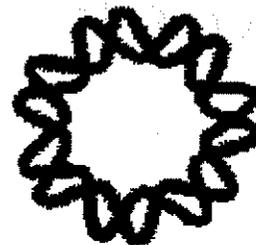


12 00551



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Dispersión de aceite y aire en presencia de micelio  
disperso y pellets de *Trichoderma harzianum***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA:

**I.B.Q. SAVIDRA LUCATERO CHÁVEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MAYO DEL 2002



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**

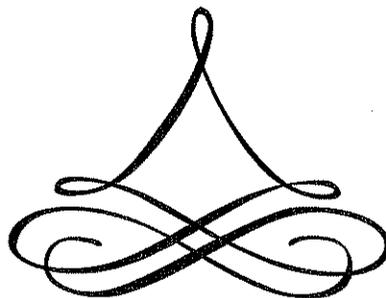
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

*A Dios, mi compañía diaria*

*A mis Padres y hermanos, siempre están en mi mente y en mi corazón*

*A Angélica Adayisa y a José Manuel, los quiero infinitamente*



Este trabajo se realizó en el Laboratorio del Dr. Enrique Galindo en el Departamento de Bioingeniería del Instituto de Biotecnología de la UNAM en la ciudad de Cuernavaca Morelos, bajo la asesoría de la Dra. Patricia Larralde y del Dr. Enrique Galindo.

Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de la DGAPA-UNAM (proyectos IN-119598 y IN-105500).

## RECONOCIMIENTOS

Mi especial agradecimiento a la Dra. Patricia Larralde y al Dr. Enrique Galindo por su asesoría, enseñanza y por todo el apoyo otorgado. Al Dr. Enrique Galindo por aceptarme como estudiante en su laboratorio.

A los integrantes del comité tutorial, el Dr. Gabriel Corkidi Blanco y la Dra. Gloria Soberón Chávez y al M.C. Martín Patiño Vera por sus provechosas evaluaciones del proyecto.

A los académicos que integraron el jurado revisor de la tesis, los Dres. Rafael Vázquez Duhalt, Jaime Vernon Carter, Alfredo Martínez Jiménez y Patricia Larralde Corona, agradezco los comentarios, observaciones y sugerencias.

Al grupo del Dr. Enrique Galindo por su colaboración en la realización de mi proyecto de Maestría.

## Índice general

<b>Índice de figuras</b>	
<b>Índice de tablas</b>	
<b>Nomenclatura</b>	
<b>Resumen</b>	1
<b>1. Introducción</b>	2
<b>2. Antecedentes</b>	5
2.1. Características de fermentaciones con hongos filamentosos	5
2.1.1. Importancia de los hongos filamentosos en la biotecnología industrial	5
2.1.2. Morfología de la biomasa fungal	6
2.1.2.1. Variables que afectan la morfología de hongos filamentosos	8
2.1.2.1.1. Agregación	8
2.1.2.1.2. Oxígeno disuelto	9
2.1.2.1.3. Concentración del inóculo	10
2.1.2.1.4. Composición del medio de cultivo	10
2.1.2.1.5. pH	11
2.1.2.1.6. Fuerzas hidrodinámicas	11
2.1.3. Análisis de imágenes de hongos filamentosos	12
2.1.3.1. Procesamiento de la imagen	13
2.1.3.2. Parámetros para la caracterización morfológica del micelio	13
2.1.4. Reología de caldos de fermentación miceliares	15
2.2. Sistemas multifásicos	18
2.2.1. Fermentaciones multifásicas	18
2.2.2. Dispersión del aire	19
2.2.3. Dispersión de fluidos inmiscibles	21
2.2.4. Análisis de imágenes para caracterizar dispersiones	22
2.2.5. Efectos de la presencia de partículas sólidas en sistemas multifásicos	24
2.2.5.1. Efecto de las partículas sólidas sobre la turbulencia	24
2.2.5.2. Efecto de la presencia de partículas sólidas sobre el área interfacial de fases dispersas	26
2.2.5.3. Efecto de los sólidos sobre el <i>hold up</i> y la dispersión de la fase gaseosa	27
<b>3. Objetivos</b>	30
3.1. Objetivo general	30
3.2. Objetivos específicos	30
<b>4. Materiales y métodos</b>	31
4.1. Materiales	31
4.1.1. Microorganismo	31
4.1.2. Obtención y conteo de esporas	31
4.1.3. Medios de cultivo	31
4.2. Fermentaciones	32
4.2.1. Producción del hongo en forma de <i>pellets</i>	32
4.2.2. Producción del hongo como micelio disperso	32

4.3. Equipos y métodos analíticos	33
4.3.1. Evaluación de la concentración de biomasa	33
4.3.2. Caracterización reológica	34
4.3.3. Determinación de la tensión superficial	34
4.3.4. Determinación de la potencia suministrada	34
4.3.5. Caracterización morfológica	34
4.3.5.1. Sistema de análisis de imágenes	34
4.3.5.2. Preparación de la muestra	35
4.3.5.3. Procesamiento digital de las imágenes	36
4.3.6. Descripción del equipo agitación-aireación	37
4.3.6.1. Diseño de los experimentos	37
4.3.6.2. Descripción de un experimento típico	39
4.3.6.3. Lavado del equipo	39
4.3.6.4. Montaje del equipo	40
4.3.7. Descripción del sistema de captura y análisis de imágenes	41
4.3.8. Interpretación de resultados	45
4.3.9. Reproducibilidad de los experimentos típicos de dispersión	46
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>47</b>
5.1. Morfología del micelio	47
5.1.1. Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de micelio disperso	47
5.1.2. Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de <i>pellets</i>	50
5.1.3. Reología de las suspensiones de biomasa	56
5.1.4. Conclusiones respecto a la producción de biomasa	58
5.2. Dispersión del aceite de ricino	59
5.2.1. Influencia de la morfología y de la concentración de micelio sobre la dispersión del aceite de ricino (sistema no aireado)	59
5.2.2. Influencia de la morfología y de la concentración de micelio sobre la dispersión del aceite de ricino (sistema aireado)	67
5.2.3. Conclusiones respecto a la dispersión de aceite como función de la morfología de la biomasa	78
5.3. Dispersión de aire	78
5.3.1. Efecto de la presencia de aire en el tamaño de las gotas de aceite	78
5.3.2. Localización de las burbujas de aire	81
5.3.3. Efecto de la morfología y la concentración del micelio sobre el tamaño de las burbujas libres	86
5.3.4. Efecto de la morfología y la concentración del micelio sobre el tamaño de las burbujas dentro de gotas	88
5.3.5. Conclusiones respecto a la dispersión y localización de burbujas	93
<b>6. Conclusiones globales</b>	<b>94</b>
<b>7. Sugerencias y Perspectivas</b>	<b>96</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>97</b>
Apéndice A. Definición de parámetros usados en la caracterización morfológica de hongos filamentosos	104
Apéndice B. Procesamiento digital de las imágenes en la caracterización morfológica del micelio	105
Apéndice C. Calibraciones para las magnificaciones del estereomicroscopio SZ1145	107

## Índice de figuras

### Figura

2.1.	Tipos de micelio disperso en hongos filamentosos	7
2.2.	Tipos de <i>pellets</i> en hongos filamentosos	8
2.3.	Digitalización y procesamiento de las imágenes para la determinación de parámetros morfológicos	14
2.4.	Representación del perímetro convexo de un agregado	15
4.1.	Configuración de biorreactor para la producción de <i>pellets</i>	33
4.2.	Sistema de análisis de imágenes para la caracterización morfológica del micelio	35
4.3.	Determinación del diámetro promedio y circularidad del micelio	36
4.4.	Características geométricas del tanque de mezclado utilizado en los experimentos	37
4.5.	Determinación de la tensión superficial durante los experimentos	39
4.6.	Metodología para el enjuagado de micelio disperso y para el enjuagado y tamizado de <i>pellets</i>	40
4.7.	Estrategia experimental general para los experimentos de dispersión de aceite de ricino y aire	42
4.8.	Sistema de análisis de imágenes para la determinación del tamaño de gotas y burbujas	43
4.9.	Plano de enfoque en la captura de imágenes	44
4.10.	Dimensiones del plano de enfoque en la captura de imágenes	45
4.11.	Reproducibilidad en las distribuciones de tamaños de las gotas de aceite	46
5.1.	Efecto de la adición de glicerol y PEG al medio de cultivo sobre la morfología del micelio disperso (cultivos en matraces).	49
5.2.	Distribuciones de diámetro del micelio disperso producido en matraz y en fermentador	50
5.3.	Morfología típica de agregados laxos producidos en fermentador	50
5.4.	Efecto de la concentración de esporas en el inóculo sobre el diámetro de los <i>pellets</i> producidos en matraces	51
5.5.	Morfología en <i>pellets</i> producida en matraces	52
5.6.	Formación de <i>pellets</i> por agregación de esporas	53
5.7.	Distribuciones de diámetro promedio para micelio disperso y <i>pellets</i>	54
5.8.	Distribuciones de circularidad para micelio disperso y <i>pellets</i>	54
5.9.	Reproducibilidad en las distribuciones de diámetro promedio de los <i>pellets</i> producidos en dos lotes diferentes	55
5.10.	Reproducibilidad en las distribuciones de circularidad de los <i>pellets</i> producidos en dos lotes diferentes	55

5.11.	Reproducibilidad de las distribuciones de diámetro promedio de micelio disperso producido en dos lotes diferentes	56
5.12.	Índice de consistencia (K) de la ley de la potencia como función de la concentración y de la morfología de micelio disperso	57
5.13.	Índice de flujo (n) como función de la concentración y la morfología del micelio	58
5.14.	Viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) del proceso como función de la concentración y la morfología del micelio	57
5.15.	Imágenes de la dispersión del aceite de ricino en el sistema de tres fases con <i>pellets</i>	60
5.16.	Imágenes de la dispersión del aceite de ricino en el sistema de tres fases con micelio disperso	61
5.17.	Efecto de la concentración y la morfología miceliar sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite en el sistema de tres fases (sistema no aireado)	62
5.18.	Efecto de la concentración de micelio disperso sobre el suministro de potencia en los sistemas no aireado y aireado	63
5.19.	Efecto de la concentración de biomasa ( <i>pellets</i> ) sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema no aireado)	64
5.20.	Efecto de la concentración de biomasa (micelio disperso) sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema no aireado)	65
5.21.	Efecto de la morfología de la biomasa sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema no aireado)	66
5.22.	Imágenes de la dispersión del aceite y del aire en el sistema de cuatro fases aireado con <i>pellets</i>	68
5.23.	Imágenes de la dispersión del aceite y del aire en el sistema de cuatro fases aireado con micelio disperso	69
5.24.	Efecto de la concentración y la morfología miceliar sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite en el sistema aireado	70
5.25.	Adhesión del micelio disperso a las burbujas de aire	71
5.26.	Efecto de la concentración de biomasa ( <i>pellets</i> ) sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema aireado)	72
5.27.	Efecto de la concentración de biomasa (micelio disperso) sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema aireado)	72
5.28.	Patrones de flujo en un tanque agitado con micelio disperso	73
5.29.	Acanalamiento de las burbujas grandes en el sistema aireado con micelio disperso	75
5.30.	Variación en el volumen de las gotas por imagen con la concentración y la morfología miceliar	76
5.31.	Efecto de la morfología miceliar sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema aireado)	77

5.32.	Efecto de la aireación sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite (sistemas con <i>pellets</i> )	79
5.33.	Efecto de la aireación sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite (sistemas con micelio disperso)	79
5.34.	Imágenes de burbujas de aire dentro de gotas de aceite	80
5.35.	Diferencias en la apariencia de la superficie de las gotas de aceite entre los sistemas no aireado y aireado	82
5.36.	Localización de las burbujas de aire como burbujas dentro de gotas de aceite y burbujas libres	83
5.37.	Porcentaje (en volumen) de burbujas dentro de gotas como función de la concentración y la morfología del micelio	83
5.38.	Imágenes con bajo número de burbujas libres en altas concentraciones de micelio disperso	84
5.39.	Disminución en el número de burbujas libres por imagen al incrementar la concentración de micelio disperso	85
5.40.	Volumen por imagen de las burbujas dentro de gotas y de las burbujas totales en el sistema aireado con micelio disperso	85
5.41.	Volumen por imagen de las burbujas dentro de gotas y de las burbujas totales en el sistema aireado con <i>pellets</i>	86
5.42.	Efecto de la concentración de biomasa y de la morfología miceliar sobre el diámetro Sauter de las burbujas libres (sistema aireado)	87
5.43.	Volumen por imagen normalizado de gotas y burbujas libres en el sistema aireado con micelio disperso	88
5.44.	Volumen por imagen de gotas y burbujas libres en el sistema aireado con <i>pellets</i>	89
5.45.	Diámetro Sauter de las burbujas dentro de gotas y de burbujas libres en el sistema con <i>pellets</i>	89
5.46.	Diámetro Sauter de las burbujas dentro de gotas y de burbujas libres en el sistema con micelio disperso	90
5.47.	Efecto de la concentración y de la morfología miceliar sobre el diámetro Sauter de las burbujas dentro de gotas	91
5.48.	Efecto de la concentración de biomasa (micelio disperso) sobre la distribución de tamaños de las burbujas dentro de gotas	92
5.49.	Efecto de la morfología de la biomasa sobre la distribución de tamaños de las burbujas dentro de gotas	92

## Índice de tablas

### Tabla

2.1. Productos sintetizados a partir de hongos filamentosos	6
2.2. Correlaciones entre los parámetros de modelos reológicos y la concentración y morfología miceliar	17
4.1. Composición del medio de cultivo para la producción del hongo en <i>pellets</i> y micelio disperso	32
5.1. Efecto de la adición de glicerol y PEG en el medio de cultivo sobre la producción de micelio disperso	48

## Nomenclatura

a	Área interfacial de transferencia de masa	$[\mu\text{m}^2]$
C	Compactabilidad del micelio	[adimensional]
$C_m$	Concentración de biomasa	[mol/l]
D	Dimensión máxima promedio	$[\mu\text{m}]$
D	Diámetro del impulsor	[cm]
$d_{eq}$	Diámetro equivalente	$[\mu\text{m}]$
$d_i$	Diámetro de la gota o burbuja i, de la población	$[\mu\text{m}]$
$d_{32}$	Diámetro Sauter	$[\mu\text{m}]$
$d_p$	Diámetro promedio de las partículas miceliarias	$[\mu\text{m}]$
$\varepsilon$	Energía de disipación específica	$[\text{kW}/\text{m}^3]$
$\phi$	Fracción volumétrica de la fase inmiscible	[adimensional]
$\varphi_g$	Retención o <i>holdup</i> de la fase gaseosa	[%]
$\varphi_d$	Retención o <i>holdup</i> de la fase dispersa	[%]
$\gamma_{av}$	Velocidad de deformación	$[\text{s}^{-1}]$
H	Altura del biorreactor	[cm]
K	Índice de consistencia del modelo de la ley de la potencia	$[\text{Pa} \cdot \text{s}^n]$
$k_L$	Coefficiente de transferencia de masa	$[\text{h}^{-1} \cdot \mu\text{m}^2]$
$k_{La}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	$[\text{h}^{-1}]$
$L_e^*$	Longitud adimensional promedio	$[\mu\text{m}]$
$L_{hgu}$	Unidad de crecimiento promedio de la hifa	$[\mu\text{m}]$
$\lambda_k$	Escala de longitud de Kolmogorov	$[\mu\text{m}]$
$\eta_{ap}$	Viscosidad aparente	[cp]
M	Magnificación del estereomicroscopio	[adimensional]
S	Tamaño de las partículas miceliarias	$[\mu\text{m}]$
OMA	Eje oval mayor	$[\mu\text{m}]$
P	Suministro de potencia en condiciones no aireadas	$[\text{kW}/\text{m}^3]$
$P_g$	Suministro de potencia en condiciones no aireadas	$[\text{kW}/\text{m}^3]$
P/V	Potencia volumétrica	$[\text{kW}/\text{m}^3]$
R	Circularidad o rugosidad de las partículas miceliarias	[adimensional]
Re	Número de Reynolds	[adimensional]
T	Diámetro del biorreactor	[cm]
$\tau_y$	Esfuerzo de cedencia	[Pa]
$\nu$	Viscosidad cinemática	$[\text{cm}^2/\text{s}]$

## RESUMEN

Algunas fermentaciones miceliales utilizan sustratos insolubles, los cuales necesitan ser dispersados en el medio acuoso. En estos casos, la dispersión del aire y del sustrato insoluble puede ser afectada por la morfología del microorganismo. En el presente trabajo se simuló las condiciones de la fermentación para la producción de  $\gamma$ -decalactona por *Trichoderma harzianum* en un sistema modelo de fermentación. El objetivo principal fue evaluar el efecto de la concentración y la morfología miceliar sobre la dispersión de aceite de ricino y de aire en este sistema de fermentación multifásico (medio acuoso-aceite de ricino-aire-micelio). La producción de biomasa en forma de micelio disperso y de *pellets* se llevó a cabo manipulando las condiciones de cultivo.

Un sistema avanzado de análisis de imágenes (cámara de video-microscopio-computadora) acoplado a un tanque de mezclado permitió la captura *en línea* de imágenes del interior del tanque de la dispersión de aceite de ricino y de aire. La caracterización de la dispersión del aceite fue determinada en un sistema modelo de tres (no aireado) y cuatro (aireado) fases. En los sistemas aireados se evaluó el efecto de la presencia de aire sobre el tamaño de las gotas de aceite y el tamaño y localización de las burbujas (ya sea libres o dentro de gotas) como función de la concentración y de la morfología miceliar.

En el sistema de tres fases, la presencia de *pellets* ocasionó un menor diámetro Sauter de las gotas de aceite con respecto al sistema con micelio disperso. El mayor tamaño de gotas en el sistema con micelio disperso fue atribuido a una mayor viscosidad y a una disminución en la turbulencia de la fase acuosa, ambos parámetros originados por la presencia de biomasa en el sistema. En el sistema modelo de cuatro fases (aireado) se observó una disminución en el diámetro Sauter de las gotas de aceite y de las burbujas al incrementar la concentración de micelio disperso en el sistema. Este comportamiento pudo explicarse por la mayor viscosidad de la suspensión originada al incrementar la concentración de micelio disperso en el sistema, lo cual causó una mayor coalescencia y la formación de gotas y/o burbujas de mayor tamaño. La viscosidad también ocasionó una segregación de las fases dispersas ya que las gotas y/o burbujas más grandes presentan la tendencia a ascender por el centro del tanque de mezclado, mientras que la región de la pared del tanque concentra las gotas y/o burbujas pequeñas (que fueron las cuantificadas) debido a la localización del punto de captura de imágenes cerca de la pared del tanque. La morfología en *pellets* no mostró un efecto significativo en el tamaño de las gotas de aceite y de las burbujas, en el rango de concentraciones de biomasa estudiado (0.04-1.32 g/l).

La presencia de aire en el sistema (0.25 vvm) originó un incremento en el tamaño de las gotas de aceite con respecto al sistema no aireado. Éste incremento fue atribuido a una caída en la potencia debida a la aireación ( $P_g/P = 0.74$ ) y a la introducción de burbujas de aire en las gotas. Con respecto a la localización de las burbujas, se observó un incremento en el porcentaje (en volumen) de las burbujas dentro de gotas de aceite al incrementar la concentración de micelio disperso. En el sistema con *pellets*, el porcentaje de burbujas dentro de gotas no presentó cambios significativos al incrementarse la concentración de biomasa.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos comprenden un rango de microorganismos muy importante industrialmente, ya que son usados para la producción de una amplia variedad de productos de alto valor, que van desde metabolitos primarios como ácidos orgánicos, hasta metabolitos secundarios como enzimas y antibióticos (Pazouki y Panda, 2000). La mayoría de los cultivos de hongos miceliares dependen de un transporte de masa efectivo a través de las interfaces. El área interfacial disponible para la transferencia de masa y el contacto del microorganismo con los sustratos disueltos en el medio de cultivo acuoso están relacionados con la velocidad de las reacciones que pueden ocurrir en el bioproceso, afectando -en última instancia- la productividad.

Se ha reportado que el suministro de oxígeno a cualquier cultivo sumergido es crítico debido a su baja solubilidad en medios acuosos. Una limitación de este sustrato en el medio de cultivo puede afectar negativamente el crecimiento microbiano y la productividad. Puede incluso favorecer la producción de metabolitos no deseables (Carlsen *et al*, 1996) como resultado de una anaerobiosis local. Esto es especialmente crítico cuando la concentración de biomasa miceliar es alta y la formación de zonas estancadas en el biorreactor agitado es evidente. En consecuencia, es importante asegurar un suministro de aire suficiente y una dispersión adecuada del mismo para satisfacer la demanda de los microorganismos.

Muchos bioprocesos industriales usan medios complejos que contienen aceites como fuente de carbono única o complementaria (Large *et al*, 1998). Los aceites y lípidos han sido tradicionalmente adicionados al medio de cultivo debido a sus propiedades naturales de antiespumante (Large *et al*, 1998). También se sabe que la adición de lípidos y aceites puede incrementar la producción de metabolitos secundarios (Dalmau *et al*, 2000; Yang *et al*, 2000) a través de una mejor transferencia de masa de la fase gaseosa debido a una mayor solubilidad de ésta en la fase oleosa. Yang *et al* (2000) sugieren que es probable una modificación en la composición de la membrana y una mayor permeabilidad de ésta por la presencia del aceite, lo cual facilita la obtención inmediata de nutrientes del medio de cultivo. Por otro lado, algunos metabolitos producidos por los microorganismos, pueden inhibir el crecimiento de éstos si se excede su concentración en el medio de cultivo. La adición de una fuente de carbono de baja solubilidad (como el aceite) es un método para evitar el efecto tóxico del metabolito debido a la acumulación de éste en la fase inmisible y a la reducción de su toxicidad en el medio de cultivo (Revilla *et al*, 1984). A diferencia de las fuentes de carbono solubles, los aceites necesitan ser dispersados en la fase continua de la fermentación y el grado de dispersión afectará de manera importante el crecimiento microbiano y la producción del

metabolito de interés. El problema encontrado al usar aceites como fuentes de carbono es la baja disponibilidad del sustrato (Li *et al*, 2001), debido a la naturaleza hidrofóbica de éstos y a la tendencia a reducir el área interfacial en medios acuosos.

