



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Instituto de Biotecnología



Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis

**“Desarrollo y aplicación de un sistema de video de alta velocidad
para el análisis de dispersiones multifásicas”**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

Presenta:

Eliane Guevara López

CUERNAVACA, MOR.

FEBRERO 2008



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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Enrique Galindo Fentanes. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y con financiamiento del proyecto CONACyT - U 44098 – Z.

*La naturaleza benigna provee de manera que en cualquier parte
halles algo que aprender.*

Leonardo Da Vinci

Agradecimientos

Al Dr. Enrique Galindo por la oportunidad que me brindó al recibirme en su laboratorio, por la confianza depositada durante la maestría, enseñanzas y comentarios que permitieron la realización de mi trabajo.

A mi comité tutorial Dra. Laura Palomares y Dr. Rafael Vázquez por los comentarios hechos durante el desarrollo del trabajo.

A los miembros del Jurado

Dr. Gabriel Corkidi Blanco
Dr. Alfredo Martínez Jiménez
Dr. Frédéric Thalasso
Dra. Marcela Ayala Aceves

A la Dra. María Soledad Córdova, Dra. Leticia Vega, M.T.I. Blanca Taboada y T.I. Mario Caro por el apoyo técnico prestado durante la realización del proyecto.

Al Staff del grupo Galindo, Dr. Leobardo Serrano, Dr. Carlos Peña y M.C. Celia Flores por la ayuda brindada durante mi estancia en el laboratorio.

A mis amigos Paty, Vianey, Alejandra, Kena, Balbi, Pato, Miriam, Isaac y Vania a quienes a pesar de la distancia siguen presentes en mi vida, gracias por todo el apoyo y cariño que me han brindado.

A Alvaro, Daniela, Ivette, Adriana, Raunel, Cristina, Liz, Alexis, Chío (Tuxtla), Lore, Alicia, Chío (Cuautla), Yuri, Lili, Germán, Mau, William, Julio, Dulce, Itzel, Yimmy, Suani, Marina, Mode, Conrado, Marco, Oscar, Juan Carlos, Luis, Antonino, Celia, Ana Laura, Gaby, David y Miguel por todos los momentos compartidos a lo largo de la maestría, por la amistad, apoyo y cariño que me han dado.

A todos los integrantes de los Grupos EG, OTR y Planta Piloto por la convivencia diaria y el apoyo brindado.

Finalmente, a las personas más importantes de mi vida, a mi Mamá, Papá, Nando, Lázaro, Caro, Emiliano, Wendy, Brenda, José Luis, Ximena y a toda mi familia. Por todo el amor que me han dado y por su apoyo incondicional. Gracias por creer en mí siempre y por impulsarme a buscar siempre más. Este trabajo está dedicado a ustedes. Los quiero mucho.

A todos ustedes, por formar parte de mi vida.

Índice general

	<i>Página</i>
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1. Dispersiones	4
2.1.1. Dispersiones multifásicas	5
2.2. Emulsiones	6
2.2.1. Surfactantes	6
2.2.1.1. Inversión de fase	7
2.3. Impulsores	8
2.4. Potencia	8
2.5. Caracterización de dispersiones	10
2.6. Sistemas utilizados en la caracterización de dispersiones	12
2.6.1. Muestreo por capilaridad	13
2.6.2. Sistemas láser	13
2.6.2.1. Anemometría láser	13
2.6.2.2. Velocimetría por análisis de imágenes (PIV)	14
2.6.3. Ultrasonido	14
2.6.4. Tomografía y radiografía	15
2.6.5. Análisis de imágenes con sistemas digitales	15
2.6.5.1. Video de alta velocidad	18
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	20
4.1. Objetivo General	20
4.2. Objetivos Particulares	20
5. Estrategia Experimental	21
6. Materiales y Métodos	23
6.1. Sistema modelo y condiciones de operación	23
6.2. Construcción de impulsores	24
6.3. Determinación de la potencia volumétrica	25
6.4. Sistema de análisis de imágenes con luz estroboscópica	25
6.5. Montaje del sistema de video de alta velocidad	27
6.6. Calibración del sistema de video de alta velocidad	28
6.7. Determinación de diámetros	30
6.8. Estadística	30

7. Resultados y discusión	32
7.1. Determinación de potencia	32
7.2. Obtención de imágenes	35
7.2.1. Sistema con luz estroboscópica	35
7.2.2. Sistema de video de alta velocidad	37
7.3. Condiciones de adquisición de imágenes	41
7.4. Calibración del sistema de video de alta velocidad	42
7.5. Límites del sistema	43
7.5.1. Límites de adquisición	43
7.5.2. Ventanas de observación	44
7.5.3. Procesamiento manual	44
7.5.3.1. Procesamiento en modo imágenes	45
7.6.3.1.1. Preproceso o selección de imágenes	45
7.5.3.2. Procesamiento manual en modo videos	47
7.6. Caracterización de dispersiones	48
7.7. Ventajas del sistema de alta velocidad	58
7.7.1. Distinción precisa entre gotas y burbujas	58
7.7.2. Determinación de inclusiones	59
7.7.3. Estimación de la velocidad de los objetos	61
7.7.4. Observación de estructuras complejas	63
7.7.5. Evolución de la dispersión como función del tiempo de proceso	64
8. Conclusiones	66
9. Perspectivas	68
10. Bibliografía	69

Índice de figuras

	<i>Página</i>
Figura 2.1. Turbina Rushton y Turbina Smith.	8
Figura 5.1. Estrategia experimental seguida durante la implementación y caracterización del sistema de video de alta velocidad.	22
Figura 6.1. Esquema del tanque de mezclado.	23
Figura 6.2. Dimensiones de los impulsores en mm.	24
Figura 6.3. Fotografía del sistema de análisis de imágenes con luz estroboscópica.	26
Figura 6.4. Fotografía del sistema de video de alta velocidad.	27
Figura 6.5. Cámara de video de alta velocidad.	28
Figura 6.6. Fuente y sonda de luz directa.	28
Figura 6.7. Imagen del micrómetro adquirida con una magnificación de 8 X.	29
Figura 6.8. Esferas de 200 μm tomadas a 6 X.	29
Figura 6.9. Medición de burbujas de aire y gotas de aceite con el <i>software</i> Image Pro Plus 5.0	30
Figura 7.1. Curvas de P/V en función de N para las dos turbinas a 0.00, 0.25 y 0.50 vvm	32
Figura 7.2. Caída de potencia en función del número de aireación.	34
Figura 7.3. Imágenes obtenidas a potencias superiores a 0.20 kW/m ³ con el sistema de luz estroboscópica	36
Figura 7.4. Imágenes obtenidas con el sistema de video de alta velocidad a 0.50 kW/m ³ .	38
Figura 7.5. Imágenes obtenidas para turbina Rushton 0.5 T a 8 X.	39
Figura 7.6. Imágenes obtenidas para turbina Rushton 0.5 T a 11 X.	40
Figura 7.7. Ubicación de las partes involucradas en el sistema de video de alta velocidad y longitud de desplazamiento para las magnificaciones utilizadas.	41

Figura 7.8. Curva de calibración para el sistema de video de alta velocidad.	42
Figura 7.9. Ventanas de observación para las magnificaciones utilizadas.	44
Figura 7.10. Selección de imágenes.	46
Figura 7.11. Repetición de objetos en más de una imagen.	46
Figura 7.12. Imágenes tomadas con una magnificación de 8X, con igual tiempo de dispersión con BSA y sin BSA.	49
Figura 7.13. Distribución de de tamaños de gotas y burbujas para una dispersión con turbina “Smith” a 0.50 kW/m^3 .	50
Figura 7.14. Efecto del tipo de impulsor en la distribución de diámetros de gotas de aceite y burbujas de aire para los experimentos a 0.50 kW/m^3 con y sin BSA.	51
Figura 7.15. Efecto de la potencia (kW/m^3) en la distribución de diámetros de gotas de aceite y burbujas de aire para los experimentos sin BSA.	52
Figura 7.16. Efecto de la proteína en la distribución de diámetros de gotas de aceite y burbujas de aire para los experimentos con turbina Rushton.	53
Figura 7.17. Diámetros medio de Sauter para gotas de aceite.	54
Figura 7.18. Diámetros medio de Sauter para burbujas de aire.	55
Figura 7.19. Influencia de los distintos tamaños de gotas de aceite en el volumen de la fase dispersa para experimentos con proteína y turbina Rushton a 0.25 KW/m^3 .	56
Figura 7.20. Utilización de la secuencia en la identificación de objetos.	59
Figura 7.21. Determinación de inclusiones por medio de la secuencia.	60
Figura 7.22. Estimación de la velocidad de una gota de aceite.	62
Figura 7.23. Observación de estructuras complejas y formación de gotas.	64
Figura 7.24. Evolución de la dispersión en términos del d_{32} de burbujas y el porcentaje de inclusiones.	65

Índice de tablas

	<i>Página</i>
Tabla 7.1. Velocidades de agitación necesarias para obtener las potencias requeridas.	33
Tabla 7.2. Valores de a para $P = aN^3$	33
Tabla 7.3. Errores encontrados en la medición de esferas de 200 μm .	43
Tabla 7.4. Tiempos requeridos en la adquisición y procesamiento de imágenes.	48
Tabla 7.5. Datos del análisis estadístico en el procesamiento de imágenes.	48
Tabla 7.6. Porcentaje de inclusiones para los experimentos realizados.	57
Tabla 7.7. Velocidades estimadas para diferentes objetos de acuerdo a P/V.	63

Nomenclatura

A_i	Ancho de la paleta	[m]
B	Brazo de palanca	[m]
d_{32}	Diámetro Sauter	[μm]
d_i	Diámetro de la gota o burbuja	[μm]
D	Diámetro del impulsor	[m]
F	Fuerza	[kgf]
H	Altura del tanque	[m]
H_L	Altura del líquido	[m]
L_i	Longitud de la paleta	[m]
n	Índice de refracción	adimensional
n_i	Número de objetos con un diámetro determinado	
N	Velocidad de rotación del impulsor	s^{-1}
Na	Número de aireación (Q/ND^3)	adimensional
Np	Número de potencia	adimensional
P	Potencia	[W]
P_g	Potencia gaseada	[W]
P/V	Potencia volumétrica	[kW/m ³]
Q	Velocidad de aireación	[m ³ /s]
T	Diámetro interno del tanque	[m]
v_t	Fracción volumen de gas	[m ³]
V	Volumen del reactor	[m ³]
ρ_c	Densidad de la fase continua	[kg/m ³]
σ	Tensión superficial	[N/m] o [mN/m]
ω	Velocidad de desplazamiento angular	s^{-1}

Resumen

La fermentación de *Trichoderma harzianum* para la producción de aromas, constituye una dispersión multifásica compleja ya que involucra aceite de ricino como fuente de carbono y aire como fuente de oxígeno. La caracterización de esta dispersión como un método para entender y mejorar el proceso de fermentación, no sólo debe hacerse en términos de los diámetros de las gotas de aceite y burbujas de aire, sino que además, debe considerarse la interacción entre las fases (burbujas de aire presentes dentro de gotas de aceite), que también definen los procesos de transferencia, al modificar el camino difusional para la transferencia de oxígeno al microorganismo. La calidad de la dispersión dependerá de diversos factores, tales como la presencia de surfactantes, tipo de impulsor y sobre todo, la potencia volumétrica suministrada al sistema.

El objetivo del trabajo fue implementar un sistema de video de alta velocidad que permita el análisis de imágenes para la caracterización de dispersiones multifásicas a potencias volumétricas entre 0.20 y 0.50 kW/m³.

Se utilizó como sistema modelo la fermentación trifásica (agua-aire-aceite) de *Trichoderma harzianum*, utilizando además, albúmina de suero bovino (BSA) y turbinas Rushton y Smith, para evaluar el efecto de la presencia de proteína como surfactante y el tipo de impulsor, respectivamente. La obtención de imágenes con un sistema de video con luz estroboscópica a potencias mayores de 0.20 kW/m³, permitió identificar distintos problemas en la adquisición, al obtener imágenes con baja nitidez, contraste e iluminación. Para resolver los problemas anteriores se montó un sistema de video de alta velocidad que utiliza una cámara de video con capacidad para adquirir 5130 cuadros por segundo (512 x 512 píxeles). La cámara acoplada a una fuente de iluminación de alta intensidad y a un estereomicroscopio ha permitido la adquisición de imágenes nítidas para caracterizar los componentes de la dispersión a potencias volumétricas de hasta 0.50 kW/m³ y magnificaciones de hasta 11 X. La calibración del sistema utilizando un micrómetro y perlas de diámetro conocido, mostró que pueden medirse diámetros con un error menor a 7 %, al utilizar magnificaciones de hasta 11 X. Con este sistema se han podido medir objetos de hasta 20 µm, evaluando el efecto del tipo de impulsor, uso de proteína y potencia volumétrica sobre los diámetros Sauter y distribuciones de tamaños de gotas de aceite y burbujas de aire. Empleando turbinas Rushton y Smith de 0.50 D/T, se observó que aunque se presentan pequeñas diferencias en las distribuciones, no existe diferencia en los d_{32} cuando ambos impulsores se comparan a la misma potencia. El uso de BSA permitió observar que aún cuando la distribución es más estrecha al emplear la proteína, no existe un impacto significativo en los d_{32} . Además, utilizando el sistema de análisis de imágenes, se pudo cuantificar la disminución en los d_{32} de gotas de aceite y burbujas de aire al incrementar la potencia volumétrica. La secuencia de imágenes obtenidas para los experimentos, ha permitido estimar el porcentaje de inclusiones (burbujas de aire dentro de gotas de aceite), observando que el empleo de proteína y aumento de potencia disminuye el porcentaje de inclusiones. Por último, este sistema ha permitido explorar otras aplicaciones en la caracterización, como la posibilidad de medir velocidades de objetos y evaluar la evolución de la dispersión a intervalos cortos de tiempo.

1. Introducción

La mayoría de los bioprocesos industriales involucran sistemas multifásicos, en los que es necesario realizar dispersiones líquido-líquido, líquido-gas y/o líquido-sólido. Cuando entre las fases involucradas hay dos líquidos inmiscibles, como en las fermentaciones que requieren aceites como fuentes de carbono (Large *et al.*, 1998), se tienen sistemas en donde existen gotas de un líquido dispersas en otro que es la fase líquida continua (Nienow *et al.*, 1985). Por otra parte, los cultivos celulares son mayoritariamente aerobios, por lo que hay que dispersar aire en forma de burbujas de gas en una fase líquida.

El mezclado entre las distintas fases involucradas tiene como fin principal llevar a cabo la transferencia de masa. Los modelos de transferencia de masa se basan en la absorción del oxígeno desde la fase gaseosa hasta la fase líquida (Bailey y Ollis, 1986). Sin embargo, en sistemas de tres fases, la predicción de la transferencia de masa se vuelve compleja debido a la interacción entre los elementos de la fase dispersa (Cents *et al.*, 2004).

Para que la transferencia de masa no se vea limitada, se manipula la potencia volumétrica (P_g/V), que depende de las características reológicas del cultivo, de la velocidad de agitación y del diseño del agitador o impulsor (Bakker *et al.*, 1994).

Una forma de caracterizar las dispersiones es midiendo la distribución de los tamaños de burbujas de aire y gotas de aceite (que proporcionan el área interfacial para la transferencia de masa), lo cual puede llevarse a cabo por análisis de imágenes. En el laboratorio del Dr. Galindo del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M. se desarrolló un sistema avanzado para el análisis de imágenes que permite adquirir imágenes en línea de la dispersión en tanques de mezclado. Dicho sistema también permite estimar el porcentaje de inclusiones (burbujas dentro de gotas). Este sistema (Galindo *et al.*, 2005) se ha empleado en la caracterización de sistemas modelo de tres y cuatro fases del cultivo de *Trichoderma harzianum* (Galindo *et al.*, 2000; Córdova-Aguilar, *et al.*, 2001; Lucatero *et al.*, 2003; Pulido-Mayoral y Galindo, 2004) utilizando potencias volumétricas hasta de 0.20 kW/m^3 , tomando como base trabajos previos (Serrano-Carreón *et al.*, 1997) que habían reportado que el hongo (productor de aromas) disminuía la productividad a potencias mayores a 0.20

kW/m^3 , posiblemente como consecuencia de los esfuerzos de corte generados a esas potencias. Posteriormente, un estudio realizado por Rocha-Valadez *et al.* (2005), en el que se cultivó *Trichoderma harzianum* en un medio con glucosa como fuente de carbono y n-hexadecano como fase extractiva, se encontró que la máxima productividad de 6-pentil- α -pirona ocurría a P_g/V de 0.61 kW/m^3 , lo que indicó que dicho microorganismo podía soportar potencias superiores a 0.20 kW/m^3 , sin menoscabo de su productividad. Además, en la literatura se ha reportado que las potencias suministradas en fermentaciones a nivel industrial y de planta piloto son cercanas a 1 kW/m^3 (Einsele, 1978), lo cual indicó que era necesario explorar el efecto de potencias volumétricas superiores a las estudiadas hasta el momento en dispersiones multifásicas.

En este trabajo se describe la implementación de un sistema de análisis de imágenes de alta velocidad que permitió caracterizar la dispersión en un sistema de tres fases (agua-aceite-aire) a potencias entre 0.20 y 0.50 kW/m^3 , evaluando la distribución de los diámetros de las gotas de aceite y de las burbujas de aire.

2. Antecedentes

2.1. Dispersiones

La mayor parte de las fermentaciones industriales implican la dispersión de al menos dos fases, tal es el caso de las fermentaciones aeróbicas realizadas por bacterias o levaduras (Tayali y Bates, 1990; Ferreira *et al.*, 2001), en las que el tamaño del microorganismo tienen poca influencia en la dispersión. En este tipo de sistemas se requiere dispersar el aire que transporta el oxígeno dentro del medio de cultivo. Debido a la baja solubilidad del oxígeno en agua, el suministro y dispersión del mismo deben ser continuos para que la transferencia de oxígeno no limite el proceso de fermentación. Los tanques agitados son comúnmente utilizados en la dispersión gas-líquido debido a su flexibilidad y buen diseño para la transferencia de calor y masa (Middleton y Smith, 2004).

Existen además dispersiones líquido-líquido, tal es el caso de aquellas en que se emplean aceites como fuente de carbono principal o secundaria, como en el caso de la producción de antibióticos, riboflavina y ácido cítrico (Ratledge, 1977). Debido a que los aceites son inmiscibles en agua, es necesario dispersarlos en el medio a fin de suministrar al microorganismo los nutrientes necesarios para su crecimiento. La agitación controla el rompimiento (dispersión) y coalescencia de las gotas, así como la suspensión de las mismas dentro del sistema. La turbulencia intensa, en zonas tales como la descarga del impulsor, impide la coalescencia y ayuda a la dispersión. El tamaño de las gotas dependerá del flujo, fuerzas de corte, turbulencia y tiempo de dispersión, así como de las propiedades físicas e interfaciales del sistema (Leng y Calabrese, 2004).

Los aceites también son empleados en fermentaciones extractivas, en donde el metabolito producido tiene mayor solubilidad en la fase lipídica, lo que facilita su recuperación o cuando puede resultar tóxico para el microorganismo que lo produce y el agregar aceite permite incrementar la productividad del metabolito de interés (Kollmer *et al.*, 1999).

La dispersión tiene como finalidad incrementar el área y por consiguiente, la velocidad de transferencia de masa, lo que para muchos procesos determina la productividad (Cents *et al.*, 2004). Por lo anterior, se requiere que las gotas de aceite y burbujas de aire sean lo más pequeñas posibles, debido a que esto permite obtener una mayor relación área superficial/volumen. Además, el tamaño pequeño de dichas estructuras permite que la velocidad de ascenso de las mismas disminuya y por tanto se consigue una mejor recirculación y un tiempo de permanencia suficiente para que se realice la transferencia de masa (Middleton y Smith, 2004).

2.1.1. Dispersiones multifásicas

La mayoría de las fermentaciones no pueden ser tratadas como sistemas de dos fases, debido a que involucran sistemas multifásicos en los que es necesario dispersar al mismo tiempo gases y líquidos inmiscibles (fermentaciones trifásicas) o en casos más complejos gases, líquidos inmiscibles y sólidos (fermentaciones tetrafásicas).

Un ejemplo de estos sistemas complejos lo constituye la producción de aromas por el hongo *Trichoderma harzianum* (Serrano-Carreón *et al.*, 1997), en el que se emplea aceite de ricino. La presencia de aceite, la morfología del hongo y la reología cambiante del medio de cultivo dificultan la dispersión en dicho sistema. Además, la presencia de aceite puede afectar el tamaño de las burbujas de gas, al mismo tiempo que las burbujas de gas afectan el tamaño de las gotas de aceite, debido a que ambas fases modifican las características del medio (Galindo *et al.*, 2000).

La fermentación de *Trichoderma harzianum* se ha tomado como modelo de estudio en la caracterización de dispersiones en sistemas de tres y cuatro fases dentro del grupo del Dr. Galindo (Galindo *et al.*, 2000; Córdova-Aguilar, *et al.*, 2001; Lucatero *et al.*, 2003; Pulido-Mayoral y Galindo, 2004). En estos sistemas, la dispersión se vuelve más compleja al presentarse la formación de gotas multifásicas (burbujas y gotas de la fase acuosa dentro de gotas de aceite).

Una dispersión de las distintas fases involucradas en el sistema requiere, en la mayoría de los casos, el empleo de agitadores (impulsores) mecánicos. Éstos tienen la finalidad de romper las gotas de aceite y burbujas de aire, logrando tamaños más pequeños y por consiguiente, incrementando la transferencia de masa.

2.2. Emulsiones

Una emulsión es una dispersión fina de un líquido en otro que forma la fase continua. Las emulsiones son termodinámicamente inestables y a diferencia de las dispersiones mencionadas anteriormente, la fase dispersa es siempre un líquido. La inestabilidad entre las fases se debe a la energía libre asociada con la interfase, lo que hace que se requiera la aplicación de energía externa para que las fases no se separen y ocasionen que dichas fases tiendan a coalescer. Cuando un gas es dispersado en un líquido bajo la aplicación de energía, tiende a formarse una espuma, que al igual que la dispersión, es inestable (Norde, 2003).

2.2.1. Surfactantes

Las emulsiones y espumas pueden ser estabilizadas usando surfactantes. Los agentes surfactantes reducen la energía necesaria para mantener separadas las fases y evitan la coalescencia. Entre estos agentes se encuentran las proteínas. La naturaleza dual (hidrofóbica-hidrofílica) de proteínas ocasiona que se concentren en las interfases, como agua-aire o aceite-agua. Las proteínas tienden a adoptar conformaciones globulares en solución acuosa en la cual los grupos no polares se agregan en los centros y los grupos polares en la periferia. Cuando este tipo de moléculas llegan a la interfase polar-no polar, éste puede adoptar una conformación en la cual los grupos predominantemente polares interactúan con la fase polar (usualmente agua) y los grupos no polares pueden escapar. Esto, junto con la eliminación de área interfacial, conduce a la disminución en la energía libre del sistema (MacRitchie, 2000), lo que conduce a una disminución de la tensión interfacial (Clarkson *et al.*, 1999; Pezennec *et al.*, 2000).

La mínima tensión interfacial dependerá de la Concentración Micelar Crítica (CMC). La CMC es un fenómeno de equilibrio. Debido a que el área superficial se crea por agitación, las moléculas de surfactante se transfieren primero a la fase acuosa y posteriormente a la interfase líquido-líquido. Sin embargo, la adsorción en la interfase no es un proceso instantáneo, así que la CMC se alcanzará cuando se llegue a un equilibrio entre las moléculas que están en la interfase y el seno del líquido (Leng y Calabrese, 2004).

Las proteínas son algunos de los metabolitos producidos durante el cultivo de *Trichoderma harzianum* para la producción de γ -decalactona. Pulido-Mayoral (2003) realizó una cinética de producción de proteína para este sistema, encontrando una producción máxima de 0.5 g/L en el transcurso del cultivo. Posteriormente, utilizó concentraciones de BSA (albúmina de suero bovino) dentro de este rango para simular las condiciones del cultivo y caracterizó la dispersión en un sistema modelo.

La CMC reportada para el caso de BSA es de 0.03 g/L, en el cual la tensión superficial (σ) disminuye de 72 mN/m a 55 mN/m (Pulido-Mayoral, 2003).

