops highly viscous and non-Newtonian broths with a pseudoplastic behaviour.¹² The formation of stagnant zones in the fermenter with an apparent strong segregation of the immiscible liquid phases (castor oil and aqueous solution) is observed. Therefore, reduced mass transfer capacity and low dissolved

* Correspondence to: Enrique Galindo, Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62250, México
E-mail: galindo@ibi.unam.mx

Contract/grant sponsor: DGAPA-UNAM; contract/grant number: IN 119598
(Received 4 April 2001; revised version received 18 June 2001; accepted 3 July 2001)



oxygen tension (DOT) occur within the fermenter. Such behaviour influences specific growth rate, biomass concentration and/or metabolite production.¹³

The most widely used strategy to achieve complete liquid-liquid dispersion is to manipulate the agitation rate,¹⁴ which has been used to improve mass transfer as well. However, *T. harzianum* is a shear-sensitive microorganism,¹² which prevents the use of high agitation rates. Instead, various kinds of impeller geometries¹⁵ and different impeller-sparger configurations¹³ have been used in order to improve phase dispersion and mass transfer in such culture.

T. harzianum cultivation for γ -decalactone production is a four-phase system involving complex mixing of castor oil (organic phase), culture media (aqueous phase), mycelium (solid phase) and air (gas phase). Information about the hydrodynamics of such complex system is limited,^{9,10} and no studies have documented the dispersion of the solid (biomass) and the immiscible liquid phase (oil) as a function of power drawn. The aim of this work was to characterize the mixing process in terms of the multiphase dispersion.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Mixing conditions and power drawn measurement

A system of triple Rushton turbines ($D/T = 0.33$) was used. Power drawn and oil dispersion in two- (oil-broth or oil-water), three- (oil-broth-air) as well as biomass dispersion in four-phase (oil-broth-biomass-air) systems were characterized. The experiments were carried out in a 0.01 m³ working volume mixing tank mounted on an accurate air-bearing dynamometer.¹⁶

Figure 1 shows a schematic diagram of the mixing tank used in this work. The stirring speed was varied from 1 to 6.5 s⁻¹. When aerated, a gas flow rate of 1 vvm was used. Samples of 10 × 10⁻⁶ m³ were taken at each stirring speed using a peristaltic pump for determining both oil and biomass (when present) fractions at the sampling point, which was located in front of the bottom impeller (Fig 1). Proper care was taken to discard tubing contents between samples.

In order to simulate the initial conditions of the fermentation, 15% (w/w) of castor oil and 1.4 kg m⁻³ of fresh *Trichoderma* mycelium were used. Likewise, 2% (w/w) of castor oil and 10.6 kg m⁻³ of fresh biomass were used to simulate the final stage of the fermentation. The rheological properties of the mycelium suspensions were stable during and after the mixing experiments. Rheological evaluations were performed using a double helical ribbon impeller adapted in a Contraves Rheomat 120 rheometer according to the procedure proposed by Bongenaar *et al.*¹⁷ Data were fitted to the power law model as described elsewhere.¹⁸ K' values were 0.015 and 0.082 Pasⁿ for the mycelium suspensions of 1.4 and 10.6 kg m⁻³, respectively. Flow behaviour indices were 0.21 and 0.16, respectively.

2.2 Production of *Trichoderma harzianum* biomass

T. harzianum IMI 206040 was used. Inoculum production, as well as the fermentation medium, was similar to that reported before,¹² only the carbon source (castor oil) was replaced by glucose. A pilot plant 0.350 m³ batch fermentation was carried out in order to produce the mycelium. The fermenter ($D = 0.69$ m) was equipped with two Rushton turbines ($D/T = 0.43$), and pH and dissolved oxygen probes. The culture was controlled at 29 °C. The stirring

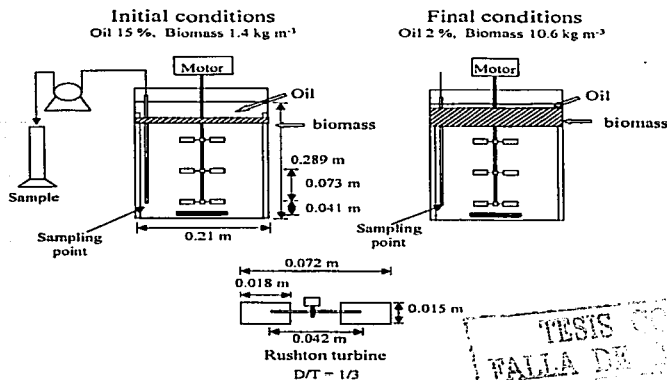


Figure 1. Schematic diagram of the mixing tank and location of impellers.

speed was 1.083 s^{-1} and the air flow rate 1 vvm . The pH was maintained at 5.6 by the automatic addition of NaOH (2 mol dm^{-3}). Mycelium was harvested after 96 h of culture and sieved with a cheese-cloth to withdraw the exhausted culture broth, which was collected and stored at 4°C to be used later as aqueous phase. Its viscosity and density were similar to those of water and its surface tension was 62 mNm^{-1} (determined by a Fisher Scientific Tensiometer 20, USA). The recovered biomass was resuspended in the exhausted broth at concentrations of 1.4 and 10.6 kg m^{-3} . Some experiments to characterize the liquid-liquid mixing of castor oil and aqueous phase were performed using distilled water.