En fermentaciones miceliarias, la dispersión del aceite y del aire así como la transferencia de masa pueden ser afectadas por la morfología miceliar como consecuencia de los cambios en las propiedades reológicas del caldo. El comportamiento no-Newtoniano generado en los caldos de fermentación se ha reportado (Pazouki y Panda, 2000) que es más crítico para la morfología dispersa, la cual forma redes tridimensionales que originan caldos altamente viscosos. Con esta morfología, la transferencia de masa (oxígeno, nutrientes, etc.) y la homogeneidad se ven drásticamente limitadas. Los problemas de transferencia de masa y mezclado son menos relevantes cuando la morfología es en forma de *pellets*.

Al aumentar la relación área superficial / volumen del aire o del aceite puede incrementarse la accesibilidad del oxígeno y del sustrato al microorganismo. En este caso, el tamaño de las gotas y de las burbujas juega un rol crítico. Generalmente, entre mayor sea su tamaño, menor será la concentración celular y/o productividad máxima obtenida debido a la menor área disponible para la transferencia de masa. Sin embargo, la transferencia de oxígeno parece no ser el paso limitante inicial en cultivos filamentosos empleando sustratos insolubles (Rocha-Valadez, 1999). En estos casos, la lenta asimilación del sustrato por el hongo, comúnmente reflejado como un periodo “lag” prolongado, representa la reacción limitante, fenómeno que puede provocar limitaciones nutricionales considerables en el crecimiento al inicio del cultivo. Esta limitación se incrementa al emplear bajas velocidades de agitación (condición afrontada en la mayoría de cultivos filamentosos) ya que el sistema pierde homogeneidad y la interacción sustrato-hongo se ve reducida, por lo que la degradación del sustrato y su posterior uso como fuente de carbono, es más lenta (Rocha-Valadez, 1999).

A pesar de que se han llevado a cabo un gran número de estudios de dispersiones en sistemas de dos fases (líquido-líquido, gas-líquido, sólido-líquido), la información disponible sobre características de transferencia de masa en tanques agitados con dispersiones líquido-líquido-gas ha recibido menos atención. La complejidad de los sistemas es aún mayor si se encuentra presente una cuarta fase sólida. La información en estos sistemas multifásicos es limitada; especialmente, los estudios de dispersión de una fase inmiscible son muy escasos.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo principal la caracterización de la dispersión de una fase inmiscible en sistemas multifásicos de fermentación. Para ello se ha tomado

como modelo de estudio la fermentación para la producción de  $\gamma$ -decalactona, molécula con aroma característico a durazno (Serrano-Carreón *et al*, 1997), por el hongo *Trichoderma harzianum*, utilizando como fuente de carbono el aceite de ricino. Este sistema involucra cuatro fases (medio acuoso-aire-aceite de ricino-micelio) y es, además, un modelo interesante para el estudio de fermentaciones miceliales hidrodinámicamente complejas, donde la morfología micelar, el mezclado y la reología están muy relacionados. En este sistema, es importante asegurar que el aceite de ricino se encuentre completamente incorporado en el medio acuoso. Para lograrlo, se pudieran utilizar altas velocidades de agitación; sin embargo, la sensibilidad mostrada por *Trichoderma harzianum* a altos esfuerzos de corte (Serrano-Carreón *et al*, 1997) limita la velocidad de agitación y en consecuencia, la potencia susceptible de suministrar. De aquí que es importante estudiar cómo la dispersión del aceite es afectada por otros parámetros, tales como la morfología micelar.

Adicionalmente, este trabajo generó información acerca de la interacción del microorganismo con las diferentes fases involucradas, así como la interacción entre éstas, mediante el análisis de las dispersiones a nivel microscópico. Esto ha sido especialmente valioso, ya que Rocha-Valadez *et al* (2000) han reportado, para el mismo sistema, que no solamente es importante el estudio de la dispersión de las fases como tal, sino que también deberían ser consideradas las interacciones entre las fases, incluyendo al microorganismo. Las interacciones entre las fases, tales como gas-sólido (aire-micelio) y gas-sólido-líquido (aire-micelio-aceite) son importantes, ya que la hidrólisis del sustrato y la degradación subsecuente dependen de la interacción micelar con las gotas de aceite (Ison y Lilly, 1996).

El conocer cómo la dispersión de aceite de ricino es afectada por la concentración y la morfología de la biomasa tiene como propósito identificar bajo que condiciones la disponibilidad de la fuente de carbono es mayor. Actualmente, otros integrantes del grupo de investigación realizan estudios sobre el efecto de otras variables (agentes tensoactivos, viscosidad) en la dispersión del aceite de ricino y del aire. Se espera obtener información que permita caracterizar con criterios más precisos el comportamiento de las dispersiones, con la premisa general de que si se conoce en forma detallada y fundamental el comportamiento del mezclado de las fases involucradas, se tendrán más herramientas en el diseño de procesos de fermentación más eficientes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Características de fermentaciones con hongos filamentosos

#### 2.1.1. Importancia de los hongos filamentosos en la biotecnología industrial

Los hongos han sido importantes en procesos biotecnológicos desde épocas ancestrales, principalmente en la preparación de alimentos y bebidas fermentadas (pan, quesos, cervezas, vino) (Bennett, 1998). Actualmente, los microorganismos miceliares desempeñan un papel de gran importancia en la industria farmacéutica, alimentaria y de control biológico. Los procesos y productos que utilizan hongos incluyen numerosos productos farmacéuticos (Bennett, 1998), la mayoría de los antibióticos (Su y He, 1997), la producción de proteínas terapéuticas, enzimas, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos (Bonnarme *et al*, 1997). Algunos hongos han mostrado ser activos contra varios patógenos de plantas importantes económicamente y han sido usados exitosamente en aplicaciones de control biológico (Elad *et al* 1982; Haran *et al*, 1996).

Las especies de hongos de los géneros tales como *Aspergillus* y *Penicillium*, han sido aprovechadas como productores de enzimas y de otros metabolitos. En 1983 había aproximadamente 30 clases diferentes de enzimas en uso comercial, de las cuales aproximadamente la mitad era de origen fúngico. Estas enzimas han sido aprovechadas para una variedad de usos comerciales, por ejemplo, en procesos alimentarios y textiles y en la manufactura de papel y pulpa y su producción es ahora un sector importante y en crecimiento de la industria de fermentación (Bennett, 1998).

Algunas de las especies de hongos usadas para la producción de enzimas para su uso en procesos industriales pueden producir grandes cantidades de los respectivos productos. Por ejemplo, *Aspergillus niger* puede sintetizar hasta 20 g/l de glucoamilasa y *Trichoderma reesei* produce hasta 30 g/l de celulasa (Peberdy, 1994). Los altos niveles de liberación de proteínas nativas por hongos filamentosos claramente los identifica como hospederos de gran potencial para la producción de enzimas de uso industrial y para la expresión de proteínas terapéuticas recombinantes de alto valor (Peberdy, 1994; Domingues *et al*, 2000). Muchas proteínas de una variedad de orígenes han sido expresadas en estos hongos. Actualmente, los hospederos de mayor uso son *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae* y *Trichoderma reesei* (Davies, 1991).

Algunos ejemplos de productos de fermentaciones industriales y las especies de hongos que los producen se muestran en la **tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Productos sintetizados por hongos filamentosos

Proceso o producto	Organismos
Antibióticos y otros farmacéuticos	
penicilina	<i>Penicilium chrysogenum</i>
cefalosporina	<i>Cephalosporium acremonium</i>
ciclosporina	<i>Tolypocladium inflatum</i>
alcaloides	<i>Claviceps purpurea</i>
griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvin</i>
mevalonina	<i>Aspergillus terreus</i>
Enzimas	
$\alpha$ -amilasas	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
celulasa	<i>Humicola insolens, Penicillium funiculosum, Trichoderma viride, Trichoderma reesei</i>
glucoamilasas	<i>Aspergillus phoenicis, Rhizopus delemar, Rhizopus niveu, Aspergillus nigers</i>
glucosa oxidasa	<i>Aspergillus niger</i>
invertasa	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae</i>
lacasa	<i>Coriolus versicolor</i>
pectinasa	<i>Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Humicola insolens</i>
proteinasas	<i>Aspergillus oryzae, Aspergillus melleus, Rhizopus dellemar</i>
renina (microbiana)	<i>Mucor miehei, Mucor pusillus</i>
Ácidos orgánicos	
ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>
ácido itacónico	<i>Aspergillus terreus</i>

Fuente: Bennett (1998).

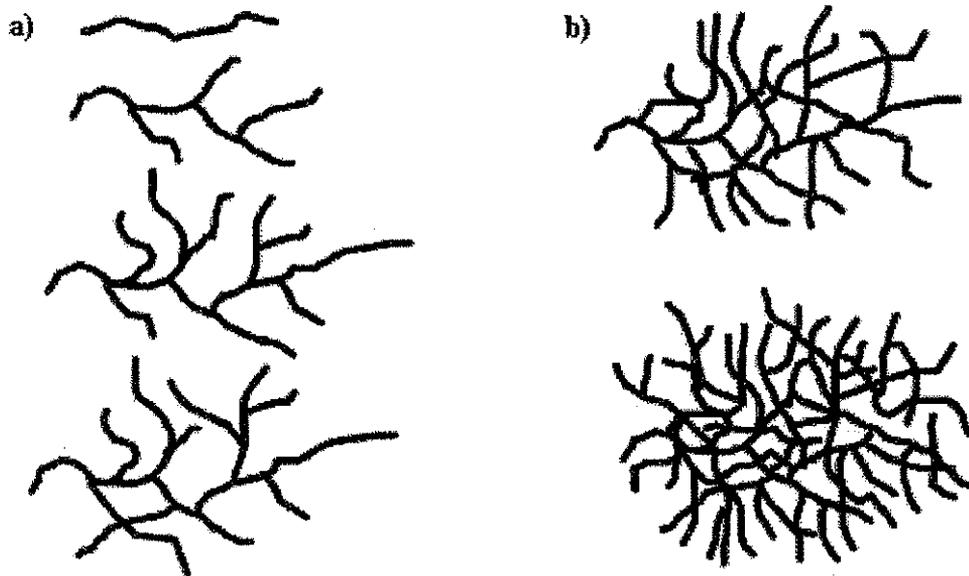
### 2.1.2. Morfología de la biomasa fungal

La morfología es un término que describe la forma y estructura externa de un organismo. En cultivo sumergido, los hongos filamentosos presentan una amplia variación en su morfología, dependiendo de las condiciones de cultivo y del genotipo del microorganismo usado (Reichl *et al.*, 1992).

De manera general, la morfología de microorganismos miceliares puede clasificarse en micelio disperso y *pellets*, con una amplia variedad de morfologías intermedias. El micelio disperso consiste de hifas ramificadas no entrelazadas con otras hifas (micelio libre filamentoso) y agregados de hifas entrelazadas (micelio disperso o agregados laxos) (ver figura 2.1).

La estructura general de los *pellets* consiste en un centro de hifas densamente empacadas, rodeado por una región anular filamentosa de hifas creciendo radialmente (Cox *et al.*, 1998). Los *pellets* han sido clasificados en dos grupos; aquellos que presentan un centro compacto con una zona anular filamentosa (figura 2.2a) y aquellos que se caracterizan por un centro compacto con crecimiento

limitado en la región anular externa, de tal manera que es visualmente liso en su superficie (figura 2.2b). Cox y Thomas (1992) mencionan que esta clasificación se basa en las mediciones de la relación entre el tamaño de la región anular filamentosa y el centro compacto. El hecho de que los hongos filamentosos crezcan como micelio disperso o como *pellet* está determinado por varios factores. Algunos de ellos se describen más adelante, e incluyen factores genéticos, agregación de las esporas, pH, viscosidad y composición del medio, temperatura, fuerzas hidrodinámicas, concentración de esporas en el inóculo y la presencia de surfactantes y/o quelantes (Vecht-Lifshitz *et al*, 1990; Carlsen *et al*, 1996).

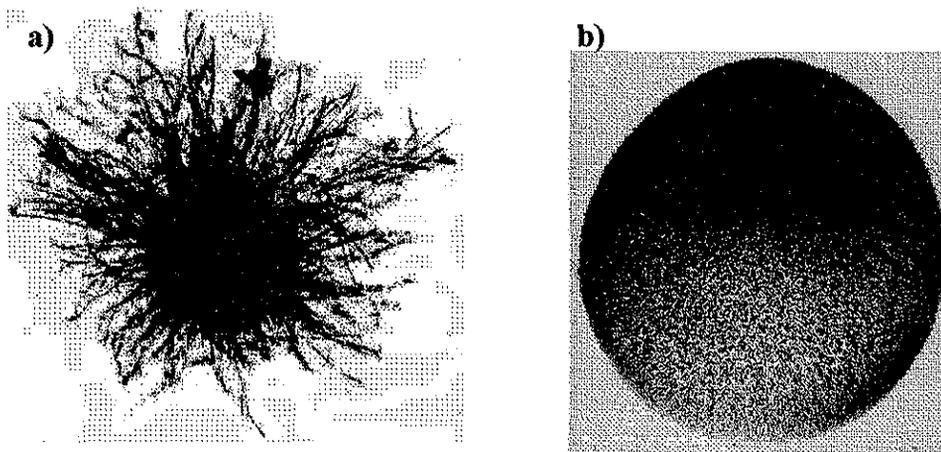


**Figura 2.1.** Tipos de micelio disperso en hongos filamentosos. a) micelio libre filamentoso y b) agregados miceliales laxos o micelio disperso. Fuente: Amanullah *et al* (2000).

La morfología filamentosa del micelio causa un fácil enredamiento de las hifas, lo cual, junto con una alta concentración de biomasa en el fermentador, ocasiona que la suspensión sea muy viscosa y con características reoadelgazantes o pseudoplásticas, en las cuales la viscosidad aparente disminuye al aumentar la velocidad de deformación. Así, en la región del impulsor de un biorreactor agitado, las velocidades de deformación son mayores que en el resto del tanque. Al aumentar la distancia desde el impulsor a las paredes del tanque, las velocidades de deformación disminuyen rápidamente y, en consecuencia, las viscosidades aparentes aumentan considerablemente (McFarlane y Nienow, 1996).

El micelio disperso puede ocasionar varios problemas importantes en la fermentación. El transporte de masa de gas a la fase líquida disminuye como resultado de una mayor coalescencia de las

burbujas originada por el incremento en la viscosidad del caldo y por la tendencia del micelio a agregarse. Otro problema es la dificultad para mezclar estos caldos, afectando la homogeneidad del medio de cultivo dentro de los fermentadores, lo cual pueden ocasionar una disminución en la productividad y/o en la producción de metabolitos indeseables. Por otro lado, con el crecimiento en *pellets* los problemas de mezclado y de transferencia de masa son menos importantes, debido a que el incremento en la viscosidad del caldo no es tan significativo como con micelio disperso.



**Figura 2.2. Tipos de *pellets* en hongos filamentosos. a) *pellet* con región anular filamentosa y b) *pellet* con superficie lisa. Fuente: a) Cox y Tomas (1992); b) Lawton *et al* (1989).**

Es evidente que la morfología del cultivo es una variable importante en procesos con hongos. Conocer cómo el crecimiento miceliar es afectado por las condiciones de cultivo es de fundamental importancia para lograr el desarrollo de cierta morfología. A continuación se describen algunas de las variables de proceso que influyen en la morfología desarrollada por hongos filamentosos.

### **2.1.2.1. Variables que afectan la morfología de hongos filamentosos**

#### **2.1.2.1.1. Agregación**

Takahashi y Yamada (1960) sugieren que existen dos clases de hongos con respecto a la facilidad de formación de *pellets*. Las especies que forman *pellets* como resultado de la agregación de las esporas durante el proceso de germinación y aquellas no agregativas, las cuales forman un *pellet* por espora. Carlsen *et al* (1996) reportaron que la formación de *pellets* en *Aspergillus oryzae* ocurre mediante la agregación de las esporas y que el proceso de agregación es dependiente del pH.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los *pellets* parece que también pueden ser formados como resultado de la agregación de varias hifas para formar agregados no compactos. Estos agregados se pueden desarrollar gradualmente en un *pellet* con centro denso, debido al crecimiento de la hifa dentro del agregado. La agregación de las hifas está determinada por las propiedades de las hifas individuales y por las condiciones de cultivo (Nielsen *et al*, 1995).

Algunos factores que pueden ser importantes para la agregación celular, incluyen aquellos de carácter genético, la habilidad para producir biofloculantes (Vecht-Lifshitz *et al*, 1990), la composición de la pared celular, la presencia de agentes surfactantes, la fuerza iónica y la presencia de iones divalentes como el  $\text{Ca}^{2+}$  (Olsvik y Kristiansen, 1994). Los factores genéticos y ambientales determinan la composición de la pared celular, sus propiedades de superficie y la producción de agentes surfactantes, los cuales afectan las fuerzas de cohesión y/o repulsión entre las células (Braun y Vecht-Lifshitz, 1991).

#### 2.1.2.1.2. Oxígeno disuelto

La tensión de oxígeno disuelto (TOD) en el medio de cultivo puede tener un impacto sobre la morfología de hongos filamentosos. Wongwicharn *et al* (1999) reportan que en el cultivo de *Aspergillus niger* B1-D fueron aparentes dos tipos de morfología. La primera fue típicamente observada en condiciones de limitación de oxígeno y fue caracterizada por elementos hifales largos y poco ramificados. El segundo tipo, característico de cultivos enriquecidos con 30 y 50 % con oxígeno, estuvo representada por elementos hifales más cortos y ramificados.

Vecht-Lifshitz *et al* (1990) mencionan que las células parecen adaptarse a una limitación de oxígeno al formar flóculos más pequeños. Esta adaptación resulta en un área superficial por unidad de volumen mayor y, por lo tanto, una mayor transferencia de oxígeno a las células. Estos autores encontraron una relación directa entre la disponibilidad de oxígeno y el tamaño del *pellet* en cultivos de *Streptomyces tendae*, a una concentración de inóculo constante. Los factores que indujeron la formación de *pellets* simultáneamente incrementaron la hidrofobicidad de la pared celular. Estos resultados sugieren que el tamaño del *pellet* pudiera estar regulado por la liberación de biofloculantes (bajo condiciones de limitación de oxígeno se reduce la liberación de biofloculantes), los cuales modifican la hidrofobicidad de la pared celular. Esta hipótesis está reforzada por la observación de que algunos surfactantes indujeron la formación de *pellets* en condiciones en las cuales normalmente no se forman.

### 2.1.2.1.3. Concentración de inóculo

Existen muchos reportes que afirman que la concentración de inóculo (esporas o micelio) puede afectar significativamente la morfología miceliar. De acuerdo con Metz y Kossen (1997), la interacción de las hifas es importante en la determinación de la posible formación de *pellets*. En altas concentraciones de inóculo, las hifas interaccionan unas con otras en las etapas tempranas del crecimiento, previniendo así el desarrollo de los *pellets*. Sin embargo, existen algunas especies de *Aspergillus* donde se reporta la formación de *pellets* a todas las concentraciones de esporas (Trinci, 1970, citado por Domingues *et al*, 2000).

En una cepa recombinante de *Aspergillus awamori*, Johansen *et al* (1998) reportaron que diferentes concentraciones de inóculo originaron una diferencia significativa en la morfología. En bajas concentraciones de inóculo se observaron más puntas por micelio y una menor velocidad de extensión de la hifa comparadas con una concentración de inóculo mayor. Estas observaciones indican que la concentración de inóculo afecta indirectamente la velocidad de extensión de una punta individual.

Domingues *et al* (2000) mencionaron que el tamaño promedio del *pellet* parece ser inversamente proporcional al tamaño de inóculo en una cepa recombinante de *Trichoderma reesei*. Por otro lado, Nielsen *et al* (1995) reportaron que para cultivos de *Penicillium chrysogenum*, concentraciones bajas de inóculo resultaron en pocos agregados y *pellets* de diámetro pequeño. A concentraciones de inóculo mayores, muchas hifas se agregaron y se desarrollaron en *pellets* de diámetro mayor. Finalmente, a concentraciones de inóculo muy altas, el tamaño final del micelio fue pequeño y por lo tanto no se formaron agregados.

### 2.1.2.1.4. Composición del medio de cultivo

Cuando el microorganismo se encuentra en un ambiente rico en nutrientes forma una red miceliar altamente ramificada, mientras que cuando los nutrientes están limitados se desarrolla un micelio menos ramificado, como respuesta de adaptación a la limitación de nutrientes (Wardell y Bushell, 1999). Por otro lado, se ha reportado que la velocidad específica de crecimiento puede cambiar cuando se usan diferentes sustratos, afectando indirectamente la morfología (Muller *et al*, 2000). Los factores que favorecen un incremento en la velocidad de crecimiento, como el enriquecimiento del medio con nutrientes fácilmente asimilables, reducen la formación de *pellets*, lo cual sugiere que la limitación de cualquier nutriente particular, incluyendo el oxígeno, induce la formación de *pellets* (Braun y Vecht-Lifshitz, 1991). Domingues *et al* (2000) estudiaron la influencia de la composición

del medio de cultivo en la morfología de *Trichoderma reesei*. Un medio de cultivo enriquecido con peptona y extracto de levadura mostró una velocidad de crecimiento mayor comparada con otros medios. Los autores consideraron que la presencia de cofactores de crecimiento en el medio enriquecido favoreció el crecimiento de micelio disperso. Wiebe y Trinci (1991) afirman que la morfología del hongo está regulada por la concentración de sustrato en el medio de cultivo.