2.2.1.1. Inversión de fase

La inversión de fases es un fenómeno comúnmente observado en el que la fase continua se transforma en la fase dispersa en un momento dado, tal es el caso de la presencia de gotas de agua en gotas de aceite (formación de estructuras complejas). La inversión de fases está determinada por la coalescencia de las fases (Leng y Calabrese, 2004).

La inversión de fases dependerá, entre otros factores, del tipo y la concentración de surfactantes, así como del volumen de la fase dispersa. Si el surfactante es soluble en agua tenderá a estabilizar la emulsión aceite-en-agua, mientras que los surfactantes solubles en aceite tienden a estabilizar la emulsión agua-en-aceite. Debido a la solubilidad del surfactante en la fase dispersa, las gotas de la fase continua pueden quedar incluidas en la fase dispersa (Alban *et al.*, 2004).

2.3. Impulsores

Existen diversos diseños de impulsores. La elección de éstos depende de distintos factores, entre los que se encuentran la viscosidad del medio y la sensibilidad de los microorganismos a los esfuerzos de corte (Amanullah *et al.*, 2004).

Los impulsores se clasifican principalmente en dos grupos (Galindo, 1996): los que producen flujo axial (paralelo a la flecha) y los que producen flujo radial (perpendicular a la flecha). Los impulsores de flujo axial, son generalmente usados cuando se requiere mantener sólidos en suspensión, entre éstos se encuentran las propelas marinas y el agitador de paletas inclinadas.

Los impulsores de flujo radial generan altos gradientes de deformación y se consideran apropiados para dispersiones gas-líquido y líquido-líquido (Myers *et al.*, 1996). Entre estos agitadores se encuentran la turbina Rushton (Fig. 2.1a) y la turbina de paletas cóncavas (turbina “Smith”) (Fig. 2.1b). Los agitadores de turbina pueden ser utilizados para el mezclado de líquidos inmiscibles ya que generan altos gradientes de deformación, lo que permite obtener emulsiones finas y estables, mejorando el área interfacial para la transferencia de masa (Hemrajani y Tatterson, 2004).

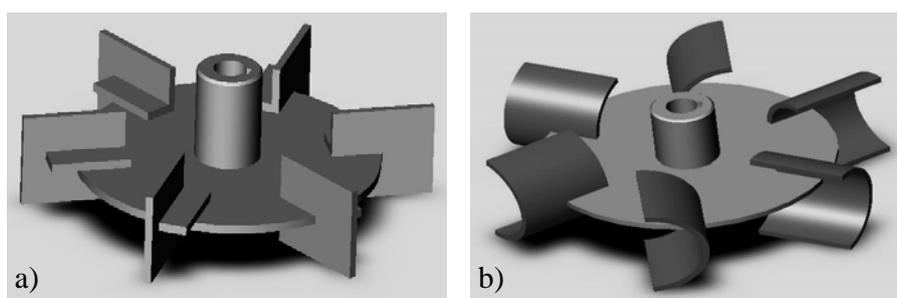


Figura 2.1. a) Turbina Rushton, b) Turbina “Smith”.

2.4. Potencia

La potencia (P) es una variable importante en los procesos de fermentación para evaluar el desempeño del agitador. Se define como la cantidad de energía necesaria, en un

período de tiempo, para generar el movimiento del fluido dentro del biorreactor, generalmente realizado por agitación mecánica a través de impulsores (Ascanio *et al.*, 2004). La potencia está influenciada por las características reológicas del cultivo, así como las condiciones de operación, las características geométricas del tanque y el diseño del impulsor (Córdova-Aguilar, 2003). Generalmente, se refiere a ella como potencia volumétrica (P/V), en donde V representa el volumen de trabajo (Ascanio *et al.*, 2004).

Los procesos de mezclado de líquidos, generación de área interfacial, y transferencia de masa gas-líquido en sistemas turbulentos son controlados principalmente por la potencia disipada en el fluido y la fracción volumétrica de gas. La potencia influye directamente en el tamaño de burbuja. Las burbujas se rompen en zonas donde las fuerzas de corte son mayores, como lo es la zona de descarga del impulsor. La potencia disipada en dichas zonas es la que controla el rompimiento; sin embargo, las correlaciones para diámetros de burbuja están basadas en la energía promedio disipada en el reactor, por unidad de masa o volumen (P/V) (Middleton y Smith, 2004).

Aunque la turbina Rushton con una relación D/T (diámetro del impulsor/diámetro del tanque) de 0.33 ha sido el agitador más usado para la dispersión de fluidos inmiscibles (gas-líquido o líquido-líquido) (Myers *et al.*, 1996; Nienow, 1996), este agitador tiene la desventaja de que, a altas velocidades de flujo de gas, se forman cavidades estables (de gas) detrás de las paletas, lo que conduce a una caída importante de la potencia y pérdida en la capacidad de dispersar gas (Bakker *et al.*, 1994). La magnitud en la caída de potencia dependerá de diversos factores, tales como el diámetro del impulsor, la velocidad de agitación, velocidad de aireación y propiedades del fluido (Nienow, 1996). En sistemas agitados con una turbina Rushton de diámetro pequeño, la potencia suministrada por el impulsor en condiciones de aireación (potencia gaseada, P_g), puede llegar a ser hasta del 20 % con respecto a la potencia no aireada (Galindo y Nienow, 1993).

La formación de dichas cavidades puede reducirse incrementando la relación D/T o modificando el diseño del impulsor (Nienow, 1996). Un diseño diferente lo constituye la turbina “Smith” (Van’t Riet *et al.*, 1976); las paletas cóncavas de esta turbina generan el

mismo patrón de flujo que la turbina Rushton (Bakker *et al.*, 1994), aunque posee un número de potencia (N_p) menor al de la turbina Rushton, típicamente 4.4 contra 6 (Hemrajani y Tatterson, 2004), y por tanto en condiciones no aireadas se consigue una menor potencia a una misma velocidad de agitación. Sin embargo, el diseño de paletas permite que, aún cuando se formen cavidades de formas similares a las que se forman detrás de las paletas de la turbina Rushton, la formación de éstas ocurra a velocidades de flujo de gas mucho mayores (Bakker *et al.*, 1994). Esta característica permite que, en el caso de fluidos parecidos al agua, la potencia suministrada al sistema se mantenga prácticamente constante cuando se introduce aire en el fluido y en el caso de fluidos de mediana viscosidad, la potencia gaseada suministrada sea alrededor del 80 % de la potencia no gaseada (Saito *et al.*, 1992). Lo anterior resulta en una mayor dispersión de gas (a la misma potencia volumétrica y diámetro del agitador) que la turbina Rushton (Nienow, 1990).

2.5. Caracterización de dispersiones

Las dispersiones de dos fases han sido estudiadas ampliamente en tanques agitados, evaluando efectos como la velocidad de agitación, tipo de impulsor y propiedades físicas de las fases. En un principio, los estudios de dispersión estaban limitados a la técnica de muestreo para determinar la fracción de la fase dispersa en el tiempo y la observación del tiempo que tarda en lograrse la dispersión completa utilizando colorantes como referencia (Zhang *et al.*, 1996). Sin embargo, estos métodos no brindan suficiente información sobre el área para la transferencia de masa.

Una forma más apropiada de caracterizar las dispersiones es midiendo los diámetros de las gotas de aceite y burbujas de aire que se generan en el sistema, ya que éstos determinan el área interfacial disponible para la transferencia de masa. En las dispersiones, el tamaño de la burbujas de gas y de las gotas de aceite está determinado por diversos parámetros físico-químicos y reológicos del fluido, así como hidrodinámicos y de operación, tales como la velocidad de agitación, la potencia volumétrica, el flujo de gas y el diseño del impulsor y del tanque (Tatterson, 1991). La concentración de la fase dispersa,

también determinará los diámetros al incrementar la coalescencia. Los sistemas muy concentrados (fracción volumen de la fase dispersa > 0.2), son considerados sistemas coalescentes. Para un sistema dado, los tamaños de gotas y burbujas nunca son uniformes, sino que existen en un amplio espectro de tamaños, donde el valor máximo estará dado por la intensidad de agitación y el mínimo por las propiedades físicas que determinan el rompimiento. En sistemas de fermentación tipo lote, las dispersiones muestran un comportamiento transitorio en el que la distribución de tamaños es amplia al inicio (debido a una dispersión incompleta) y se vuelve más angosta conforme transcurre el tiempo de agitación. La distribución también será más extensa con el incremento de la viscosidad, la tensión interfacial y la disminución de la velocidad de agitación (Leng y Calabrese, 2004). Una adecuada transferencia de masa requiere incrementar el área interfacial entre las fases, lo que se logra obteniendo burbujas pequeñas y alta fracción de gas retenido (Middleton y Smith, 2004).

El diámetro promedio puede caracterizar un conjunto de gotas o burbujas y proporciona información sobre la calidad de las dispersiones, ya que considera el diámetro de burbujas o gotas del conjunto y el número de objetos que integran dicho conjunto de datos (Córdova-Aguilar, 2003). El diámetro Sauter (d_{32}), es el diámetro promedio más utilizado ya que relaciona el área de la fase dispersa con su volumen (Pacek *et al.*, 1998). El diámetro Sauter se define como:

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

donde d_i es el diámetro de la gota o burbuja y n_i es el número de objetos con dicho diámetro.

Existen correlaciones que estiman el d_{32} con respecto a la potencia volumétrica a partir de propiedades físicas de los fluidos, condiciones de operación y parámetros geométricos del biorreactor e impulsor. Sin embargo, la mayor parte de estas ecuaciones sólo son válidas cuando la fase dispersa está muy diluida (0.03 %) (Zhou y Kresta, 1998).

Entre las más conocidas está la ecuación de Calderbank, para reactores agitados por turbinas Rushton (Laakkonen *et al.*, 2005a):

$$d_{32} = 4.15 \left[\frac{\sigma^{0.6}}{(P_g / V)^{0.4} \rho_c^{0.2}} \right] v_t^{0.5} + 0.0009$$

donde: σ es la tensión superficial (N/m), P_g es la potencia gaseada de mezclado (W), V es el volumen del reactor (m³), ρ_c es la densidad de la fase continua (kg/m³) y v_t es la fracción volumen de gas o coeficiente de retención de gas.

Aunque el diámetro Sauter es el término más empleado en la caracterización de dispersiones, debido a que se puede obtener un mismo valor de d_{32} para dispersiones con distintas distribuciones de tamaño (Zhou y Kresta, 1998), es conveniente complementar el estudio de la dispersión cuantificando la distribución de tamaños en el sistema en estudio.

La evaluación de la distribución de tamaños puede realizarse en función de la densidad de probabilidad o del volumen acumulado, lo que se hace a través de una tabla de frecuencias y su histograma. Las frecuencias se obtienen clasificando los tamaños de gotas y burbujas en intervalos establecidos. Al presentar los datos en forma de distribución acumulada de volumen puede observarse la importancia de cada partícula y cómo se distribuye el volumen total de la fase dispersa en un eje de tamaños de gotas o burbujas (Ramkrishna *et al.*, 1995).

Experimentalmente, los tamaños de gotas y burbujas en una dispersión pueden determinarse por diferentes métodos, entre los que se encuentran los de análisis de imágenes.

2.6. Sistemas utilizados en la caracterización de dispersiones

En la caracterización de dispersiones se han empleado distintas técnicas, cada una de las cuales presenta ventajas y desventajas. A continuación se mencionan las más utilizadas.

2.6.1. Muestreo por capilaridad

La técnica consiste en tomar una muestra a través de un capilar de vidrio, donde la dispersión se transforma a una forma cilíndrica y el volumen de la fase puede ser calculado. La técnica puede emplearse a dispersiones opacas y elevados coeficientes de retención de gas; sin embargo, no puede ser utilizada en pequeños volúmenes debido a la necesidad de muestreo (Laakkonen *et al.*, 2005c).

Una de las desventajas de la técnica es que en muchas ocasiones, las burbujas son más pequeñas que el diámetro del capilar, por lo que los diámetros de éstas no pueden medirse. En general, los diámetros obtenidos están en el orden de mm (Laakkonen *et al.*, 2005b).

2.6.2. Sistemas láser

Los láseres han sido utilizados para la caracterización de dispersiones en términos de la velocidad de partículas, fracción de gas retenida, patrones de flujo y tamaño de partículas. Algunas de las técnicas que utilizan láser se mencionan a continuación.

2.6.2.1. Anemometría láser

Se basa en el efecto Doppler. Es una técnica no invasiva que permite determinar velocidad, tamaño de partículas, y concentración en sistemas multifásicos (Chaouki *et al.*, 1997).

La técnica usa dos rayos láser que son dirigidos al sistema para interceptar las burbujas y gotas. Cuando una burbuja pasa a través de los rayos, el detector recibe la señal y detecta el cambio entre ambos rayos, con lo que determina el diámetro. La técnica requiere de dispersiones y tanques transparentes (Laakkonen *et al.*, 2005c).

La aplicación de esta técnica está limitada a sistemas con fases dispersas muy diluidas (Maab *et al.*, 2007); además, la precisión de las mediciones dependerá de la esfericidad de las burbujas, debido a que la medición depende de la curvatura de la superficie de las burbujas (Laakkonen *et al.*, 2005c).

Esta técnica también ha sido empleada para determinar velocidades del fluido en las diferentes zonas del reactor. Schäfer *et al.* (1998) emplearon un sistema de anemometría láser para determinar la velocidad del fluido en un reactor agitado con un impulsor de paletas inclinadas, para un fluido con viscosidad de 0.00159 Pa.s. Ellos reportan una velocidad de hasta 0.5 veces la velocidad en la punta del impulsor, para el fluido en las zonas cercanas a la descarga del impulsor y aproximadamente 0.15 veces la velocidad del impulsor en las zonas más cercanas a la pared del tanque.

2.6.2.2. Velocimetría por análisis de imágenes (PIV)

Es una técnica de visualización de flujo que provee información de los componentes de flujo en sistemas multifásicos. Los sistemas ocupados en esta técnica constan de un rayo láser, una cámara y un sistema de análisis de imágenes (Chaouki, *et al.*, 1997).

La aplicación de esta técnica se limita a dispersiones transparentes (Chaouki *et al.*, 1997). Laakkonen *et al.* (2005a) emplearon esta técnica en el análisis de dispersiones gas-líquido, para determinar diámetros de burbujas de acuerdo a la posición dentro del tanque.

Escudí y Liné (2003) utilizaron un sistema PIV para medir patrones de flujo en un tanque agitado con turbina Rushton, reportando valores de alrededor de 80 % la velocidad en la punta del impulsor en zonas cercanas a la descarga del mismo.

2.6.3. Ultrasonido

Con este sistema se pueden medir diámetros y distribuciones de tamaño de partículas sólidas, líquidas y gaseosas en sistemas multifásicos. Se basa en la velocidad

ultrasónica y atenuación sobre el tamaño de partículas y la fracción retenida de la fase dispersa. Emplea la velocidad del sonido y el coeficiente de atenuación a una frecuencia dada (Cents, *et al.*, 2004).

2.6.4. Tomografía y Radiografía

Son técnicas de imágenes basadas en principios nucleares, usando rayos X, rayos γ , resonancia magnética nuclear, microondas, entre otros. La transmisión de radiación a través de medios heterogéneos se acompaña por la atenuación de la misma, lo que proporciona la información sobre las fases de una dispersión (Chaouki *et al.*, 1997).

2.6.5. Análisis de imágenes con sistemas digitales

Una forma de medir los d_{32} de gotas de aceite y burbujas de gas en sistemas multifásicos, es utilizando técnicas de análisis de imágenes, las cuales tienen la ventaja de que no perturban el sistema, ya que no se requiere obtener una muestra para el análisis. Durante los últimos diez años, el empleo de este tipo de técnicas se ha incrementado debido al desarrollo de cámaras digitales, láser y sistemas para el procesamiento automático de imágenes, que hacen las mediciones más sencillas (Laakkonen *et al.*, 2005b).

Sin embargo, los sistemas de análisis de imágenes convencionales, emplean fotografías y, por lo tanto, presentan muchas desventajas, principalmente porque las fotografías obtenidas no suelen ser claras, presentan distorsión de los objetos y el análisis manual de dichas fotografías es tedioso y costoso. Además, la mayor parte de los algoritmos de computación empleados en el análisis de imágenes no son flexibles, y son poco aplicables en la evaluación de dispersiones complejas (Laakkonen *et al.*, 2005b).

El principal problema de estos sistemas radica en la dificultad para adquirir imágenes en movimiento lo suficientemente claras para poder discernir y caracterizar todos los elementos presentes en la dispersión. El solapamiento de objetos en las imágenes, la

adquisición de imágenes borrosas, fuera de foco y deformación de objetos, hacen difícil la identificación por estos sistemas (Laakkonen *et al.*, 2005c).

En el grupo del Dr. Galindo del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M., se ha desarrollado un sistema para la adquisición de imágenes empleando una cámara de video convencional acoplada a un estereomicroscopio y una fuente de luz estroboscópica, conducida al interior del fermentador a través de una sonda de fibra óptica, que permite resolver problemas de claridad y traslape de los objetos presentes en los sistemas de dispersión (Taboada *et al.*, 2003; Galindo *et al.*, 2005). Además, mediante la inmersión del tanque de mezclado dentro de una chaqueta transparente en la que se introduce agua, se pudo resolver el problema de distorsión de las imágenes, al mismo tiempo que permitió mantener la temperatura constante. Dicho sistema de adquisición de imágenes acoplado a una computadora ha hecho posible la obtención de imágenes en línea de la dispersión en el interior del tanque.

Este sistema se ha empleado para la caracterización de dispersiones en medios de fermentación modelo utilizados para el cultivo de *Trichoderma harzianum*. De este modo se han podido determinar los diámetros de gotas de aceite y burbujas de gas en sistemas de tres y cuatro fases (medio-aceite-aire-biomasa). Los estudios han mostrado que al variar la concentración de aceite (2-15 % v/v), los d_{32} para burbujas de gas son entre 500 y 1750 μm , mientras que en el caso de gotas de aceite van de 900 a 1750 μm (Galindo *et al.*, 2000; Córdova-Aguilar, 2003). En presencia de micelio disperso para cultivos de *Trichoderma harzianum* (0-3.5 g/L), el d_{32} para gotas de aceite es de 1100-1650 μm y para burbujas de gas de 260-520 μm . Cuando el microorganismo se encontraba en forma de *pellets*, se obtuvieron d_{32} prácticamente constantes para gotas de aceite y burbujas de gas, siendo de 1300 y 470 μm respectivamente (Lucatero *et al.*, 2003). En un estudio en el que se incorporaron proteínas al medio, los valores de d_{32} para las gotas de aceite fueron de 400 a 1150 μm y para burbujas de aire de 300-500 μm (Pulido-Mayoral y Galindo, 2004). En general, se observó que el aumento en la concentración de aceite incrementaba el d_{32} de las gotas de aceite y disminuía el de las burbujas de gas. La presencia de biomasa y proteína en el sistema disminuye los d_{32} para gotas de aceite y burbujas de gas. Además, el trabajo

de Córdova-Aguilar *et al.* (2001) demostró que los mayores problemas de dispersión se presentan al inicio del proceso (cuando la concentración de aceite es máxima y la de biomasa es mínima), debido a que la biomasa, que aumenta con el tiempo de cultivo, sirve como acarreador de aceite y aire, lo que favorece la dispersión, independientemente del aumento en la viscosidad del cultivo.

Sin embargo, ninguno de los estudios realizados dentro del grupo ha evaluado el efecto del tipo de impulsor y la variación de la potencia volumétrica, ya que todos ellos se han llevado a cabo utilizando turbinas Rushton y P_g/V de 0.20 kW/m^3 .

Por otro lado, aún cuando en la bibliografía también se reportan distintos estudios de dispersión empleando cámaras digitales, la mayor parte de ellos están limitados a sistemas bifásicos. Storiadis *et al.*, (2005) utilizaron una cámara de video digital para determinar distribuciones de tamaños de burbujas en una columna con recirculación. Las imágenes fueron procesadas con el *software* Image Pro Plus y pudieron medir burbujas con diámetros de 0.5 a 6 mm.

Otros sistemas utilizando luz estroboscópica, estereomicroscopio y cámaras digitales han sido empleados para determinar diámetros de partículas en sistemas bifásicos agua-aceite (Alban, *et al.*, 2004).

Francis *et al.* (2006) utilizaron un sistema de análisis de imágenes con luz estroboscópica y lentes de 20 y 40 X para la medición de diámetros en sistemas de dos fases. Con este sistema lograron medir diámetros de partículas entre 3 y $200 \mu\text{m}$.

Recientemente se han utilizado sistemas avanzados de análisis de imágenes para la determinación de distribuciones de tamaños de *pellets* y burbujas (Junker, 2006) combinando los sistemas de adquisición, con sistemas para el procesamiento y análisis de datos.

2.6.5.1. Video de alta velocidad

La adquisición de imágenes de objetos en movimiento ocasiona distintos problemas, el principal como consecuencia de la velocidad de los objetos en relación a la velocidad de la cámara. Cuando los objetos a analizar se mueven a una velocidad mayor a la del barrido de la cámara, resultan imágenes movidas o difusas (Brito-Albavera, 2001).

El desarrollo de técnicas de iluminación avanzadas y de cámaras de video de alta velocidad ha permitido la determinación de tamaños de partículas (en el orden de micras) en dispersiones multifásicas (Tayali y Bates, 1990).

El análisis de imágenes con sistemas de alta velocidad permite la observación lenta de fenómenos que se llevan a cabo a altas velocidades. El análisis de imágenes con video de alta velocidad es usado en la industria automotriz (evaluación de bolsas de aire), en la industria química (análisis de dispersiones), pruebas de balística (impacto y explosión), entre otros (Chin *et al.*, 2003).

Se han utilizado cámaras de video de alta velocidad, que permiten obtener imágenes para la medición en dispersiones líquido-líquido, cuando la fase dispersa está en altas concentraciones, tal como reportan Lovick *et al.* (2005), quienes utilizan una cámara de video de alta velocidad acoplada a un endoscopio, para la medición de gotas menores a 500 μm .

Chin *et al.* (2003) reportan el diseño de una cámara capaz de adquirir 25 millones de cuadros por segundo; sin embargo, a esta velocidad de adquisición, la cámara sólo puede grabar en forma continua 128 cuadros y operar un máximo de 30 s (grabando videos de 128 cuadros con un intervalo de 20 ms entre ellos), debido a problemas de sobrecalentamiento del sistema. La resolución máxima de las imágenes obtenidas con esta cámara es de 500 x 292 pixeles. Por lo anterior, operando la cámara a dicha velocidad, el tiempo de grabación no sería suficiente para evaluar dispersiones en biorreactores.

En el laboratorio del Dr. Galindo se cuenta con una cámara de video de alta velocidad, capaz de grabar hasta 5130 imágenes por segundo (512 X 512 pixeles), la cual utiliza una fuente de luz directa de alta intensidad. Esta cámara permite adquirir fotografías nítidas de objetos moviéndose a altas velocidades sin la necesidad de dispositivos de iluminación adicionales para congelar la imagen.

3. Hipótesis

El uso de un sistema de video de alta velocidad permite caracterizar procesos de dispersión que ocurren a potencias mayores de 0.20 kW/m^3 .

4. Objetivos

4.1. Objetivo General:

Desarrollar y evaluar un sistema de análisis de imágenes de alta velocidad que permita evaluar dispersiones multifásicas presentes en fermentaciones a potencias mayores a 0.20 kW/m^3 .

4.2. Objetivos Particulares:

- Implementar un sistema de análisis de imágenes de alta velocidad que permita observar dispersiones multifásicas a potencias mayores a 0.2 kW/m^3 .
- Evaluar el potencial y limitaciones del sistema.
- Utilizar el sistema desarrollado para la caracterización de un sistema modelo basado en una fermentación multifásica.