2.3 Oil and biomass determinations

Castor oil (food grade, viscosity = 560 mPa s , determined at 26°C) was quantified by extraction from the samples using $5 \times 10^{-6}\text{ m}^3$ of *n*-hexane in a first extraction, and $3 \times 10^{-6}\text{ m}^3$ in a second extraction. The *n*-hexane was evaporated at room temperature. The pre-weighed test tubes with the oil fraction were dried to constant weight at 80°C and measured gravimetrically. Biomass was quantified by dry weight as reported before.¹²

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Two-phase systems: oil-water and oil-broth systems

A first approach to characterize the liquid-liquid mixing of castor oil and aqueous phase was carried out using distilled water as the aqueous phase. Nevertheless, the actual fermentation system is conducted using a salt-rich aqueous solution as culture medium. Therefore, in order to simulate the actual composition of the fermentation broth, the exhausted culture medium was also used as the aqueous phase. The effect of the type of aqueous phase (distilled water or exhausted broth) on oil dispersion under un aerated conditions is shown in Fig 2. Overall, and for $P/V < 0.3\text{ kW m}^{-3}$, oil was better dispersed in the broth-oil system than in the distilled water-oil system for the two concentrations of oil tested. However, for $P/V > 0.4\text{ kW m}^{-3}$, oil is similarly dispersed in both distilled water-based and broth-based systems. Clearly, the composition of the aqueous phase had an effect on oil dispersion. Similar effects have been observed for another multiphase system.¹⁹ Many different compounds produced by *Tharxianum* during culture (such as hydrolytic enzymes and glycosylated proteins) are secreted to the broth,²⁰ which act as surfactants and hence contribute to better oil dispersion in the broth-based system. It has been shown that such proteins are quite suitable for stabilizing oil dispersions.²¹ As aqueous phase composition affects oil dispersion, further experiments were conducted using the exhausted broth in order to better simulate the actual conditions of the fermentation.

Figure 2 also shows that oil content did not affect

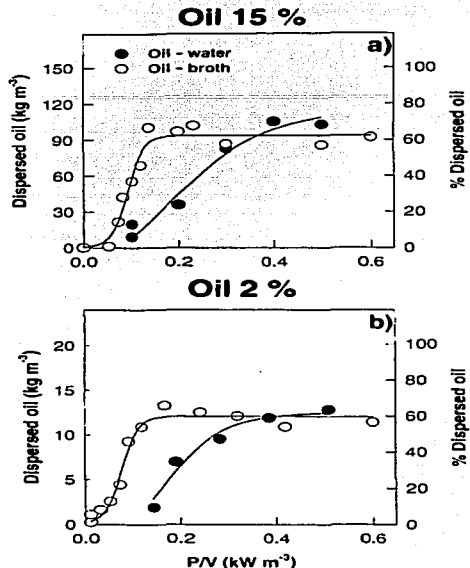


Figure 2. Comparative oil dispersion as a function of the volumetric power drawn for: (a) 15% (w/w) and (b) 2% (w/w) of castor oil in two-phase systems.

the oil dispersion profiles (in terms of percentage of oil dispersed). This is in line with the fact that, under un aerated conditions, oil dispersion depends mainly on the bulk blending ability of the impeller.²² It was noticeable that in terms of the amount of oil dispersed, the high-oil condition dispersed 7.5-fold the amount of oil dispersed by the low-oil system. This behaviour is in part due to the initial shorter distance between the top impeller and the oil phase layer in the high-oil system (Fig 1), which facilitates the incorporation of the oil to the flow patterns generated by the impeller system.

3.2 Three-phase systems

3.2.1 Effect of aeration on oil dispersion (oil-broth-air)
As shown in Fig 3, the presence of the third phase (air) in the oil-broth system had different effects on the oil dispersion depending upon the oil content. In the 15% castor oil system, a negative effect was observed (Fig 3(a)) whereas aeration enhanced oil dispersion in the 2% castor oil system (Fig 3(b)). This may be a

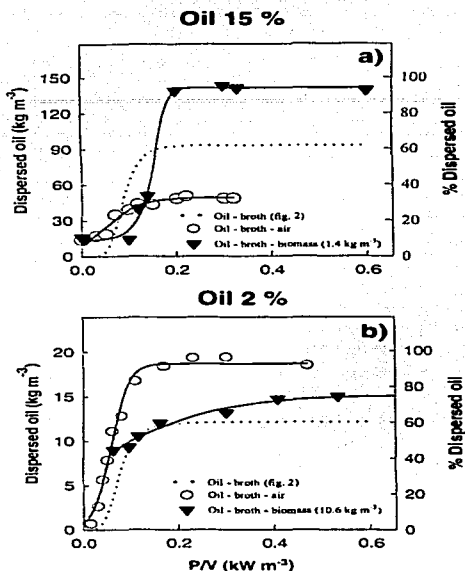


Figure 3. Oil dispersion as a function of the volumetric power drawn for: (a) 15% (w/w) and (b) 2% (w/w) of castor oil for two and three phases. Aeration (when present) = 1 vvm.

consequence of the formation of an air-oil emulsion at the top of the tank (a phenomenon that has been observed in the actual fermentation¹³ and which rules phase interaction) and the fact that bubbles are trapped inside oil drops, as documented recently.¹¹ It has been shown¹¹ that larger oil drops and smaller air bubbles (measured as Sauter mean diameter, d_{32}) are observed as the oil concentration increased. In the case of high-oil (15%), the reasons for the negative effect of aeration (observed above 0.1 kW m^{-3}) could be due to the presence of relatively small