La estructura de los *pellets* parece ser dependiente de la especie microbiana; sin embargo, algunos aditivos -tales como polímeros y surfactantes- afectan el crecimiento en *pellet* (Vecht-Lifshitz *et al*, 1990; Hotop *et al*, 1993). En su trabajo, Domingues *et al* (2000) encontraron que el uso de *Tween 80* en el medio de cultivo inhibió la formación de *pellets* en cultivos de *Trichoderma reesei*. Por otro lado, Su y He (1997) lograron controlar la morfología de *Neurospora crassa* mediante la adición de *Carbopol* (carboxipolimetileno) al medio de cultivo. Los *pellets* formados en el medio con *Carbopol* fueron más pequeños y dispersos que los formados en el medio sin éste componente.

#### 2.1.2.1.5. pH

Carlsen *et al* (1996) sugieren que es posible controlar (hasta cierto grado) la morfología micelial mediante el pH del medio. Estos autores mencionan que las propiedades de superficie de las esporas pueden estar influenciadas por el pH. A valores de pH por arriba de 5.5, las paredes celulares de la mayoría de microorganismos están negativamente cargadas, tendiendo a causar su separación mediante repulsión electrostática (Braun y Vecht-Lifshitz, 1991).

Carlsen *et al* (1996) investigaron la influencia del pH sobre la morfología de *Aspergillus oryzae* en cultivos en lote en biorreactores agitados. Los autores observaron que a pH muy bajo ( $\leq 2.5$ ) el micelio mostró alta vacuolización y un hinchamiento en las paredes celulares y, en consecuencia, un menor crecimiento. A pH de 3-3.5 se observó micelio libre disperso. En el rango de pH entre 4 y 5, se observaron *pellets* y micelio libre disperso, mientras que a pH mayores de 6, los *pellets* fueron la única forma de crecimiento observada. Además, se observó que a un tiempo de cultivo dado, el radio del *pellet* se incrementó al aumentar el pH. La determinación de la ramificación y otras propiedades de crecimiento de hifas libres no mostraron diferencias entre los resultados obtenidos a pH de 3.5 y a pH de 6.

#### 2.1.2.1.6. Fuerzas hidrodinámicas

En un biorreactor agitado, la energía cinética trasferida al fluido por el impulsor es transportada por *eddies* ("remolinos" generados en el flujo turbulento) de diferentes longitudes, las más grandes con una longitud aproximadamente igual al diámetro del impulsor. La energía cinética de las *eddies* se

pasa rápidamente a *eddies* más y más pequeñas en una cascada de transferencia de energía. Las *eddies* más pequeñas se caracterizan por presentar una longitud que puede ser estimada a partir de la escala de Kolmogorov,  $\lambda_k$ , (Prokop y Bajpai, 1992), dada por la ecuación:

$$\lambda_k = \left( \frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (1)$$

donde  $\nu$  es la viscosidad cinemática y  $\varepsilon$  es la velocidad de disipación de energía local. En biorreactores agitados de laboratorio la longitud de las *eddies* de Kolmogorov es del orden de 25 a 200  $\mu\text{m}$  (Prokop y Bajpai, 1992), esto sugiere que la biomasa miceliar dispersa, en agregados o en *pellets*, puede ser dañada debido a que los tamaños de las partículas miceliar en cuestión son del orden de 50  $\mu\text{m}$  y mayores (Hewitt *et al.*, 1998).

En el caso de *Streptomyces tendae*, el cultivo en matraces no bafleados produjo *pellets* con un tamaño promedio de 1.4 mm, mientras que el crecimiento en matraces bafleados resultó en *pellets* de 0.8 mm. Cuando este microorganismo se cultivó en biorreactores agitados a una velocidad de agitación de 300 rpm, el micelio fue filamentoso, mientras que a 50 rpm creció predominantemente en forma de *pellets* (Joshi *et al.*, 1996).

Joshi *et al.* (1996) mencionan que la agitación previene la formación de *pellets* por dispersión de los agregados de esporas en las etapas iniciales del crecimiento fúngico y que el número de esporas por agregado es inversamente proporcional al suministro de potencia por agitación. Justen *et al.* (1998) han propuesto un modelo que permite correlacionar la fragmentación inducida por la agitación. Este modelo plantea que la frecuencia de circulación del micelio a través de las zonas de alta energía disipada en el biorreactor, es probablemente el parámetro más importante en el rompimiento de las hifas.

### 2.1.3. Análisis de imágenes de hongos filamentosos

El análisis computarizado de imágenes se refiere a la extracción de información de una imagen mediante una computadora. El desarrollo relativamente reciente de técnicas de análisis de imágenes computarizadas para la medición de parámetros morfológicos de organismos filamentosos (Thomas, 1992) ha permitido la evaluación de la morfología de estos microorganismos de una manera cuantitativa. Esta metodología se ha usado para investigar la influencia de varios parámetros sobre la morfología miceliar (Yang *et al.*, 1996).

Anteriormente, la caracterización morfológica de hongos filamentosos se llevaba a cabo dibujando el micelio mediante un cursor sobre una mesa digital, lo cual resulta lento y muy laborioso. Se desarrolló entonces una alternativa basada en análisis de imágenes computarizado, la cual mostró ser más rápida y exacta que el método digital (Packer y Thomas, 1990). Más recientemente, Tucker *et al* (1992) reportaron un método de análisis de imágenes completamente automático. El método no solo permite hacer más rápido las mediciones de los parámetros morfológicos del micelio, sino que también permite hacer una caracterización más detallada de los agregados y la determinación de la proporción de éstos en la muestra.

El análisis de imágenes computarizado se logra a través de una cámara de video conectada a un microscopio y a una computadora. El campo enfocado en el microscopio se envía a la computadora para su procesamiento y análisis. Una vez que la imagen es capturada puede ser procesada (ver siguiente sección) para mejorar su calidad y después se analiza para obtener las mediciones de los parámetros morfológicos requeridos (Thomas, 1992).

#### **2.1.3.1. Procesamiento de la imagen**

El primer paso en el proceso de análisis de imágenes es la captura de la imagen de un campo enfocado de la laminilla (portaobjetos). La imagen se envía a la computadora mediante una cámara de video. El procesamiento digital subsecuente a la captura de la imagen se resume en la **figura 2.3**.

#### **2.1.3.2. Parámetros para la caracterización morfológica del micelio**

Existen varios parámetros para la caracterización morfológica de hongos filamentosos (ver **Apéndice A**). Sin embargo, si el objetivo es representar la influencia de cierta variable sobre la morfología miceliar, los parámetros elegidos deberán representar adecuadamente los efectos. La longitud de la hifa principal, el diámetro promedio (el cual es determinado a partir del promedio de las longitudes de una serie de trazos a través del centro de gravedad del micelio), el diámetro equivalente (el cual se define como el diámetro de un círculo de área igual a la del micelio) y el área del micelio han sido muy usados para describir las características morfológicas del micelio. La circularidad o rugosidad (medida de la irregularidad en el perímetro del micelio) y la compactabilidad (este parámetro ha sido estimado como la relación del área proyectada de las hifas en el agregado con el área convexa proyectada de ese agregado, ver **figura 2.4**) han sido muy útiles en la descripción de la región anular externa de agregados miceliar y de *pellets*.

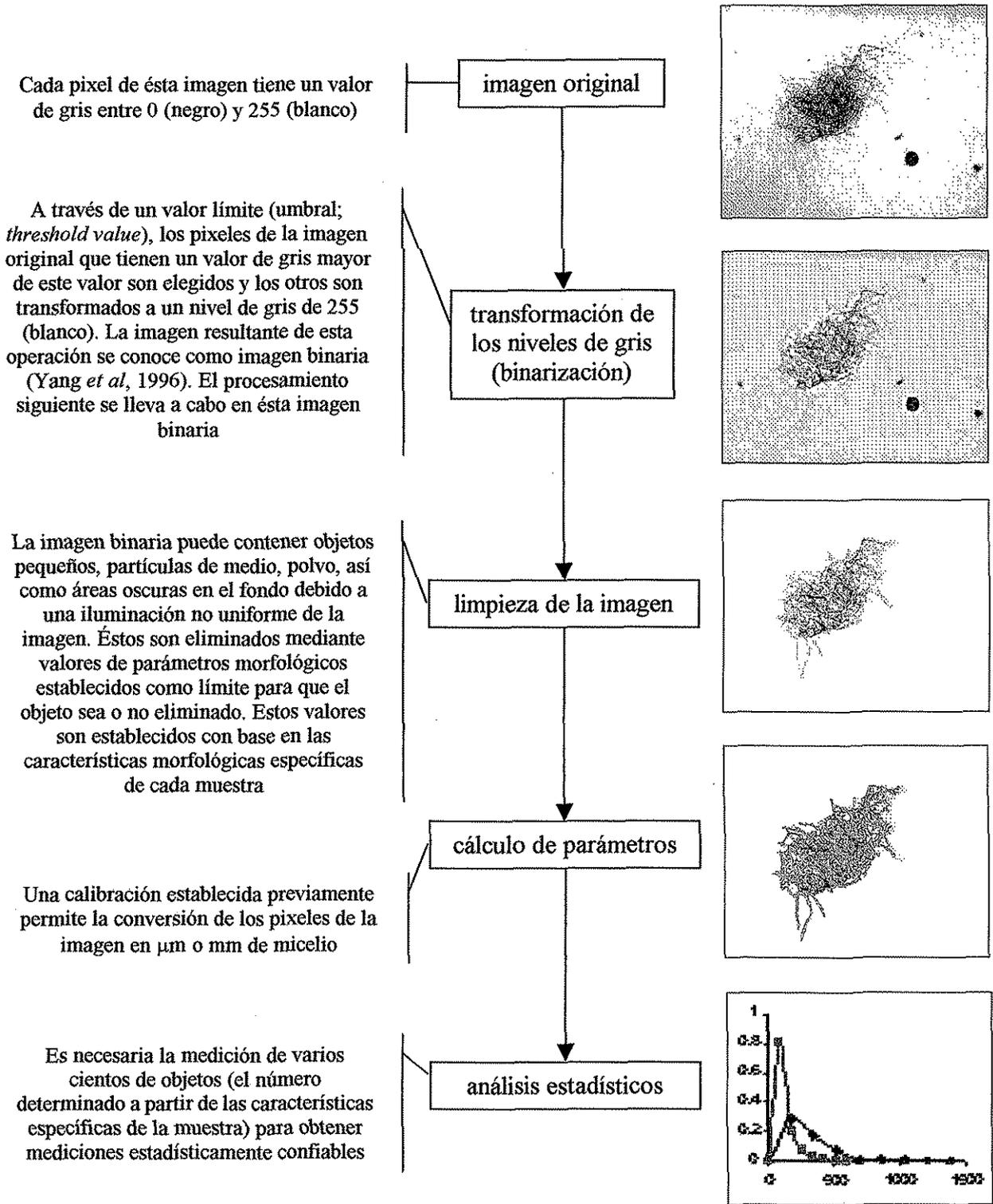
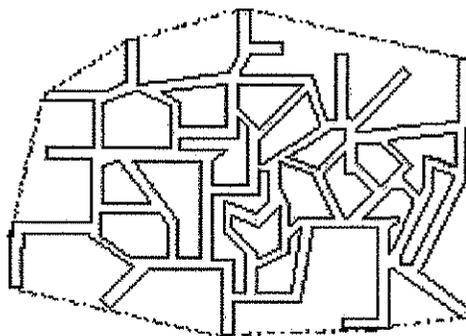


Figura 2.3. Digitalización y procesamiento de las imágenes para la determinación de parámetros morfológicos.

Tucker *et al* (1992), Packer y Thomas (1990) y Cox y Thomas (1992) reportaron la longitud total del micelio, la longitud de la hifa principal, el número de puntas por micelio, la rugosidad, el área o el porcentaje de los agregados, la longitud de la unidad de crecimiento de hifa, para caracterizar la morfología durante el curso del cultivo de diferentes hongos filamentosos.



**Figura 2.4. Representación de un agregado. Líneas continuas: perímetro; líneas punteadas: perímetro convexo. Fuente: Tucker *et al* (1992).**

El efecto del esfuerzo de corte puede ser evaluado a través del diámetro equivalente, densidad y área de la región anular. Mediante estos parámetros puede ilustrarse la remoción de hifas laterales debido a los altos esfuerzos de corte cerca del impulsor y la limitación de extensión de las hifas en esta zona (Cox y Thomas, 1992). El rompimiento de *pellets* (Metz *et al*, 1981; van Suijdam y Metz, 1981) puede ser evaluado mediante una reducción en el diámetro equivalente y área del centro del mismo y con el incremento en el índice de circularidad, debido a la producción de fragmentos irregulares. Smith *et al* (1990), Justen *et al* (1998) y Cui *et al* (1998) usaron la longitud de la hifa, el área proyectada del micelio, la fracción de micelio libre disperso, la fracción de agregados, el grado de dispersión en la superficie y el tamaño del *pellet* para caracterizar el efecto de la agitación sobre la morfología. Para estudiar la transferencia de masa en *pellets* y estimar las velocidades difusionales de nutrientes pueden usarse el diámetro equivalente, el área y el volumen estimado del centro del *pellet*. Las mediciones de la región anular externa también son importantes porque el diámetro y la densidad de la región anular presentan otra posible resistencia a la transferencia de masa (Cox y Thomas, 1992).

#### **2.1.4. Reología de caldos de fermentación miceliares**

La reología de caldos miceliares puede ser afectada significativamente por la concentración y la morfología micelilar (Metz *et al*, 1979). Roels *et al* (1974) han sugerido que la formación de una red

tridimensional entre las partículas de micelio origina que las suspensiones sean muy viscosas. Un incremento en la viscosidad aparente del caldo puede reducir el área de transferencia de masa debido a una mayor coalescencia de las gotas o de las burbujas en cultivos multifásicos (Kawase *et al.*, 1997).

Varios autores han descrito el efecto de la concentración de biomasa ( $C_m$ ) sobre la viscosidad del caldo de cultivo. Sin embargo, la descripción de la viscosidad del caldo como función de la concentración de biomasa solamente es de valor limitado, ya que ésta relación dependerá de manera importante de la morfología miceliar desarrollada. Un mejor entendimiento de las relaciones entre la morfología y la reología puede lograrse mediante una combinación de estudios de ambas variables. En estos casos, es vital la descripción del tamaño y la forma de las partículas miceliarias mediante diferentes parámetros (Olsvik *et al.*, 1993; Olsvik y Kristiansen, 1994). Pedersen *et al.* (1993) reportaron un aumento mayor en el índice de consistencia de la ley de la potencia para una morfología dispersa que para una morfología en *pellets* en cultivos de *Penicillium chrysogenum*. Pazouki y Panda (2000) mencionan que el crecimiento filamentoso del micelio incrementa la viscosidad del medio requiriendo, por lo tanto, un mayor suministro de potencia para mantener una aireación y mezclado adecuados. La viscosidad del medio con *pellets* es sustancialmente baja, así que se requiere menos potencia para la agitación y aireación. Mohseni y Allen (1995), Olsvik y Kristiansen (1994), Tucker y Thomas (1993) y Riley *et al.* (2000) han resaltado el efecto de la presencia y la concentración de agregados miceliarios y sus características (particularmente la rugosidad,  $R$ ) sobre los parámetros de los modelos reológicos. Se han propuesto varias expresiones para relacionar los parámetros de los modelos reológicos con parámetros morfológicos del micelio (ver **tabla 2.2**).

Con el fin de investigar los efectos de las propiedades reológicas en el mezclado y la dispersión del gas, los caldos opacos de fermentación pueden simularse utilizando soluciones de polímero que son transparentes (McFarlane y Nienow, 1996; Nienow y Elson, 1988). El efecto del incremento en la viscosidad sobre la dispersión del gas ha sido más estudiado en sistemas utilizando agentes viscosantes que con biomasa miceliar. Aún cuando un sistema con micelio disperso es físicamente muy diferente a un sistema con un agente viscosante, ambos originan un incremento en la viscosidad del sistema.

Shimizu *et al.* (1999) mencionan que el comportamiento no-Newtoniano de la fase continua origina una ampliación de la distribución de tamaños de las gotas. En las fases continuas no-Newtonianas una gota usualmente se dispersa en gotas grandes y gotas muy pequeñas, más bien que en gotas del mismo tamaño.

**Tabla 2.2. Correlaciones entre los parámetros de modelos reológicos y la concentración y morfología miceliar.**

Organismo	Correlación	Medición reológica	Protocolo de fermentación
<i>A. niger</i>	$K = 0.308 * C_m^{0.315} * d_p^{0.229}$ $K = 0.559 * C_m^{0.058} * d_p^{-0.08}$	Viscosímetro de tubo	Fermentador <i>air-lift</i>
<i>P. chrysogenum</i>	$K = C_m^{2.8} * R^{0.7} * C^{1.2} * \text{const}$ (valor de la constante no dado)	Reómetro de turbina	<i>batch</i>
<i>P. chrysogenum</i>	$K = C_m^{2.3} * R^{-0.96} * C^{0.79} * 6.6 * 10^{-5}$	Reómetro de turbina	<i>batch</i>
<i>A. niger</i>	$K = -0.56 + 0.0018 * R * C_m^{1.7}$	Reómetro de impulsor	continuo, y <i>fed-batch</i> y <i>batch</i>
<i>A. niger</i>	$K = 0.38 + 4.8 * 10^{-5} * R * C_m^{2.9}$	Reómetro de impulsor	<i>fed-batch</i> y <i>batch</i> , respectivamente
<i>S. levoris</i> y <i>A. niger</i>	$\tau_y = 4.2 * 10^{-6} (C_m)^{2.6} (L_c^*)^{2.2}$ $\tau_y = 7.2 * 10^{-3} (C_m)^{2.2} (L_{\text{hgu}})^{0.65}$ $\tau_y = 4.8 * 10^{-7} (R)^{3.2} (C_m)^{2.5}$	Técnica "vane"	<i>batch</i> (crecido en fermentador y matraces agitados)

Fuente: Riley *et al* (2000). Para la definición de variables ver la sección de nomenclatura.

McFarlane y Nienow (1996) reportan para soluciones viscosas y reoadelgazantes de CMC que la aireación resultó en una distribución bimodal de las burbujas de gas, con un gran número de burbujas muy pequeñas y algunas grandes. Las burbujas pequeñas siguieron el movimiento de la fase líquida o fueron mantenidas en las regiones de movimiento lento (cerca de la pared del tanque). Las burbujas grandes tuvieron tiempos de residencia cortos en el tanque y resultaron en una acanalamiento parcial del gas por el centro del tanque agitado. Mencionan que estos efectos parecen estar relacionados con una reducción en la velocidad del fluido al incrementarse la distancia del impulsor y una disminución relativa del movimiento del fluido debido a la naturaleza viscosa y reoadelgazante de las soluciones de polímero. Observaciones similares han sido reportadas por Nienow y Elson (1988) en sistemas con fluidos reoadelgazantes, con muchas burbujas muy pequeñas (< 0.5 mm) siguiendo el flujo y relativamente pocas en número (pero una gran proporción en volumen) muy grandes fluyendo por el centro del tanque agitado. Kawase *et al* (1997) mencionan que en soluciones viscosas y reoadelgazantes de CMC se formaron burbujas grandes (debido a la coalescencia), las cuales ascendieron cerca del centro del tanque agitado.

Vlaev y Martinov (1998) estudiaron la dispersión del gas (medida como la retención o el *holdup* del gas -fracción volumétrica del gas en el sistema- en diferentes posiciones del tanque) con fluidos viscoelásticos y reoadelgazantes de poliacrilamida (0.7-2.5%). Los autores reportan que en presencia de fluidos reoadelgazantes, la descarga del líquido disminuye exponencialmente con la

distancia radial desde la punta del impulsor. Este efecto dificulta el transporte de burbujas grandes a la pared del tanque y ésta región concentra solamente una parte de burbujas muy pequeñas. Este patrón de dispersión pudo explicarse por la alta viscosidad y la baja movilidad del fluido reoadelgazante en las zonas alejadas del impulsor. Paglianti *et al* (2000) proponen un modelo para determinar la retención del gas en tanques agitados. Este modelo permite entender la influencia del incremento en la viscosidad del líquido en el comportamiento de retención del gas, la cual primero se incrementa a un valor crítico y, posteriormente, presenta una disminución muy marcada.

## 2.2. Sistemas multifásicos

### 2.2.1. Fermentaciones multifásicas

En fermentaciones miceliarias comúnmente se usan sustratos insolubles (tales como aceites) como fuente de carbono única o complementaria. El uso de aceites vegetales como fuente de carbono en fermentaciones miceliarias ha presentado algunas ventajas, incluyendo sus propiedades como antiespumante (Large *et al*, 1998). Los aceites son componentes esenciales en la industria de los antibióticos (Elibol y Mavituna, 1997), ya que se ha reportado que mejoran la producción de compuestos solubles en aceites (Keudell *et al*, 2000). Los aceites también pueden servir como fase extrayente de metabolitos inhibidores del crecimiento del medio, tales como antibióticos (Serrano-Carreón *et al*, 1992; Bonnarme *et al*, 1997; Ho *et al*, 1990). En estos casos, el metabolito se concentra en la fase inmisible, en la cual es más soluble, disminuyendo su concentración y, por lo tanto, su toxicidad en el medio acuoso. También se ha reportado (Mehra y Sharma, 1986; Rols y Goma, 1991) que la adición de una segunda fase líquida dispersa, la cual es inmisible en la fase líquida original (pero tiene una alta solubilidad para el gas) puede utilizarse para incrementar la transferencia de masa de la fase gaseosa. El efecto de la segunda fase en el coeficiente de transferencia de masa,  $k_L$ , y en el área interfacial,  $\alpha$ , es muy compleja. Das *et al* (1985) observaron que conforme se incrementa la fracción de la fase orgánica, el área interfacial primero se incrementa, pasa luego por un máximo y posteriormente disminuye.