5. Estrategia Experimental

En la figura 5.1 se muestra un esquema de la estrategia experimental seguida durante el desarrollo de este trabajo.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizó como modelo de una fermentación multifásica el medio de fermentación de *Trichoderma harzianum* para la producción de aromas, como un sistema trifásico agua-aire-aceite, además de utilizar albúmina de suero bovino (BSA) en algunos experimentos (Sección 6.1). Asimismo, se utilizaron dos tipos de impulsores, las turbinas Rushton y “Smith” con una relación 0.5 (D/T) (Sección 6.2). Con los impulsores elegidos se realizaron curvas de potencia, para determinar la velocidad de agitación requerida para alcanzar potencias volumétricas (P/V) de 0.25 y 0.50 kW/m³ (Sección 6.3). Con el sistema de análisis de imágenes de luz estroboscópica se adquirieron imágenes a las potencias mencionadas (Sección 6.4). Durante la obtención de estas imágenes se identificaron distintos problemas en la adquisición (nitidez, iluminación, contraste, etc.). Para tratar de resolver los problemas presentados en la adquisición de imágenes se implementó un sistema de video para el análisis de imágenes utilizando una cámara de alta velocidad acoplada a un estereomicroscopio y una fuente de iluminación de alta intensidad (Sección 6.5). Con el sistema implementado se lograron adquirir imágenes bien iluminadas y con el contraste necesario para la caracterización de dispersiones a potencias de 0.25 y 0.50 kW/m³ para el sistema modelo, con turbina Rushton y “Smith”, utilizando magnificaciones de 6X, 8X y 11X. Asimismo, el sistema se calibró utilizando un micrómetro para determinar la equivalencia pixeles/μm para las magnificaciones utilizadas y se obtuvieron imágenes de perlas de 200 μm para realizar la medición de diámetros y determinar el error en la medición (Sección 6.6). Después de realizar la calibración, las equivalencias pixeles/μm se utilizaron para la medición de diámetros de gotas de aceite y burbujas de aire de las imágenes obtenidas de la dispersión modelo (Sección 6.7). Con los diámetros medidos se determinó el diámetro Sauter y se realizaron gráficas de distribución de tamaños para las distintas condiciones evaluadas (Sección 6.8). Los datos obtenidos permitieron comparar y determinar diferencias en la distribución de tamaños y diámetros

Sauter de las dispersiones, al variar el tipo de impulsor, potencia volumétrica e incorporar una proteína a la dispersión.

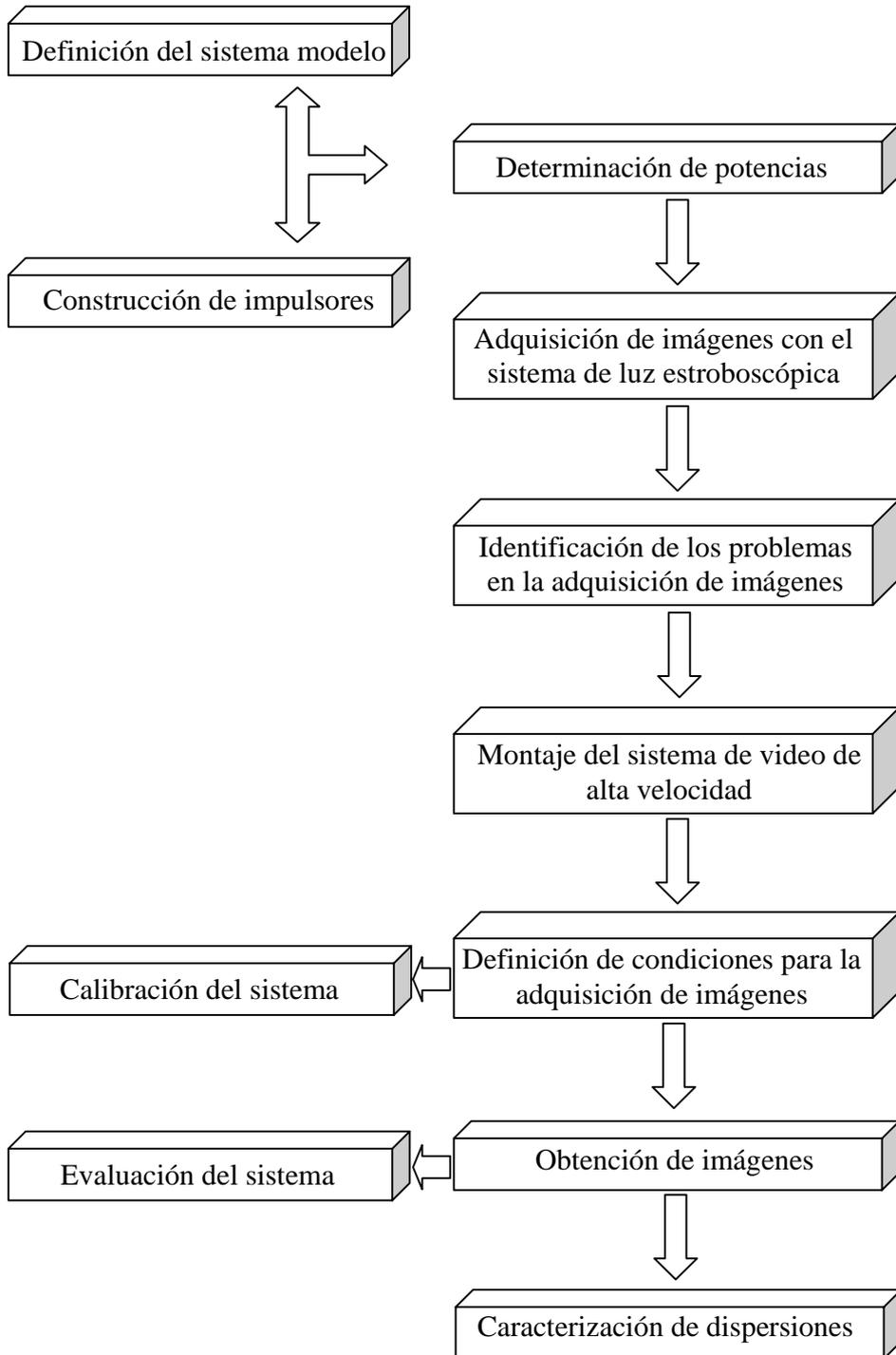


Figura. 5.1. Estrategia experimental seguida durante la implementación y caracterización del sistema de video de alta velocidad.

6. Materiales y Métodos

6.1. Sistema modelo y condiciones de operación

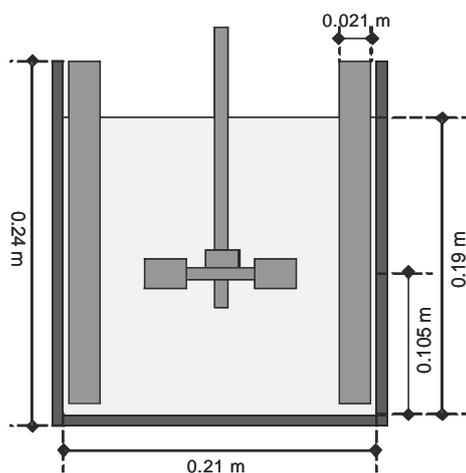


Figura 6.1. Esquema del tanque de mezclado. Diámetro interno (T) de 0.21 m y una altura (H) de 0.24 m, Volumen de llenado: 6.7 L, 0.25 vvm, 5 % de aceite de ricino.

Los experimentos se realizaron en un tanque cilíndrico de vidrio, cuyas dimensiones se muestran en la figura 6.1, el tanque cuenta con cuatro deflectores colocados de forma equidistante. Este tanque fue acoplado al sistema de adquisición y análisis de imágenes, tal como lo describen Lucatero *et al.* (2003). El volumen de trabajo utilizado fue de 6.7 L, que representa el 80 % del volumen total, dando una altura del líquido (H_L) de 0.19 m. Se utilizó un difusor sinterizado de acero inoxidable con un tamaño de poro de 20 μm . El flujo de aire utilizado fue de 0.25 vvm.

Para los cálculos de potencia se utilizaron turbinas Rushton y “Smith” con una relación D/T igual a 0.50. Los impulsores fueron colocados a 0.105 m del fondo, que es igual a D.

El medio de cultivo utilizado en todos los experimentos fue el que se emplea para la fermentación de *T. harzianum* (Serrano Carreón *et al.*, 1997), cuya composición en g/L es: (NH₄)₂SO₄, 5, KH₂PO₄, 7, NaHPO₄, 2, MgSO₄, 1.5, CaCl₂·2H₂O, 0.067, ZnSO₄·7H₂O, 0.0001 y FeCl₃·6H₂O, 0.008. El pH se ajustó a 5.6 con ácido fosfórico. Se agregó 5 % de aceite de ricino (fase dispersa) y 0.2 g/L de albúmina de suero bovino (BSA) como tensoactivo en los experimentos con proteína.

6.2. Construcción de impulsores

Se construyeron turbinas Rushton y “Smith” de 0.5 (D/T), tomando en cuenta las consideraciones generales de diseño para turbina Rushton en las que la longitud de la paleta (L_i) es 0.25 D y el ancho de la paleta (A_i) es 0.20 D. Las dimensiones de los impulsores se muestran en la figura 6.2.

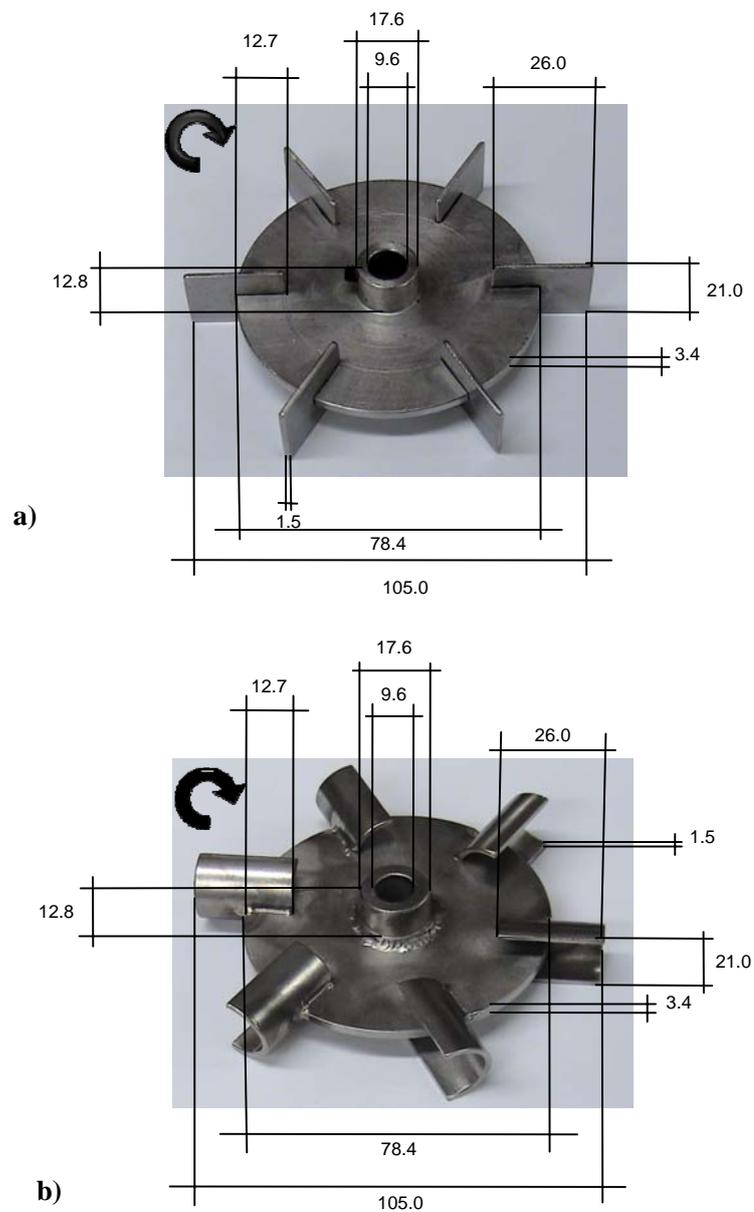


Figura 6.2. Dimensiones de los impulsores en mm: a) Turbina Rushton, b) Turbina “Smith”.

6.3. Determinación de la potencia volumétrica

Para la caracterización de la dispersión a distintas potencias volumétricas, se determinó la potencia volumétrica alcanzada a distintas velocidades de agitación, a fin de obtener una curva de potencia con los dos impulsores (turbina Rushton y turbina de paletas cóncavas de 0.50 T), con velocidades de aireación de 0.00, 0.25 y 0.50 vvm. Las mediciones experimentales se realizaron con un dinamómetro de cojinete neumático (Reséndiz *et al.*, 1991), utilizando la siguiente ecuación (Ascanio *et al.*, 2004):

$$\text{Potencia} = (\text{Torque}) (\text{Velocidad de desplazamiento angular})$$

ó bien,

$$P = 9.8067 (F) (B) (\omega)$$

donde P es la potencia (watts), F es la fuerza (kg_r), B es el brazo de palanca (m) y ω la velocidad de desplazamiento angular (s⁻¹),

siendo

$$\omega = 2\pi N$$

y N es la velocidad de rotación del impulsor (s⁻¹).

Con el dinamómetro se puede conocer la fuerza (F) al variar la velocidad de agitación, manteniendo constante el brazo de palanca (B).

6.4. Sistema de análisis de imágenes con luz estroboscópica

Con el sistema de análisis de imágenes desarrollado previamente (Taboada *et al.*, 2003; Galindo *et al.*, 2005) (figura 6.3), se adquirieron imágenes en el interior del tanque de las gotas y burbujas utilizando las herramientas del programa *Image Pro Plus 5.0*

(Media Cybernetics, USA). Este sistema consta de un estereomicroscopio (*Olympus SZ 1145ESD*) que puede proporcionar magnificaciones entre 1.8 y 11 X. El estereomicroscopio es acoplado a una cámara de video (*Hitachi KP-D50, color RGB-NTSC*), la cual provee imágenes de alta calidad y utiliza una fuente de luz estroboscópica (*EG & G Optoelectronics, model MVS-2600*) conducida al interior del tanque de mezclado a través de una sonda de fibra óptica. Esta luz sirve como fuente de iluminación de la dispersión y permite que los objetos en movimiento se vean estáticos al momento de adquirir las fotografías. El estroboscopio emite un pulso de luz de 5.5 μ s, lo cual permite obtener imágenes enfocadas de objetos moviéndose a una velocidad de hasta 30 mm/s.

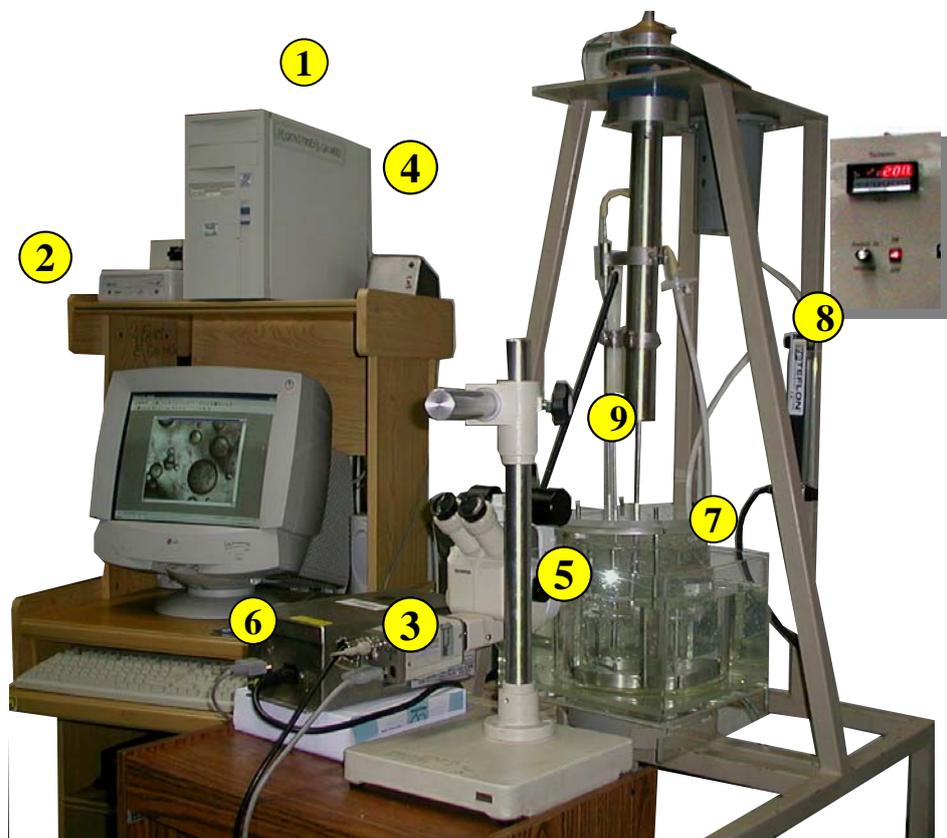


Figura 6.3. Fotografía del sistema de análisis de imágenes con luz estroboscópica (1), (2) computadora con tarjeta de digitalización, (3) cámara de video, (4) sincronizador, (5) cabezal del estereomicroscopio, (6) fuente de luz estroboscópica, (7) tanque de vidrio con tapa, (8) rotámetro, (9) sonda de luz estroboscópica.

Con este sistema se obtuvieron fotografías a potencias entre 0.25 kW/m³ y 1.00 kW/m³. Las imágenes se muestran en la sección 7.2.1.

6.5. Montaje del sistema de video de alta velocidad

Para la adquisición de imágenes también se implementó un sistema de video de alta velocidad. En la figura 6.4 se pueden observar los constituyentes del sistema.

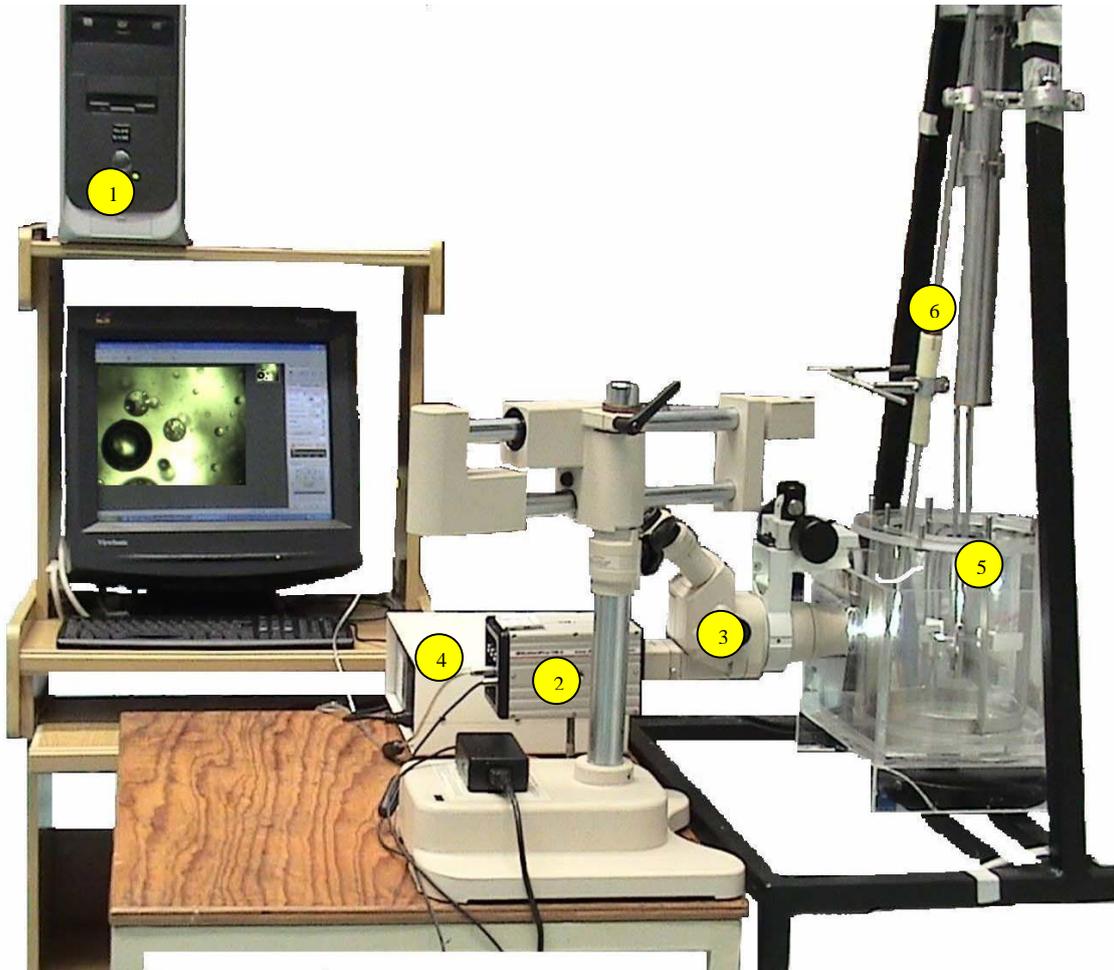


Figura 6.4. Fotografía del sistema de video de alta velocidad: (1) computadora, (2) cámara de video de alta velocidad, (3) cabezal de estereomicroscopio, (4) fuente de luz directa, (5) tanque de vidrio, (6) sonda de luz directa.

El sistema utiliza una cámara de video de alta velocidad (Redlake Motion Pro HS-4) (figura 6.5). La captura de imágenes con esta cámara, se realiza empleando el *software* “Motion Pro Central” de Redlake Inc. La cámara de video de alta velocidad permite alcanzar velocidades de adquisición de hasta 5130 imágenes por segundo (512 x 512 píxeles).

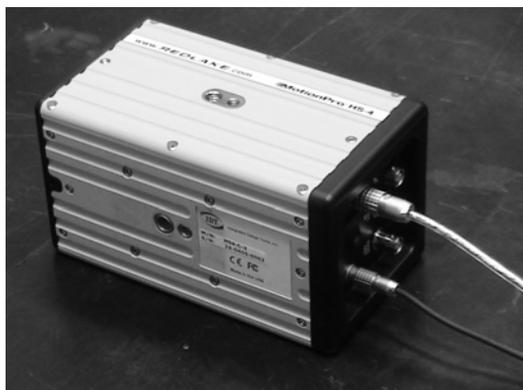


Figura 6.5. Cámara de video de alta velocidad.

El sistema se acopló a una fuente de luz directa (Xenon arc light generator), con una lámpara de 180 watts (figura 6.6a). La luz es conducida al tanque con una sonda de fibra óptica (endoscopio rígido, Fort Imaging Systems, Inc.) de 10 mm de diámetro y 710 mm de longitud (figura 6.6b).



Figura 6.6. Fuente (a) y sonda de luz (b) directa.

6.6. Calibración del sistema de video de alta velocidad

La calibración del sistema se realizó con un micrómetro (portaobjetos que contiene una regla de 1 mm de longitud dividido en micras) (figura 6.7). Este micrómetro se colocó dentro del tanque de mezclado y se adquirieron videos a magnificaciones entre 6 y 22 X. Para alcanzar las magnificaciones arriba de 11 X se utilizó un lente duplicador.

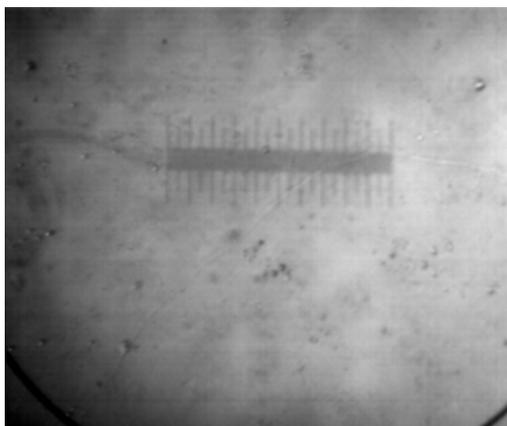


Figura 6.7. Imagen del micrómetro adquirida con una magnificación de 8X.

Los videos se procesaron con el programa *Image Pro Plus 5.0* (Media Cybernetics, USA) y se construyó una curva de calibración con la equivalencia pixeles/micrómetro para cada magnificación, la cual se presenta en la sección 7.4.

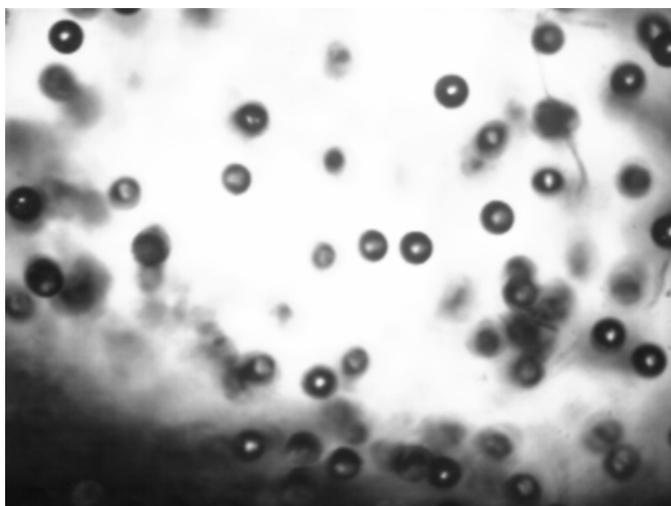


Figura 6.8. Esferas de 200 μm tomadas a 6 X.