($d_{32} \sim 700 \mu\text{m}$),¹¹ and probably more, bubbles contained in large oil drops ($d_{32} \sim 1750 \mu\text{m}$).¹¹ The consequence of this is a low average density of the oil phase (containing air bubbles inside), which promotes liquid phase separation, therefore enhancing segregation. In fact, a thick layer of the air-oil emulsion was observed at the top of the tank. As the system with low-oil has relatively small oil drops ($d_{32} \sim 1200 \mu\text{m}$)¹¹ and large air bubbles ($d_{32} \sim 1300 \mu\text{m}$),¹¹ the probability of bubbles being inside oil drops is considerably lower and, therefore, the average density of the oil phase (containing air bubbles) is expected to be higher than in the case of the high-oil system. Furthermore, for the low castor oil content (2%), the air-oil emulsion was also observed at the top of the tank. In this case, the air-oil emulsion reduces significantly the distance between the oil layer and the top impeller, which may be contributing, in addition to the higher average density of the oil phase, to enhance oil dispersion. For the high-oil system, it was observed that less than 40% of the oil was dispersed at $P/V \geq 0.2 \text{ kW m}^{-3}$ and for the low-oil system (at the same P/V), 90% of the oil was dispersed. However, it should be pointed out that dispersed oil quantities were quite different in either case. Table 1 shows the quantities of oil dispersed (kg m^{-3}) at a power drawn of 0.2 kW m^{-3} (under which the actual fermentation is conducted).¹³ For the high-oil system, up to 18 kg m^{-3} were dispersed, which is 50% less than in the non-aerated system (98 kg m^{-3}), whereas for the low-oil system, 18 kg m^{-3} were dispersed, 40% higher than in the two-phase system (13 kg m^{-3}). This indicates that even if higher segregation was observed in the high-oil system (initial fermentation conditions), the amount of oil dispersed was always higher than in the low-oil system.

3.2.2 Effect of biomass on oil dispersion (oil-broth-biomass)

For conditions of high-oil/low-biomass, simulating the beginning of the fermentation (but with no air), similar oil fractions were dispersed at $P/V < 0.2 \text{ kW m}^{-3}$ for the systems with and without biomass (Fig 3(a)). However, at $P/V > 0.2 \text{ kW m}^{-3}$, a higher fraction of oil was dispersed due to the presence of biomass (Fig 3(a)) and it constituted practically all the oil present in the system (95%). On the other hand, for conditions simulating the end of the fermentation (low-oil/high-biomass, but with no air), the presence of biomass did not affect oil dispersion for $P/V < 0.3 \text{ kW m}^{-3}$, whereas

Table 1. Extent of dispersed oil and biomass at 0.2 kW m^{-3}

	Oil-broth	Oil-broth-air	Oil-broth-biomass	Oil-broth-biomass-air
Oil 15%, biomass 1.4 kg m^{-3}				
Oil dispersed, kg m^{-3} and (%)	98 (65)	48 (32)	143 (95)	12 (8)
Biomass dispersed, kg m^{-3} and (%)	—	—	1.2 (86)	0.28 (20)
Oil 2%, biomass 10.6 kg m^{-3}				
Oil dispersed, kg m^{-3} and (%)	13 (65)	18 (90)	12 (60)	16.2 (81)
Biomass dispersed, kg m^{-3} and (%)	—	—	9.8 (93)	8.8 (83)

a slightly higher oil dispersion was evident for $P/V > 0.4 \text{ kW m}^{-3}$ (Fig 3(b)). In terms of the quantities of oil dispersed (kg m^{-3}) at a power drawn of 0.2 kW m^{-3} (Table 1), 1.43 kg m^{-3} of oil were dispersed in the high-oil content system, 46% more than in the system without biomass (oil-broth). For the low-oil content system, 12 kg m^{-3} of oil were dispersed, a quantity similar to the oil-broth system.

3.3 Four-phase system

3.3.1 Biomass dispersion (three and four phases)

Biomass dispersion as a function of volumetric power drawn in the three- (oil-broth-biomass) and four-phase systems (oil-broth-air-biomass) is shown in Fig 4. For the high-oil/low-biomass system (Fig 4(a)), biomass dispersion differed for aerated and unaerated conditions. Without aeration, practically all the biomass present was dispersed (1.2 kg m^{-3}). Aeration caused a strong negative effect on the biomass dispersion: less than 30% of the biomass was dispersed under this condition (0.28 kg m^{-3}). In contrast, in the

low-oil/high-biomass system, a similar high-biomass dispersion profile was exhibited under unaerated and aerated conditions (Fig 4(b)).

3.3.2 Oil dispersion

For the high-oil/low-biomass system, aeration had a pronounced negative effect (Fig 5(a)), whereas for the low-oil/high-biomass system, aeration enhanced oil dispersion (Fig 5(b)). Comparing the effect of the different phases, aeration affected oil dispersion to a greater extent than biomass did. Overall, a good biomass dispersion favours oil dispersion. Particularly at low oil concentration, aeration in the presence of biomass had a positive effect on oil dispersion (Fig 5(b)). The data suggest that biomass is playing a role as an oil carrier, therefore enhancing oil dispersion. Because of the high biomass/oil ratio, the contact area is larger and oil dispersion can therefore be improved by facilitating oil droplet-mycelial collisions, as has been shown to occur in clavulanic acid production.²

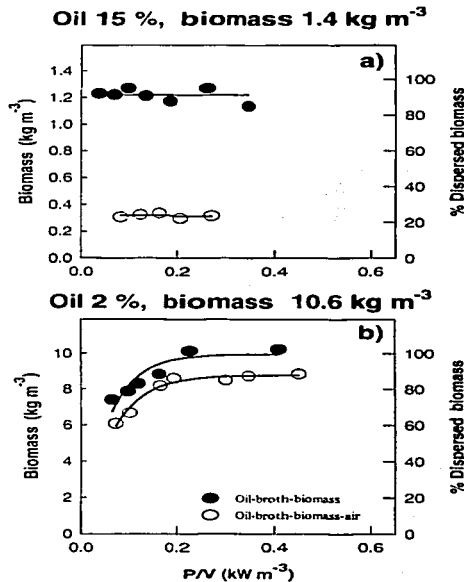


Figure 4. Biomass dispersion as a function of volumetric power drawn for conditions of high-oil/low-biomass (a) and low-oil/high-biomass (b) under unaerated and aerated (1 vvm) conditions.