El proceso de degradación metabólica de los aceites involucra una serie de etapas, desde la síntesis de lipasas y posteriormente la hidrólisis del sustrato. Una eficiente degradación de los aceites depende del área disponible para transferencia de masa del sustrato y de una adecuada interacción de ésta con otras fases presentes en el sistema, incluyendo al microorganismo.

A pesar del amplio uso de aceites en fermentaciones miceliarias, los estudios enfocados en la cuantificación del área de transferencia de masa y en la dispersión de ésta fase y del aire son escasos. Usando análisis de imágenes, Dalmau *et al* (1998) determinaron los tamaños de gotas de ácido oleico como función de la velocidad de agitación (300-800 rpm) en sistemas modelo de tres fases. Estos autores relacionaron el tamaño de gota con la producción de lipasa extracelular por *Candida rugosa* y encontraron que el tamaño de gota afectó la productividad. Observaron un incremento en ésta al incrementar el tamaño de gota de ácido oleico.

La publicación de Galindo *et al* (2000) es el antecedente más directo del presente trabajo, ya que utilizando un sistema modelo de fermentación multifásico (medio acuoso –aceite de ricino – aire – micelio de *Trichoderma harzianum*), determinaron las distribuciones de tamaños de gotas y burbujas como función de la concentración de aceite de ricino y de biomasa. Reportaron un incremento en el tamaño de las gotas de aceite al incrementar la concentración de la fase dispersa en los sistemas medio acuoso – aceite y medio acuoso – aceite – aire. Tanto para el sistema no aireado como para el aireado, la adición e incremento en la concentración de biomasa en el sistema originó una disminución en el tamaño de las gotas de aceite.

Por otro lado y como continuación del trabajo de Galindo *et al* (2000), Larralde *et al* (2002) evaluaron la proporción y la distribución de tamaños de las burbujas dentro de gotas de aceite y de burbujas libres en el medio acuoso como función de la concentración de aceite y de biomasa. En todos los casos, las burbujas dentro de gotas fueron más pequeñas (280 – 600  $\mu\text{m}$ ) que las burbujas libres (800 – 1000  $\mu\text{m}$ ). Los autores reportan que la presencia de biomasa en el sistema causó una disminución en el tamaño de las burbujas dentro y fuera de las gotas de aceite. Esta disminución fue más pronunciada para las burbujas libres que para las burbujas dentro de gotas de aceite. No se observaron diferencias importantes en el tamaño de las burbujas dentro de gotas con respecto al tamaño de las burbujas libres ( $d_{32} = 400 \mu\text{m}$ ). También se reportó un incremento en la proporción de burbujas dentro de gotas al incrementar la concentración de aceite. Solamente el 9 % del número total de burbujas se encontraron en la concentración más baja de aceite analizada (2 %), mientras que con 5 % de aceite se observó una proporción máxima del 42 % de burbujas dentro de gotas.

### 2.2.2. Dispersión de aire

Uno de los objetivos más importantes de un biorreactor es la dispersión de gas en el seno del líquido (transferencia de oxígeno). La transferencia de oxígeno tiene lugar a través de la interfase gas-líquido. El contacto gas-líquido y una eficiente dispersión de gases son importantes para un

suministro de oxígeno suficiente para los requerimientos metabólicos de los microorganismos en cultivo sumergido. El gas es dispersado en forma de burbujas y el rompedor de burbujas más comúnmente usado es el impulsor mecánico (que rompe las burbujas mediante agitación) de varias formas y configuraciones. Convencionalmente, el gas es suministrado a través de tubos con orificios y es dispersado debido al esfuerzo de corte en la región del impulsor. Las burbujas generadas ascienden y responden al patrón de flujo del líquido también creado por el impulsor. Debido a que las turbinas Rushton tienen altos números de potencia ( $P_0 \approx 5$ ) han sido consideradas especialmente valiosas para la dispersión de gas y para la ruptura de gotas (Oldshue, 1981).

Debido a la baja solubilidad del aire en el agua, el oxígeno es sin duda el elemento más difícil de suministrar en cualquier cultivo sumergido. En fermentaciones de hongos filamentosos, el suministro de oxígeno se complica aún más por la alta viscosidad y las características no-Newtonianas de éstos caldos, donde los tiempos de mezclado llegan a ser del orden de minutos. Por lo anterior, los hongos pueden experimentar limitaciones severas de éste componente.

El área interfacial para la transferencia de masa de la fase gaseosa está directamente relacionada con el tamaño de la burbuja que depende, en general, del equilibrio dinámico entre la ruptura y la coalescencia de las mismas. El tamaño de burbuja está determinado por la velocidad de rotación del impulsor, el flujo de gas, la geometría del impulsor y del tanque, las propiedades físicas (tensión superficial, densidad) del fluido y su reología (Tattersson, 1991). La evidencia visual sugiere que la ruptura de burbujas ocurre exclusivamente en la región del impulsor en biorreactores agitados, donde el nivel de disipación de energía es más alta. Las burbujas que emergen del impulsor parece que no se dispersan más en el medio, debido a los bajos niveles de esfuerzo de corte que prevalecen fuera de la zona del impulsor (Parthasarathy y Ahmed, 1994; Shimizu *et al*, 1999). Las mediciones del tamaño de burbujas proveen información útil acerca de la dispersión del gas (Markopoulos *et al*, 2000) y del área interfacial para la transferencia de masa generada en los sistemas.

Una variación de las propiedades físicas de la fase líquida generalmente origina una variación en el tamaño y la velocidad de ascensión de las burbujas (Paglianti *et al*, 2000). Los metabolitos producidos por las células, incluyendo las proteínas resultado del metabolismo y de la lisis celular, el consumo de sustratos, por mencionar algunos, cambian la composición del medio y pueden variar la distribución de tamaños de burbujas significativamente (Adler *et al*, 1980). Por otro lado, se ha reportado que la presencia de partículas sólidas en el medio puede inhibir la coalescencia de las burbujas por adhesión a la superficie de éstas, promover un mayor rompimiento debido al impacto partículas-burbujas o favorecer la coalescencia debido a un incremento en la viscosidad de la fase continua. Estos puntos se tratarán más en detalle en las secciones 2.2.4.2 y 2.2.4.3.

Además de un menor tamaño de las burbujas, también son deseables altos tiempos de residencia del gas para que se lleve a cabo la mayor transferencia de oxígeno de las burbujas al microorganismo y lograr altas conversiones de las reacciones metabólicas que ocurren en el medio (Pelton y Piette, 1992). Con respecto a esto, la velocidad de ascensión de las burbujas es también importante (Akita y Yoshida, 1973, citado por Saberi *et al*, 1995). Se ha reportado que las burbujas de mayor diámetro tienen una mayor velocidad de ascensión que las burbujas más pequeñas. La velocidad de ascensión de las burbujas en el reactor es una medida del recíproco del tiempo de residencia de la fase gaseosa, afectando directamente la retención o el *holdup* (fracción volumen de la mezcla ocupada por la fase dispersa) de ésta fase. Las burbujas muy pequeñas de gas, siguen más fácilmente el movimiento de la fase líquida, contribuyendo a una mayor recirculación de la fase gaseosa y, por lo tanto, al *holdup* del gas en el sistema (Roman y Tudose, 1997a). Li *et al* (1997) y Kim *et al* (1994) han reportado que en ausencia de interacciones, la velocidad de ascensión de la burbuja aumenta con su volumen y parece ser independiente del diámetro del orificio del difusor.

Otro punto de relevancia en el mezclado y en las distribuciones de tamaño de las burbujas de gas en el biorreactor que es importante mencionar es que la introducción de gas en un sistema acuoso causa una disminución en la capacidad de bombeo del impulsor y, por lo tanto, en el flujo del líquido en todos los puntos del tanque, incluyendo la base (Nienow *et al*, 1986). Se ha observado que al aumentar el flujo volumétrico del gas, manteniendo una velocidad de agitación constante, el consumo de potencia disminuye. Esta reducción en la potencia puede explicarse principalmente debido a las cavidades de aire formadas detrás de las paletas de un impulsor de turbina (Roman y Tudose, 1997a), lo que origina una disminución en la capacidad de bombeo del mismo. Este hecho es generalmente más significativo con altas viscosidades de la fase continua que con fluidos de baja viscosidad, a velocidades de agitación similares (McFarlane y Nienow, 1996). La disminución en la potencia suministrada, así como el incremento en la viscosidad de la fase continua pueden afectar adversamente la velocidad de transferencia de masa en los sistemas.

### 2.2.3. Dispersión de fluidos inmiscibles

El transporte de masa a través de interfaces líquido-líquido en tanques agitados mecánicamente es una operación industrial muy común. En éste caso se adiciona una fase inmiscible a un medio acuoso, el sistema es agitado y, en consecuencia, el aceite se dispersa en forma de gotas (Pacek *et al*, 1994). El propósito principal de la agitación es promover un buen contacto entre las fases inmiscibles y aumentar el área interfacial con el fin de incrementar la velocidad de transferencia de masa. La predicción del área interfacial a partir del diámetro promedio de las gotas en dispersiones

es de importancia considerable en operaciones de transferencia de masa en dispersiones líquido-líquido. En éstos procesos es importante operar a una velocidad de agitación que asegure que las dos fases están bien mezcladas y que la fase dispersa está completamente incorporada en la fase continua (Armenante y Huang, 1992). El tamaño de las gotas es una medida del grado de dispersión (Dalmau *et al*, 1998) y está relacionado con la velocidad de transferencia de masa, así como con la velocidad de las reacciones que pueden ocurrir en el bioproceso (Podgórska y Baldyga, 2001).

La distribución de tamaños de gotas presente en el sistema está determinada por un equilibrio dinámico entre la ruptura y coalescencia de las gotas que existe en la dispersión y es una de las características más importantes en dispersiones líquido-líquido (Zhou y Kresta, 1998a). De acuerdo con Hinze (1955) citado por Pacek *et al* (1998), la ruptura de las gotas ocurre cuando las fuerzas hidrodinámicas del fluido que tienden a deformar una gota exceden las fuerzas de tensión interfacial que resisten la deformación. Por lo tanto, al aumentar la velocidad en la punta del impulsor aumentan las fuerzas que tienden a deformar la gota de aceite, reduciendo así su tamaño.

Las distribuciones de tamaño de las gotas pueden variar con la ubicación en el interior del tanque agitado, debido principalmente a las diferencias de energía de disipación entre las zonas del impulsor y aquellas alejadas del mismo. Asimismo, la distribución de tamaños de gotas no es solamente el resultado de procesos de ruptura y coalescencia, sino también de fuerzas de gravedad y de diferentes velocidades de ascensión de gotas de diferentes tamaños (Mlynek y Resnick, 1972, citado por Daglas y Stamatoudis, 2000).

El tamaño promedio y la distribución de tamaños de las gotas dependerá de la geometría del sistema, de las condiciones de la energía suministrada, de la fracción en volumen de la fase dispersa y de las propiedades físicas de ambos líquidos (viscosidad, tensión superficial, hidrofobicidad) (Zhou y Kresta, 1998b), así como de la influencia de terceras especies, tal como partículas sólidas y de las propiedades físicas de éstas. Al igual que con la dispersión de aire, la presencia de agentes surfactantes, electrolitos y algunos otros compuestos presentes en el medio de cultivo de fermentaciones miceliares influyen en la distribución de tamaños de las gotas. Por otro lado, un aumento en la viscosidad aparente de la fase acuosa puede afectar significativamente las distribuciones de tamaño de la fase dispersa.

#### **2.2.4. Análisis de imágenes para caracterizar dispersiones**

Para la caracterización de las dispersiones es común el empleo del diámetro promedio Sauter,  $d_{32}$ . Este parámetro está directamente relacionado con el área interfacial por unidad de volumen,  $a$ , la

cual determina la transferencia de masa (Zhou y Kresta, 1998b). Ambos parámetros se relacionan de acuerdo a las siguientes expresiones:

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

$$a = \frac{6\phi}{d_{32}} \quad (3)$$

en donde,  $n$  es el número de objetos en la población,  $d_i$  es el diámetro de la gota o burbuja  $i$  ( $\mu\text{m}$ ) y  $\phi$  es la fracción volumétrica de la fase inmisible.

Para la determinación del diámetro Sauter a partir de la ecuación (2) se realizan mediciones del diámetro de las gotas o de las burbujas de una población. El  $d_{32}$  también puede ser determinado a partir de la ecuación (3), conociendo  $a$  (Kaireddy y Al Taweel, 1990). Entre otras técnicas (resumidas en la tesis de Brito-Albavera, 2001) la medición del diámetro de las gotas o burbujas puede lograrse mediante la técnica de análisis de imágenes. El fundamento de ésta consiste básicamente en la captura, *en línea*, de imágenes de la dispersión, de las cuales se extrae la información requerida (diámetros de gotas y burbujas) mediante el procesamiento (por medio de una computadora) de las mismas. Para que una imagen pueda ser procesada con una computadora necesita ser digitalizada, es decir, convertida en una forma numérica. Para ello, se divide en una cuadrícula bidimensional, en elementos llamados píxeles. Cada píxel se reconoce por su posición en la cuadrícula y contiene información correspondiente a ese punto de la imagen en *bits* (la menor cantidad de información reconocida por una computadora) (Brito-Albavera, 2001).

La aplicación del estudio cuantitativo de imágenes en la caracterización de dispersiones ha sido usado desde hace muchos años para evaluar dispersiones gas-líquido y líquido-líquido. Anteriormente, el tamaño de las gotas y burbujas fue determinado manualmente a partir de las fotografías de la dispersión (Chen y Middleman, 1967). Actualmente el proceso ha sido optimizado mediante la digitalización y procesamiento de las imágenes en una computadora.

Las ventajas del análisis de imágenes en la caracterización de dispersiones son:

- Permite obtener imágenes del experimento *en línea*, sin necesidad de una toma de muestra.
- La captura casi instantánea de imágenes de la distribución de tamaños de gotas, permite un análisis cuantitativo de la dispersión, así como de la estructura de la dispersión. Por ejemplo, la

presencia de burbujas en gotas, gotas en gotas, interacciones aceite-micelio, aire-micelio, aceite-aire-micelio.

- Permite la revisión de detalles en las imágenes sin necesidad de repetir el experimento y la reutilización de las mismas para proveer más datos si son necesarios.
- Permite cambiar de magnificación rápidamente, lo cual permite un análisis detallado de una cola larga o pequeña de distribuciones muy amplias.

Las mayores desventajas de ésta técnica son:

- El análisis de datos es más lento que para técnicas automáticas que combinan la dispersión de luz y el efecto Doppler para determinar el tamaño de partículas (Zhou y Kresta, 1998a y b).
- Otra desventaja es que a mayores volúmenes de la fase dispersa o con la presencia de sólidos suspendidos, la observación es limitada (Pacek *et al*, 1994), debido a un oscurecimiento de las imágenes. En este caso, la utilización de una lente colimadora (que concentra e intensifica el haz de luz emitido, ver Brito-Albavera, 2001) puede ser de utilidad.
- El arreglo experimental del sistema está limitado a monitorear la región de la pared (transparente) de un tanque agitado. Sin embargo, los sistemas de fibra óptica y las técnicas de iluminación avanzadas ofrecen el potencial de un arreglo espacialmente más versátil.

## 2.2.5. Efectos de la presencia de partículas sólidas en sistemas multifásicos

### 2.2.5.1. Efecto de las partículas sólidas sobre la turbulencia

Se sabe que existe una relación entre la turbulencia y la ruptura de las gotas dispersas en un tanque agitado (Kresta, 1998). El nivel de turbulencia ha sido representado por la escala de longitud de Kolmogorov (ver ecuación 1), que ha sido empleada como una estimación del tamaño mínimo de gota generado en las dispersiones (Zhou y Kresta, 1998b). En sistemas multifásicos tiene lugar la interacción entre las partículas suspendidas y el rango de escalas de las *eddies* de Kolmogorov, el cual puede ser modificado por la presencia de las partículas sólidas (Schreck y Kleis, 1993). Gore y Crowe (1989) mencionan que las partículas sólidas pueden causar un aumento o disminución en la intensidad de la turbulencia, dependiendo del tamaño relativo de las partículas con respecto a la escala de longitud de las *eddies* en el fluido. Los autores relacionaron el tamaño de las partículas sólidas con su efecto sobre la turbulencia. En particular, reorganizaron los datos experimentales de varios autores acerca de la modificación de turbulencia por partículas sólidas dispersas. Estos

autores propusieron que la forma en la cual el nivel de turbulencia es modificado depende solamente del tamaño de la partícula. Encontraron que las partículas pequeñas (relativas a la escala de longitud de *eddies* turbulentas de la fase fluida) redujeron la turbulencia, mientras que las partículas grandes la incrementaron. Sugieren que las partículas pequeñas con respecto a la escala de longitud de las *eddies* turbulentas extraen energía de las *eddies*, disminuyendo así el nivel de turbulencia. Mencionan que el efecto de disminución de la turbulencia por las partículas pequeñas debería estar relacionado con la transformación de parte de la energía de la *eddy* en energía cinética de la partícula. Por otro lado, las partículas grandes causan una estela de turbulencia detrás de sí (*vortex shedding*), incrementando así la turbulencia en la escala de *eddies* con mayor energía. A partir de su correlación parece que el efecto de disminución de la turbulencia es pequeño, mientras que el aumento de la turbulencia por partículas grandes es más pronunciado.

Brilman *et al* (1999) mencionan que las partículas relativamente grandes pueden interactuar con las fluctuaciones de la macroescala de turbulencia e incrementarla por la estela de turbulencia generada detrás de las partículas (*vortex shedding*). Las partículas ligeras y pequeñas tienden a interactuar con las fluctuaciones de la microescala de turbulencia y es probable que la energía sea principalmente disipada por interacciones partícula-partícula (disminución de la turbulencia o *turbulence damping*).

Barresi (1997) y Elgobashi (1994) usando el número de Reynolds de la partícula, encontraron que aquellas partículas con número de Reynolds bajo tendieron a disminuir la turbulencia. Por otro lado, consideran que el incremento de la turbulencia (probablemente por la estela de turbulencia generada detrás de la partícula o *vortex shedding*) ocurre a altos números de Reynolds de la partícula ( $> 400$ ), requiriendo partículas relativamente grandes y diferencias de densidad altas entre la fase continua y las partículas sólidas. Estos autores mencionan también que el área superficial de la fase sólida está relacionada con la disipación / producción de la energía de turbulencia en suspensiones diluidas. Al incrementar el área superficial de la fase sólida, se incrementa la velocidad de disipación de energía.

Schreck y Kleis (1993) estudiaron el efecto de partículas sólidas esféricas (600-710  $\mu\text{m}$ , de plástico ( $\rho = 1045 \text{ kg/m}^3$ ) y vidrio ( $\rho = 2400 \text{ kg/m}^3$ ), en concentraciones de 0.4, 0.8, 1.2 y 1.5 %) sobre la turbulencia en sistemas líquido-sólido. En su estudio observaron un incremento monótonico en la velocidad de disipación de energía con la concentración de partículas. Una posible explicación del incremento de la velocidad de disipación observado está dado por Derevich (1987) citado por Schreck y Kleis (1993), quien argumenta que las partículas pueden alterar la transferencia de energía de *eddies* mayores a *eddies* más pequeñas.

Bennington y Bourne (1990) y Bennington y Thangavel (1993) usaron una reacción sensible al mezclado para estudiar el efecto de partículas de *nylon* suspendidas sobre el macromezclado y el micromezclado en un tanque agitado. Encontraron que las fibras disminuyeron el nivel de turbulencia, que fue atribuido a la formación de una red por las fibras. Sugieren que la presencia de fibras afecta tanto el macromezclado como el micromezclado dentro de un tanque y tiene consecuencias importantes para las reacciones químicas llevadas a cabo en la suspensión. En varios de los estudios donde se ha estudiado la turbulencia en suspensiones de fibras de pulpa de papel han mostrado una reducción en la intensidad de la turbulencia incluso en bajas concentraciones (0.5%) (Bennington y Thangavel, 1993).

Rewatkar y Bennington (2000) sugieren que las suspensiones de fibras de papel forman redes arriba de una concentración crítica, la cual depende de las propiedades de la fibra (longitud, irregularidad en el perímetro). Estos autores reportan una disminución en la turbulencia conforme se incrementó la concentración de fibras. Esta disminución es atribuida a la energía de disipación por la fricción en puntos de contacto fibra-fibra y por los movimientos relativos de unas fibras con otras en el flujo, hecho que remueve energía de las *eddies* turbulentas. Andersson y Rasmuson (2000) sugieren que los puntos de contacto entre las fibras es importante. Las fibras de vidrio son rectas y lisas, mientras que las fibras de pulpa presentan más curvaturas, y es, por lo tanto, posible que las fibras de vidrio presenten un esfuerzo muy bajo para romper la red formada, comparada con la de fibras de pulpa a la misma concentración.

#### **2.2.5.2. Efecto de la presencia de partículas sólidas sobre el área interfacial de fases dispersas**

Otro fenómeno que puede ser causado por la presencia de partículas es que éstas pueden colisionar y romper las burbujas de gas en tamaños más pequeños y generar una mayor área interfacial específica,  $a$  (Zhao *et al*, 1999).