Posteriormente, utilizando esferas de Poliestireno-Divinilbenceno, con diámetro de 200 $\mu\text{m} \pm 4 \mu\text{m}$ (Duke Scientific Corporation), introducidas en el tanque de mezclado, se adquirieron videos que fueron procesados con el mismo programa (figura 6.8) para estimar la variación en la medición que corresponde a las distintas magnificaciones.

6.7. Determinación de diámetros

Una vez que se tiene la calibración para cada una de las magnificaciones empleadas, los datos son alimentados al programa *Image Pro Plus 5.0*. La medición de los diámetros se realiza utilizando la herramienta “measurements” de dicho programa, definiendo un círculo por medio de tres puntos en la circunferencia (figura 6.9). El programa reporta el radio, la circunferencia y las coordenadas (x, y) del centro del objeto en micrómetros.

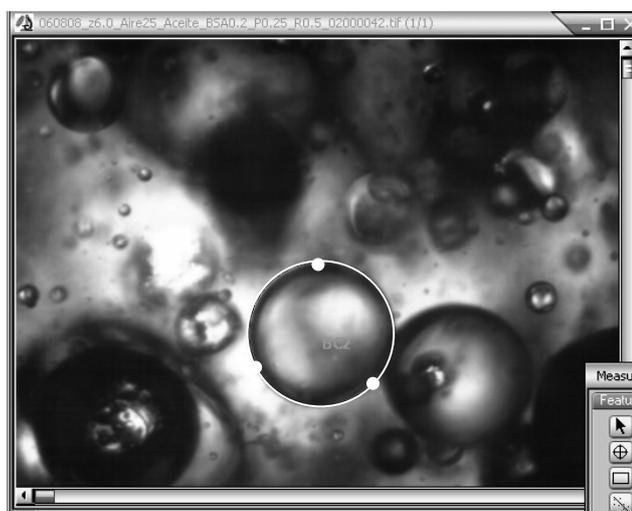


Figura 6.9. Medición de burbujas de aire y gotas de aceite con el programa Image Pro Plus 5.0.

Durante la segmentación, fue necesario realizar la diferenciación y separación de los objetos (gotas de burbujas), por lo que en una imagen, se midieron primero todas las gotas de aceite y al final las burbujas de aire. Los datos fueron exportados a *Excel* (opción “input/output” de la función “measurements”) y se separaron las gotas de las burbujas para el tratamiento estadístico. Las burbujas de aire también se dividieron separando aquellas que se observan dentro de gotas de aceite (burbujas incluidas), de las que se encuentran libres (dispersas en la fase continua).

6.8. Estadística

Una vez que se exportaron los datos a *Excel*, se determinó el diámetro Sauter para gotas y burbujas, burbujas libres y burbujas incluidas, así como la media, desviación

estándar, valores máximos y mínimos para las burbujas de aire y gotas de aceite. Para obtener un error menor al 10 % en la determinación de los mismos diámetros, se requirió medir al menos 500 gotas de aceite y 300 burbujas de aire (Brito-Albavera, 2001).

Con los datos obtenidos se calculó la Densidad de Probabilidad de Número (DPN) como lo señala Brito-Albavera (2001), para conocer la distribución de diámetros de burbujas de aire y gotas de aceite presentes en las condiciones evaluadas. La DPN representa la probabilidad de que un evento ocurra, es decir, la probabilidad de que se presente un determinado diámetro.

Se determinó el porcentaje de burbujas de aire dentro de gotas de aceite, observando la secuencia de imágenes, como se describe en la sección 7.7.2.

Las distribuciones fueron comparadas realizando la prueba de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples con el programa Stats Direct (Stats Direct Ltd.). Con esta prueba se determinó si existe diferencia significativa entre las distribuciones ($\alpha=0.05$).

7. Resultados y discusión

7.1. Determinación de potencia

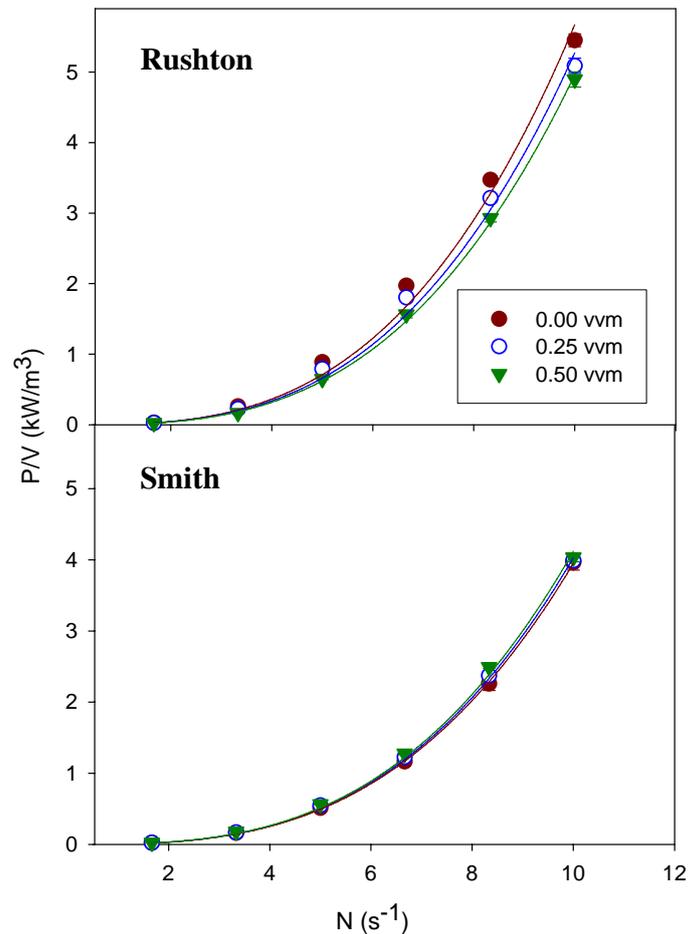


Figura 7.1. Curvas de P/V en función de N para las dos turbinas a 0.00, 0.25 y 0.50 vvm

En la figura 7.1 se muestran las curvas obtenidas en la determinación de la potencia, variando la velocidad de agitación, con tres velocidades de aireación (0.00, 0.25 y 0.50 vvm). Se observa que a una misma velocidad de agitación la turbina “Smith” alcanza una menor potencia que la turbina Rushton, esto es debido a que la turbina Rushton presenta un mayor número de potencia ($N_p = 3$) que la turbina “Smith” ($N_p = 2$). Los datos de N_p reportados fueron determinados en régimen turbulento. No obstante que los datos de N_p fueron reproducibles, los valores son menores a los reportados por Hemrajani y Tatterson (2004) para ambas turbinas. Existen estudios que indican que N_p varía de acuerdo a las

dimensiones del tanque y el impulsor (tales como diámetro, grosor del disco y grosor de la paleta) (Bujalski, *et al.*, 1987). Estos autores establecen una correlación para predecir el N_p de acuerdo a las dimensiones del tanque y el impulsor, sin embargo, existen diferencias en el diseño de las turbinas utilizadas en este trabajo que no permiten aplicar dichas correlaciones y que explican los bajos N_p obtenidos.

Con la obtención de las gráficas de potencias fue posible encontrar las velocidades de agitación necesarias para alcanzar potencias volumétricas de 0.25 y 0.50 kW/m³, utilizando impulsores Rushton y “Smith” de 0.50 D/T (tabla 7.1), para lo cual se realizaron ajustes, tomando como base la relación de $P \propto N^3$, para potencias no aireadas en tanques agitados.

Tabla 7.1. Velocidades de agitación necesarias para obtener las potencias requeridas.

Velocidad de aireación	P (kW/m ³)	N (rpm)	
		Rushton 0.5(D/T)	Smith 0.5(D/T)
0.25 vvm	0.25	217	238
	0.50	273	300
	0.75	313	343
	1.00	344	378

Con las curvas de potencia se obtuvieron, también, los valores de a para los cálculos de potencias ($P = aN^3$), para las dos turbinas con tres velocidades de aireación (0.00, 0.25 y 0.50 vvm), los cuales se muestran en la tabla 7.2.

Tabla 7.2. Valores de a para $P = aN^3$

Velocidad de aireación (vvm)	Valores de a	
	Rushton 0.5 (D/T) 1.67 ≤ N ≤ 10	Smith 0.5 (D/T) 1.67 ≤ N ≤ 13.33
0.00	0.0057	0.004
0.25	0.0053	0.004
0.50	0.005	0.0041

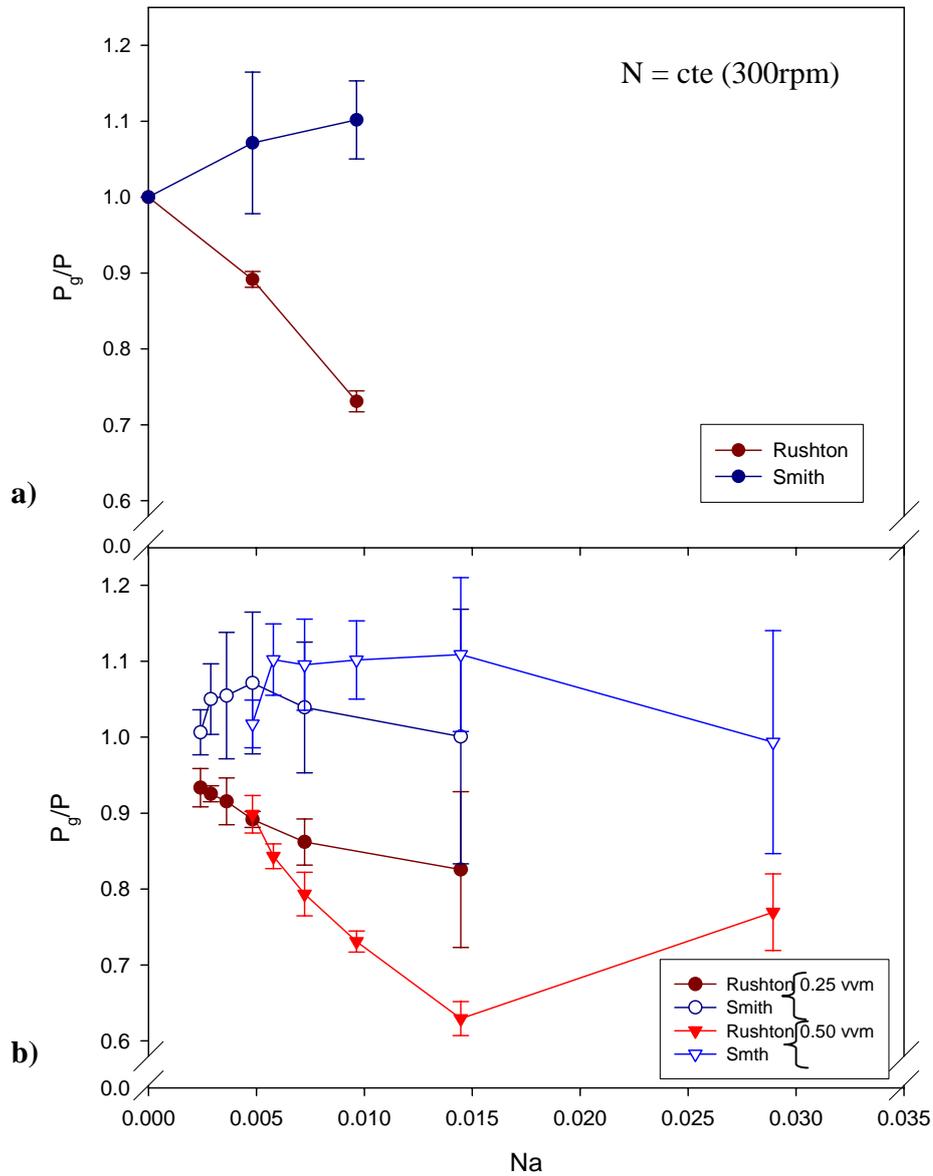


Figura 7.2. Caída de potencia (P_g/P) en función del número de aireación (Na). a) a agitación constante (300 rpm). b) a velocidad de aireación constante.

En la figura 7.2 se muestra dos gráficas de caída de potencia en función del número de aireación (Na) para ambas turbinas. La figura 7.2a muestra la caída de potencia al variar Na manteniendo la velocidad de agitación constante y variando la velocidad de aireación. En esta gráfica se observa que cuando incrementa la aireación (aumento de Na), la turbina “Smith” no presenta caída de potencia, sin embargo, en el caso de la turbina Rushton, la potencia disminuye más del 30 %. En la figura 7.2b se muestra la caída de potencia al

variar Na manteniendo la velocidad de aireación constante y variando la velocidad de agitación. Se observa que para la turbina Rushton, a menor velocidad de agitación (aumento de Na) mayor caída de potencia, mientras que para la turbina “Smith” la potencia se mantiene prácticamente constante. Ambas gráficas permiten apreciar el incremento de la caída de potencia con el aumento de Na . Sin embargo, un mismo número de aireación no refleja el mismo valor de P_g/P , ya que los fenómenos hidrodinámicos que se presentan con el incremento de la agitación y/o la disminución de la aireación no son los mismos. Además, este número (Na) no considera fenómenos como la recirculación del gas y coalescencia del sistema y por lo tanto, el efecto observado variará de acuerdo a las características del sistema (Middleton, 1985).

7.2. Obtención de imágenes

7.2.1. Sistema con luz estroboscópica

El aumento en la potencia volumétrica suministrada al sistema, trae como consecuencia distintos problemas en la adquisición de imágenes. La disminución en el tamaño de las gotas de aceite y burbujas de aire requiere el incremento de la magnificación, con lo que la distancia y plano focal se ven reducidos, dificultando el enfoque. La disminución en el plano focal y el aumento en la velocidad a la que se mueven las gotas de aceite y burbujas de aire en el reactor, hacen que la probabilidad de obtener un objeto enfocado en una imagen sea muy baja.

El incremento en la potencia, también conduce a un oscurecimiento del fondo como consecuencia de la formación de espuma, la disminución del tamaño de las partículas, la velocidad con que se mueven y la interacción entre las fases. La formación de estructuras complejas (agua y aire dentro de aceite) y el aumento en el tamaño de éstas, generan turbidez en el sistema. Ante estos problemas, la intensidad de la luz estroboscópica no es suficiente para la iluminación del sistema, por lo que se obtienen imágenes oscuras. Además, la sensibilidad de la cámara no es suficiente para obtener imágenes de objetos

moviéndose a gran velocidad, por lo que las estructuras que componen la dispersión se observan movidas y con baja nitidez.

En la figura 7.3 pueden observarse fotografías de gotas de aceite tomadas a potencias mayores a 0.20 kW/m^3 . Se observa que, a medida que se incrementa la potencia de mezclado se pierde nitidez y enfoque en las imágenes adquiridas, por lo que no es posible utilizarlas para el análisis de imágenes.

P/V (kW/m^3)

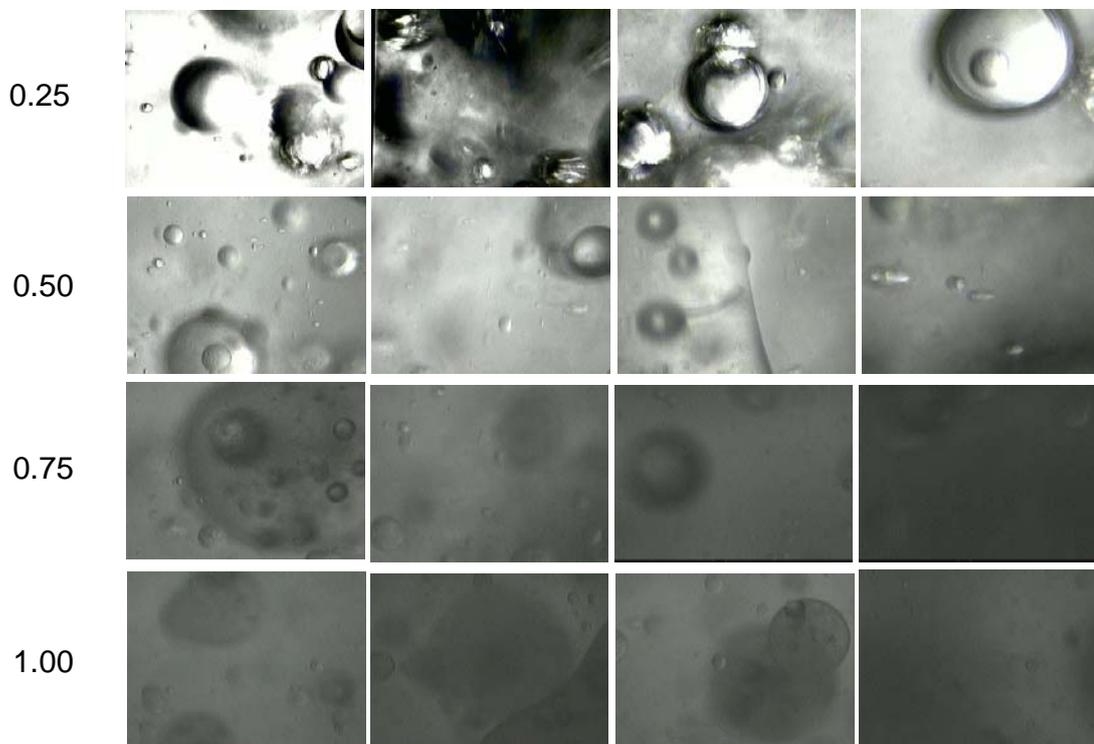


Figura 7.3. Imágenes obtenidas a potencias superiores a 0.20 kW/m^3 con el sistema de luz estroboscópica.

Por todos los problemas presentados, el sistema de análisis de imágenes con luz estroboscópica, resultó ineficiente para la adquisición de fotografías a potencias superiores a 0.20 kW/m^3 . Lo anterior, hizo necesario el uso de una luz de mayor intensidad. Sin embargo, esto implica prescindir de la luz estroboscópica, que permite que las imágenes se

vean estáticas, por lo que se requirió el uso una cámara que proporcione una mayor velocidad y sensibilidad en la adquisición de fotografías.

7.2.2. Sistema de video de alta velocidad

A fin de solucionar los problemas presentados durante la adquisición de imágenes con el sistema previamente desarrollado (Galindo *et al.*, 2005), se utilizó una cámara de video de alta velocidad, con la que es posible adquirir videos a una velocidad de hasta 5130 imágenes por segundo (512 x 512 pixeles) y puede ser acoplada al estereomicroscopio para obtener las magnificaciones requeridas. Con esta cámara no se requiere la utilización de luz estroboscópica ni sincronizador. Lo anterior permite utilizar una fuente de luz directa (fuente de luz Arco Xenon de 180W, directa, SX200, Fort Imaging systems, Inc. Francia., 230 V - 50 Hz), aproximadamente 500 veces más intensa que la luz estroboscópica.

Para obtener las imágenes con el sistema de video de alta velocidad se probaron distintas velocidades de adquisición y se manipuló la resolución de la cámara y la intensidad de la luz. Como resultado de las pruebas, se decidió obtener ocho videos de 200 imágenes a una velocidad de 5130 imágenes/s (512 x 384 pixeles), de la dispersión en el tanque de mezclado con magnificaciones de 6 X, 8 X y 11 X. La velocidad y condiciones de luz ocupadas permitieron obtener imágenes nítidas y aumentar la probabilidad de encontrar objetos enfocados dentro de las imágenes, además de obtener el número de gotas de aceite y de burbujas de aire requeridos para el tratamiento estadístico.

En la figura 7.4 se muestran imágenes obtenidas con el sistema de video de alta velocidad para sistemas con agua-aire, agua-aceite y agua-aire-aceite a potencias de 0.50 kW/m³. Como se puede observar, a pesar del incremento de potencia, las imágenes se observan enfocadas y bien iluminadas, por lo que pueden ser utilizadas para la determinación de diámetros.

Para observar el efecto de agentes tensoactivos en la dispersión se adquirieron imágenes utilizando una concentración de 0.2 g/L de albúmina de suero bovino (BSA), bajo

las mismas condiciones de operación. El uso de agentes tensoactivos, tiene como finalidad estabilizar la dispersión e impedir la coalescencia de gotas y burbujas. La elección de una proteína como agente tensoactivo se debe a que en el sistema modelo (producción de aromas por *Trichoderma harzianum*), existe formación de éstas durante el transcurso del cultivo y a trabajos previos del grupo de investigación utilizando BSA (Pulido-Mayoral y Galindo, 2004).

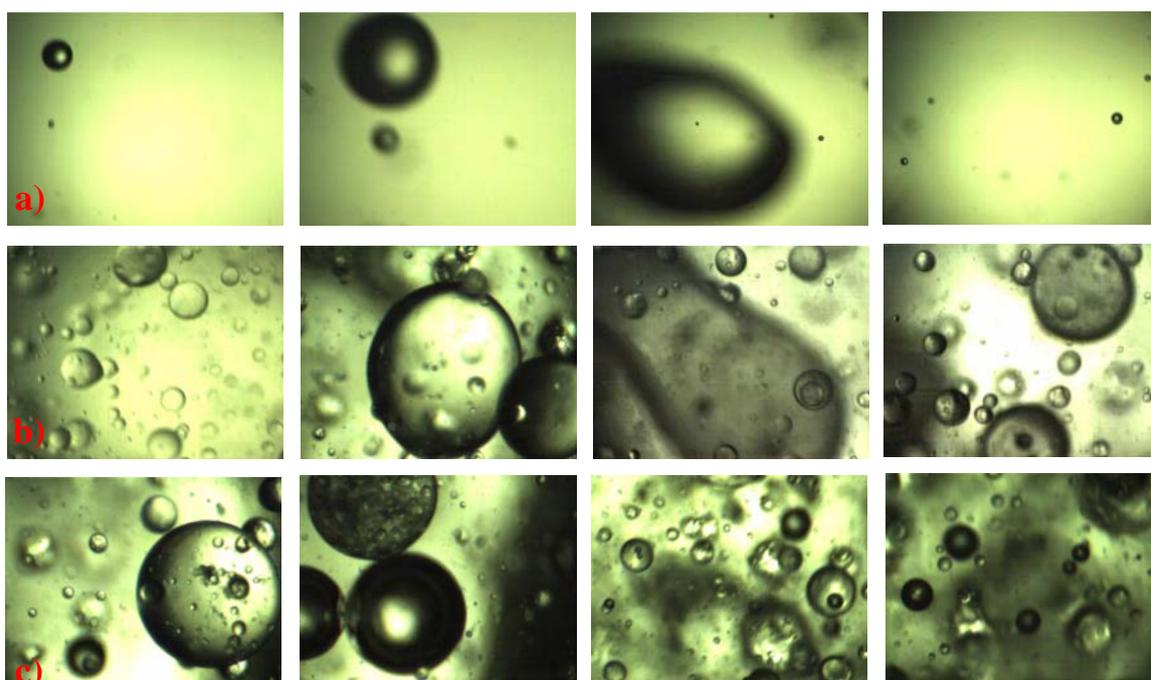


Figura 7.4. Imágenes obtenidas con el sistema de video de alta velocidad a 0.50 kW/m^3 . Sistemas bifásicos a) agua-aire, b) agua-aceite y c) sistema trifásico agua-aire-aceite.

En las figuras 7.5 y 7.6 se muestran fotografías tomadas a una potencia de 0.50 kW/m^3 a magnificaciones de 8 y 11X con y sin BSA. Se observa que las imágenes obtenidas con BSA presentan mayor nitidez y contraste que las que se adquieren sin usar BSA, sobre todo a medida que el tiempo (desde que se inicia la agitación) transcurre y la magnificación aumenta, lo que hace viable el uso de dichas imágenes para el análisis y determinación de diámetros de gotas de aceite y burbujas de aire bajo estas condiciones a periodos más largos de tiempo.

Figura 7.5. Imágenes obtenidas para turbina Rushton 0.5 T a 8X.