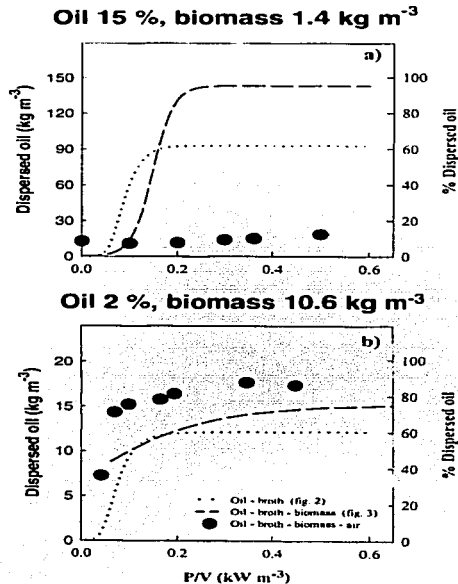


Figure 5. Oil dispersion as a function of volumetric power drawn in three- and four-phase systems for the two simulated conditions of fermentation. Aeration (when present) = 1 vvm.



3.3.3 Homogeneity of the system

The extent of oil and biomass dispersion was indicative of the homogeneity of the system. At the beginning of the culture (high-oil/low-biomass), where the oil/biomass ratio is 107, the segregation of the system is high as only 8% of the oil (referred to the homogeneous) and 20% of the biomass were detected at the bottom impeller (Table 1, last column). At the end of the culture (oil/biomass ratio of 2), despite the rheological complexity due to the higher biomass content, the homogeneity of the phases was considerably higher than that occurring at the beginning of the fermentation. The last column of Table 1 shows that up to 81-83% of the homogeneous oil and biomass concentrations were detected at the bottom impeller in the four-phase system.

4 CONCLUSIONS

Oil was better dispersed if the aqueous phase was an exhausted broth, as compared with distilled water. Aeration had a negative effect on oil dispersion in the high-oil system whereas it enhanced oil dispersion in the low-oil system. The low amount of biomass dispersed in the system with high oil content indicates that, at the beginning of the process, segregation controls the oil and biomass dispersion. However, at the end of the process, the high concentration of biomass dispersed is the factor that enhances oil dispersion because the mycelium acts as an oil carrier. Poor initial mixing due to the presence of the air-oil mixture and a layer of biomass, both at the top of the tank, is the main limitation to overcome. However, although the high-oil system presented a higher segregation than the low-oil system, under aerated conditions, either system seemed to fulfil the nutritional requirements of the fungus. Despite the changes in the rheology of the broth, homogeneity was higher as fermentation proceeded, a phenomenon associated with the increase of the biomass/oil ratio and the role of the biomass as oil carrier.

ACKNOWLEDGEMENTS

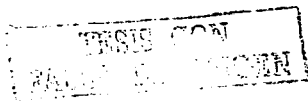
This project was financed in part by DGAPA-UNAM (grant IN 119598). The technical assistance of V Albitar, M Caro, C Flores and M Patiño is gratefully acknowledged. Helpful discussions with JA Rocha-Valadéz, P Larralde-Corona and A Martínez-Jiménez are acknowledged with thanks.

REFERENCES

- 1 Cooke M, *Processing of Solid-Liquid Suspensions*, Ed by Shamlou PA, Butterworth-Heinemann Ltd. pp 192-220 (1993).
- 2 Large KP, Ison AP and Williams DJ, The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* 63:111-119 (1998).
- 3 Ratledge C, Fermentation substrates. *Ann Rev Ferment Proc* 1:49-71 (1977).
- 4 Jones AM and Porter MA, Vegetable oils in fermentation:

beneficial effects of low-level supplementation. *J Ind Microbiol Biotechnol* 21:203-207 (1998).