Las partículas sólidas pueden afectar el tamaño de la burbuja (y por lo tanto, el área superficial y el *holdup*). Las partículas pequeñas se pueden adherir a la superficie de las burbujas, disminuyendo la coalescencia e incrementando  $a$ . Las partículas grandes pueden romper las burbujas, mejorando la coalescencia (reduciendo  $a$ ). El efecto global dependerá de las características de los sólidos (Nienow *et al*, 1986).

Kim *et al* (1994) han reportado -para sistemas de lechos fluidizados con partículas de vidrio -que el *holdup* de la fase dispersa,  $\phi_d$ , es mayor en el caso de partículas de 3 mm que en el caso de aquellas

de 1.7 mm. Mencionan que las gotas de keroseno pueden romperse en el lecho de partículas de 3 mm, pero pueden coalescer en el lecho de partículas de 1.7 mm. Kim *et al* (1989) han reportado que el diámetro de partículas crítico que caracteriza la frontera entre la coalescencia y la ruptura de gotas es de 2.3 mm en lechos fluidizados. Estos autores mencionan que en el lecho conteniendo partículas grandes, la fuerza de inercia de la partícula es mayor que las fuerzas viscosas y de tensión superficial de los fluidos, porque la gota se rompe sin importar la velocidad de la fase dispersa. Así, las gotas son dispersadas por el mayor momento generado por las partículas grandes.

Se ha tratado de mejorar la velocidad de transferencia de masa mediante la ruptura de burbujas por partículas grandes en lechos fluidizados. Kang *et al* (1991) emplearon “rompedores” de burbujas constituidos de esferas de acrílico de 15 mm de diámetro y encontraron que el coeficiente de transferencia de masa volumétrica se mejoró hasta en un 25 %. Los autores mencionan que es fácil observar cómo las burbujas grandes ascendiendo son dispersadas por los “rompedores” y que para dispersar efectivamente las burbujas grandes, el tamaño de los “rompedores” debería también ser relativamente grande.

Kawase *et al* (1997) mencionan que en sistemas gas-líquido-sólido agitados mecánicamente con soluciones no-Newtonianas de carboximetilcelulosa (CMC), la presencia de partículas sólidas (esferas de 2 mm de diámetro) puede mejorar la ruptura de burbujas grandes formadas debido a la coalescencia. Reportan que la ruptura de burbujas por los sólidos adicionados causó un incremento en el área interfacial y, por lo tanto, en el  $k_L a$ . Además, incrementó la turbulencia interfacial, que parece resultar en una mayor retención del gas. Por otro lado, Brehm *et al* (1984) citado por Roman y Tudose (1997b) mencionaron que a velocidades de agitación moderadas ( $N < 15 \text{ s}^{-1}$ ), las partículas sólidas pueden moverse independientemente de los elementos de fluido y romper la interfase gas-líquido.

### **2.2.5.3. Efecto de los sólidos sobre la retención volumétrica y dispersión de la fase gaseosa**

Varios investigadores han reportado la influencia de los sólidos (y sus propiedades físicas) en la retención o *holdup* de la fase gaseosa,  $\phi_g$ . El *holdup* es la fracción volumen de la mezcla ocupada por la fase dispersa (Jamialahmadi y Steinhagen, 1991). Dada la compleja morfología de las partículas miceliales, un sistema con micelio es físicamente muy diferente a un sistema con otro tipo de partículas sólidas. Sin embargo, se ha observado que la presencia de micelio en el sistema pudiera tener alguna similitud con los efectos reportados por partículas sólidas en otros sistemas. Con base en lo anterior, en esta sección se ha revisado la literatura que reporta el efecto de las

partículas sólidas sobre el *holdup* y la dispersión de la fase gaseosa. Se resaltan los estudios que involucran fibras de pulpa de papel como partículas sólidas, las cuales presentan mayor grado de irregularidad en su perímetro que otro tipo de partículas sólidas, asemejándose, en este aspecto, a las partículas de micelio disperso.

Ozkan *et al* (2000) sugieren que pudiera esperarse una disminución en el  $\varphi_g$  y, en consecuencia, en el área superficial específica en tanques agitados conforme la fracción volumétrica de sólidos se incrementa. Kawase *et al* (1997) sugieren también que la presencia de sólidos puede ser responsable de una disminución en el  $\varphi_g$  en tanques agitados. Por otro lado, Rewatkar y Bennington (2000) estudiaron la transferencia de masa gas-líquido en suspensiones de fibras de pulpa de papel en mezcladores de paletas inclinadas. Los autores reportaron una disminución en el  $k_L a$  debido a la presencia de fibras en el sistema. Sugieren que ésta disminución es probablemente debida a una menor cantidad de gas disperso en la suspensión conforme se incrementó la concentración de fibras de pulpa de papel. Con respecto al  $\varphi_g$ , es importante considerar el tamaño y la velocidad de ascensión de las burbujas. Roman y Tudose (1997a) reportaron una mayor contribución de las burbujas pequeñas sobre el  $\varphi_g$  en el sistema. Banisi *et al* (1995b) indicaron que -como observación general- un aumento en la velocidad de la burbuja causará una disminución en el  $\varphi_g$  y viceversa.

Banisi *et al* (1995a) resumen una lista de publicaciones acerca del efecto de los sólidos (y sus propiedades físicas: tamaño, concentración y densidad y las condiciones operacionales: dimensiones de la columna y el flujo de gas) sobre el  $\varphi_g$  en columnas de burbujeo gas-líquido-sólido. Con base en esto, Banisi *et al* (1995a) sugieren que para partículas muy finas ( $< 10 \mu\text{m}$ ) en bajas concentraciones de sólidos ( $< 0.6 \%$ ) y partículas muy grandes ( $> 2000 \mu\text{m}$ ) en altas concentraciones de sólidos ( $> 10 \%$ ), tienden a incrementar el  $\varphi_g$ . Para el rango de tamaño de partícula intermedio ( $10\text{-}2000 \mu\text{m}$ ) y concentraciones de sólidos moderadas ( $> 3 \%$  v/v) el efecto es una disminución en el  $\varphi_g$ . Estos autores estudiaron el efecto de las partículas sólidas (sílica, calcita y carbón) y sus propiedades físicas (concentración, tamaño y tipo) sobre el  $\varphi_g$ . En todos los casos, los autores reportan una disminución en el  $\varphi_g$  (con respecto al sistema aire-agua) debido a la presencia de partículas sólidas.

En la segunda parte de su estudio, Banisi *et al* (1995b) proponen diferentes mecanismos para explicar la reducción en el  $\varphi_g$  debido a la presencia de partículas sólidas en el sistema. Mencionan que ni la coalescencia de las burbujas (por la mayor viscosidad originada por la presencia de los sólidos) ni los cambios en la densidad de la suspensión originaron la reducción en el  $\varphi_g$ . Estos autores sugieren que probablemente el incremento en la viscosidad debido a la presencia de sólidos,

causó una estabilización y un mayor tamaño de la estela de turbulencia generada detrás de las burbujas en ascensión. Mencionan que el fenómeno anterior ocasiona que la velocidad de ascensión de las burbujas cercanas a una estela de turbulencia sea mayor. La mayor velocidad de ascensión (un incremento de hasta un 40 % con respecto al sistema aire-agua) resultante, reduce el  $\varphi_g$ .

Janse *et al* (1999) estudiaron el efecto de la presencia de fibras de pulpa de papel sobre el  $\varphi_g$  en columnas de flotación. Estos autores reportan una disminución en el  $\varphi_g$  con un incremento en la concentración de fibras. Lindsay *et al* (1995) y Reese *et al* (1996) reportan también una disminución significativa en el  $\varphi_g$  (relativo al agua) con una concentración de fibras de 0.1-1 y de 1-2 %, respectivamente. Sugieren que un mecanismo que pudiera explicar el menor  $\varphi_g$  es la coalescencia de las burbujas grandes que ascienden más rápidamente que las burbujas pequeñas y tienen un tiempo de retención reducido y, por lo tanto, un  $\varphi_g$  más bajo. Joosten *et al* (1977) observaron una disminución en el  $\varphi_g$ , lo cual fue atribuido al efecto promotor de la coalescencia por los sólidos, que promueve un incremento en el tamaño y velocidad de la burbuja y por lo tanto una disminución en el  $\varphi_g$ . Padmavathi y Rao (1992) observaron también una disminución en el  $\varphi_g$  del gas al incrementar la viscosidad y mencionan que este efecto puede ser atribuido a una mayor coalescencia de las burbujas.

Tsustsumi *et al* (1991) mencionan que, en contraste con lo que sucede con partículas hidrofílicas, las partículas hidrofóbicas se unen a las burbujas, lo cual puede alterar su movimiento suficientemente para tener un efecto adicional en el  $\varphi_g$ . La adhesión de partículas sólidas hidrofóbicas a burbujas de aire, también ha sido reportado por Pelton y Piette (1992).

Jamialahmadi y Steinhagen (1991) estudiaron los efectos de la fase sólida y su concentración sobre el  $\varphi_g$  y la coalescencia de burbujas, en columnas de burbujeo. Usando partículas plásticas sólidas con diferente densidad, tamaño y propiedades superficiales, observaron que el  $\varphi_g$  se redujo incluso con la adición de pequeñas cantidades de sólidos. La mayor reducción en el  $\varphi_g$  ocurrió para las partículas más pequeñas (0.8 mm) con una densidad de 1.2 g/cm<sup>3</sup>. El  $\varphi_g$  aumentó al incrementar el tamaño de partícula y al disminuir la densidad de ellas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Evaluar la dispersión y distribución de tamaños de las gotas del aceite de ricino y de las burbujas de aire en un sistema modelo de fermentación multifásico, como función de la concentración y la morfología del micelio.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Identificar las mejores condiciones de cultivo para la producción de *pellets* y de micelio disperso por *Trichoderma harzianum*.
- Evaluar la influencia de la concentración y la morfología del micelio de *Trichoderma harzianum* en la dispersión del aceite de ricino, en un sistema modelo de tres fases (medio acuoso - aceite de ricino – micelio de *Trichoderma harzianum*).
- Evaluar la influencia de la concentración y la morfología del micelio de *Trichoderma harzianum* en la dispersión del *aceite de ricino*, en un sistema modelo de cuatro fases (medio acuoso - aceite de ricino – aire – micelio de *Trichoderma harzianum*).
- Evaluar la influencia de la concentración y la morfología del micelio de *Trichoderma harzianum* en la dispersión del *aire*, en un sistema modelo de cuatro fases (medio acuoso - aceite de ricino – aire – micelio de *Trichoderma harzianum*).
- Analizar la proporción de burbujas dentro de gotas de aceite y de burbujas libres en el sistema modelo de fermentación de cuatro fases.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Materiales

#### 4.1.1. Microorganismo

En este estudio se usó el hongo *Trichoderma harzianum* var. *rifaii* obtenido de la colección del *International Mycological Institute* (IMI, UK), número IMI 206040. El microorganismo liofilizado se cultivó en tubos de ensayo (*slants*) en medio de Agar de Dextrosa y Papa (PDA, Bioxon) que fueron almacenados a 4°C. Para el mantenimiento de la cepa se realizaron resiembras mensuales.

#### 4.1.2. Obtención y conteo de las esporas

De la cepa en el *slant* se dispersó el inóculo mediante una asa de cultivo sobre el área de contacto en la caja Petri conteniendo medio fresco (PDA). Siguiendo la incubación de 6 días a 29°C, las esporas fueron enjuagadas 2 o 3 veces (con movimientos circulares de la caja Petri) con 5 ml de una solución salina (9 g/l NaCl y Tween 40 al 0.05%) previamente esterilizada y a temperatura ambiente. Posteriormente, la suspensión de esporas se diluyó con el resto de la solución salina preparada (200 ml). Ésta suspensión se mantuvo en agitación suave durante 20 minutos para la separación de las esporas y se determinó enseguida la concentración de esporas mediante una cámara de Neubauer, utilizando el objetivo 20X de un microscopio (Nikon Optiphot-2). Esta suspensión de esporas se usó para inocular tanto matraces de 500 ml para la producción de *pellets*, como los fermentadores de 14 l, para producción del micelio disperso.

#### 4.1.3. Medios de cultivo

La composición del medio de cultivo (en g/l, excepto el Tween 40) para la producción de *pellets* y micelio disperso se muestra en la **tabla 4.1**. La fuente de carbono (dextrosa, Arancia, México) se diluyó en el 50 % del volumen de agua destilada, para su esterilización por separado, mientras que las sales y otros componentes se diluyeron en el 50 % del agua destilada restante, ajustando el pH de ésta solución con HCl concentrado para la morfología dispersa y con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85 % para la morfología en *pellets*. Posteriormente, se llevó a cabo la esterilización en autoclave a 120°C durante 20 minutos. Una vez a temperatura ambiente, la solución de azúcar se mezcló asépticamente con la solución de sales en el fermentador, haciendo uso de una bomba peristáltica (Cole-Parmer, modelo 7014-20). En los matraces esto se logró mezclando un volumen de la solución de azúcar con un volumen de la solución de sales.

**Tabla 4.1. Composición del medio de cultivo para la producción del hongo en *pellets* y micelio disperso.**

compuesto (g/l)	<i>pellets</i>	micelio disperso
Dextrosa	50	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.38	6.38
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5	5
NaHPO <sub>4</sub>	2	2
MgSO <sub>4</sub>	1.5	1.5
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.067	0.067
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0001	0.0001
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.008	0.008
<i>Tween</i> 40 (gotas/l)	5	10
Extracto de levadura	-	1
PEG 20000	-	0.5
pH inicial	5.6	3.0*

\* A las 36 h de cultivo el pH fue ajustado a 4.0 mediante una adición puntual de NH<sub>4</sub>OH.

## 4.2. Fermentaciones

### 4.2.1. Producción del hongo en forma de *pellets*

La morfología en *pellets* fue producida en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 100 ml de volumen de trabajo incubados durante 108 h a 29 ± 1°C en una incubadora agitada mecánicamente (New Brunswick Scientific, Edison, NJ). La velocidad de agitación fue de 200 rpm. La concentración de esporas en el inóculo fue de 10<sup>3</sup> esporas/ml.

Con el fin de obtener una mayor cantidad de *pellets* por lote se intentó producirlos en biorreactores de 14 l, con 10 l de volumen de trabajo. Se utilizó una configuración de reactor de cuatro difusores sinterizados en forma de cruceta (**figura 4.1**). La velocidad de agitación en este caso fue 100 rpm.

### 4.2.2. Producción del hongo como micelio disperso

La producción del micelio disperso se llevó a cabo en un biorreactor agitado (Labroferm FS-314 New Brunswick Scientific, Edison, NJ), equipado con electrodos de pH y oxígeno disuelto (Ingold, EUA). El diámetro interno del biorreactor es de 0.21 m y la relación H/T es de 3:1. El sistema de agitación consistió de tres turbinas Rushton (D/T = 1/3), cada una con 6 paletas planas, operando a una velocidad de agitación de 200 rpm. El suministro de oxígeno al medio se hizo mediante aire filtrado con un prefiltro de fibra de vidrio y un filtro (Sartorius) con un tamaño de poro de 0.22 μm. Se utilizó un difusor de punto y una aireación inicial de 0.4 vvm, incrementándose a 1 vvm a las 36

h de cultivo hasta la cosecha del mismo, a las 72 h. La temperatura del cultivo se mantuvo a  $29 \pm 1^\circ\text{C}$  mediante un baño de recirculación. El pH inicial fue de 3.0 y a las 36 h de cultivo se ajustó a 4.0 mediante una adición puntual de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a través del puerto de inoculación. En caso de ser necesario se adicionó octametilciclotetrasiloxano (Corning, EUA) como antiespumante, mediante el uso de una bomba peristáltica (Cole-Parmer, modelo 7014-20). El volumen de trabajo fue de 10 l. La concentración de esporas en el inóculo fue de  $10^4$  esporas/ml.

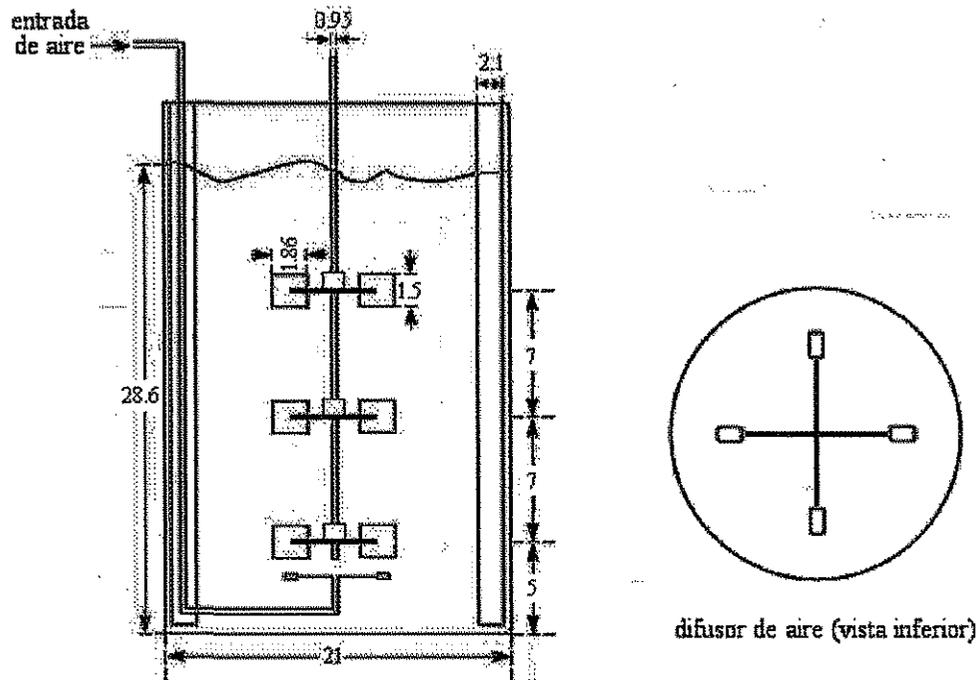


Figura 4.1. Configuración de biorreactor para la producción de *pellets* (dimensiones en cm).

### 4.3. Equipos y métodos analíticos

#### 4.3.1. Evaluación de la concentración de biomasa

La concentración de biomasa fue determinada mediante la técnica de peso seco, filtrando una muestra ( $\approx 5$  ml) mediante una membrana (2.5 cm de diámetro) recortada de papel filtro (Whatman No. 1), previamente tarada y a peso constante. Durante la filtración se realizaron dos lavados con agua destilada para eliminar residuos de sales. El filtrado de células se secó a  $85^\circ\text{C}$  en una estufa (Hoffmann Pinther & Bosworth, EUA) durante 12 h y posteriormente se dejó enfriar en un desecador para ser pesado nuevamente. La concentración de biomasa se calculó mediante la ganancia en peso de la membrana y se expresó como gramos de biomasa por litro.

### 4.3.2. Caracterización reológica

Para la caracterización reológica de las muestras de micelio disperso o en *pellets* se utilizó un reómetro Contraves Rheomat 120 (Contraves, Zurich, Suiza) operando a 29°C, con un impulsor helicoidal (IH2) para evitar los problemas de separación de fases y sedimentación del micelio que han sido observados con el dispositivo de aguja *vane* (Godoy-Silva, 1998). El reómetro está conectado a una computadora PC para la entrada y adquisición de datos. La descripción de este equipo ha sido detallada por Godoy-Silva (1998).

### 4.3.3. Determinación de la tensión superficial

La tensión superficial de las suspensiones fue determinada mediante la técnica Du Nuoy, haciendo uso de un tensiómetro de anillo (Fisher, Modelo 21). Este aparato mide la fuerza necesaria para jalar un anillo de platino-iridio, de dimensiones conocidas, de la superficie líquido-aire y es directamente convertida en tensión superficial, la cual es leída en el lector calibrado (en dinas/cm). Para los detalles se refiere al lector a los manuales del equipo.

### 4.3.4. Determinación de la potencia suministrada

La medición de la potencia mecánica disipada por el impulsor se llevó a cabo a través de un dinamómetro de cojinete neumático descrito en detalle por Reséndiz *et al* (1991). La técnica de medición consistió en determinar el torque transmitido al dinamómetro por una turbina de disco sumergida en el fluido de un tanque de 0.21 m de diámetro, que se encuentra soportado sobre un cojinete neumático. Mediante éste arreglo, la fricción estática entre las superficies del cojinete neumático y del tanque de mezclado rotando, es virtualmente eliminada. El torque ejercido por el agitador en el tanque se evaluó midiendo la fuerza que actúa en una celda de carga conectada con una balanza electrónica. Se tomó la media aritmética de 20 lecturas de torque para cada conjunto de condiciones. La incertidumbre obtenida en las mediciones de torque fue menor al 1 %.

### 4.3.5. Caracterización morfológica

#### 4.3.5.1. Sistema de análisis de imágenes

La morfología del micelio fue evaluada usando un sistema de análisis de imágenes (**figura 4.2**). El sistema consistió de una cámara CCD (Nikon Color, KP-D50) montada en el microscopio (Nikon Optiphot-2) o una cámara CCD (Nikon KP-160) montada en el estereomicroscopio (Olympus

SZ40). Para acoplar la cámara al estereomicroscopio se usó un triocular Olympus SZ-CTV. Las cámaras están conectadas a una computadora (PC). La captura de la imagen se hizo a través del programa comercial *Image Pro Plus 4.1* (Media Cybernetics, MD, EUA). Se ajustó la iluminación, el contraste y el enfoque del campo, con el fin de obtener imágenes nítidas adecuadas para su procesamiento posterior. En cada caso se usó una calibración específica (establecida previamente) de acuerdo con la magnificación seleccionada en el microscopio.