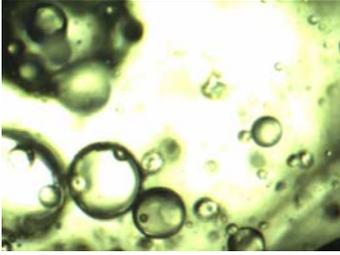
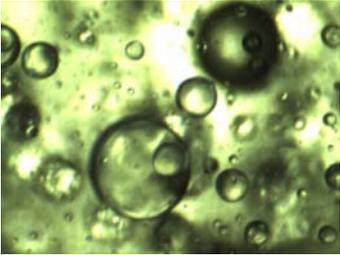
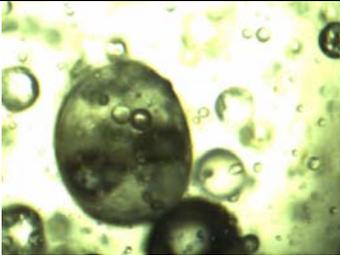
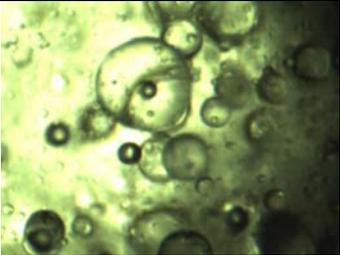
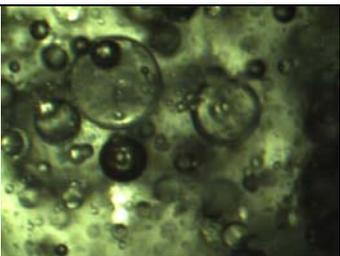
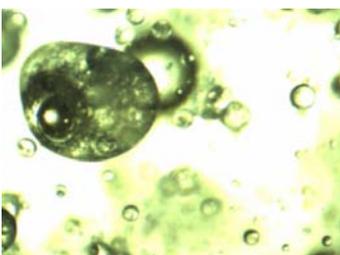
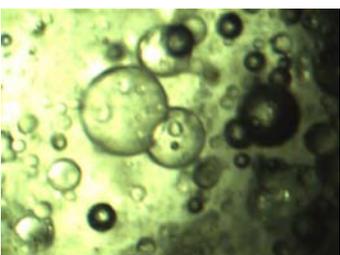
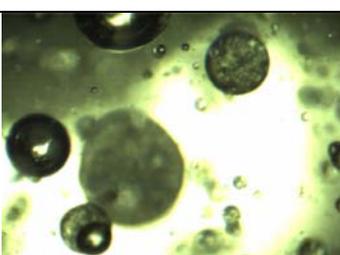
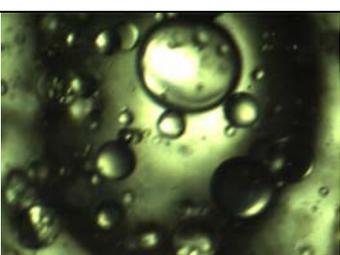
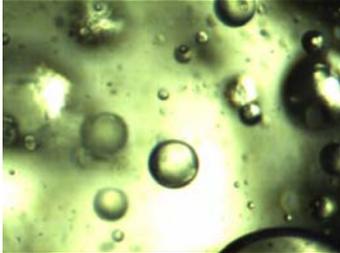
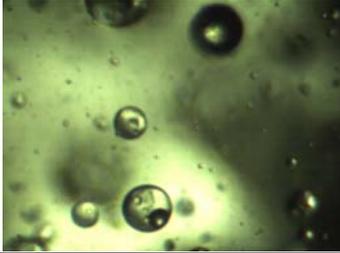
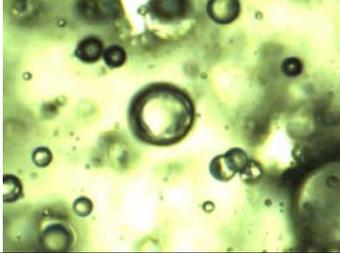
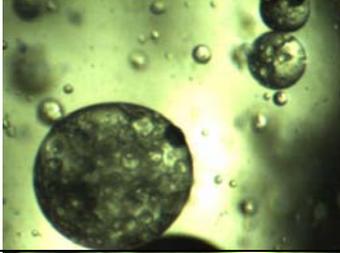
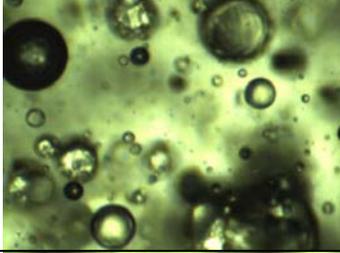
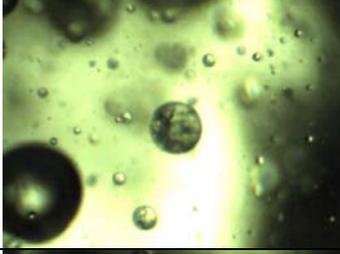
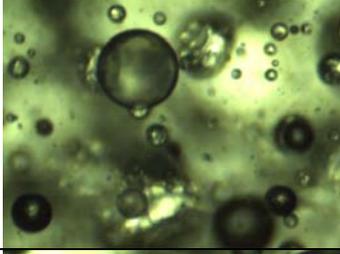
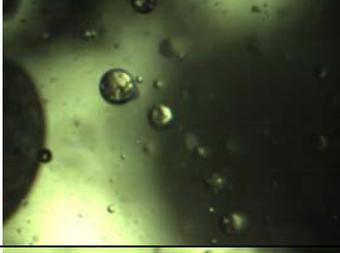
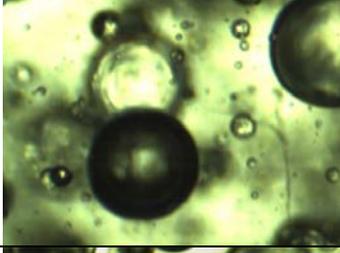
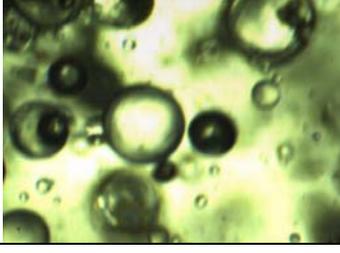
Tiempo transcurrido (min)	Sin BSA	Con BSA
1		
2		
3		
4		
5		

Figura 7.6. Imágenes obtenidas para turbina Rushton 0.5 T a 11X.

Tiempo transcurrido (min)	Sin BSA	Con BSA
1		
2		
3		
4		
5		
10		

7.3. Condiciones de adquisición de imágenes

Para la adquisición de imágenes con el sistema de video de alta velocidad, se determinaron las distancias a las cuales se debían colocar la luz y el estereomicroscopio, así como la longitud de desplazamiento que se tiene entre la pared y la luz durante la adquisición de fotografías (zona donde se pueden tener objetos enfocados). La adquisición se hizo enfocando la región que se encuentra a la mitad entre la pared del tanque y la luz. Estas dimensiones se muestran en la figura 7.7.

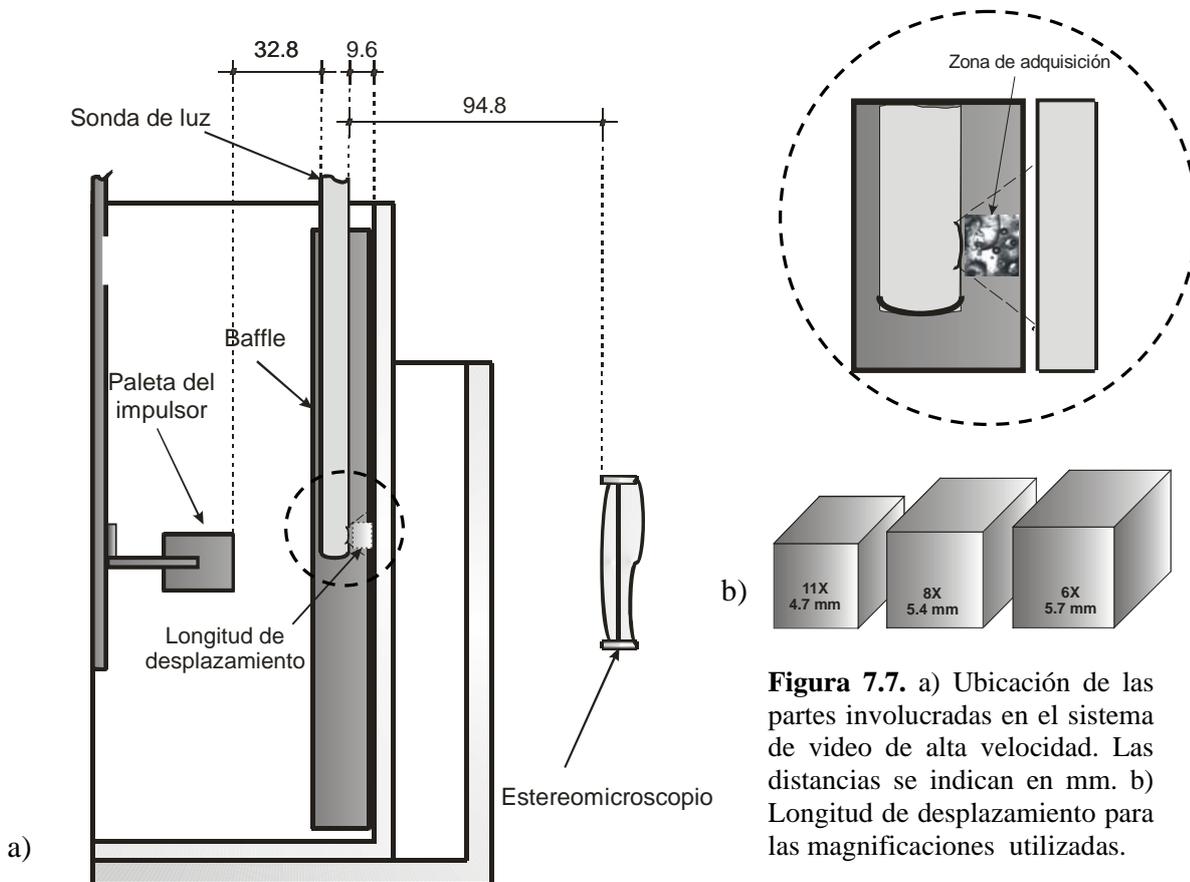


Figura 7.7. a) Ubicación de las partes involucradas en el sistema de video de alta velocidad. Las distancias se indican en mm. b) Longitud de desplazamiento para las magnificaciones utilizadas.

Como se observa en la figura 7.7, debido a las magnificaciones y potencia utilizadas, la distancia a la que debe colocarse la luz para obtener la iluminación adecuada, hace que la zona de observación este restringida a menos de un centímetro de la pared. Al colocar la luz a una distancia más lejana a la pared, la densidad de objetos enfrente del plano focal hacen que la iluminación sea insuficiente, por lo que las imágenes adquiridas se observan oscuras y no es posible caracterizar los objetos. Además, a medida que se

incrementa la magnificación, la distancia en la que es posible desplazarse para obtener objetos enfocados disminuye, siendo de tan sólo 4.7 mm para 11 X. La distancia focal conseguida con este arreglo es de 9 cm.

7.4. Calibración del sistema de video de alta velocidad

En la figura 7.8 se muestra la curva de calibración obtenida para el sistema de video de alta velocidad. Dicha curva nos muestra las equivalencias en pixeles/micrómetro para magnificaciones de 6 a 22X. Estas calibraciones son proporcionadas al sistema *Image Pro Plus 5.0* para poder efectuar la segmentación.

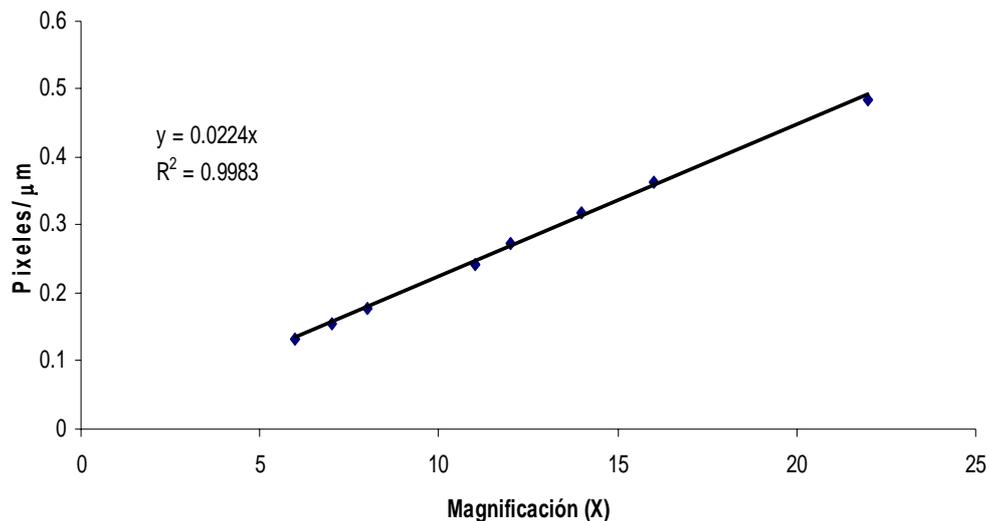


Figura 7.8. Curva de calibración para el sistema de video de alta velocidad.

Una vez obtenida la curva de calibración, los datos obtenidos se utilizaron para determinar la variación que proporciona el sistema, midiendo las esferas de 200 μm con los aumentos proporcionados con y sin el lente duplicador. En la tabla 7.3 se muestran los errores máximos y mínimos calculados de las mediciones de las esferas, para las diferentes magnificaciones. De este análisis se determinó que al utilizar magnificaciones entre 6 y 11 X (sin lente duplicador) la variación en la medición puede ser hasta de 7.0 %, mientras que

al utilizar magnificaciones de 12 a 22 X (con el lente duplicador), la variación será hasta de 12.2 %.

Tabla 7.3. Errores encontrados en la medición de esferas de 200 μm .

Magnificación (X)	% de error	
	Mínimo	Máximo
6	0.4	7.0
8	0.4	6.0
11	0.4	6.7
12	2.3	10.7
16	0.4	7.5
22	2.1	12.2

7.5. Limitaciones del sistema

Aún cuando el sistema de análisis de imágenes de alta velocidad permite una gran variedad de aplicaciones y presenta ventajas con respecto al sistema descrito por Taboada, *et al.* (2003), el arreglo de dicho sistema y la cantidad de información que puede obtenerse trae como consecuencia ciertas desventajas en el análisis de imágenes.

7.5.1. Límites de adquisición

La complejidad generada en la dispersión modelo utilizada en este trabajo, cuando se utilizan potencias volumétricas mayores a 0.20 kW/m^3 hasta el momento sólo ha permitido la obtención de imágenes en los primeros diez minutos de la dispersión, ya que a tiempos mayores la turbidez que se genera en el sistema hace necesario el empleo de una fuente de iluminación más potente de la empleada en el desarrollo del sistema de video de alta velocidad.

El problema es mayor conforme la potencia se incrementa, por lo que hasta el momento no ha sido posible la obtención de imágenes a potencias mayores a 0.50 kW/m^3 .

7.5.2. Ventanas de observación

Debido a la disminución de tamaños, el aumento en la velocidad de los objetos y la turbidez del sistema, se requiere aumentar la magnificación y reducir la distancia focal, como se detalla en la figura 7.7. Esto da como resultado que, al utilizar magnificaciones de entre 6X y 11 X, las ventanas de observación fueron de 3.81 x 2.86 mm para una magnificación de 6 X y de 2.08 x 1.56 mm para una magnificación de 11 X (figura 7.9).

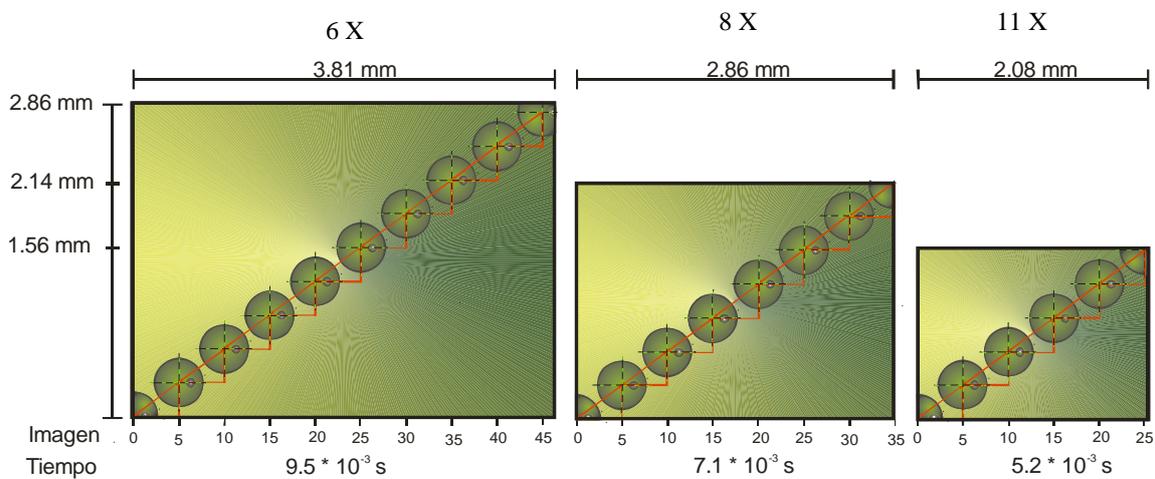


Figura 7.9. Ventanas de observación para las magnificaciones utilizadas. Cada objeto en la ventana representa la posición que ocuparía al avanzar cinco imágenes en la secuencia, moviéndose a 50 cm/s en la trayectoria mostrada.

Lo anterior implica que un objeto moviéndose a una velocidad de 50 cm/s (ver sección 7.7.3) que permaneciera enfocado y atravesara diagonalmente en la ventana de observación, podría aparecer entre 25 y 45 imágenes. Sin embargo, el tiempo que duraría en pasar por las ventanas, siguiendo esta trayectoria no sería mayor a 9.5×10^{-3} s.

7.5.3. Procesamiento manual

Para la caracterización de las dispersiones multifásicas se debe realizar la identificación de gotas y burbujas, la medición de diámetros de los objetos, así como la distinción, en forma precisa, de las burbujas de aire que se encuentran libres y aquellas que están incluidas en gotas de aceite. La obtención de secuencias permite realizar la

diferenciación de gotas y burbujas y la determinación de inclusiones de burbujas de aire en de gotas de aceite de una forma más precisa (secciones 7.7.1. y 7.7.2).

Debido a la diferencia en el tipo de imágenes obtenidas con el sistema de video de alta velocidad, en comparación con los sistemas descritos por Taboada, *et al.* (2003) Corkidi *et al.* (2007) y a la obtención de secuencias; los algoritmos desarrollados para la segmentación semiautomática Taboada, *et al.* (2006) no pudieron utilizarse para el procesamiento de las imágenes adquiridas en este trabajo, por lo que es necesario el procesamiento manual de los videos para la medición de los objetos.

7.5.3.1. Procesamiento en modo imágenes

7.5.3.1.1. Preproceso o selección de imágenes

El *software* “Motion Pro Central”, utilizado en la grabación de videos, permite almacenarlos ya sea en modo video (formato *avi*), en modo imágenes (formato *tif*) o en ambos formatos. En un principio, se optó por obtener los videos como imágenes individuales y procesarlas por separado.

Para el procesamiento manual, entre las 200 imágenes obtenidas por video se hizo una selección bajo el siguiente lineamiento:

- Se seleccionó aquella imagen donde el objeto a medir tiene las mejores características de enfoque y nitidez, a fin de disminuir la repetición de objetos en imágenes consecutivas (figura 7.10).

El preproceso disminuye el número de imágenes por video a aproximadamente 30, sin embargo, esta selección no elimina la repetición de objetos por completo, debido a que la alta velocidad a la que los videos son adquiridos, implica que un objeto puede aparecer hasta en más de 40 imágenes (figura 7.9) y, al realizarse el preproceso, pueden presentarse casos como los que se muestran en la figura 7.11. Lo anterior requiere que en el momento

de la segmentación se tome en cuenta dicha repetición y simultáneamente se realice la revisión del video para evitar medir el mismo objeto dos veces.

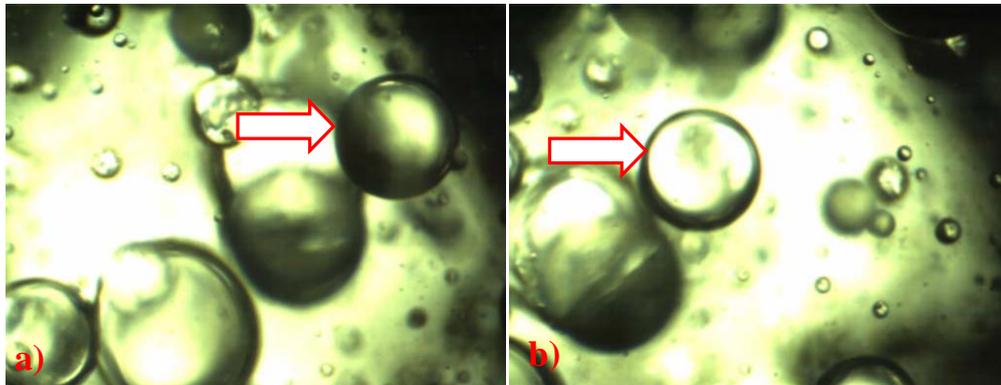


Figura. 7.10. Selección de imágenes. El objeto señalado con la flecha en ambas imágenes es el mismo, sin embargo, en la foto a) se observa mejor enfocado.

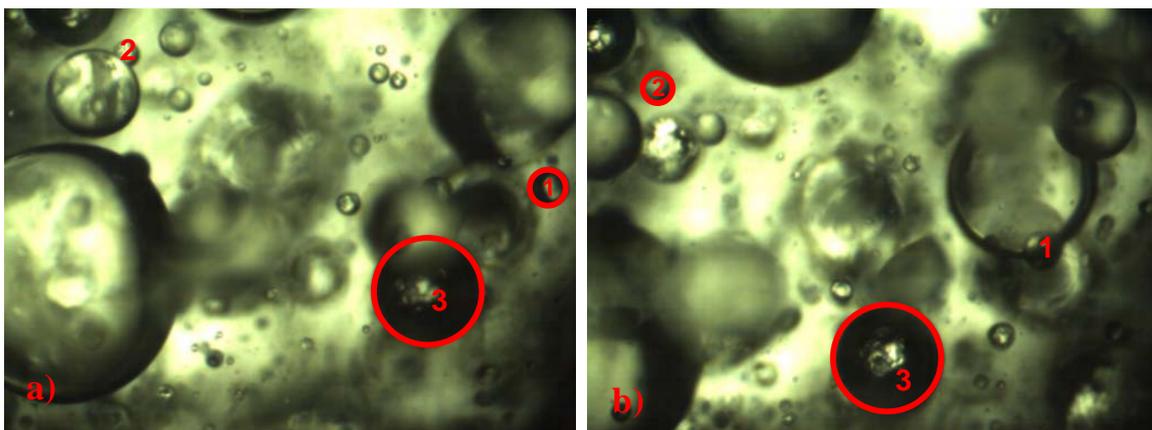


Figura 7.11. Repetición de objetos en más de una imagen. El objeto uno es visible en ambas imágenes, pero sólo es medible en a); el objeto dos es visible en ambas y medible en b) y el objeto 3 es visible y medible en ambas imágenes.

Cabe mencionar que la repetición de objetos podría eliminarse si el interés de la caracterización fuera la medición de diámetros, como en el caso de sistemas agua-aire en los que no hay inclusiones de una fase en otra. En estos casos, la repetición puede resolverse guardando y procesando cada determinado número de imágenes (por ejemplo, cada 40 imágenes considerando el número de imágenes en que puede aparecer el mismo objeto). Esta selección puede realizarse con el programa de adquisición, lo que facilitaría el procesamiento manual y evitaría el preproceso. Sin embargo, como se mencionó

anteriormente, la caracterización de dispersiones multifásicas requiere además, distinguir entre gotas y burbujas y discernir en forma precisa las burbujas que se encuentran libres y aquellas que están atrapadas en gotas de aceite.

El procesamiento manual hace que el tiempo requerido para el análisis de imágenes se incremente con respecto a los sistemas descritos por Taboada, *et al.* (2003) y por Corkidi *et al.* (2007). Otra desventaja de la cantidad de información generada es que cada experimento (200 imágenes) requiere 116 MB de memoria de cómputo para su almacenamiento.

7.5.3.2. Procesamiento manual en modo videos

Debido al tiempo requerido para el procesamiento, así como a la capacidad requerida para el almacenamiento, cuando los videos se adquieren en formato de imagen, se decidió adquirir y procesar en formato de video. La adquisición en formato de video implica que al analizar la secuencia, la selección o preproceso se hacen de manera simultánea a la medición y análisis de los objetos.

Al adquirir en formato de video (*avi*) se requiere menor capacidad de almacenamiento en disco (37.5 MB por experimento o video de 200 cuadros), lo que representa aproximadamente una tercera parte de la capacidad de almacenamiento requerida al almacenar como imágenes individuales.