- 5 Eiki H, Gushima H, Saito T, Ishida H, Oka Y and Osano T, Product inhibition and its removal on josamycin fermentation by *Streptomyces narbonensis*. *J Ferment Technol* 66:559-565 (1988).
- 6 Keudell KC, Huang JK, Wen L, Klopfenstein WE, Bagby MO, Lanser AC, Plattner RD, Peterson RE and Weisleder D, Fatty acids enhanced tubercycin production by *Pseudomonas* strain 2HS. *Microbios* 102(401):27-38 (2000).
- 7 Dalmau E, Sánchez A, Montesinos JL, Valero F, Lafuente FJ and Casas C, Study of drop size frequencies in a microbial growth system with an aqueous-organic medium: lipase production from *Candida rugosa*. *J Biotechnol* 59:183-192 (1998).
- 8 Haeber B, Turul O, Boreckli M, Lenz RW, Fuller RC and Goodwin SD, Bacterial production of polyesters from free fatty acids obtained from natural oils by *Pseudomonas oleovorans*. *J Environ Polymer Degrad* 6(2):109-113 (1998).
- 9 Kollmer A, Schmid A, Rudolf von Rohr PH and Sonnleitner B, On liquid-liquid mass transfer in two-liquid-phase fermentations. *Bioproc Eng* 20:441-448 (1999).
- 10 Elhibol M and Mavituna F, Characteristics of antibiotic production in a multiphase system. *Process Biochem* 32(5):417-422 (1997).
- 11 Galindo E, Paek AW and Nienow AW, A study of drop and bubble sizes in a simulated mycelial fermentation broth up to four phases. *Biotechnol Bioeng* 69(2):213-221 (2000).
- 12 Serrano-Carreón L, Flores C and Galindo E, Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in a stirred bioreactor. *Biotechnol Prog* 13:205-208 (1997).
- 13 Rocha-Valadéz JA, Galindo E and Serrano-Carreón L, Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. *Bioproc Eng* 23:403-410 (2000).
- 14 Armentante PM and Abu-Hakmeb EA, A novel method for the experimental determination of the minimum agitation speed for complete liquid-liquid dispersion in agitated liquid-liquid systems. *Trans I Chem E* 72(Part A):677-685 (1994).
- 15 Godoy-Silva RD, Serrano-Carreón L, Asciano G and Galindo E, Effect of impeller geometry on the production of aroma compounds by *Trichoderma harzianum*, in *Proc 4th Int Conf on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics*, Ed by BHR Group, Edinburgh, UK, pp 61-72 (1997).
- 16 Resendiz R, Martínez A, Asciano G and Galindo E, A new pneumatic bearing dynamometer for power input measurements in stirred tank. *Chem Eng Technol* 14:105-108 (1991).
- 17 Bongenaar JJM, Kossen NWF, Metz B and Meinboom FN, A method for characterising the rheological properties of viscous fermentation broths. *Biotechnol Bioeng* 15:201-209 (1973).
- 18 Brito-De La Fuente E, Nava JA, Medina L, Asciano G and Tanguy P, On the use of helical ribbon based viscosimetry for the determination of flow curves, in *Rheology VII*, Ed by Ait-Kadi JM, Jaws DF and Williams MC, Canadian Group of Rheology, pp 672-677 (1996).
- 19 Tsouris C, Lizama HM, Spurrier MA, Takeuchi TL and Scott TC, Hydrodynamics of bioreactor systems for liquid-liquid contacting. *Appl Biochem Biotechnol* 57:581-592 (1996).
- 20 Peberly JF, Protein secretion in filamentous fungi - trying to understand a highly productive black box. *Trends Biotechnol* 12:50-57 (1994).
- 21 Tuinier R and de Kruif CG, Phase separation, creaming and network formation of oil-in-water emulsions induced by an exocellular polysaccharide. *J Colloid Interface Sci* 218:201-210 (1999).
- 22 Armentante PM and Huang YJ, Experimental determination of the minimum agitation speed for complete liquid-liquid dispersion in mechanically agitated vessels. *Ind Eng Chem Res* 31:1398-1406 (1992).

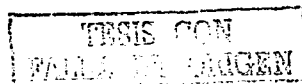


Apéndice B

Distribution of free and oil trapped air bubbles in simulated broths containing fungal biomass.

C. Patricia Larralde-Corona, Ma. Soledad Córdova and Enrique Galindo (2002) *Can. J. Chem. Eng.*

80: 491-494





Distribution of the Free and Oil-Rrapped Air Bubbles in Simulated Broths Containing Fungal Biomass

C. Patricia Larralde-Corona, Ma. Soledad Córdova and Enrique Galindo*

Departamento de Bioingeniería, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca 62250, Mor., México

The use of a second, water-immiscible liquid phase is common in industrial biotechnology. Oils are used in fermentation processes for a wide number of reasons and to perform a variety of tasks. The roles of oils include carbon sources, antifoams, oxygen carriers and extractants of lipid-soluble (sometimes toxic) metabolites. A comprehensive literature review of the field has been included in the recent papers by Galindo et al. (2000) and Córdova-Aguilar et al. (2001), which describe the specific applications and the problems involved when using immiscible oils in bioprocessing.

Although oils have been used in submerged culture fermentation processes for a very long time (Cavanagh et al., 1994), their role in the fermentation process is not completely understood and very little is known about their effect on physical processes such as air dispersion. Recently, Galindo et al. (2000) published a study on oil drops and bubble sizes in a four-phase simulated fermentation broth. They found that bubble size decreased as the oil content was increased, and reported that the presence of fungal biomass significantly decreased bubble size. One interesting result of that study was the fact that air bubbles were trapped by oil drops. However, no attempt was made in that work to identify the extent to which bubbles were trapped inside oil drops. This phenomenon will have an important effect on the overall oxygen transfer, as oxygen transfer from a bubble to a viscous oil and then to the aqueous medium, is of will of course bedifferent to the normally assumed pathway mechanism of oxygen transfer from a bubble to aqueous medium (McMillan and Wang, 1987).

The aim of this work is to quantify the proportion and sizes of the bubbles present in a four-phase model fermentation system comprising oil, an aqueous medium, biomass and air bubbles, and to identify the location of the bubbles, i.e., whether they are inside oil drops (oil-trapped) or freely suspended in the aqueous phase.

Experimental Stirred Tank

The tank and impeller used in this work mimicked the setup used previously (Galindo et al., 2000). The flat-bottomed glass tank had a diameter (T) of 0.15 m. The liquid height was 0.118 m, giving a volume of 2 L. The tank was equipped with a single Rushton turbine ($D = 0.07$ m),

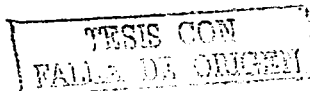
The location of air bubbles (i.e. inside oil drops or free in the aqueous phase) was studied by image analysis as a function of the oil and biomass concentrations in a 2 L stirred tank using a simulated fermentation medium (aqueous-salt solution, castor oil, air and fungal biomass) agitated by a Rushton turbine. The solid (fungal) phase plays an important role in defining the location of bubbles, as the percentage (in bubble volume) of bubbles trapped in oil increases threefold when biomass is added to the medium. The bubbles located inside oil drops were found to occupy 60% of the total bubble volume and to be 40% smaller than those which were non-oil associated. This phenomenon has important implications for oxygen mass transfer in multiphase fermentations.