La evaluación morfológica del micelio disperso y de los *pellets* fue llevada a cabo usando el microscopio y el estereomicroscopio, respectivamente, aunque la mayoría de las muestras requirieron el uso de ambos. Las magnificaciones utilizadas fueron 4X y 2.5X en el microscopio y estereomicroscopio, respectivamente. Se analizaron 300 objetos por muestra para asegurar un error estimado menor al 10 % con respecto al promedio, con un intervalo de confianza del 95 %.

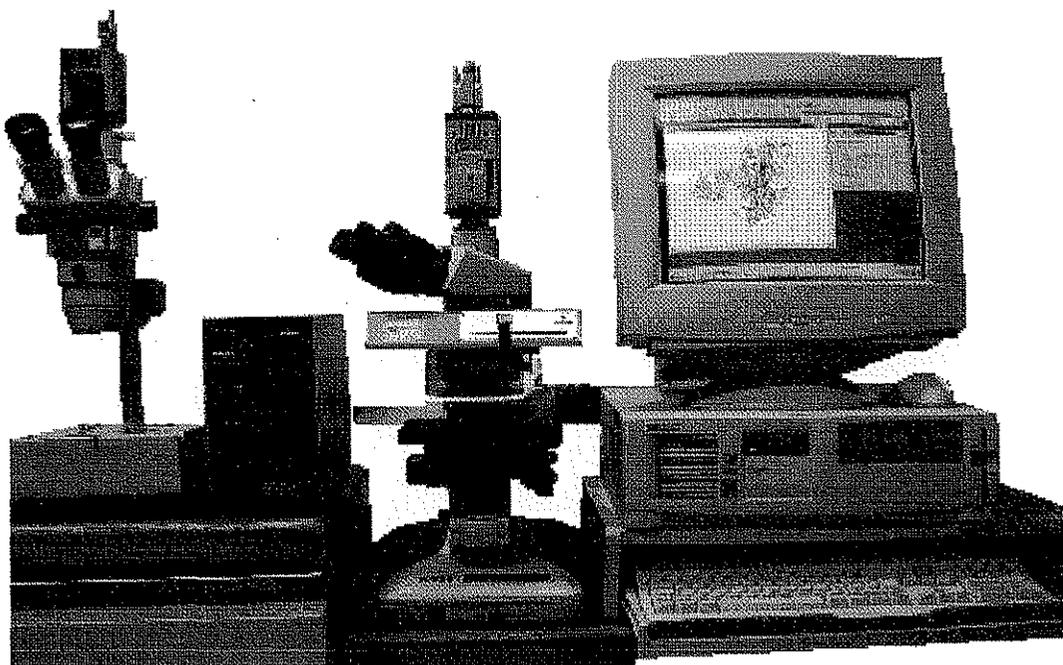


Figura 4.2. Sistema de análisis de imágenes para la caracterización morfológica del micelio.

#### 4.3.5.2. Preparación de la muestra

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Una muestra de biomasa fresca (20 ml) se diluyó con el mismo volumen de solución fijadora de formalina (Packer y Thomas, 1990) (13 ml de formaldehído al 40 %, w/v, 5 ml de ácido acético glacial y 200 ml de etanol al 50 % w/v). Al momento del análisis morfológico, la muestra fijada fue diluida en una proporción 1:20 con agua destilada para separar los agregados del micelio libre disperso. Se usó una solución de azul de metileno (1.3 g/l y filtrada en membranas Millipore de 0.45

µm para eliminar las partículas del colorante no disueltas) con el fin de producir una coloración oscura del micelio y mejorar su visualización bajo un campo brillante de iluminación. Una vez agitada la suspensión de células y colorante, se tomó una muestra de 30 µl (usando puntas de 200 µl con el extremo cortado para evitar cualquier alteración en la morfología y/o un tamaño miceliar preferencial) y se dispersó sobre la superficie de un portaobjetos. Enseguida se colocó un cubreobjeto. Durante el análisis, la muestra fue humedecida con agua destilada en las orillas del cubreobjeto aproximadamente cada hora, para evitar que el micelio se secase.

#### 4.3.5.3. Procesamiento digital de las imágenes

Mediante el uso de una cámara de video conectada al microscopio, es posible capturar la imagen de un campo en el portaobjetos. Ésta se envía a la computadora, para su procesamiento subsecuente, el cual se resumió en la figura 2.3. En el apéndice B se hace una descripción general del uso del programa *Image Pro Plus*. Para una descripción más detallada se sugiere la revisión del manual del programa.

Los parámetros morfológicos evaluados del micelio fueron el diámetro promedio ( $d_p$ ) y la circularidad (R). La figura 4.3 muestra esquemáticamente cómo el programa *Image Pro Plus* realiza la determinación del diámetro promedio (a) mediante una serie de trazos a través del centro de gravedad del micelio y la circularidad (b) como una medida de la irregularidad del perímetro del micelio.

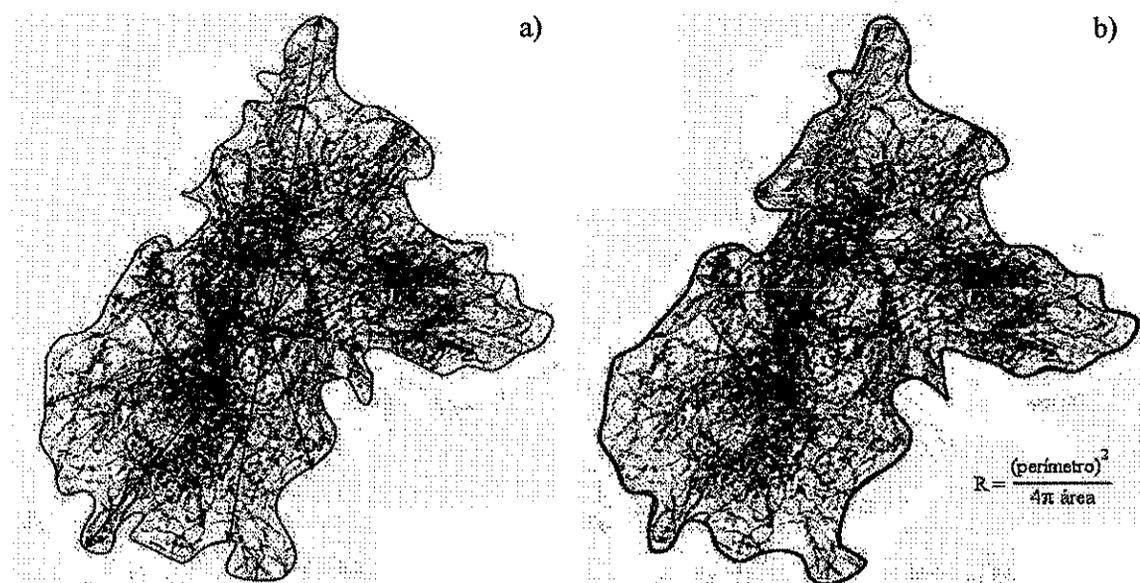
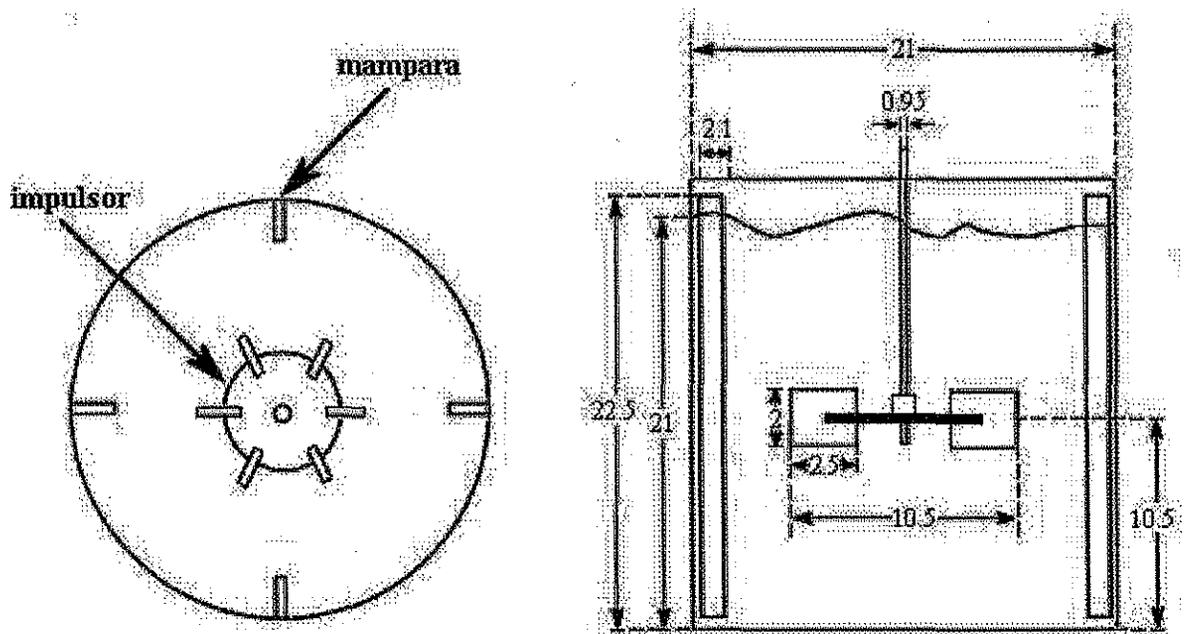


Figura 4.3. Determinación de (a) diámetro promedio,  $d_p$ , y (b) circularidad, R, del micelio.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 4.3.6. Descripción del equipo de agitación-aireación

Se utilizó un tanque de mezclado para simular las condiciones de la fermentación. Este sistema modelo permitió tener flexibilidad en el control de las variables de interés en el presente trabajo (concentración y morfología de la biomasa). El tanque de mezclado consistió en un cilindro de vidrio de 0.21 m de diámetro interno y una altura de 0.24 m ( $H/T = 1$ ), con cuatro mamparas y una turbina Rushton ( $D/T = 1/2$ ) de 6 paletas de acero inoxidable, operando a una velocidad de agitación de 200 rpm. La **figura 4.4** muestra las características geométricas del tanque de mezclado utilizado. En todos los experimentos, la temperatura del interior del tanque y de la chaqueta se mantuvo en 29°C mediante un baño de recirculación (Polyscience, México).



**Figura 4.4.** Características geométricas del tanque de mezclado utilizado en los experimentos.

#### 4.3.6.1. Diseño de los experimentos

Es importante mencionar que los experimentos estuvieron diseñados para evaluar el efecto de la presencia de micelio como partículas sólidas inertes sobre la dispersión del aceite de ricino y del aire. Es decir, en el diseño experimental se tuvieron en cuenta aquellos factores que pudieran afectar las dispersiones y tratar de controlarlos, para atribuir los resultados únicamente al efecto de la concentración y la morfología del micelio. Uno de los factores de mayor relevancia fue el de tener al hongo inactivo o con una actividad metabólica mínima durante los experimentos. En este caso, se

consideró inactivar al hongo mediante su exposición a altas temperaturas. Sin embargo, la inactivación del hongo por temperatura podría causar algún efecto en las propiedades del micelio, tal como en la hidrofobicidad de las paredes celulares y, probablemente, alguna alteración en la morfología del micelio. Esto desviaría significativamente las propiedades del micelio que no ha sido tratado con altas temperaturas, es decir, tal como crece bajo las condiciones de fermentación. Más adelante se mencionará la importancia de la hidrofobicidad del micelio en las dispersiones.

Con base en lo anterior se tomaron varias medidas. Una vez cosechado el micelio fue enjuagado cuatro veces con suficiente agua destilada en cada lavado, agitando manualmente con la manos cubiertas con guantes de látex. El propósito de ésta etapa fue lograr la eliminación del medio agotado de la superficie miceliar. El medio agotado puede contener compuestos tensoactivos que afecten la dispersión del aceite y del aire.

La biomasa se enjuagó al cosecharla y se utilizó inmediatamente para realizar los experimentos. Durante el experimento el resto del micelio se mantuvo en un recipiente cubierto y en refrigeración.

El medio acuoso utilizado en los experimentos de dispersión no contiene dextrosa como fuente de carbono, la cual sí se utilizó en el medio para producir el micelio. El medio acuoso sin dextrosa contiene aceite de ricino; sin embargo, el hongo necesitaría un tiempo “lag” para sintetizar las lipasas que degradan el aceite de ricino. Cuando se inoculó con micelio, el crecimiento del hongo inicia (dependiendo de las condiciones) después de 12 h (Rocha-Valadez, 1999), tiempo que es mucho mayor que el de duración de un experimento típico (7 h, como máximo).

La liberación de proteínas (*i.e.* lipasas) por el hongo durante el tiempo del experimento causaría algún efecto en la tensión superficial del medio. En este caso, se determinó la tensión superficial del medio acuoso como función del tiempo del experimento (figura 4.5). Se observó una pequeña diferencia de los sistemas con biomasa con respecto al control (sin biomasa). En los sistemas con biomasa la tensión superficial disminuyó ligeramente con el tiempo del experimento, sin embargo esta disminución es muy pequeña para originar cambios en el diámetro Sauter de las gotas o burbujas. Durante la primer hora del experimento, la tensión superficial en todos los casos es prácticamente la misma, mientras que sí se observaron cambios en el diámetro Sauter de las gotas o de las burbujas en ese periodo (ver figuras 5.24 y 5.42). Adicionalmente, la tensión superficial en ninguno de los casos correlacionó con el diámetro Sauter de las gotas o burbujas (una disminución monótonica en el diámetro Sauter como resultado de la disminución en la tensión superficial). A partir de éstas observaciones se puede afirmar que los cambios observados en el tamaño de gotas y burbujas, pueden ser atribuidos únicamente a la concentración y a la morfología del micelio.

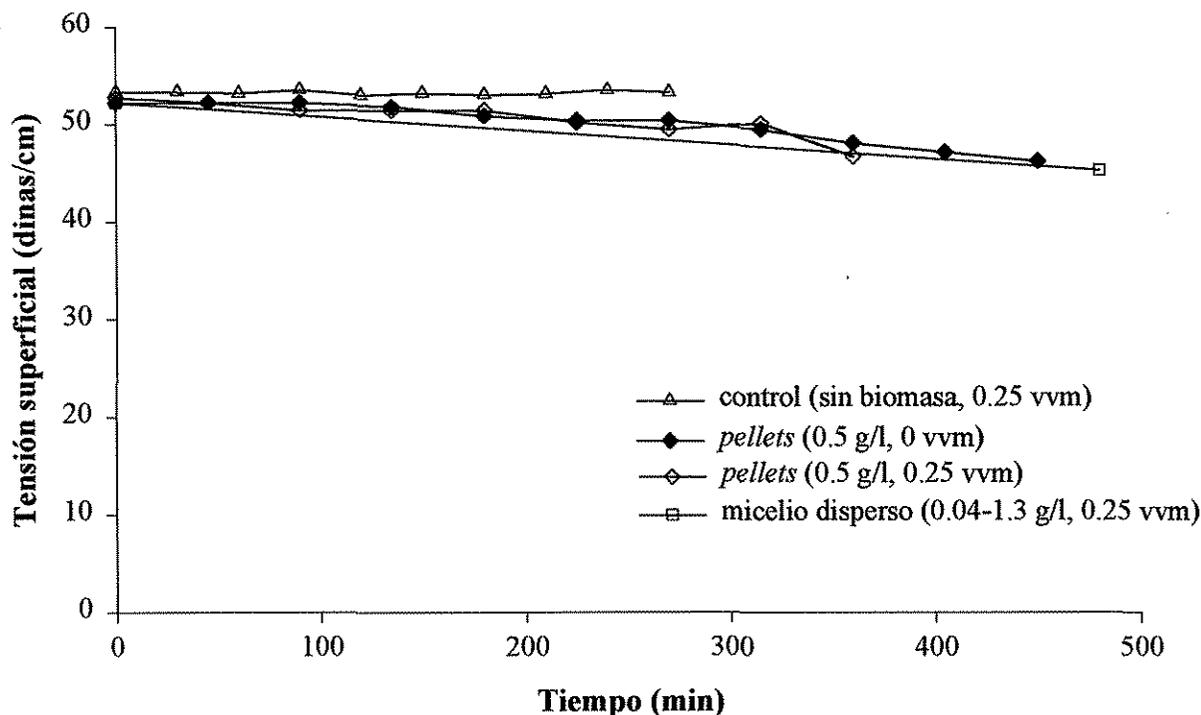


Figura 4.5. Determinaciones de la tensión superficial durante los experimentos.

#### 4.3.6.2. Descripción de un experimento típico

Un experimento típico consistió en cosechar la biomasa producida en las fermentaciones y enjuagarla tres veces con agua destilada, para separar el caldo agotado. En el caso de la morfología en *pellets*, al mismo tiempo de enjuagar se hizo un tamizado de la biomasa utilizando un tamiz (ver figura 4.6a) implementado con una malla de mosquitero (de tamaño de poro 2.5 mm), con el fin eliminar cualquier fracción de micelio disperso y *pellets* muy pequeños. Para enjuagar el micelio disperso se utilizó una tela filtro (usadas en queserías, marca Magitel). Generalmente, la tela filtro se fija a un vaso de precipitado de 5 litros (ver figura 4.6b). Se tomaron volúmenes de aproximadamente 1 litro (volumen que puede ser manejado adecuadamente en el tamiz y en la tela filtro) de la biomasa cosechada. Ésta se filtra y enjuaga con tres volúmenes de 4 litros de agua destilada. Una vez que se ha enjuagado la biomasa, ésta se mantiene en refrigeración en lo que se lleva a cabo el montaje del equipo y enseguida se lleva a cabo el experimento.

#### 4.3.6.3. Lavado del equipo

Debido a la fuerte sensibilidad de las dispersiones a trazas de compuestos o impurezas adheridos al material, cada experimento implicó un procedimiento exhaustivo de lavado del tanque de vidrio y material de acero inoxidable (impulsor, difusor, flecha, mamparas). La limpieza del material se basó

en lavados con líquido desengrasante (Cesco, México) y alcohol (70 %), la circulación de agua sobre el material durante 15 minutos y finalmente el enjuagado (tres veces) con agua destilada. Durante el montaje del sistema se tomaron las precauciones necesarias para evitar cualquier contaminación que pudiera interferir en los resultados de dispersión del aceite y aire.

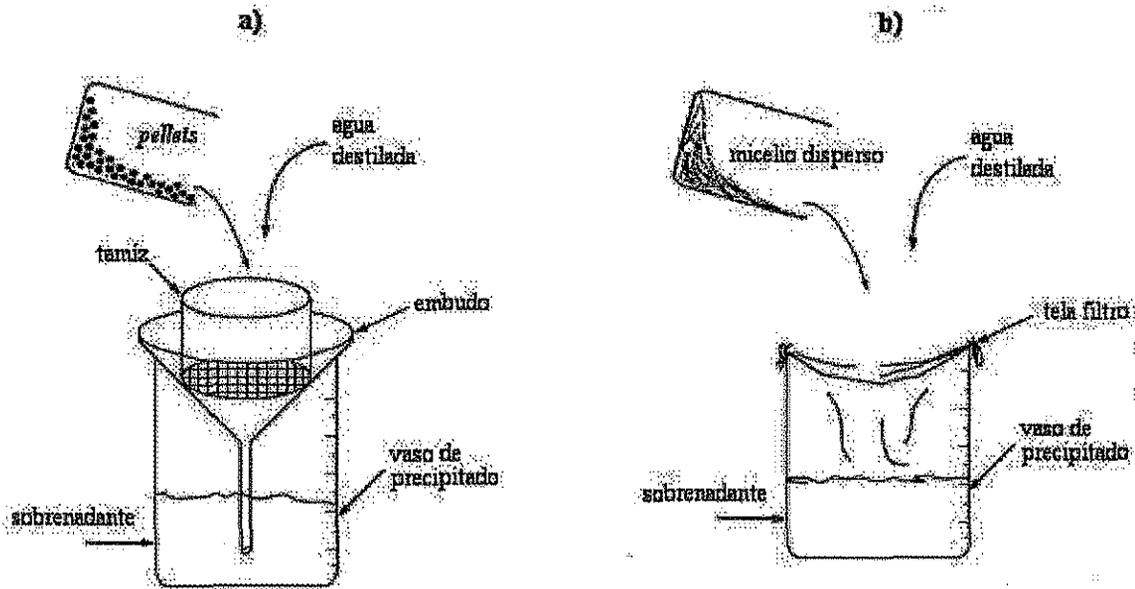


Figura 4.6. Metodología para el enjuague de micelio disperso (a) y enjuague y tamizado de *pellets* (b).

#### 4.3.6.4. Montaje del equipo

Una vez que el material de vidrio y acero del equipo de agitación-aireación fue lavado con el procedimiento descrito anteriormente se llevó a cabo el montaje del sistema. Esta etapa incluyó el montaje del tanque de mezclado, mamparas, flecha, impulsor, sonda de luz (y difusor en los casos en que se usó aireación), así como todas las conexiones del sistema de análisis de imágenes. Se preparó un volumen de 6 litros de medio acuoso con la misma composición y pH que se utilizan en la fermentación real. La composición del medio acuoso es la siguiente (en g/l):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7,  $\text{NaHPO}_4$  2,  $\text{MgSO}_4$  1.5,  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.067,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0001,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.008. El pH de este medio se ajustó a 5.6 con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85 %. El medio acuoso (recién preparado) así como 300 ml de aceite de ricino (5 % v/v de 6 litros) y  $\approx 40$  ml de la biomasa enjuagada previamente y de una morfología específica se adicionaron al tanque de mezclado. En este momento fue ajustada la velocidad de agitación (200 rpm,  $\text{Re} = 36,700$ , calculado con la viscosidad del agua) y, en su caso, la velocidad de aireación (0.25 vvm) y la temperatura del medio (29°C). El conjunto de condiciones se dejó estabilizar durante 30 minutos, periodo en el que se ajustó el enfoque y otros parámetros

(brillo, contraste). Una vez transcurrido éste periodo se inició la captura de imágenes. Enseguida se agregó un segundo volumen de biomasa ( $\approx 40$  ml) y, nuevamente, el sistema se dejó estabilizar por 30 minutos, se capturaron nuevamente las imágenes y así sucesivamente. La **figura 4.7** muestra la estrategia experimental general llevada a cabo en los estudios de dispersión del aceite de ricino y aire. La determinación de la concentración de biomasa de cada condición experimental se hizo al término de cada experimento mediante la técnica de peso seco. Las concentraciones de biomasa se variaron en el rango de 0.04 y 1.3 g/l. En los experimentos de tres fases, el tanque de mezclado se mantuvo tapado para evitar la aireación superficial causada por el atrapamiento de burbujas de aire.