La mayor ventaja del procesamiento como videos es que el tiempo requerido para el análisis de las imágenes se disminuye. En la tabla 7.4 se muestran los tiempos requeridos en la adquisición y en el procesamiento de imágenes de acuerdo al formato de adquisición. Los pasos que requieren más tiempo cuando los videos adquiridos son almacenados en modo de imágenes son el preproceso o selección de las imágenes y la segmentación, que implican en conjunto casi tres semanas. La adquisición como videos disminuye el tiempo a una semana, lo que representa casi una tercera parte del tiempo de análisis.

Tabla 7.4. Tiempos requeridos en la adquisición y procesamiento de imágenes.

Proceso	Tiempo	
	Imágenes	Videos
Montaje equipo	60 min	60 min
Adquisición	10 min	10 min
Desmontaje	30 min	30 min
Preproceso	3 días	1 semana
Segmentación	2 semanas	
Estadística	2 horas	2 horas

7.6. Caracterización de dispersiones

Tabla 7.5. Datos del análisis estadístico en el procesamiento de imágenes.

Turbina	Potencia kW/m ³		Imágenes procesadas	Objetos procesados	Objetos/ imagen	Gotas/ imagen	Burbujas/ imagen
Rushton	0.25	Sin BSA	549	1562	2.85	2.50	0.34
		Con BSA	567	2232	3.94	2.97	0.97
	0.50	Sin BSA	856	3563	4.16	3.86	0.30
		Con BSA	683	2509	3.67	2.43	1.24
Smith	0.25	Sin BSA	521	1568	3.01	2.80	0.21
		Con BSA					
	0.50	Sin BSA	623	2303	3.70	2.29	0.27
		Con BSA	601	2745	4.59	2.85	1.74

En la tabla 7.5 se muestra el número de objetos procesados y número de objetos por imagen de los 24 videos (tres videos para cada una de las magnificaciones utilizadas) adquiridos variando el tipo de impulsor y la potencia, con y sin proteína. La obtención de dichos datos es importante, ya que el error en la determinación de los diámetros Sauter, tanto de burbujas de aire como de gotas de aceite, dependerá del tamaño de la muestra; de tal manera que, para obtener un error menor al 10 % es necesario medir al menos 500

objetos en el caso de las gotas de aceite y más de 300 para las burbujas de aire (Brito-Albavera, 2001; Brown *et al.*, 2004).

En el caso de las gotas de aceite, se lograron medir arriba de 1000 objetos (con y sin BSA), con lo que se asegura que el error es alrededor de 6 % para ambos casos, sin embargo, para las burbujas de aire, en los experimentos sin proteína, en algunos casos no fue posible medir las 300 burbujas. Cuando se utilizó la turbina Rushton sin BSA a 0.25 kW/m³, sólo se midieron 189 objetos con lo que el error se encuentra alrededor del 14 % (Brito-Albavera, 2001).

Estos datos implican que, para conseguir el número de burbujas de aire que aseguren un error menor al 10 %, es necesario la obtención y procesamiento de un mayor número de videos, lo que aumentaría considerablemente el tiempo de procesamiento.

En general, el número de objetos segmentados es mayor cuando se utiliza BSA, debido a la estabilización de la dispersión y a la disminución en la coalescencia y formación de estructuras complejas (gotas de aceite con burbujas de aire incluidas) que generan turbidez en el sistema. El uso de proteína mejora la calidad de las imágenes, incrementando el número de imágenes seleccionadas en el preproceso y el número de objetos medibles por imagen (figura. 7.12).

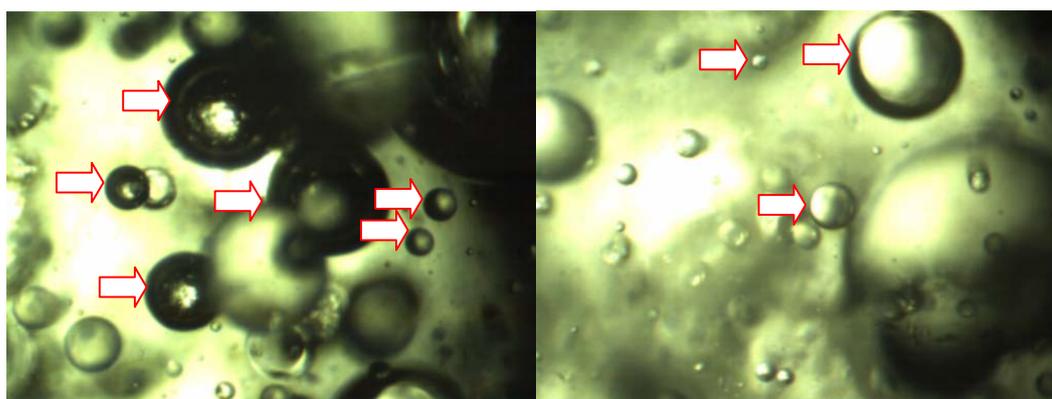


Figura 7.12. Imágenes tomadas con una magnificación de 8X, con igual tiempo de dispersión a) con BSA y b) sin BSA. Las flechas indican el número de objetos que pueden medirse en cada imagen.

Sin embargo, el número de objetos por imagen es menor al reportado cuando se emplea el sistema con luz estroboscópica. Esto no significa que el número de objetos enfocados en cada imagen sea menor, sino que es una consecuencia de la repetición de objetos que se obtuvo al procesar las imágenes como se describe en este trabajo. Sin embargo, al obtener un mayor número de imágenes en cada experimento, el total de objetos medidos es mayor al que se consigue con el sistema de luz estroboscópica.

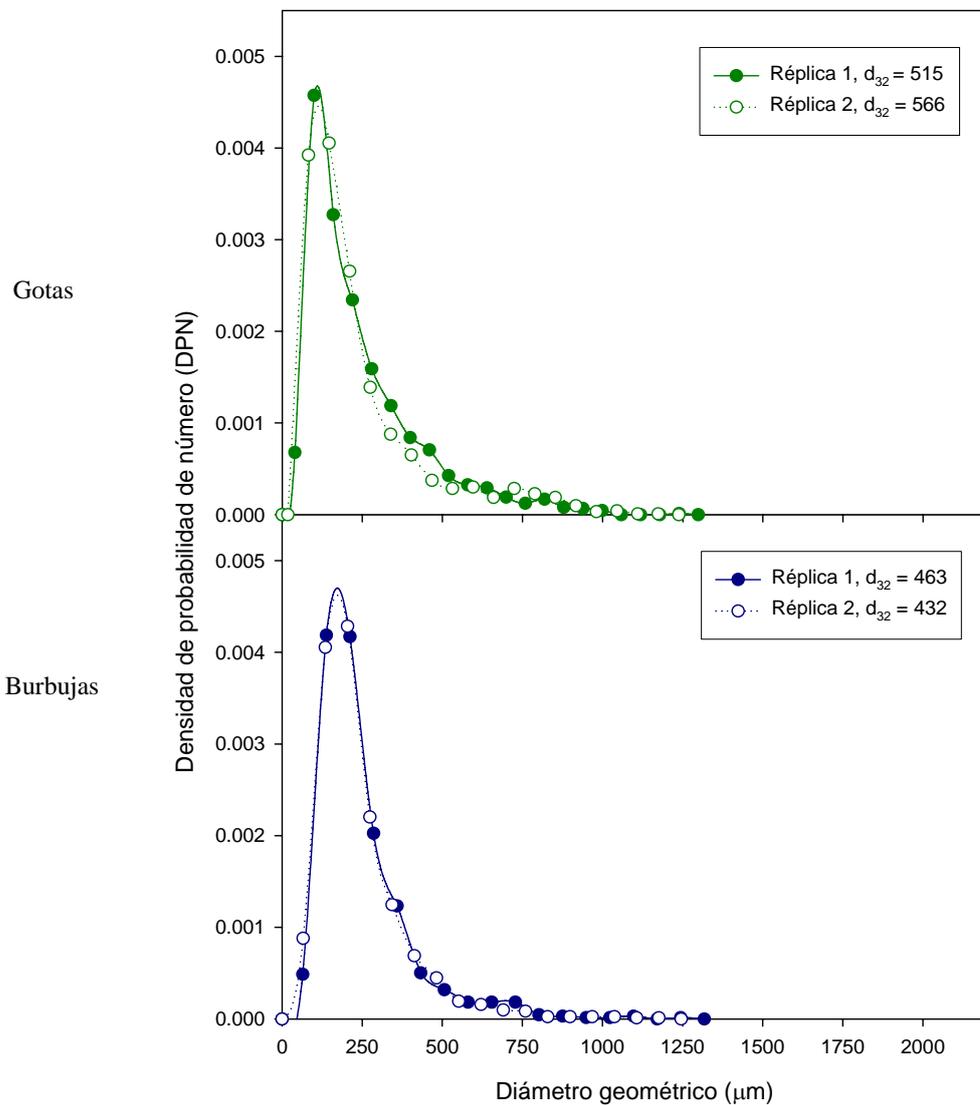


Figura 7.13. Distribución de tamaños de gotas y burbujas para una dispersión con turbina “Smith” a 0.50 kW/m^3 .

En la figura 7.13 se muestran los duplicados de una distribución de tamaños para gotas de aceite y burbujas de aire de una dispersión con turbina “Smith” a 0.50 kW/m^3 . El diámetro Sauter promedio para gotas de aceite fue de $540 \mu\text{m}$ y para las burbujas de aire fue de $447 \mu\text{m}$. Al observar la gráfica, no se aprecia una diferencia en las distribuciones de tamaños de gotas y burbujas. Los datos obtenidos con estos experimentos prueban que el sistema proporciona datos reproducibles en la determinación de tamaños de gotas y burbujas, así como en la estimación de los diámetros Sauter.

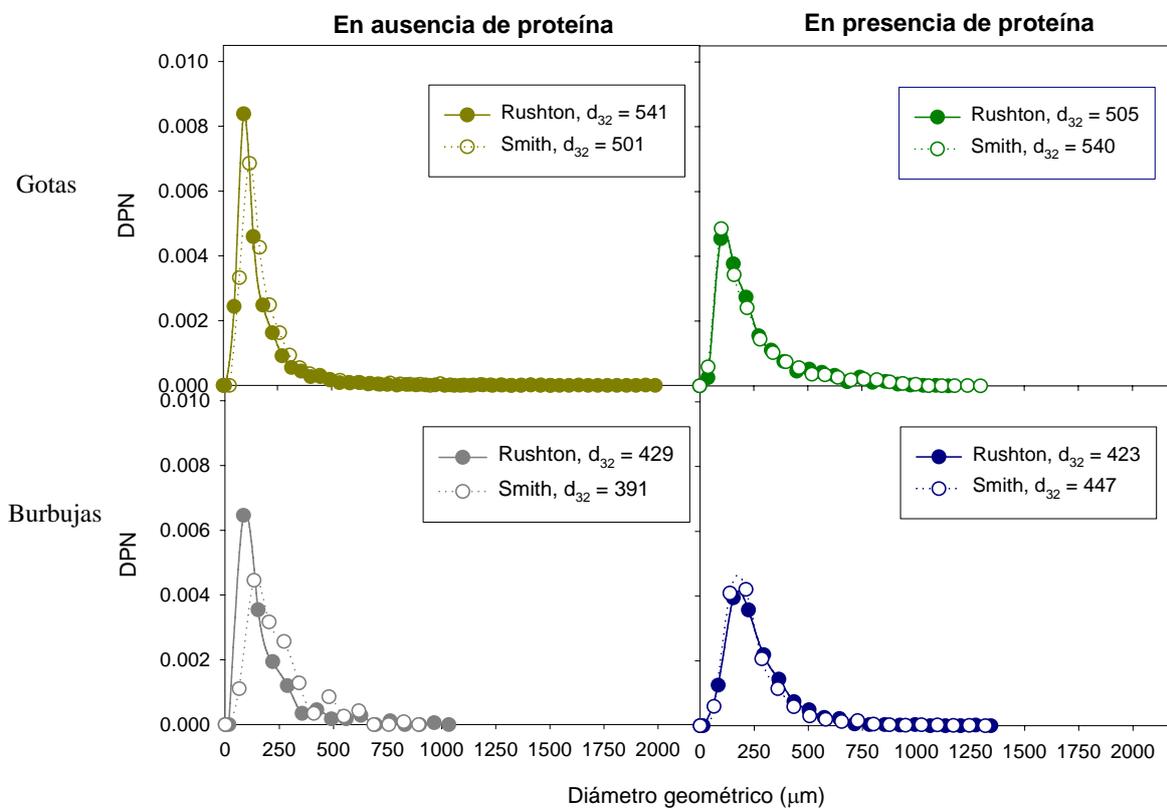


Figura 7.14. Efecto del tipo de impulsor en la distribución de diámetros de gotas de aceite y burbujas de aire para los experimentos a 0.50 kW/m^3 con y sin BSA.

En la figura 7.14 se muestran distribuciones de tamaño de gotas de aceite y burbujas de aire a 0.50 kW/m^3 comparando los dos impulsores. Con las magnificaciones utilizadas, se lograron medir diámetros entre 20 y $2000 \mu\text{m}$, mientras que en el caso del sistema descrito por Taboada *et al.* (2003) el diámetro menor medido era de $50 \mu\text{m}$ y al utilizar el sistema 3-D (que emplea dos cámaras bajo el principio de estereoscopia) (Brière *et al.* 2005

y Ruíz-Burguete, 2006), no se han utilizado magnificaciones superiores a 4 X en la adquisición de imágenes del sistema modelo debido a la pérdida en la calidad y nitidez de las imágenes, por lo que no es posible medir objetos menores a 150 μm con un error menor al 10 % (Corkidi *et al.*, 2007).

Al realizar la prueba de Tukey-Kramer se observa que hay diferencias significativas en la distribución de tamaños como consecuencia de las diferencias en el diseño de las paletas de ambos impulsores (que generan pequeños cambios en los patrones de flujo), sin embargo, los diámetros Sauter determinados son similares. Esto coincide con lo reportado en la bibliografía (Middleton y Smith, 2004; Laakkonen *et al.*, 2005a), donde se menciona que a la misma potencia volumétrica, el diámetro no varía con el tipo de impulsor. Aunque no se obtuvieron duplicados de estos experimentos debido al tiempo de procesamiento, los resultados mostrados en la figura 7.13 sugieren que la reproducibilidad es alta.

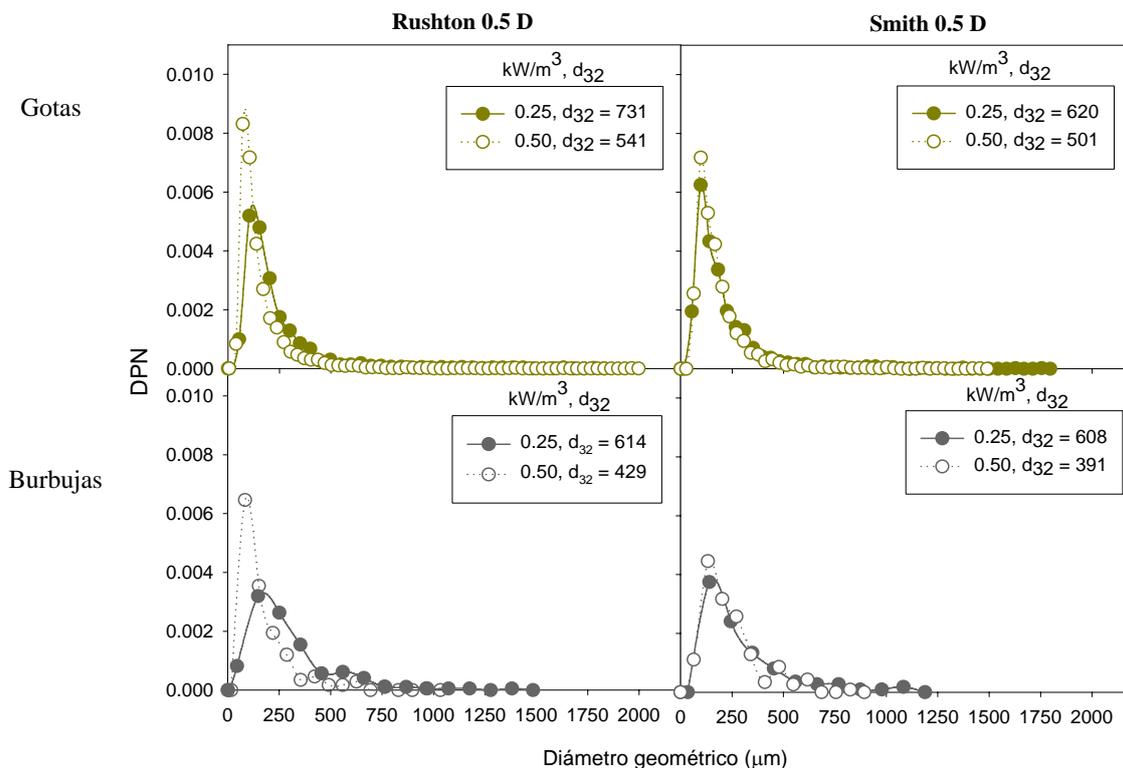


Figura 7.15. Efecto de la potencia (kW/m^3) en la distribución de diámetros de gotas de aceite y burbujas de aire para los experimentos sin BSA.

En la figura 7.15 se muestra el efecto de la potencia, para turbinas Rushton y “Smith” sin BSA. En el caso de la turbina Rushton se observan diferencias significativas en las distribuciones de tamaño de gotas y burbujas. En el caso de la turbina “Smith” no existe diferencia significativa en las distribuciones de tamaño de gotas y burbujas, sin embargo, se aprecia un efecto sobre el diámetro Sauter para ambos impulsores. La disminución en los diámetros Sauter puede deberse al efecto que tiene el incremento de potencia sobre los fenómenos de rompimiento y coalescencia del sistema (Leng y Calabrese, 2004).

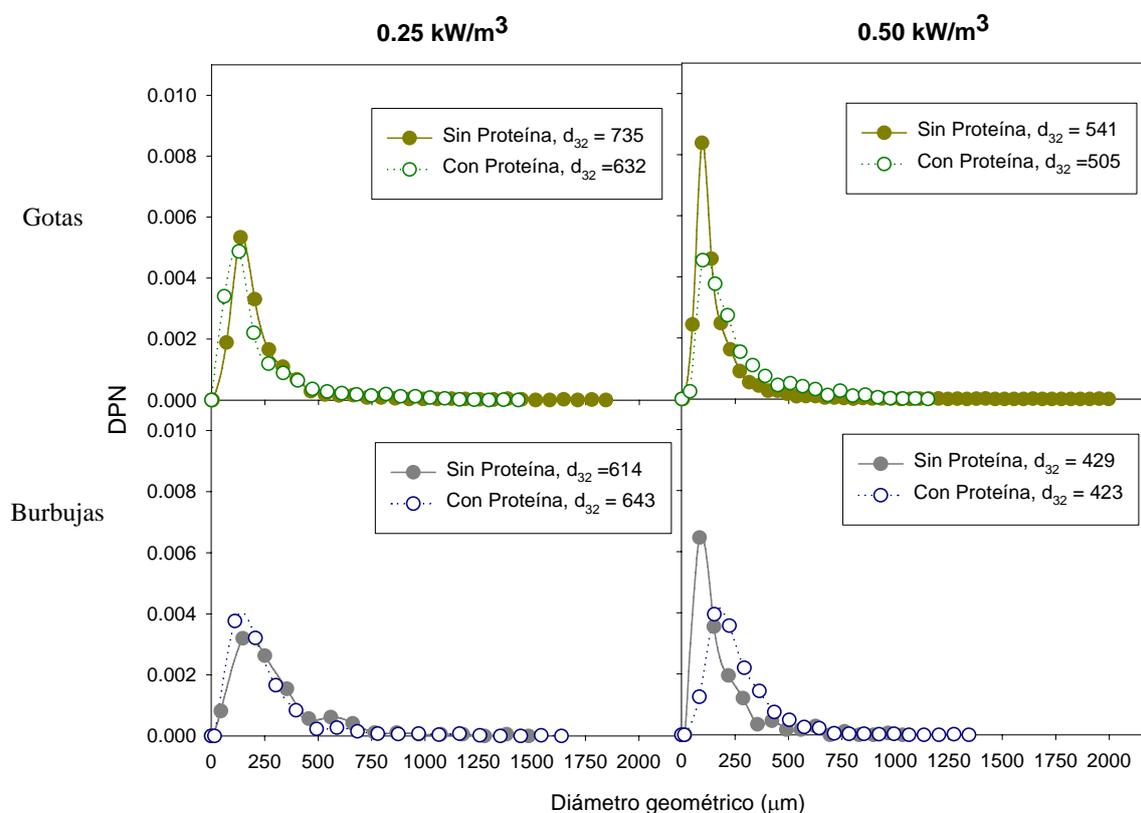


Figura 7.16. Efecto de la proteína en la distribución de diámetros de gotas de aceite y burbujas de aire para los experimentos con turbina Rushton.

En la figura 7.16 se muestra el efecto de la presencia de proteína sobre las distribuciones, utilizando la turbina Rushton. Aún cuando la concentración de proteína utilizada está por arriba de la CMC y por tanto, ya se ha alcanzado la menor tensión superficial (Leng y Calabrese, 2004), sólo se observa efecto del uso de proteína sobre el diámetro Sauter para las gotas de aceite a 0.25 kW/m^3 , sin embargo, al realizar la prueba de Tukey-Kramer no existe diferencia significativa entre las distribuciones de tamaños con y

sin proteína. A una potencia de 0.50 kW/m^3 , se observa efecto en la distribución, pero no en el diámetro Sauter. Los resultados anteriores no permiten establecer un efecto del uso de proteína sobre los diámetros de gotas y burbujas.

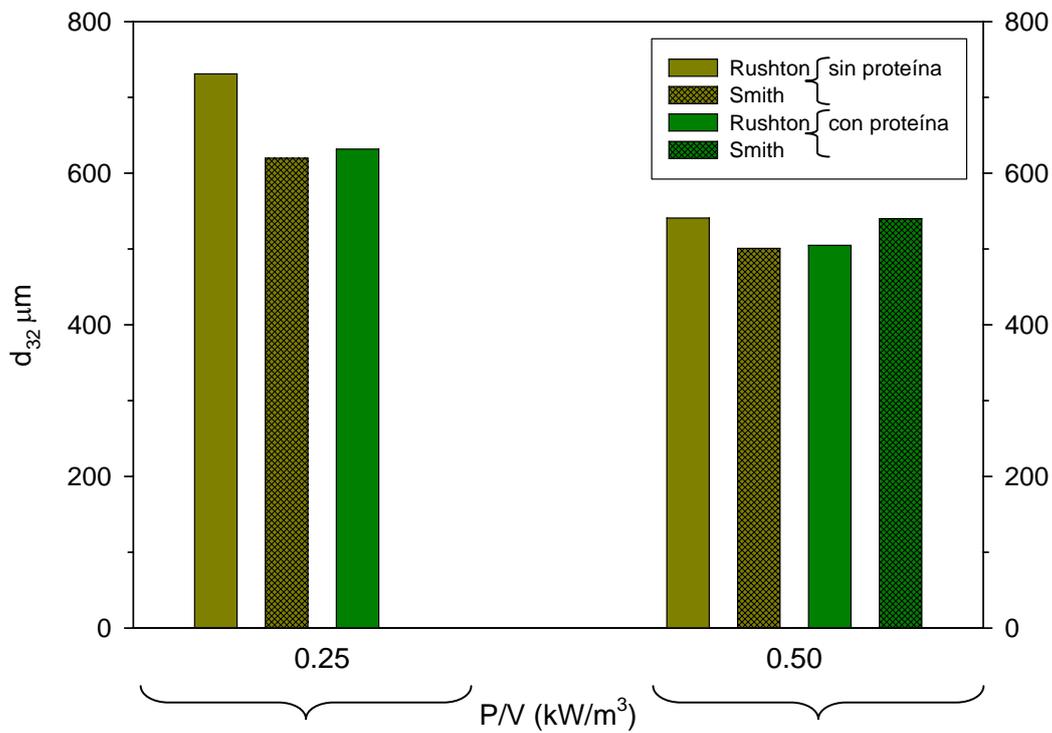


Figura 7.17. Diámetros medio de Sauter para gotas de aceite.