On a étudié la localisation de bulles d'air (p. ex., à l'intérieur des gouttes d'huile ou à l'état libre dans la phase aqueuse) par analyse d'images en fonction des concentrations d'huile et de biomasse dans un réservoir de 2 L agité par un turbine Rushton avec un milieu de fermentation simulé (solution aqueuse-sel, huile de castor, air et biomasse fongique). La phase solide (fongique) joue un rôle important pour déterminer la localisation des bulles car le pourcentage (dans le volume de bulles) de bulles prisonnières dans l'huile triple avec l'ajout de biomasse dans le milieu. On a trouvé que les bulles localisées à l'intérieur des gouttes d'huile occupaient 60 % du volume total de bulles et étaient plus petites de 40 % que les bulles non associées à l'huile. Ce phénomène a des répercussions importantes sur le transfert de matière de l'oxygène dans les fermentations polyphasiques.

Keywords: bubbles, oil dispersion, fungal biomass, multiphase mixing, image analysis.

placed 0.06 m from the tank bottom. The vessel had four equally spaced stainless-steel baffles, with a width of 7/10. Temperature was controlled at 26°C by a water jacket. Air was supplied by a stainless steel sintered sparger placed underneath the impeller. Air

*Author to whom correspondence may be addressed. E-mail address: galindo@ibt.unam.mx



flow was fixed at 0.25 vvm and agitation rate at 250 rpm in all experiments. Experiments were conducted in duplicate. Typical standard errors were lower than 10% and they have been included as error bars in all figures.

Image Analysis Equipment

Figure 1 shows the system used. The images were captured by a CCD video camera (Hitachi KP-D50 digital) attached to a stereomicroscope, which was set at a magnification of 2.5X. A high-energy strobe lamp was used to feed an optic fibre probe, placed inside the vessel one centimetre above the upper corner of the impeller blades, with a gap of 1.5 cm between the light and the vessel wall. A purpose-built synchronization circuit was used to couple the framing signal of the camera to the flashing strobe lamp. Measurements of bubbles (or drops) at the mid-plane between the baffles were conducted 30 min after of starting up the experiment. This time was determined to allow in preliminary experiments in which the dispersion was followed until no changes occurred, implying that equilibrium of the phases was reached. The commercial software package Image-Pro® Plus v. 4.1 (Media Cybernetics, USA) was used. Algorithms for image processing were developed to measure bubble and drop diameter, counting a minimum of 700 objects per sample in order to have reproducible calculations and statistically validated data (error <10%). In practically all the images, we observed spherical objects. Their volume was calculated using their diameter, which we considered to be that of a sphere.

Solid, Continuous and Dispersed Liquid Phases

The composition of the aqueous phase (continuous phase) and the procedures used to obtain the solid phase (fungal biomass of *Trichoderma harzianum* IMI 206040) were as described by Galindo et al. (2000). Biomass concentrations of 0.5, 2 and 5 g/L, which are typical of that occurring in an actual fermentation (Serrano-Carreón et al., 1997; Rocha-Valadez et al., 2000), were used at 10% castor oil concentration. The dispersed phase, food-grade castor oil (Aldrich Chemical Co.) was used at concentrations (v/v of the aqueous phase) ranging from 2% to

15%. Good pictures of both drops and bubbles were obtained at up to 5 g/L of biomass (Figure 1). Above this concentration, clear images could not be obtained. The oil density was 960 kg/m³ and its viscosity at 26°C was 560 mPa·s.

Solid (Biomass) Morphology determination

The morphology of the biomass was as loose aggregates, being morphologically the same as the one used by Galindo et al. (2000). Samples of biomass were fixed using a formaldehyde solution (Clark, 1981) and 1 mL aliquots were stained with 20 µl of a 0.1% aqueous methylene blue solution. Images were obtained by a CCD video camera (Hitachi KP-D50 colour digital) attached to an optical microscope (Optiphot-2, Nikon, Japan). Images were quantified using a commercial image analysis software package (Image Pro Plus v. 4.1, Media Cybernetics, USA). The aggregate size was measured by analysing at least 300 objects per sample. The average aggregate diameter (which refers to the average length of diameters passing through the aggregate's centroid) was 280 µm, with an object density (or porosity) of 0.7.

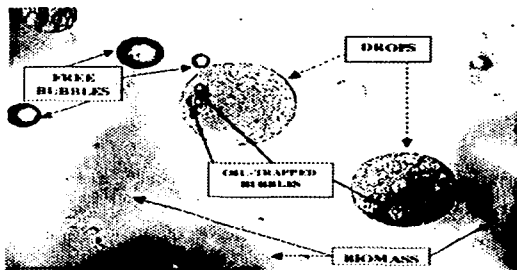


Figure 1. Experimental set-up used for size analysis of air bubbles and oil drops. Images of a four-phase (air-oil-medium-mycelia) dispersion showing oil drops, air bubbles, and air bubbles inside oil drops and mycelia.

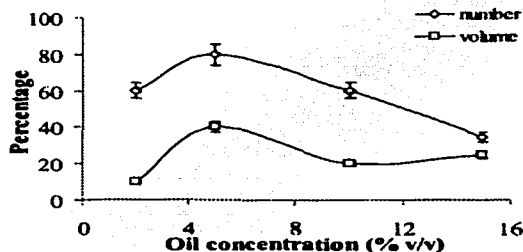


Figure 2. Proportion of oil-trapped bubbles in terms of number and volume as a function of oil concentration.