Para el sistema de cuatro fases, la adición de aire al sistema se llevó a cabo utilizando un difusor sinterizado (cilindro sinterizado, con un tamaño de poro de *ca.* 20  $\mu\text{m}$ ; Waters Chromatography) colocado entre el fondo del tanque y el impulsor, a una velocidad de aireación de 0.25 vvm (1.675 litros de aire por minuto). El aire suministrado fue filtrado mediante una membrana de microfiltración (Millipore) con tamaño de poro de 0.2  $\mu\text{m}$ .

La influencia de la morfología miceliar sobre la dispersión del aceite de ricino se evaluó en los siguientes sistemas modelo:

- 1) Sistema modelo de tres fases (medio acuoso-aceite de ricino-micelio de *Trichoderma harzianum*).
- 2) Sistema modelo de cuatro fases (medio acuoso-aceite de ricino-aire-micelio de *Trichoderma harzianum*).

En los sistemas con aire se evaluaron también características relevantes de la fase gaseosa, las cuales incluyeron:

- El efecto de la presencia de aire en el sistema sobre el tamaño de las gotas de aceite.
- La localización de las burbujas de aire (*i.e.* dentro o fuera de gotas de aceite) como función de la concentración y la morfología miceliar.
- El efecto de la concentración y la morfología miceliar sobre el tamaño de las burbujas dentro de gotas y de burbujas libres.

#### 4.3.7. Descripción del sistema de captura y análisis de imágenes

En esta sección se describirá de una manera general el sistema de análisis de imágenes utilizado en los estudios de dispersión de aceite de ricino y aire llevados a cabo en el presente trabajo. Para mayores detalles y consideraciones del sistema se refiere al lector a la tesis de Brito-Albavera (2001) y a Taboada y Corkidi (2002).

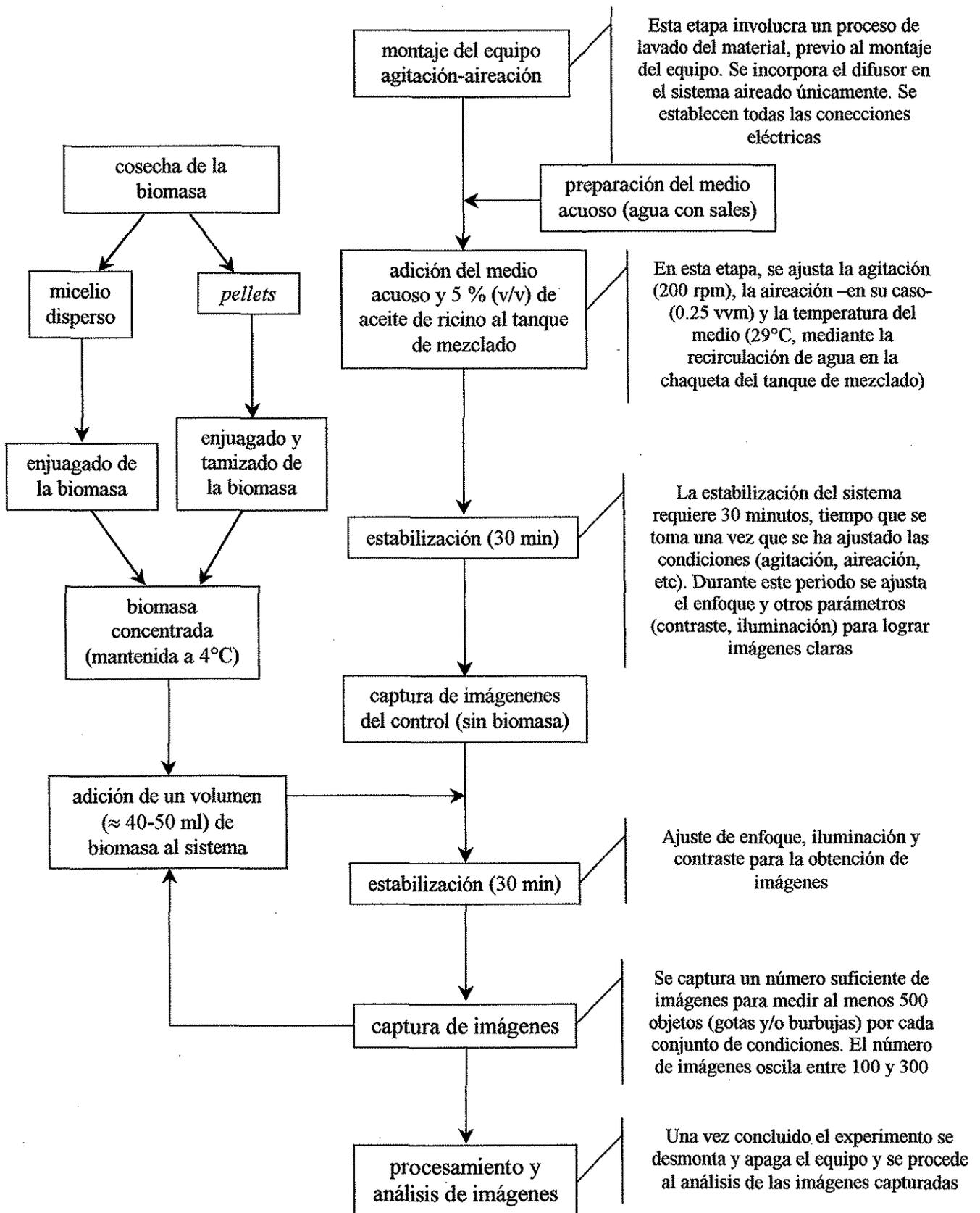
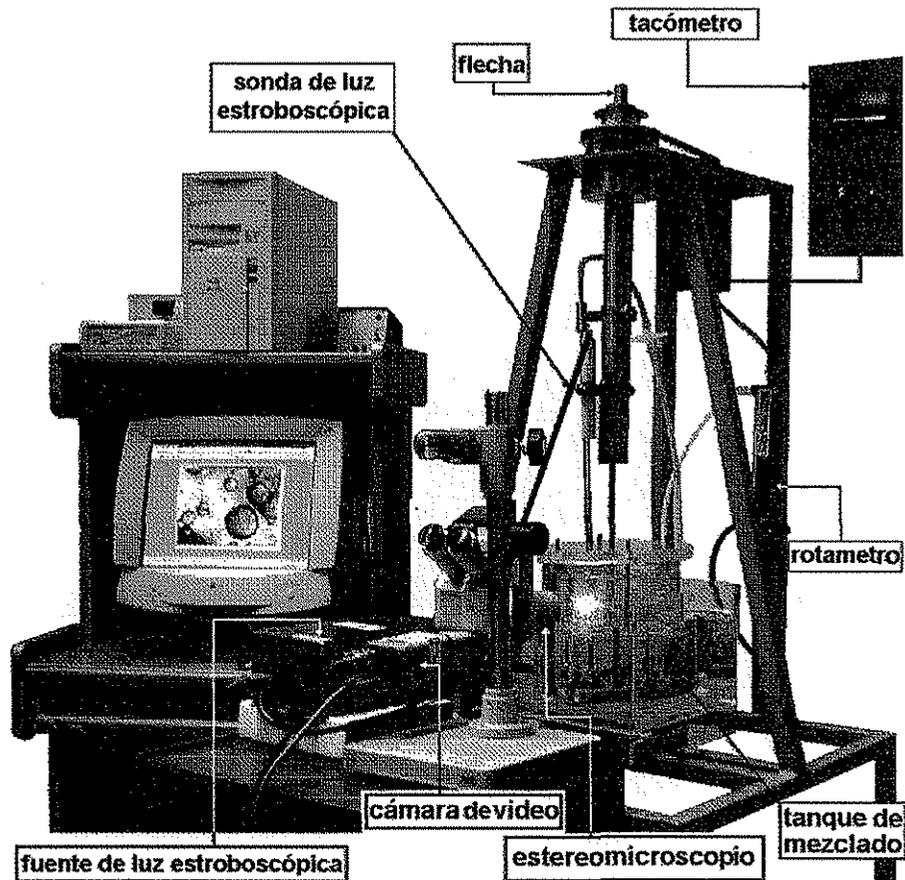


Figura 4.7. Estrategia experimental general de los estudios de dispersión del aceite de ricino y aire.

Las imágenes de las gotas de aceite y/o burbujas de aire fueron obtenidas mediante el arreglo experimental ilustrado en la **figura 4.8**, que consiste en un sistema avanzado de video-estereomicroscopio-computadora, acoplado con un tanque de mezclado (sistema de agitación-aireación, descrito anteriormente).



**Figura 4.8.** Sistema de análisis de imágenes para la determinación del tamaño de gotas y burbujas de las fases dispersas.

Las imágenes amplificadas del interior del tanque fueron capturadas a través de la chaqueta y de la pared de vidrio del tanque *en línea*. La posición vertical de la sonda puede variarse; sin embargo, en todos los experimentos se mantuvo a una distancia constante del fondo del tanque de mezclado, para capturar las imágenes en la misma posición (ver **figura 4.9**) en todos los casos (11.5 cm desde el fondo del tanque y 1.8 cm de la pared del tanque y en un punto medio entre dos de los *baffles*). El sistema de adquisición de imágenes consistió en una cámara de video de alta resolución (Hitachi KP-D50 *Color NTSC Digital*) conectada con un cabezal de un estereomicroscopio triocular (Olympus SZ1145ESD) con un rango de relaciones de magnificación de 1.5 hasta 11 veces el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

tamaño real. La frecuencia de disparo de la luz estroboscópica está sincronizada con la de la cámara de video. La fuente de luz estroboscópica es conducida al interior del tanque de mezclado a través de una sonda de fibra óptica (Metax, UK). La figura 4.10 muestra en detalle las dimensiones del plano de enfoque utilizando las magnificaciones de 4 y 6X. Se lograron obtener imágenes muy claras de las fases dispersas y sus interacciones.

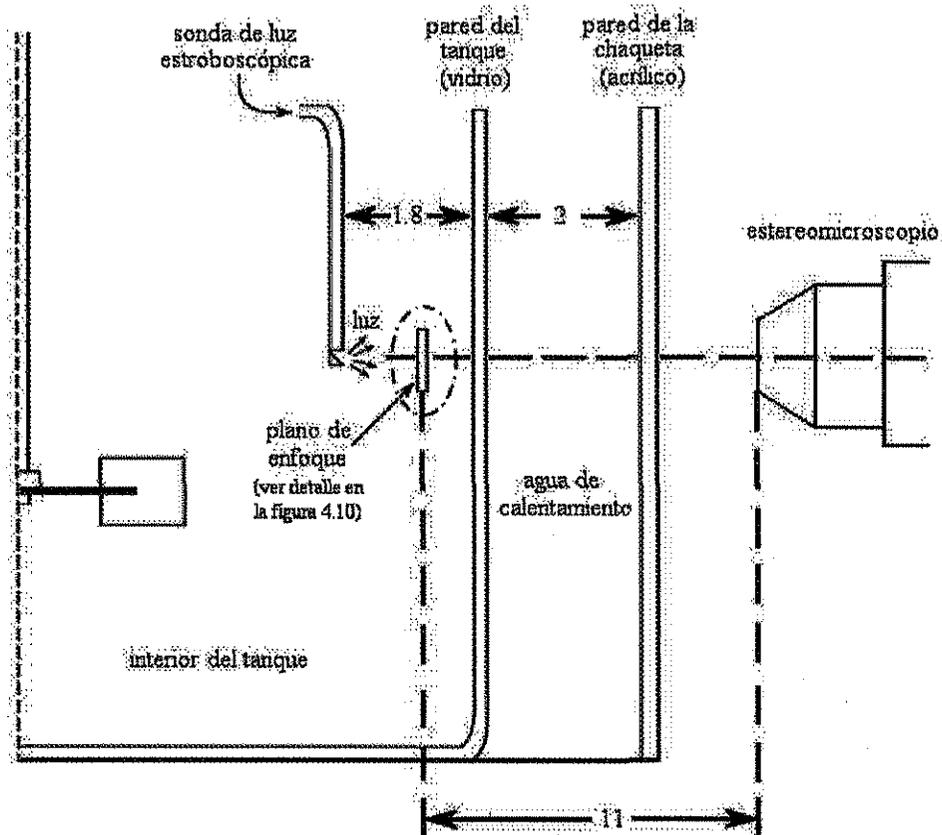


Figura 4.9. Plano de enfoque en la captura de imágenes.

El diámetro de las gotas y burbujas en píxeles fue determinado como se describe a continuación. Se usa el "mouse" para colocar el cursor en el centro geométrico de una gota o burbuja con un enfoque claro en la imagen. Para identificar las gotas enfocadas se hizo un juicio subjetivo considerando la claridad del brillo delineando las gotas, mientras que para las burbujas el enfoque estuvo determinado por un perímetro muy definido de las mismas. Manteniendo presionado el botón izquierdo del "mouse", el círculo en formación se extiende hacia el perímetro de la esfera, ajustándose al tamaño de la gota. Se mide automáticamente el diámetro en píxeles a partir del círculo formado. Mediante una calibración (píxeles/ $\mu\text{m}$ , ver Apéndice C) establecida previamente, el programa convierte automáticamente los píxeles a micrómetros. La calibración se llevó a cabo

capturando imágenes de la cuadrícula de una cámara de Neubauer, bajo las mismas condiciones que las mediciones del tamaño de gotas y burbujas. La cámara de Neubauer tiene una cuadrícula de líneas de precisión de dimensiones conocidas ( $50\ \mu\text{m}$ ), así que puede establecerse una calibración para cada magnificación del estereomicroscopio. Para cada conjunto de condiciones se capturó un número suficiente de imágenes para hacer la medición de al menos 500 objetos (gotas o burbujas), número de objetos con el cual se asegura un error no mayor al 10 % con respecto al promedio, con un intervalo de confianza del 95 % (Brito-Albavera, 2001). El programa de análisis de imágenes permite enviar los datos de diámetro (de gotas o burbujas) a una hoja de cálculo de Excel® para su posterior análisis estadístico.

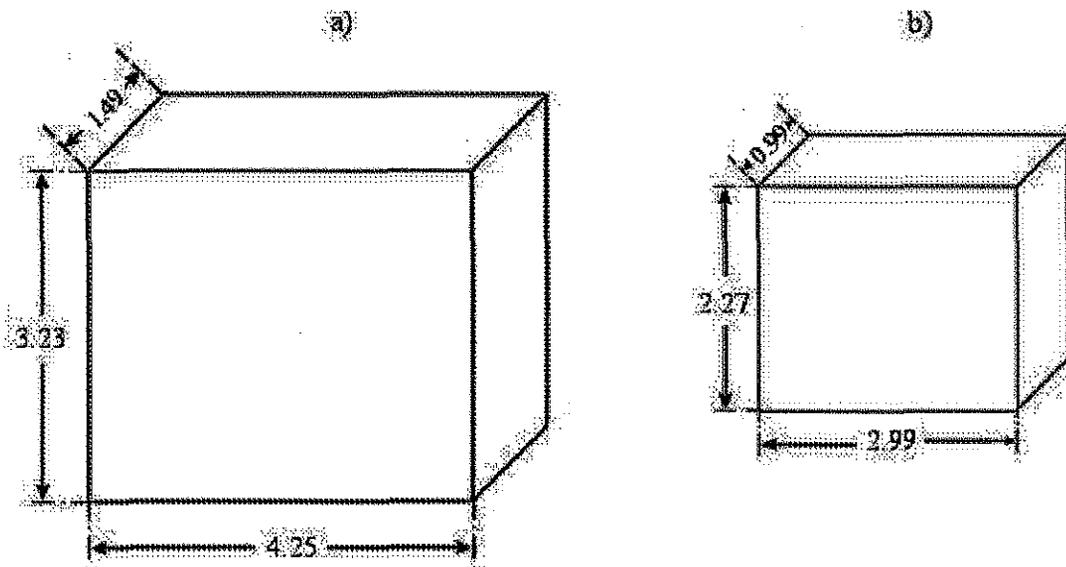


Figura 4.10. Dimensiones (en mm) del plano de enfoque en la captura de imágenes, a)  $M = 4$ , b)  $M = 6$ .

#### 4.3.8. Interpretación de resultados

La caracterización de las dispersiones se hizo en términos del diámetro Sauter y de distribuciones de densidad de probabilidad de número de las gotas y de las burbujas. Los valores experimentales del diámetro de las gotas determinados a partir del procesamiento digital de las imágenes capturadas son usados para calcular el diámetro Sauter mediante la ecuación (2) descrita en la sección 2.2.4 y para obtener las distribuciones de tamaños de las gotas de aceite y de las burbujas de aire.

Una distribución de densidad de probabilidad de número es una modificación del histograma y representa la probabilidad de encontrar una gota o burbuja de un tamaño dado. Con una gráfica de densidad de probabilidad de número no solo es posible ver la distribución de tamaños, sino que

además proporciona una idea de qué tan dispersos se encuentran los datos (curvas anchas representan datos con alta dispersión). En ellas se aprecian las colas, que indican la presencia de objetos de gran tamaño, pero de poca probabilidad de aparecer (Brito-Albavera, 2001).

#### 4.3.9. Reproducibilidad de los experimentos típicos de dispersión

Se determinó la reproducibilidad de experimentos típicos. Para ello se llevó a cabo una prueba por duplicado de la determinación de tamaños de gotas de aceite en un sistema modelo de fermentación de cuatro fases (medio acuoso – aceite de ricino – aire – micelio de *Trichoderma harzianum*), con micelio disperso. La figura 4.11 muestra los diámetros Sauter así como las distribuciones de tamaños de las gotas determinados para dos experimentos independientes realizados con el mismo lote de biomasa y bajo las mismas condiciones (impulsor Rushton, 200 rpm, 0.25 vvm, 5 % aceite de ricino, 0.45 g/l de biomasa).

Los resultados de diámetro Sauter, así como las distribuciones de tamaño de las gotas mostraron una alta reproducibilidad (ver figura 4.11). La diferencia en el diámetro Sauter de las gotas entre ambos experimentos fue de 19  $\mu\text{m}$ . La desviación estándar del diámetro Sauter con respecto al promedio fue de 1.23 %.

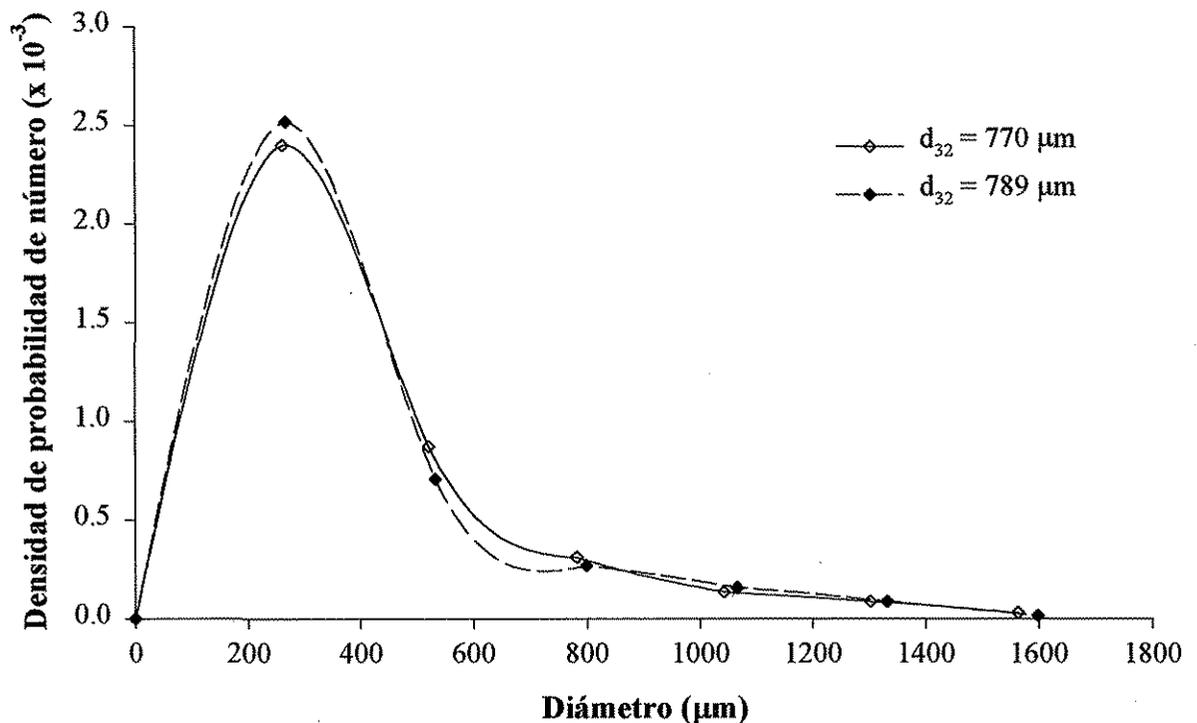


Figura 4.11. Reproducibilidad de pruebas para determinar tamaños de gotas de aceite.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Morfología del micelio

#### 5.1.1. Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de micelio disperso

Para evaluar el efecto de la morfología del micelio sobre la dispersión de aceite y de aire, fue necesario producir biomasa de los dos tipos extremos de morfología: *pellets* y micelio disperso. La estrategia para lograr lo anterior consistió en manipular diferentes condiciones de fermentación e identificar aquellas que promovieron el crecimiento de una u otra morfología.