Los diámetros Sauter para gotas y burbujas bajo las distintas condiciones experimentales (figuras 7.17 y 7.18), permitieron observar el efecto de la proteína y la potencia sobre los diámetros de estos objetos. Se observó que, al incrementar la potencia, los diámetros Sauter decrecieron entre 19 y 34 % para las condiciones probadas. La ecuación de Calderbank (Laakkonen *et al.*, 2005a) predice una disminución del 24 % al doblar la potencia. Los datos que más se acercan a dicha predicción son los determinados para diámetros de gotas de aceite con turbina Rushton (turbina con la que fue determinada dicha ecuación), en los que hay una disminución del 20 y 26 % para los experimentos con y sin BSA, respectivamente. Sin embargo, aún cuando la ecuación de Calderbank está definida para determinar diámetros de burbujas, la disminución en dichos diámetros en los experimentos está entre 30 y 36 %. Aún cuando existen diversas ecuaciones para la

determinación teórica de los diámetros, las determinaciones no son totalmente aplicables a nuestro caso debido a que están restringidas para condiciones muy específicas y en general, cuando la fase dispersa está muy diluida (Zhou y Kresta, 1998). Lovick *et al.* (2005) reportan la medición de diámetros geométricos menores a 500 μm para un sistema líquido-líquido (fase dispersa al 10 %) en un tanque de mezclado de 138 mm de diámetro y velocidades de agitación entre 350 y 550 rpm. La determinación de los diámetros fue realizada utilizando una técnica de endoscopía de alta velocidad y una técnica de reflectancia óptica, los diámetros Sauter reportados son menores a los encontrados en éste trabajo (menores a 90 μm), lo que puede explicarse debido al menor volumen del tanque, mayor velocidad de agitación y a que el sistema evaluado por Lovick *et al.* (2005) es bifásico.

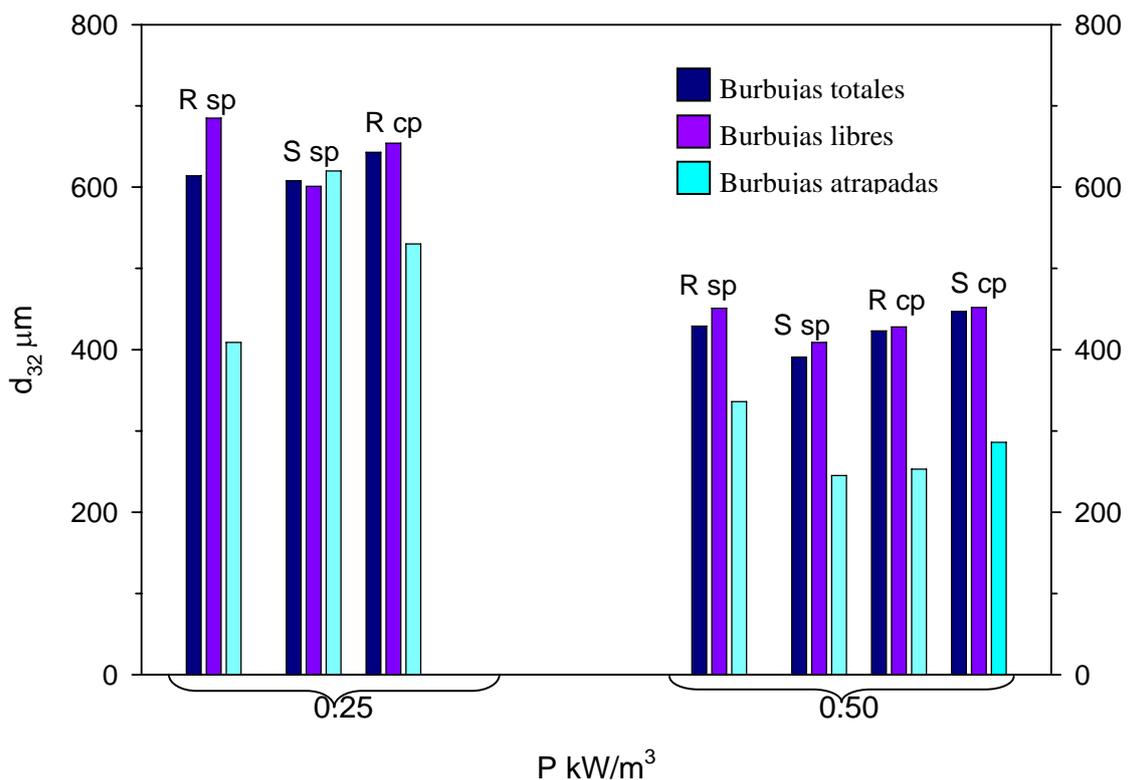


Figura 7.18. Diámetros medio de Sauter para burbujas de aire. R- Rushton, S- “Smith”, sp- sin proteína, cp- con proteína.

Laakkonen *et al.* (2005c) reportan diámetros Sauter de burbuja para un sistema gas-líquido (agua-aire) entre 2.3 y 3.2 mm en zonas cercanas a la pared para un tanque de mezclado con diámetro de 260 mm, agitado a 340 rpm y con velocidades de aireación de 0.072 vvm, evaluados con un sistema de análisis de imágenes.

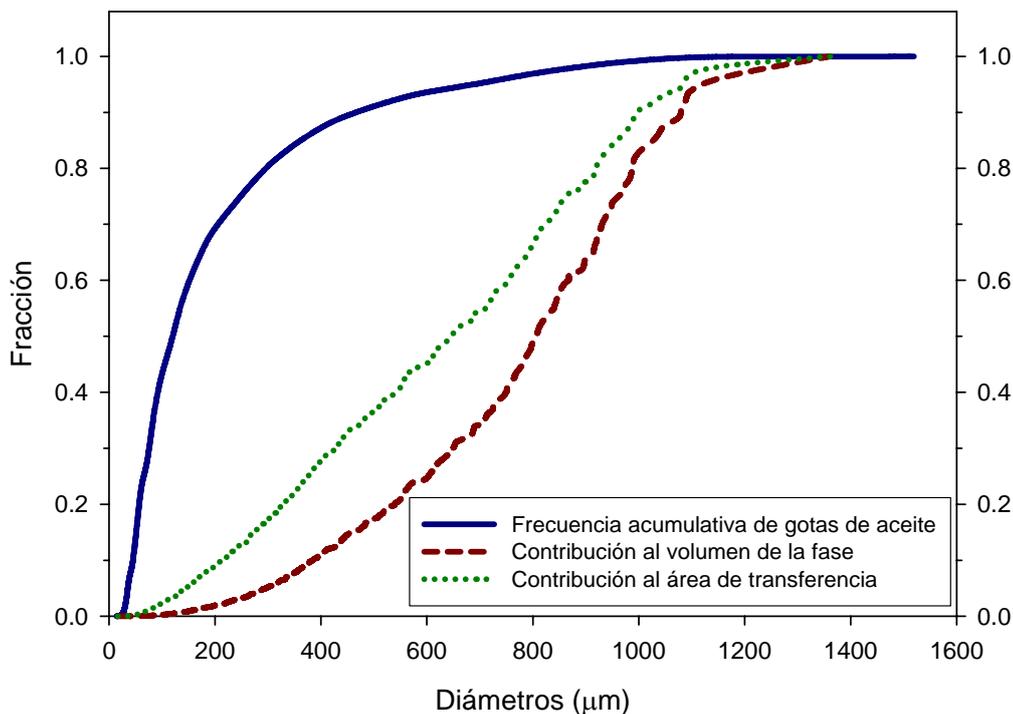


Figura 7.19. Influencia de los distintos tamaños de gotas de aceite en el volumen de la fase dispersa y área interfacial para experimentos con proteína y turbina Rushton a 0.25 kW/m^3 .

En la determinación de los diámetros de gotas y burbujas se observó que aunque la gran mayoría de las gotas y burbujas corresponde a diámetros menores a $500 \mu\text{m}$ para potencias de 0.25 kW/m^3 y de $300 \mu\text{m}$ para 0.50 kW/m^3 (figuras 7.13 a 7.16), los diámetros Sauter obtenidos están por arriba de estos valores. Lo anterior puede explicarse con la figura 7.19, en la que se presenta la distribución de volumen acumulado (línea azul continua) y la contribución al volumen de la fase dispersa de los distintos diámetros (línea roja discontinua), para gotas de aceite con proteína y con turbina Rushton a 0.25 kW/m^3 . Se observa que aunque el 90 % de los datos medidos corresponden a diámetros menores a $500 \mu\text{m}$, el volumen contenido en ellas, representa sólo el 20 % de la fase dispersa

(volumen de aceite). Debido a que el diámetro Sauter es una relación volumen/área (Pacek *et al.*, 1998), el 10 % de la población medida que representa los diámetros de mayor tamaño, impactará significativamente en el Sauter determinado, siendo para este ejemplo de 632 μm . En la gráfica también puede observarse que aunque para un mismo volumen de aceite, la contribución al área de transferencia (línea verde punteada) es mayor si el volumen se encuentra distribuido en gotas pequeñas, debido al poco volumen que se encuentra distribuido en diámetros menores a 500 μm , éstas sólo proporcionarán el 30 % del área de transferencia.

Tabla 7.6. Porcentaje de inclusiones de burbujas en gotas para los experimentos realizados.

Turbina	Potencia (kW/m ³)	% Burbujas incluidas con respecto a burbujas totales		% Volumen de gas incluido con respecto a volumen total de gas	
		Sin BSA	Con BSA	Sin BSA	Con BSA
Rushton	0.25	39	12	17	8
	0.50	22	6	15	2
Smith	0.25	33		36	
	0.50	39	12	7	2

Por último, en la tabla 7.6 se muestra el porcentaje de inclusiones de burbujas de aire en gotas de aceite para los distintos experimentos y el volumen de gas incluido con respecto al volumen total de gas. Se observa que hay una disminución en el porcentaje de burbujas incluidas con el aumento de la potencia volumétrica, lo cual puede deberse al impacto de la potencia sobre los eventos de coalescencia (Leng y Calabrese, 2004), lo que evita que las burbujas y gotas colisionen y por tanto, queden atrapadas. Aunque no se apreció un efecto de la proteína sobre los diámetros Sauter, si se observó una disminución del porcentaje de inclusiones (número de burbujas dentro con respecto a burbujas totales), lo que puede deberse a que al concentrarse las proteínas en la interfase agua-aire o aceite-agua, estabilizan la dispersión y evitan que las fases coalescan y por tanto el aire quede incluido en el aceite (MacRitchie, 2000). Aunque no se aprecia una correspondencia clara entre el número de burbujas incluidas y el volumen de gas incluido, en general se observa

la misma tendencia en ambos casos, mostrándose una disminución del volumen de gas incluido al incrementarse la potencia y al utilizarse proteína.

Con los resultados obtenidos de la caracterización, se puede afirmar que el sistema de alta velocidad posee gran versatilidad en la caracterización de dispersiones con respecto al sistema descrito por Taboada *et al.* (2003), al poder determinar de forma precisa el diámetro de los objetos, porcentaje de inclusiones e impacto en el volumen de cada uno de los elementos observados en dispersiones hasta de 0.50 kW/m^3 . Con este sistema se han podido explorar otras aplicaciones, las cuales se muestran en la sección 7.7.

7.7. Ventajas del sistema de alta velocidad

Durante la implementación del sistema de video de alta velocidad, se encontraron varias ventajas con respecto al sistema de luz estroboscópica. En la sección 7.5.3 se mencionó que la obtención de secuencias de imágenes dificulta el procesamiento de las imágenes para la caracterización de dispersiones multifásicas, debido a la necesidad del procesamiento manual. Sin embargo, la obtención de secuencias ha permitido explorar aplicaciones del sistema que no se habían observado con el sistema descrito por Taboada *et al.*, (2003) con el que no era posible obtener secuencias de imágenes y por tanto, no había posibilidad de observar un objeto en más de una imagen. Estas ventajas se describen en las secciones 7.7.1 a 7.7.5.

7.7.1. Distinción precisa entre gotas y burbujas.

La diferencia en el índice de refracción (n) del aire ($n = 1.000$) y el aceite ($n = 1.476$) permite que al adquirir las imágenes ambas estructuras puedan diferenciarse por el color, de manera que las burbujas de aire se observan oscuras con centros brillantes y las gotas de aceite se aprecian claras y con menor contraste (Galindo *et al.*, 2000). Sin embargo, durante la adquisición de imágenes, las condiciones de iluminación en un punto específico del reactor y la interferencia de objetos situados enfrente del plano focal pueden hacer confusa la identificación. La secuencia de imágenes obtenidas con el sistema de video

de alta velocidad permitió hacer una identificación más precisa de los objetos con respecto al sistema de luz estroboscópica (Taboada *et al.*, 2003), en el que un determinado objeto sólo aparece en una imagen.

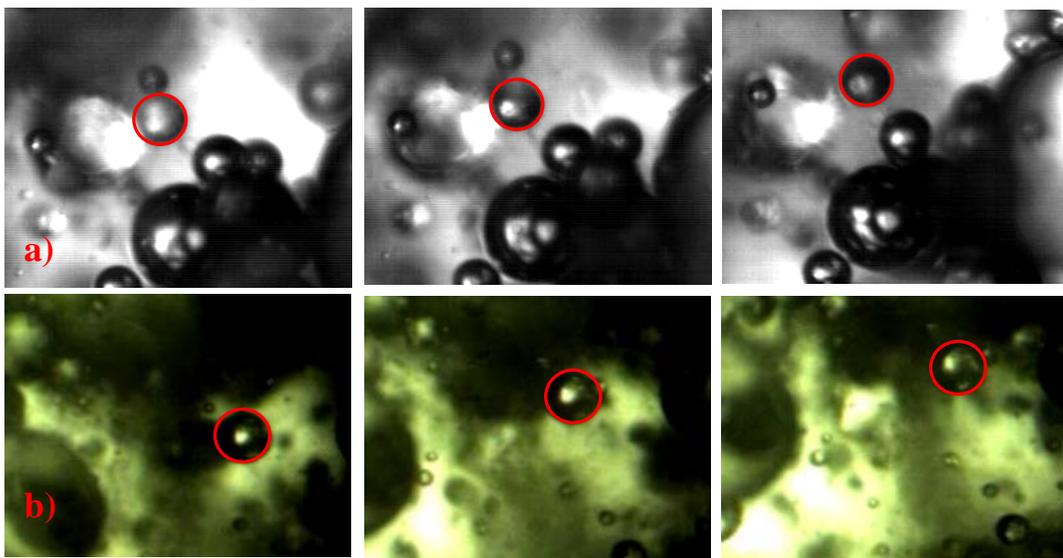


Figura 7.20. Uso de la secuencia en la identificación de objetos. a) Burbuja de aire, b) Gota de aceite.

En la figura 7.20 se pueden observar dos secuencias. En la secuencia a), debido a la presencia de un objeto enfrente del plano focal, el objeto marcado aparenta ser una gota de aceite (objeto claro y con bajo contraste) si se observa la primera imagen, sin embargo, al seguir la secuencia se encuentra que es una burbuja de aire (objeto oscuro con centro brillante). Por otro lado, en la secuencia b), las condiciones de iluminación hacen que el objeto marcado se observe como una burbuja de aire (objeto oscuro con centro brillante) en la primera imagen, cuando en realidad es una gota de aceite (objeto claro y con bajo contraste).

7.7.2. Determinación de inclusiones

El sistema de video de alta velocidad, permite identificar las burbujas de aire que se encuentran dentro de gotas de aceite observando la secuencia en el video. En la figura 7.21, se encierran en amarillo las gotas de aceite y en naranja las burbujas de aire. Si a lo largo de

una secuencia se observa que los objetos permanecen enfocados, se puede asumir que el movimiento en z es despreciable, debido a que la profundidad de campo (distancia en la que un objeto puede verse enfocado) que se genera con el sistema es mínima. Bajo esta consideración, se puede asumir que una burbuja se encuentra dentro de una gota de aceite, si al observar la secuencia en el video, la burbuja de aire conserva su posición dentro de la gota y, por tanto, ambas siguen la misma trayectoria de movimiento (figura 7.21 a). Por otro lado, al observar la figura del extremo izquierdo en la secuencia, 7.21 b), se observa que los objetos están sobrelapados y al avanzar en la secuencia, la diferencia en la velocidad y trayectoria hace que se separen. Si en esta secuencia sólo se contara con la imagen del extremo izquierdo podría pensarse que la burbuja está dentro de la gota.

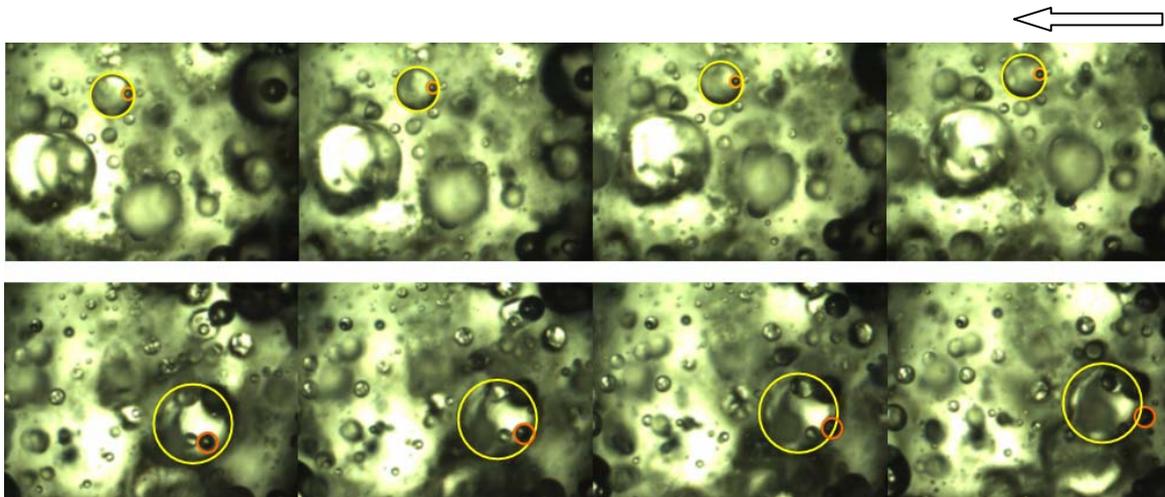


Figura 7.21. Determinación de inclusiones por medio de la secuencia. La flecha superior indica el inicio de la secuencia y la dirección del flujo.

El procedimiento descrito permite disminuir la subjetividad del observador, como sucedía en el sistema descrito por Taboada *et al.* (2003), en el que la diferenciación entre inclusiones y objetos sobrelapados dependía del criterio del observador. Sin embargo, el sistema es menos preciso que el descrito por Corkidi *et al.* (2007), el cual utiliza el principio de la estereoscopia para poder observar objetos en forma tridimensional (3-D) y determinar la posición de ambos objetos, ya que en el caso del sistema de video de alta velocidad, existe la probabilidad de que una burbuja que está fuera de la gota y se mueva a la misma velocidad y en el mismo plano (en vista de que ambas pueden ser impulsadas por

el flujo), pueda tomarse como una inclusión. No obstante, con ninguno de los dos sistemas anteriores (Taboada *et al.*, 2003 y Corkidi *et al.*, 2007) ha sido posible obtener imágenes a potencias superiores a 0.20 kW/m^3 , por lo que hasta el momento, la caracterización de las dispersiones bajo esas condiciones, en términos de diámetros de gotas y burbujas, así como del porcentaje de inclusiones depende del empleo de la sistema de video de alta velocidad y el uso de las secuencias como una herramienta de análisis.

7.7.3. Estimación de la velocidad de los objetos

Con la calibración del sistema en micrómetros y utilizando el software *Image Pro Plus 5.0* se puede conocer las coordenadas x y y , tomando como referencia el centro de un objeto. Si un objeto permanece enfocado durante un lapso de tiempo muy corto (imágenes consecutivas o muy cercanas) se puede despreciar el movimiento en z (debido a que la profundidad de campo es mínima) y calcular el desplazamiento. Al conocer la velocidad a la que fueron adquiridas las imágenes, se puede determinar el tiempo transcurrido entre la adquisición de una imagen y otra, y de esta forma estimar la velocidad de un objeto.

En la figura 7.22 se muestran dos imágenes de una secuencia, a partir de las coordenadas (x_1, y_1) y (x_2, y_2) se puede conocer el desplazamiento de un objeto y estimar su velocidad. El objeto presentado en la imagen, tiene una velocidad aproximada de 44.4 cm/s . En la tabla 7.7 se muestra la estimación de la velocidad para diez objetos diferentes a 0.25 y 0.50 kW/m^3 . Se puede observar que las velocidades van de 21 a 77 cm/s . Las velocidades encontradas representan entre 0.2 y 0.6 veces la velocidad en la punta del impulsor para las determinaciones a 0.25 kW/m^3 y entre 0.13 y 0.51 veces para las determinaciones a 0.50 kW/m^3 . Los valores encontrados están por debajo de los reportados por Escudié y Liné (2003) para zonas cercanas al impulsor y son semejantes o mayores a los reportados por Schäfer *et al.*, (1998) para zonas cercanas a la pared del tanque. Aunque el cálculo de la velocidad por el método aquí descrito es un proceso manual, hasta el momento los reportes de cálculo de velocidades de objetos en reactores se han limitado a estudios de dos fases y en general, de partículas sólidas, tal es el caso de los trabajos reportados por Escudié y Liné

(2003) y Schäfer *et al.*, (1998), que emplean partículas de vidrio y dióxido de titanio, respectivamente.

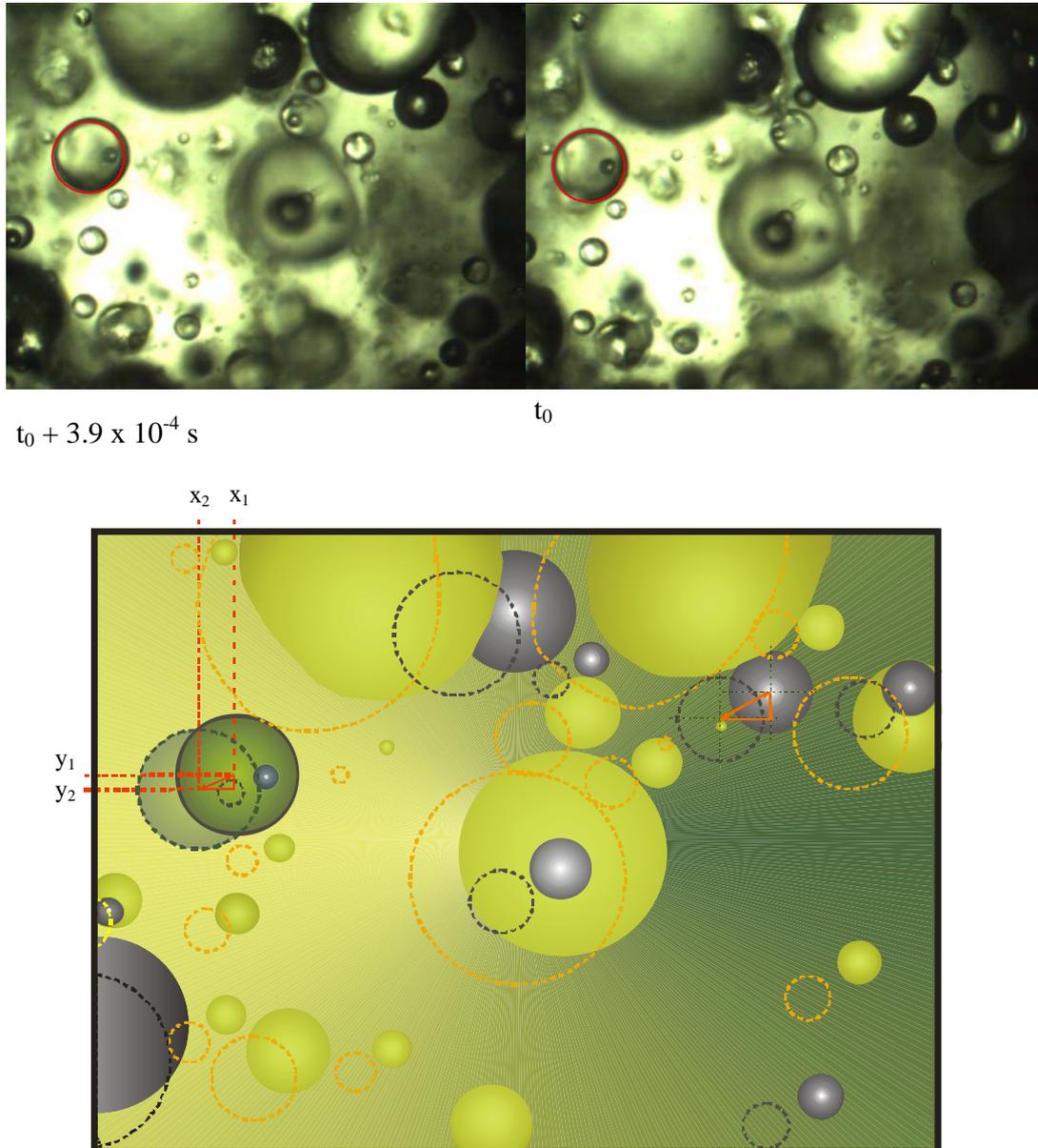


Figura 7.22. Estimación de la velocidad de una gota de aceite. El video fue tomado a 5130 imágenes por segundo y que las fotografías mostradas corresponden a las imágenes 18 y 20 de una secuencia, se estima que la velocidad a la que se mueve el objeto es de 44.4 cm/s.