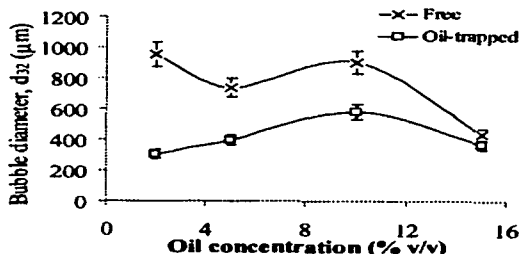


Figure 3. Effect of oil content (% v/v) on Sauter mean diameter of free and oil-trapped air bubbles.

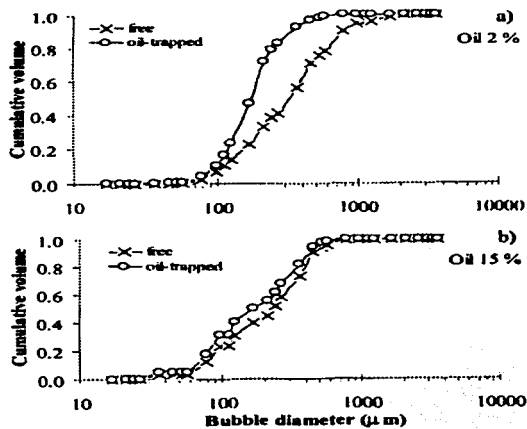


Figure 4. Cumulative volume distributions of free and oil-trapped bubbles at: a) 2%; and b) 15% oil. No biomass.

Results and Discussion

Data Reproducibility

As the experimental conditions in this work were practically the same as those in a previous work (Galindo et al., 2000), we first checked the reproducibility of the data by measuring oil drops sizes and by comparing bubble sizes (either free and oil-trapped) with those previously measured without identifying their location. The data of Galindo et al. (2000) for 10% oil concentration gave a very close value of 1000 μm for bubble diameter (regardless of location) to that measured in this work for free bubbles (900 μm). This may simply mean that free bubbles were easier to count as bubbles inside oil drops were less likely to be in focus in any given frame. For the oil concentrations of 2% and 5%, smaller bubble Sauter diameters (800 to 1000 μm) were found in this work when compared to the data reported by Galindo et al. (ca. 1500 μm). However, the distributions of bubble sizes measured in this work (see Figure 4a) at these low oil concentrations were very similar (data not shown) to the data of Galindo et al. (2000). Considering the standard error (<10%) of the determinations, the agreement with previous data was very good.

Effect of Oil Content

It was qualitatively reported by Galindo et al. (2000) that many air bubbles were trapped inside oil drops for the range of oil concentrations tested. As can be seen in Figure 2, in terms of both number and volume, the percentage of oil-trapped bubbles reached a maximum (statistically significant with >95% confidence) at an oil concentration of 5%. This percentage, in terms of bubble numbers, was as high as 80%. As shown in

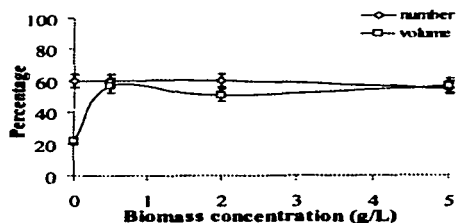


Figure 5. Proportion of oil-trapped bubbles, in terms of number and volume, as a function of fungal biomass concentration. Oil concentration: 10%.

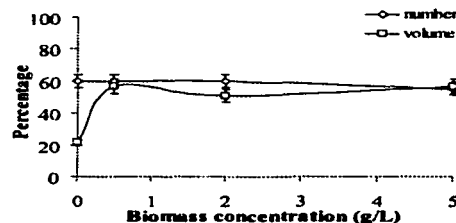


Figure 6. Effect of fungal biomass concentration on the Sauter mean diameter of free and oil-trapped air bubbles.

Figure 3, the Sauter mean diameter (d_{32}) of the free bubbles decreased as the oil content increased, whilst oil content caused an increase on the Sauter diameter of the oil-trapped bubbles, in the range of 2% to 10% oil. In this range, free bubbles exhibited a size distribution shift to the right (i.e., larger bubbles) when compared to the distribution of oil-trapped bubbles, as can be noticed in Figure 4a, where the cumulative volume distributions of free and oil-trapped bubbles for 2% oil is presented as an example. It is worth noticing that, at the highest oil concentration tested (15%) there is very little difference between free and oil-trapped bubble sizes (Figures 2 and 4b).

In general, oil-trapped bubbles were smaller than the free ones. For oil-trapped bubbles, increasing oil concentration caused a reduction in bubble number (as determined by the average number of bubbles per frame), associated with an increase in their Sauter diameter. This means that bubble coalescence can be occurring within the drops. This is consistent with an increase on Sauter mean diameter of the oil drops (see Figure 7 in Galindo et al., 2000), which consequently allows a higher volume of air to be held within them.

On the other hand, free bubbles decrease in size as oil concentration increases, probably because there are more and larger oil drops contacting the bubbles, a phenomenon that may inhibit bubble coalescence in the aqueous phase (Zahradnik et al., 1999).

Effect of Biomass

The effect of biomass on bubble size was investigated using an oil concentration of 10%. Biomass (regardless of the specific concentration) had a more pronounced effect than oil concentration (without biomass) on bubble sizes. As shown in Figure 5, the presence of biomass increased the proportion of bubble volume inside oil nearly three fold. Once present, biomass concentration had a relatively weak effect on the Sauter mean diameter of the bubbles. Interestingly, the percentage of free and oil-trapped bubbles remained constant, regardless of the biomass concentration (Figure 5). This suggests that there must have been changes in the sizes of the bubbles. In fact, a decrease of approximately 50% was found in free bubble size as a result of the presence of biomass, although this effect was less pronounced (30% decrease) for the bubbles inside oil drops (Figure 6). The mechanism of this phenomenon is not clear, though it may be associated with the fact that the presence of a solid phase could increase the frequency of collisions that bubbles have with a solid surface, thereby promoting break-up or inhibiting coalescence. This has already been demonstrated for other three-phase systems (Nienow et al., 1986; Kawase et al., 1997).

Implications for the Fermentation Process

Our results show that, under conditions similar to those present in a mycelial fermentation, where oil is used as the carbon source (such as those used for the production of aroma compounds, e.g. Serrano-Carreón et al., 1997; Rocha-Valadez et al., 2000), up to 60% of the bubbles (in terms of volume) are inside oil drops. The beneficial effect of oil, in terms of a higher volumetric oxygen transfer coefficient ($k_L a$) has been discussed before by Galindo et al. (2000). However, in that work, no quantification was made of the extent to which bubbles were trapped inside oil drops. With nearly 60% of the air volume (bubbles) inside oil drops, it is very likely that oil drops serve as temporary reservoirs for bubbles increasing their residence time, therefore allowing the oxygen contained in them to be transferred to the oil, and later on to the aqueous phase. This may explain mechanistically why other several authors (Rols and Goma, 1991; Ho et al., 1990; Ju et al., 1991) have shown a positive effect of increasing concentration of oils on the volumetric oxygen transfer coefficient along with a higher medium oxygen solubility.

Conclusions

A higher oil content resulted in a smaller free bubble sizes. In contrast, the size of bubbles inside oil drops increased slightly at a higher oil concentration. The volume of bubbles inside oil drops was found to comprise as much as 60% of the total bubble volume. Biomass had a pronounced effect on bubble size (either free or trapped in oil) and promoted a nearly three-fold increase of the percentage of bubbles volume inside oil drops. However, once present, bubble size proved to be relatively insensitive to biomass concentration. A large proportion of small bubbles inside oil drops may explain why these systems can have considerably higher $k_L a$ values than systems in which no oil or biomass are present.

Acknowledgements

This work was financed by the National University of México (DGAPA grants IN-119598 and IN-105500). The participation of Dr. Gabriel Coricki, Blanca Taboada and Teresa Brito in the design and implementation of the image analysis equipment is acknowledged with thanks. Dr. C.P. Larralde-Corona is currently at the Centro de Biología Genómica - IIM, in Cd. Reynosa (Tamaulipas), México.

Nomenclature

D	impeller diameter, (m)
d_{32}	Sauter mean diameter, (μm)
N	agitator speed, (s^{-1})
T	tank diameter, (m)
w_{vm}	volume of air per volume of liquid per minute, ($\text{m}^3/\text{m}^3 \text{ min}$)

References

- Cavanagh, M.E., A.P. Ison and M.D. Lilly, "The Utilization of Lipids during Streptomycete Fermentations", *Trans. Inst. Chem. Eng.* **72**, 14-16 (1994).
- Córdova-Aguilar, M.S., A. Sánchez, L. Serrano-Carreón and E. Galindo, "Oil and Fungal Biomass Dispersion in a Stirred Tank Containing a Simulated Fermentation Broth", *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **76**, 1-6 (2001).
- Clark, G. "Staining Procedures", 4th. edition, USA: Williams & Wilkins, PA (1981).
- Galindo, E., A.W. Patek and A.W. Nienow, "A Study of Drop and Bubble Sizes in a Simulated Mycelial Fermentation Broth up to Four Phases", *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 213-221 (2000).
- Ho, C.S., L. Ju and R.F. Baddour, "Enhancing Penicillin Fermentations by Increased Oxygen Solubility Through the Addition of N-hexadecane", *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 1110-1118 (1990).
- Ju, L.K., J.F. Lee and W.B. Armiger, "Enhancing Oxygen Transfer in Bioreactors by Perfluorocarbon Emulsions", *Biotechnol. Prog.* **7**, 323-329 (1991).
- Kawase, Y., T. Araki, K. Shimizu and H. Miura, "Gas-liquid Mass Transfer in Three-phase Stirred Tank Reactors: Newtonian and non-Newtonian fluids", *Can. J. Chem. Eng.* **75**, 1159-1163 (1997).
- Mc Millan, J.D. and D.L.C., Wang, "Enhanced Oxygen Transfer Using Oil-in-Water Dispersions", *Ann. NY Acad. Sci.* **506**, 569-582 (1987).
- Nienow, A.W., M. Konno, and W. Bujalski, "Studies on Three-phase Mixing: A Review and Recent Results", *Chem. Eng. Res. Des.* **64**, 35-42 (1986).
- Rocha-Valadez, J.A., E. Galindo and L. Serrano-Carreón, "Effect of the Impeller-sparger Configuration over *Trichoderma Harzianum* Growth in Four-phases Cultures Under Constant Dissolved Oxygen", *Bioproc. Eng.* **23**, 403-410 (2000).
- Rols, J.L. and G. Goma, "Enhanced Oxygen Transfer Rates in Fermentation Using Soybean Oil in Water Dispersions", *Biotechnol. Lett.* **13**, 7-12 (1991).
- Serrano-Carreón, L., C. Flores and E. Galindo, "g-Decalactone Production by *Trichoderma Harzianum* in a Stirred Bioreactor", *Biotechnol. Prog.* **13**, 205-208 (1997).
- Zahradnik, J., G. Kuncová and M. Fialová, "The Effect of Surface Active Additives on Bubble Coalescence and Gas Holdup in Viscous Aerated Batches", *Chem. Eng. Sci.* **54**, 2401-2408 (1999).

Manuscript received October 10, 2001; revised manuscript received April 29, 2002; accepted for publication May 31, 2002.