Tabla 7.7. Velocidades estimadas para diferentes objetos de acuerdo a P/V.

No. de objeto	Velocidad (cm/s)	
	0.25 kW/m ³	0.50 kW/m ³
1	44.4	56.1
2	52.4	73.3
3	50.4	77.0
4	67.1	39.8
5	51.6	20.9
6	34.5	41.0
7	41.1	51.0
8	32.6	50.2
9	71.1	47.6
10	26.7	46.8

7.7.4. Observación de estructuras complejas

La alta velocidad de adquisición de imágenes, aumenta la probabilidad de observar los fenómenos de interacción entre las distintas fases del sistema, formación de gotas, de burbujas y de estructuras complejas, lo que es prácticamente imposible con los sistemas descritos por Taboada, *et al.* (2003) y Corkidi *et al.* (2007) y basado en iluminación estroboscópica usando una cámara convencional de baja velocidad con la que no es posible obtener secuencias.

En la figura 7.23 se muestran distintas estructuras. En las secuencia a) se pueden observar distintas gotas multifásicas (burbujas de aire en gotas de aceite); en las secuencias b) y c) se observan procesos de deformación que podría indicar la formación o separación de gotas, sobre todo al observar los extremos (zonas marcada con recuadros). En el caso de la secuencia d) se aprecia la posible formación de una estructura compleja, es decir, una inclusión de aire. Sin embargo, aunque la velocidad de adquisición de las imágenes permite observar este tipo de estructuras en forma de secuencia, el tamaño de las ventanas y el tiempo que tardan los objetos en atravesarlas (sección 7.5.2) no permite seguir dichos

eventos y observar el fenómeno completo. La observación de los eventos completos permitiría un mayor entendimiento de la interacción entre las fases y los mecanismos por los cuales se forman las distintas estructuras en la dispersión.

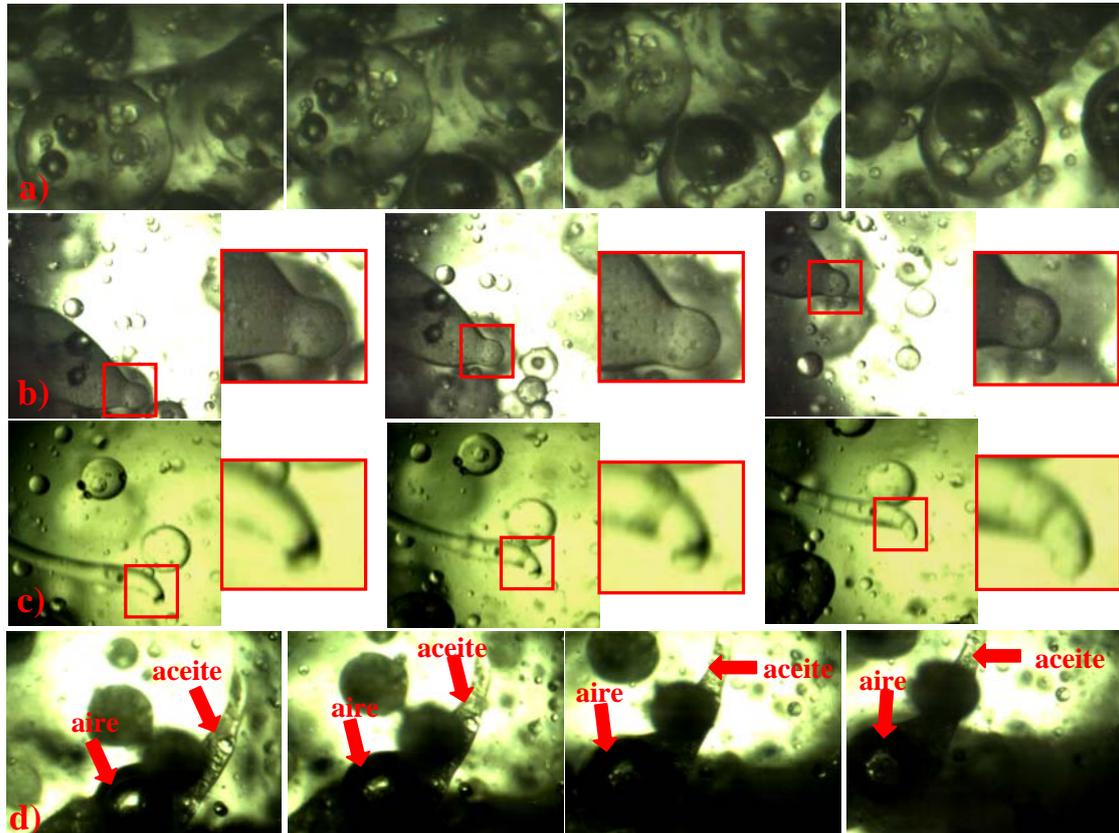


Figura 7.23. Observación de estructuras complejas y formación de gotas. a) Estructuras complejas, b) y c) formación de gotas y d) posible formación de estructuras complejas.

7.7.5. Evolución de la dispersión como función del tiempo de proceso

Aún cuando con el sistema descrito por Taboada, *et al.* (2003) se podían evaluar los cambios en la dispersión a través del tiempo y observar las variaciones en el diámetro Sauter de las estructuras, distribución de tamaños y en el porcentaje de inclusiones, debido al número de imágenes que pueden obtenerse en poco tiempo, el nuevo sistema permite hacer estos estudios con más detalle. La velocidad de adquisición permite obtener más de cinco mil imágenes en un segundo, lo que representa un gran número de objetos enfocados

que pueden ser medidos y cuantificados, dando validez estadística al poder medir el número de objetos necesarios para obtener un error menor al 10 % (Brito-Albavera, 2001). Lo anterior permite que el tiempo que se quiere evaluar sea preciso, mientras que con los sistemas basados en luz estroboscópica (Taboada *et al.*, 2003 y Corkidi *et al.*, 2007), el tiempo necesario para adquirir las imágenes que aseguraran el número de objetos necesarios para la validación estadística, podía tomar más de dos minutos y por lo tanto, resulta difícil evaluar cambios en cortos periodos de tiempo.

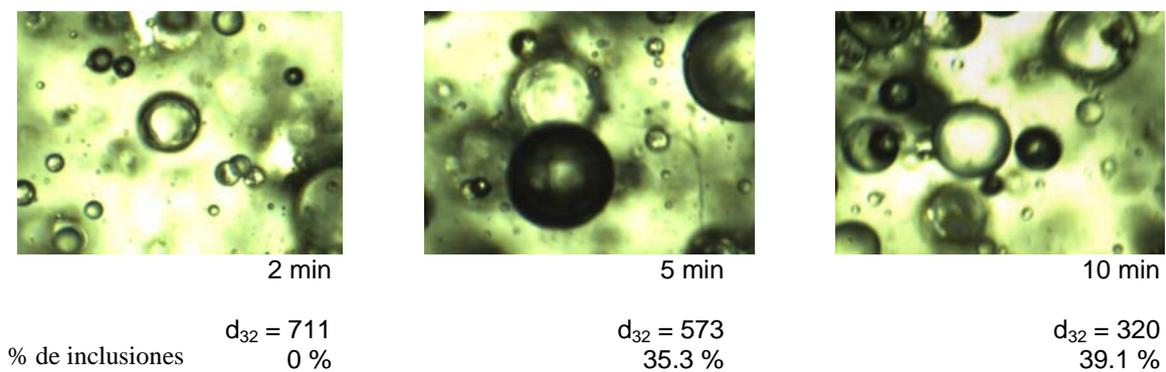


Figura 7.24. Evolución de la dispersión en términos del d_{32} de burbujas y el porcentaje de inclusiones.

En la figura 7.24 se muestra un ejemplo de la evolución de la dispersión en el tiempo, en un experimento utilizando turbina “Smith” a 0.50 kW/m^3 . Las imágenes mostradas fueron adquiridas a los tiempos que se indican después de iniciar la agitación. En el esquema se puede observar cómo el d_{32} de las burbujas de aire disminuye y el porcentaje de inclusiones aumenta conforme transcurre el tiempo. Este tipo de estudios permitirían evaluar el comportamiento transitorio de las dispersiones (Leng y Calabrese, 2004) y determinar el tiempo en el que se logra la dispersión completa de acuerdo a las variables del sistema.

8. Conclusiones

El uso de la cámara de video de alta velocidad acoplada a una fuente de luz de alta intensidad permitió obtener imágenes claras de la dispersión a potencias de hasta 0.5 kW/m³ y magnificaciones de hasta 11 X en un sistema trifásico de fermentación. Esto no fue posible con el sistema de luz estroboscópica, debido a que la velocidad a la que se mueven los objetos y la formación de estructuras complejas enturbian el sistema y la intensidad de la luz estroboscópica es insuficiente.

El sistema utilizado permite obtener secuencias con las que es posible caracterizar dispersiones multifásicas en forma precisa, evaluando los diámetros y el porcentaje de inclusiones con el seguimiento del video, sin embargo, esto implica un procesamiento manual de las imágenes, lo que aumenta el tiempo de análisis.

El sistema desarrollado permite obtener resultados reproducibles en la determinación de diámetros de gotas y burbujas.

Al cambiar el tipo de impulsor no se observó efecto sobre los diámetros Sauter manteniendo la potencia constante, sin embargo, si se apreció el efecto en la distribución y los diámetros Sauter con la variación de la potencia. Dichos resultados concuerdan con lo reportado en la bibliografía, lo que confiere confiabilidad al sistema desarrollado.

Al agregar proteína al sistema, no se observó un efecto sobre el diámetro Sauter de gotas y burbujas, aunque hay cambios en la distribución de tamaños. El uso de proteína mejora la calidad de las imágenes y permite un mayor número de objetos enfocados.

El porcentaje de inclusiones (burbujas dentro de gotas) disminuye con el uso de proteína y con el incremento de la potencia volumétrica, lo que puede atribuirse a la disminución en la coalescencia, y el incremento en el rompimiento.

La obtención de secuencias permite la distinción clara entre gotas y burbujas y ayuda a estimar el porcentaje de inclusiones de burbujas de aire en gotas de aceite. Las secuencias también permiten estimar la velocidad a la que se mueven los objetos en la dispersión, observar fenómenos de interacción y observar cambios en los tamaños de gotas y burbujas, así como en el porcentaje de inclusiones en periodos de tiempo cortos.

9. Perspectivas

Mejorar el proceso de segmentación creando algoritmos que permitan la semiatomatización del proceso y disminuyan el tiempo de procesamiento de las imágenes y la interferencia del usuario.

Caracterizar la dispersión trifásica para evaluar otras potencias comprendidas entre 0.25 y 0.50 kW/m³ a fin de obtener un mayor número de datos experimentales que permitan establecer correlaciones para predecir el diámetro Sauter en sistemas complejos a partir de la potencia suministrada.

Utilizar el sistema de video de alta velocidad para caracterizar una dispersión tetrafásica (agua-aire-aceite-biomasa) y observar el efecto de la biomasa sobre los diámetros de gotas y burbujas y el porcentaje de inclusiones de aire en aceite, a potencias superiores a 0.20 kW/m³.

Caracterizar la evolución de la dispersión a través del tiempo de agitación, estudiando la variación en los diámetros de gotas y burbujas y el porcentaje de burbujas incluidas en gotas de aceite para establecer el estado de equilibrio de acuerdo a las variables del proceso.

Evaluar velocidades y diámetros de gotas y burbujas en diferentes zonas del reactor en sistemas bifásicos (agua-aire y agua-aceite) y trifásicos (agua-aire-aceite) a fin de establecer la dependencia de la variación en los patrones de flujo con los diámetros determinados, utilizando endoscopía de alta velocidad.

10. Bibliografía

- Alban, F.B., Sajjadi, S. and Yianneskis, M. (2004). Dynamic tracking of fast liquid-liquid dispersion processes with a real-time in-situ optical technique. *Trans IChemE*. (A8):1054-1060.
- Amanullah, A., Buckland, B.C. and Nienow, A. W. (2004) Mixing in the fermentation and cell culture industries. En: *Handbook of Industrial Mixing*, Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A. and Kresta, S. M. (Eds), Wiley-Interscience, New-Jersey, pp. 1071-1154.
- Ascanio, G., Castro, B. and Galindo, E., (2004) Measurement of power consumption in stirred vessels- a review. *Chem. Eng. Res. Des.* 82(A9):1282-1290.
- Bailey, J. E. and Ollis, D.F. (1986). Transport Phenomena in Bioprocess Systems. Design and Analysis of Biological Reactors. *Biochemical Engineering Fundamentals*, pp. 457-657.
- Bakker, A., Smith, J. M. and Myers, K. J. (1994) How to disperse gases in liquids. *Chem. Eng.* 101(12):98-104.
- Brière J. B., Cordova, M. S., Galindo, E. and Corkidi, G. (2005) Micro-stereoscopic vision system for the determination of air bubbles and aqueous droplets content within oil drops in simulated processes of multiphase fermentations. En: *Fifth International Conference on 3-D Digital Imaging and Modeling, 2005 (3DIM 2005)*, 13-16 June 2005, pp. 499-505.
- Brito-Albavera, M. T. (2001) *Montaje de un arreglo experimental basado en análisis de imágenes para la evaluación de dispersiones en sistemas de fermentación*, Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Brown, D. A. R., Jones, P. W. and Middleton, J. C. (2004) Experimental methods, Part A. En: *Handbook of Industrial Mixing*, Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A. and Kresta, S. M. (Eds), Wiley-Interscience, New-Jersey, pp. 145-201.
- Bujalski, W., Nienow, A. W., Chatwin, S. y Cooke, M. (1987) The dependency on scale of power numbers of rushton disc turbines, *Chem. Eng. Sci.* 42:317-326.
- Cents, A. H. G., Brilman, D. W. F., Versteeg, G. F., Wijinstra, P. J. and Regtien, P. P. L. (2004) Measuring bubble, drop and particle sizes in multiphase systems with ultrasound, *AIChE Journal*. 50: 2750-2762.
- Chaouki, J., Larachi, F. and Dudukovic, M. P. (1997) Noninvasive tomographic and velocimetric monitoring of multiphase flows. *Ind. Eng. Chem. Res.* (36):4476-4503.

- Chin, T. C., Lancée, C. Borsboom, J., Mastik, F, Frijlink, M. E. and Jong, N. (2003) Brandaris 128: A digital 25 million frames per second camera with 128 highly sensitive frames. *Rev. Sci. Instrum.* (74): 5026-5034.
- Clarkson, J.R., Cui, Z.F. and Darton, R.C. (1999) Protein denaturation in foam II. *J. Colloid Interface Sci.* 215: 333-338.
- Córdova-Aguilar, M. S., Sánchez, A., Serrano-Carreón and 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.
- Córdova-Aguilar, M. S. (2003) *Estudio de las dispersiones de aceite, biomasa y aire en un sistema modelo de fermentación tetrafásica*, Tesis de Doctorado en Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Corkidi, G., Voinson, T., Tabada, B. I., Córdova, M. S. and Galindo, E. (2007) Accurate determination of embedded particles within dispersed elements in multiphase dispersions, using a 3D micro-stereoscopic vision system. *Chem. Eng. Sci.* 63:317-329.
- Einsele, A. (1978) Scaling up bioreactors. *Process Biochem.* 7:13-14.
- Escudié, R., and Liné, A. (2003) Experimental analysis of hydrodynamics in radially agitated tank, *AIChE J.* 9:585-603.
- Ferreira, E. C., Mota, M. and Pons, M. N. (2001) Image analysis and multiphase bioreactors. En: *Multiphase bioreactor design*, Cabral, J. M. S. y Mota, M. (Eds), Routledge, U.S.A. pp. 25-52.
- Francis, E., Calabrese, R. and Phongikaroon, S. (2006) Novel probe for the *in situ* measurement of particle size distributions. *Rev. Sci. Instrum.* 77, 123704:1-8.
- Galindo, E. and Nienow, A.W. (1993) Performance of the Scaba 6SRGT agitator in mixing of simulated xanthan gum broths. *Chem. Eng. Technol.* 16:102-108.
- Galindo, E. (1996) "Fermentadores: Operaciones de Transferencia", En: *Libro de Notas de V Curso Latinoamericano de Biotecnología*, Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile, pp. 157-207.
- Galindo, E., Pácek, A. W. and Nienow, A.W. (2000). Study of drop and bubble sizes in a simulated mycelial fermentation broth of up to four phases. *Biotechnol. Bioeng.* 69(2):213-221.
- Galindo, E., Larralde-Corona, C. P., Brito, T., Córdova-Aguilar, M. S., Taboada, B., Vega-Alvarado, L. and Corkidi, G. (2005) Development of advanced image analysis techniques for the *in situ* characterization of multiphase dispersions occurring in bioreactors. *J. Biotechnol.* 116:261-270.

- Hemrajani, R. R. and Tatterson, G. B. (2004) Mechanically Stirred Vessels. En: *Handbook of Industrial Mixing*, Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A. y Kresta, S. M. (Eds), Wiley-Interscience, New-Jersey, pp. 345-390.
- Junker, B. (2006) Measurement of bubble and pellet size distributions: past and current image analysis technology, *Bioproc. Biosyst. Eng.* 29:185-206.
- 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.
- Laakkonen, M., Honkanen, M., Saarenrinne, P. and Aittamaa, J. (2005a) Local bubble size distributions, gas-liquid interfacial areas and gas holdups in a stirred vessel with particle image velocimetry. *Chem. Eng. J.* 109:37-47.
- Laakkonen, M., Moilanen, P. and Aittamaa, J. (2005b) Local bubble size distributions in agitated vessels. *Chem. Eng. J.* 106:133-143.
- Laakkonen, M., Moilanen, P., Miettinen, T., Saari, K., Honkanen, M., Saarenrinne, P. and Aittamaa, J. (2005c). Local bubble size distributions in agitated vessel. Comparison of three experimental techniques. *Trans IChem*, (A1): 50-58.
- Large, K. P., Ison, A. P. and Williams, D. J. (1998) The effect of agitation rate on lipid utilization and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biotechnol.* 116:261-270.
- Leng, D. E. and Calabrese, R. V. (2004). Immiscible Liquid-Liquid Systems, In: *Handbook of Industrial Mixing*, Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A. and Kresta, S. M. (Eds), Wiley-Interscience, New-Jersey, pp. 639-743.
- Lovick, J., Mouza, A. A., Paras, S. V., Lye, G. J. and Angeli, P. (2005) Drop size distribution in highly concentrated liquid-liquid dispersions using a light back scattering method. *J. Chem. Technol. Biot.* 80:545-552.
- Lucatero, S., Larralde-Corona, C. P., Corkidi, G. and Galindo, E. (2003) Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology. *Biotechnol. Prog.* 19:285-292.
- Maab, S., Wollny, S., Rojahn, J., Paschedag, A. R. and Kraume, M. (2007) Comparison of measurement techniques for drop sizes in highly dispersed and fastly coalescing systems, In: *International Congress on Particle Technology (PARTEC)*.
- MacRitchie, F. (2000) Proteins at liquid interfaces, En: *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, Baszkin, A. y Norde, W. Eds., Marcel Dekker, New York, pp. 137-153.

- Middleton, J. C. (1985) Gas-liquid dispersion and mixing, En: *Mixing in the Process Industries*, Harnby, N., Edwards, M. F. y Nienow, A. W. Eds., Butterworths, London, pp. 322-355.
- Middleton, J. C. and Smith, J. M. (2004) Gas-Liquid Mixing in Turbulent Systems. En: *Handbook of Industrial Mixing*, Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A. and Kresta, S. M. (Eds), Wiley-Interscience, New-Jersey, pp. 585-638.
- Myers, K. J., Reeder, M., Bakker, A. and Ridgen, M. (1996) Agitating for success. *Chem. Eng.* 620:39-42.
- Nienow, A. W., Edwards, M.F. and Harnby, N. (1985) Introduction to mixing problems, In: *Mixing in the Process Industries*, Harnby, N., Edwards, M. I., Nienow, A.W. (Eds), Butterworths, London, pp. 1-22.
- Nienow, A. W. (1990) Gas dispersion performance in fermenter operation. *Chem. Eng. Prog.* 86 (2):61-71.
- 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.
- Norde, W (2003) Emulsions and Foams, In: *Colloids and Interfaces in Life Sciences*, New York, pp. 365-382.
- 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.
- Pezenec, S., Gauthier, F., Alonso, C., Graner, F., Croguennec, T., Brulé, G. and Renault, A. (2000). The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air-water interface. *Food Hyd.* 14: 463-472.
- Pulido-Mayoral, N. O. (2003) *Dispersión de fases y transferencia de oxígeno en un sistema modelo de fermentación multifásica conteniendo proteína soluble*, Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Pulido-Mayoral, N. and Galindo, E. (2004) Phases dispersion and oxygen transfer in a simulated fermentation broth containing castor oil and proteins. *Biotechnol. Prog.* (20):1608-1613.
- Ramkrishna, D., Sathyagal, A. and Narsimhan, G. (1995) Analysis of dispersed –phase systems: fresh perspective. *AIChE J.* 41(1):35-44.
- Ratledge, C. (1977) Fermentation substrates. *Ann. Rep. Ferment. Proc.* 1:49-71.

- 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., Hassan, M., Gorkidi, G., Flores, C., Galindo, E. and Serrano-Carreón, L. (2005) 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnol. Bioeng.* 91(1):54-61.
- Ruiz-Burguete, I. I. (2006). *Visualización estereoscópica de la dispersión de gotas de aceite y burbujas de aire en un sistema de fermentación tetrafásica*, Memoria de Residencia Profesional, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, México.
- Schäfer, M., Yianneskis, M., Wätcher, P., y Durst, F. (1998) Trailing vortices around a 45° pitched-blade impeller. *Chem. Eng. Sci.* 44(6):1233-1246.
- Saito, F., Nienow, A. W., Chatwin, S. and Moore, I. P. T. (1992) Power, gas dispersion and homogenisation characteristics of Scaba SRGT and Rushton turbine impellers. *Chem. Eng. Jpn.* 25:281-287.
- Serrano-Carreón, L., Flores, C. and Galindo, E. (1997) γ -Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in a stirred bioreactor. *Biotechnol. Prog.* 13:205-208.
- Storiadis, A. A., Thorpe, R. B. and Smith, J. M. (2005) Bubble size and mass transfer characteristics of sparged downwards two-phase flow. *Chem. Eng. Sci.* (60): 5917-5929.
- Tayali, N. E. and Bates, C. J. (1990) Particle sizing techniques in multiphase flows: A review. *Flow Meas. Instrum.* 1:77-105.
- Taboada, B., Larralde, P., Brito-Alavera, T., Vega-Alvarado, L., Díaz, R., Galindo, E. and Corkidi, G. (2003) Images acquisition of multiphase dispersions in fermentation processes. *J. App. Res. Technol.* 1(1):78-84.
- Taboada, B., Vega-Alvarado, L., Córdova-Aguilar, M. S., Galindo, E. and Corkidi, G. (2006) Semi-automatic image analysis methodology for the segmentation of bubbles and drops in complex dispersions occurring in bioreactors. *Experiments in Fluids.* 41: 383-392.
- Tattersson, G. B. (1991) Gas dispersion in agitated tanks. In: *Fluid mixing and gas dispersion in agitated tanks*, Mc. Graw-Hill. U.S.A., pp. 417-529.
- Van't Riet, K., Boom, J. M. and Smith, J. M. (1976) Power consumption, impeller coalescence and recirculation in aerated vessels. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 54:124-131.
- Zhang, Y., Ni, X., and Mustafa, I. (1996) A study of oil-water dispersion in a pulsed baffles reactor. *J. Chen. Technol. Biot.* 66: 305-311.

Zhou, G. and Kresta, S. M. (1998) 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.