La producción de micelio disperso, el cual incluye tanto micelio libre filamentoso como agregados miceliarios laxos (ver **figura 2.1**), se llevó a cabo, primero, en matraces de 500 ml con 100 ml de medio, y más adelante en fermentadores de 10 litros. En matraces, la concentración de inóculo en estos experimentos fue de  $10^6$  esp/ml en matraces y el pH inicial fue de 3.0. Se eligieron estas condiciones, ya que se sabe que una concentración de inóculo alta (Metz y Kossen, 1977; Johansen *et al*, 1998; Nielsen *et al*, 1995) y un pH inicial bajo (Carlsen *et al*, 1996) favorecen el crecimiento miceliar en la forma dispersa. También en matraces se evaluó el efecto de la adición de glicerol y de polietilenglicol (PEG, PM = 20000) al medio de cultivo, sobre la morfología miceliar. Se ha reportado que la adición de polímeros pueden afectar el crecimiento en *pellets* (Su y He, 1997; Vecht-Lifshitz *et al*, 1990) y que la agregación miceliar puede ser inhibida mediante la adición de polímeros al medio (Hotop *et al*, 1993), mientras que los depresores de la actividad de agua (*i.e.* glicerol), se han relacionado con el crecimiento miceliar y la esporogénesis (Gervais *et al*, 1988).

La **tabla 5.1** muestra las características de esporulación y la concentración de biomasa producida en matraces con medios de cultivo adicionados de glicerol y PEG y del control. La presencia de glicerol en el medio de cultivo no tuvo un efecto significativo en la morfología del micelio con respecto al medio sin glicerol (ver **figura 5.1a**), sin embargo la producción de biomasa en el medio de cultivo con glicerol fue más baja con respecto al control. En consecuencia, se descartó el medio con glicerol para la producción de micelio disperso. La adición de PEG al medio de cultivo no tuvo un efecto significativo en la morfología miceliar con respecto al control (ver **figura 5.1b**). La ventaja que el medio con PEG presentó con respecto al control fue la ausencia de esporulación. En el medio con 0.1 g/l de PEG se observó la presencia de *pellets* pequeños con filamentos largos, que no son deseables en el micelio disperso. Con base en las características morfológicas anteriores se seleccionó el medio con 0.5 g/l de PEG para la producción de micelio disperso.

**Tabla 5.1. Efecto de la adición de glicerol y PEG en el medio de cultivo sobre la producción de micelio disperso.**

Medio	Concentración de biomasa (g/l)	Observaciones
(control) sin PEG ni glicerol	7.9	Presentó muy poca esporulación
1 % glicerol	5.8	No presentó esporulación
5 % glicerol	4.4	Presentó cierto grado de esporulación
0.1 g/l PEG	8.2	No presentó esporulación
0.5 g/l PEG	8.7	No presentó esporulación

Al iniciar los experimentos se observó que la cantidad de biomasa producida en 20 matraces no fue suficiente para los estudios de dispersión de aceite de ricino. Lo anterior condujo a la producción de micelio disperso en fermentadores de 14 l, con 10 l de medio. El medio de cultivo usado en los fermentadores fue el mismo que el utilizado en matraces (0.5 g/l PEG), excepto que estuvo adicionado con extracto de levadura (EL, 1 g/l). Se ha reportado que los factores que favorecen un incremento en la velocidad de crecimiento (como el enriquecimiento del medio con nutrientes fácilmente asimilables, en éste caso, el extracto de levadura) reducen la formación de *pellets* (Braun y Vecht-Lifshitz, 1991; Wardell y Bushell, 1999; Choi *et al*, 2000). Por otra parte, la concentración de esporas en el inóculo se redujo a  $10^4$  esp/ml, para evitar que quedaran esporas sin germinar. Las distribuciones de diámetro del micelio disperso producido en matraces (0.5 g/l PEG) y en fermentadores (0.5 g/l PEG y 1 g/l EL) se ilustran en la figura 5.2. La frecuencia de las distribuciones no son significativamente diferentes, excepto para tamaños de micelio de alrededor de 0.3 mm, la cual fue mayor en el fermentador con respecto a los matraces, probablemente debido a las diferentes condiciones hidrodinámicas entre ambos sistemas. Adicionalmente, la concentración de biomasa obtenida en el fermentador fue mayor (9.3 g/l) que la obtenida en los matraces, probablemente debido a una mayor velocidad específica de crecimiento por la adición del extracto de levadura. La figura 5.3 muestra imágenes típicas del micelio obtenido en el fermentador.

Se puede concluir que el crecimiento de *Trichoderma harzianum* en diferentes medios de cultivo y su caracterización morfológica mediante análisis de imágenes permitió identificar las condiciones para la producción de micelio disperso. Los lotes de micelio disperso para los experimentos se produjeron en fermentadores de 14 l, bajo condiciones de pH inicial bajo (3.0) y concentración de inóculo alta ( $10^4$  esp/ml). El medio adicionado con PEG (0.5 g/l) y extracto de levadura (1 g/l) no esporuló y presentó una menor agregación como ventajas con respecto al medio sin estos componentes. El micelio disperso producido bajo las condiciones de cultivo anteriores presentó una concentración de biomasa y características morfológicas aceptables (no presentó *pellets* con superficie filamentosa), con respecto a los otros medios de cultivos probados.

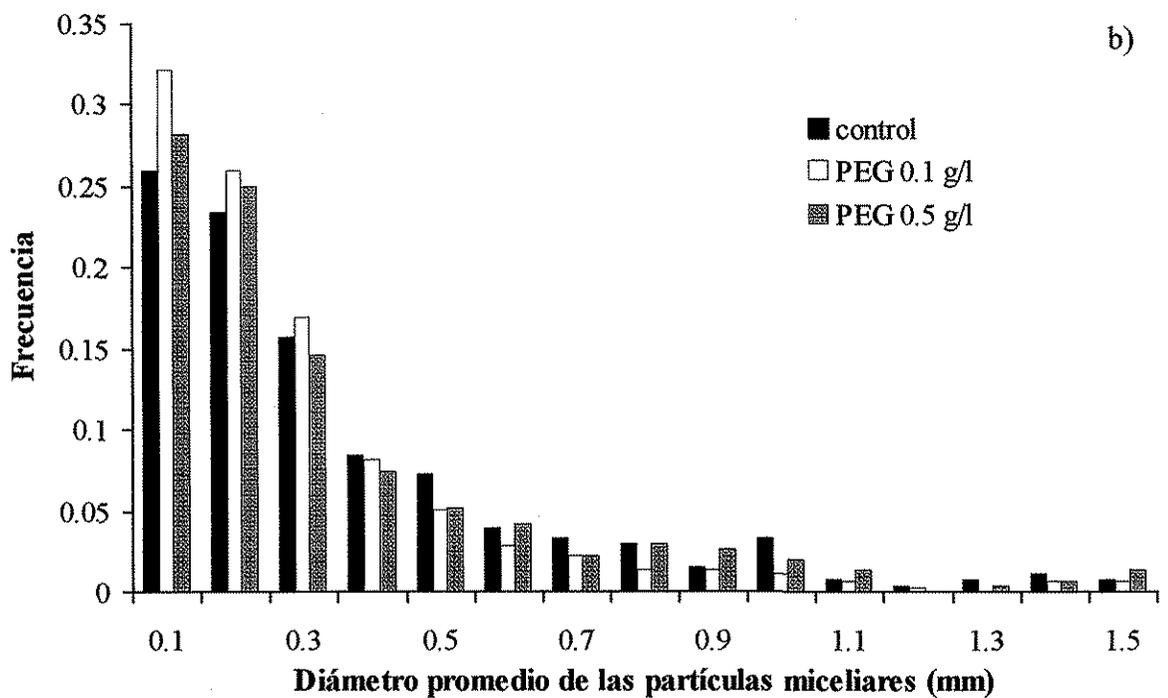
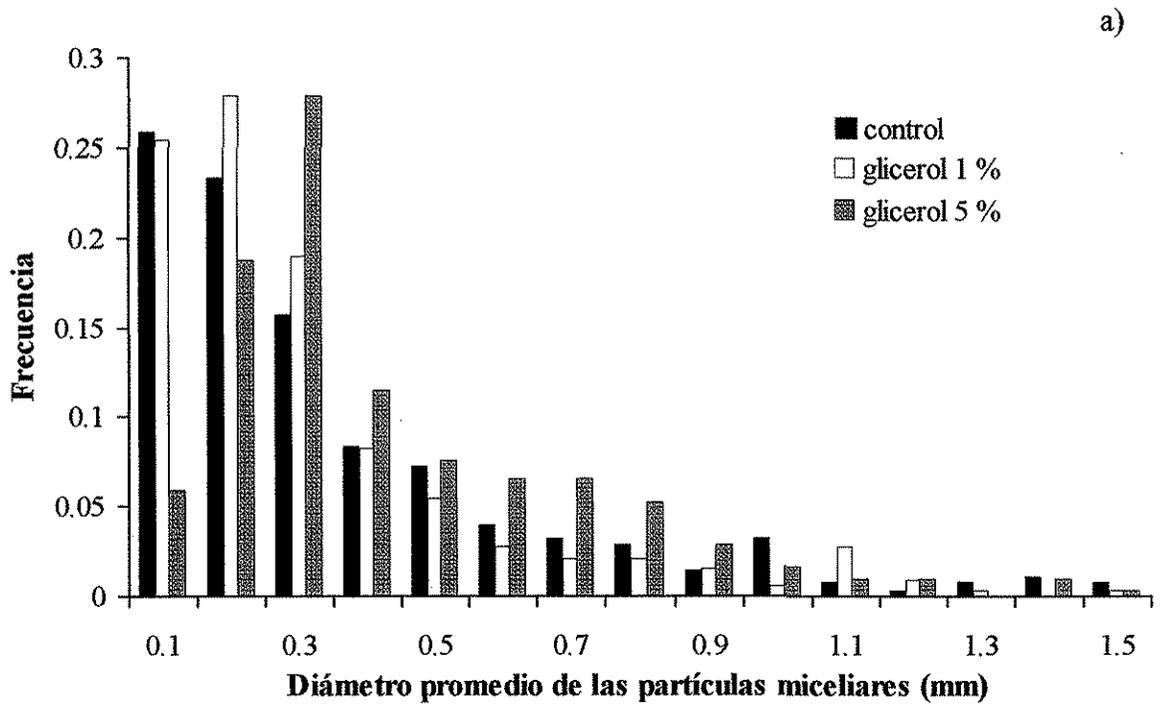


Figura 5.1. Efecto de la adición de glicerol (a) y PEG (b) al medio de cultivo sobre la morfología del micelio disperso (cultivos en matraces).

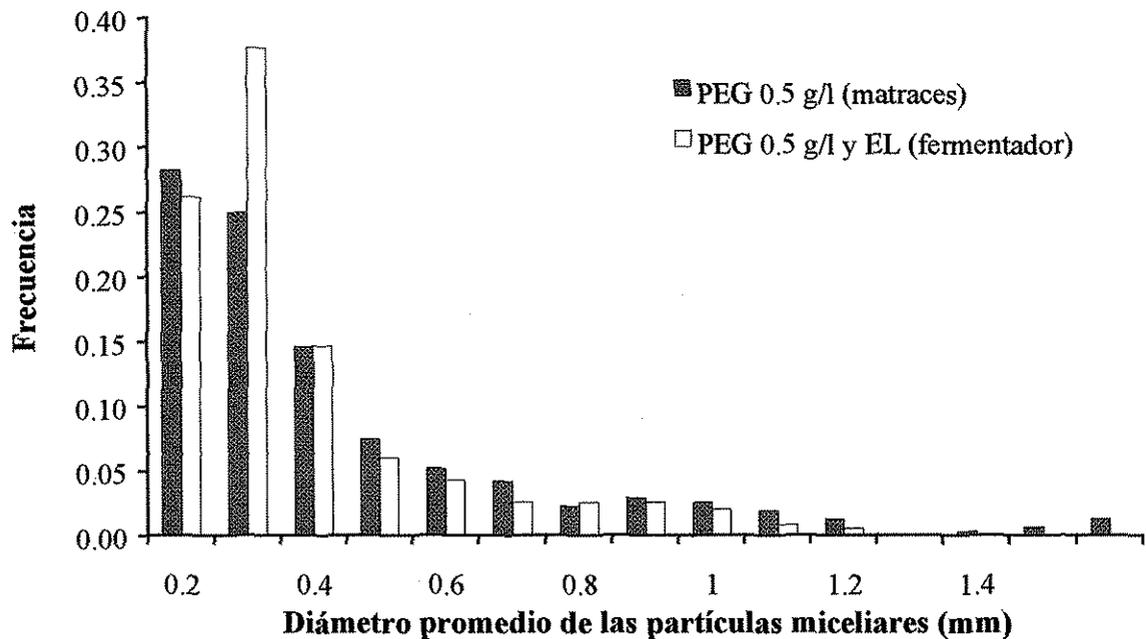


Figura 5.2. Distribuciones de diámetro promedio del micelio disperso producido en matraz y en fermentador.

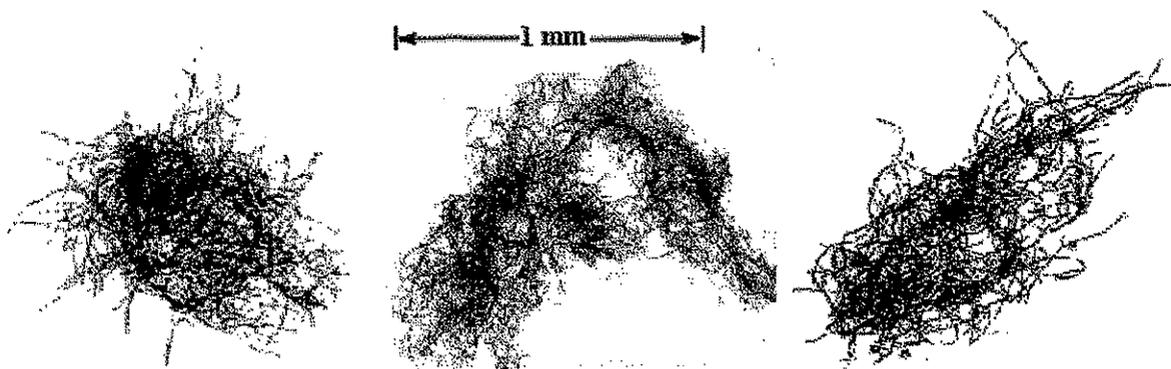
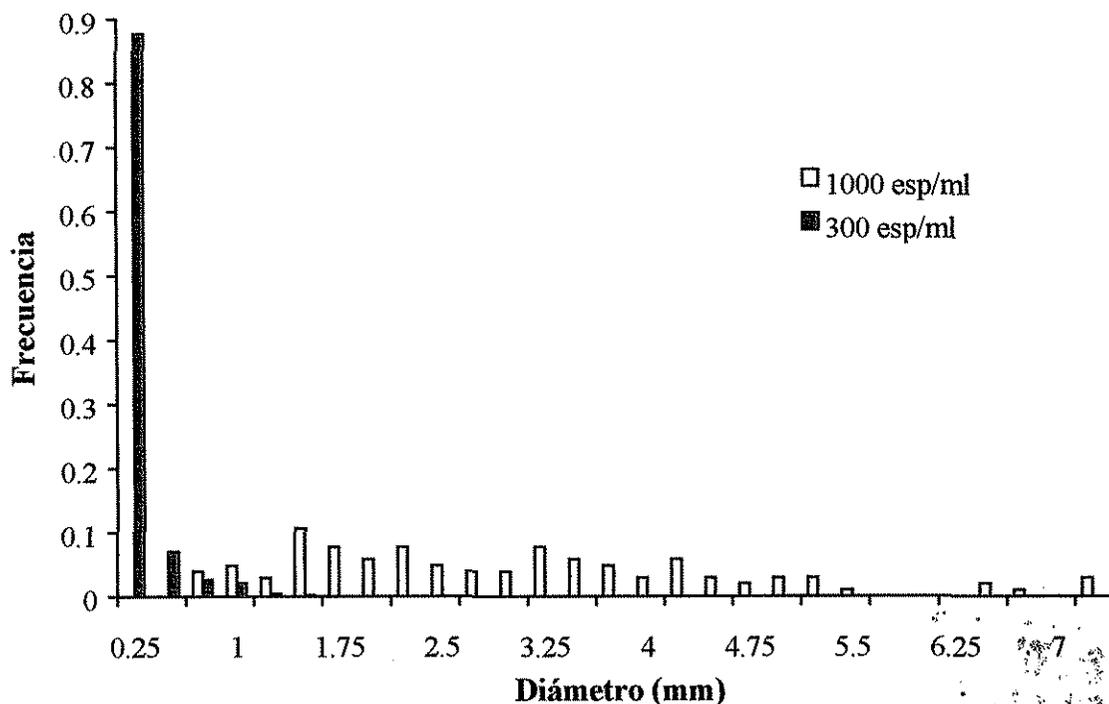


Figura 5.3. Morfología típica de agregados laxos producidos en fermentador.

### 5.1.2. Influencia de las condiciones de cultivo en la producción de *pellets*

La producción de *pellets* en matraces mostró depender de la concentración de sales, de *Tween* y de esporas en el inóculo. Debido al tamaño de los *pellets* obtenidos, el efecto de la concentración de sales y de *Tween* fue visual. Éste último influyó significativamente en el desarrollo morfológico de los *pellets*. El efecto del *Tween* sobre la morfología miceliar ya había sido reportado por Dominguez *et al* (2000) en cultivos de *Trichoderma reesei*. Se ha reportado (Goldberg y Stieglitz, 1985) que la adición de surfactantes al medio origina cambios en las propiedades de la membrana celular. Al

parecer, el *Tween* modifica la hidrofobicidad de ésta y, en consecuencia, la agregación del microorganismo (Vecht-Lifshitz *et al.*, 1990). Utilizando la composición del medio reportada en la **tabla 4.1**, se probaron dos concentraciones de inóculo (300 y 1000 esp/ml). En ambos casos se produjeron *pellets*. Sin embargo, los de mayor tamaño (1.5-5.5 mm) se obtuvieron con el inóculo mayor (1000 esp/ml), tal como se ilustra en la **figura 5.4**. En este caso, la distribución de los diámetros de las partículas miceliales fue muy amplia. Con el fin de tener una distribución de tamaños más uniforme, el lote de *pellets* cosechado se tamizó para eliminar cualquier fracción de micelio disperso y *pellets* de diámetro muy pequeño. Esto se discutió con detalle en la sección 4.3.6.



**Figura 5.4.** Efecto de la concentración de esporas en el inóculo sobre el diámetro promedio de los *pellets* producidos en matraces.

No se logró producir la morfología en *pellets* en fermentadores de 14 l, incluso utilizando velocidades de agitación muy bajas (100 rpm) y con la configuración de reactor mostrada en la **figura 4.1**. Se utilizó ésta configuración de reactor por la mayor transferencia de masa de la fase gaseosa que se genera mediante los cuatro difusores sinterizados (cuatro cilindros sinterizados, con un tamaño de poro de *ca.* 20  $\mu\text{m}$ ; Waters Chromatography). En consecuencia, la velocidad de agitación para la dispersión del aire pudo disminuirse significativamente con respecto a la empleada utilizando la configuración con un difusor de punto y tres turbinas Rushton (200 rpm). Se ha

reportado que una disminución en la velocidad de agitación puede favorecer el desarrollo de la morfología en *pellets*, así como un incremento en su tamaño (Justen *et al*, 1996; Joshi *et al*, 1996; Metz y Kossen, 1977). Sin embargo, los *pellets* producidos utilizando la configuración de reactor mostrada en la figura 4.1 fueron menos densos y se observó una mayor fracción de micelio disperso, con respecto a la morfología desarrollada en matraces. Esto puede ser atribuido a las diferentes condiciones hidrodinámicas entre ambos sistemas. Godoy-Silva (1998) reporta la producción de *pellets* grandes y densos en fermentadores de 14 litros con cuatro difusores sinterizados en forma de cruceta y utilizando un impulsor helicoidal. El impulsor helicoidal genera un mezclado excelente y condiciones hidrodinámicas mucho más suaves que las creadas con otros impulsores (Godoy-Silva, 1998), lo cual favoreció la producción de *pellets* compactos y grandes. En el presente trabajo no fue posible implementar el biorreactor con el impulsor helicoidal (debido a problemas técnicos) y no se logró producir *pellets* con las características deseadas en fermentador. Los lotes que se usaron para los experimentos usando esta morfología fueron producidos en matraces. Se produjeron al menos cuatro lotes (de 38 matraces cada uno). Las condiciones de cultivo se detallaron en las secciones 4.1.3 y 4.2.1.

La figura 5.5 muestra imágenes típicas de los *pellets* producidos en matraces, algunos de los cuales mostraron ser agregados formados por dos o más *pellets* (ver figura 5.6). Se han reportado varias especies agregativas de hongos (Carlsen *et al*, 1996), las cuales tienden a producir un *pellet* por varias esporas (Takahashi y Yamada, 1960; Metz y Kossen, 1977). Lo anterior implica que, bajo ciertas condiciones de cultivo, el hongo *Trichoderma harzianum* pueden agregarse, comportándose como una especie agregativa.

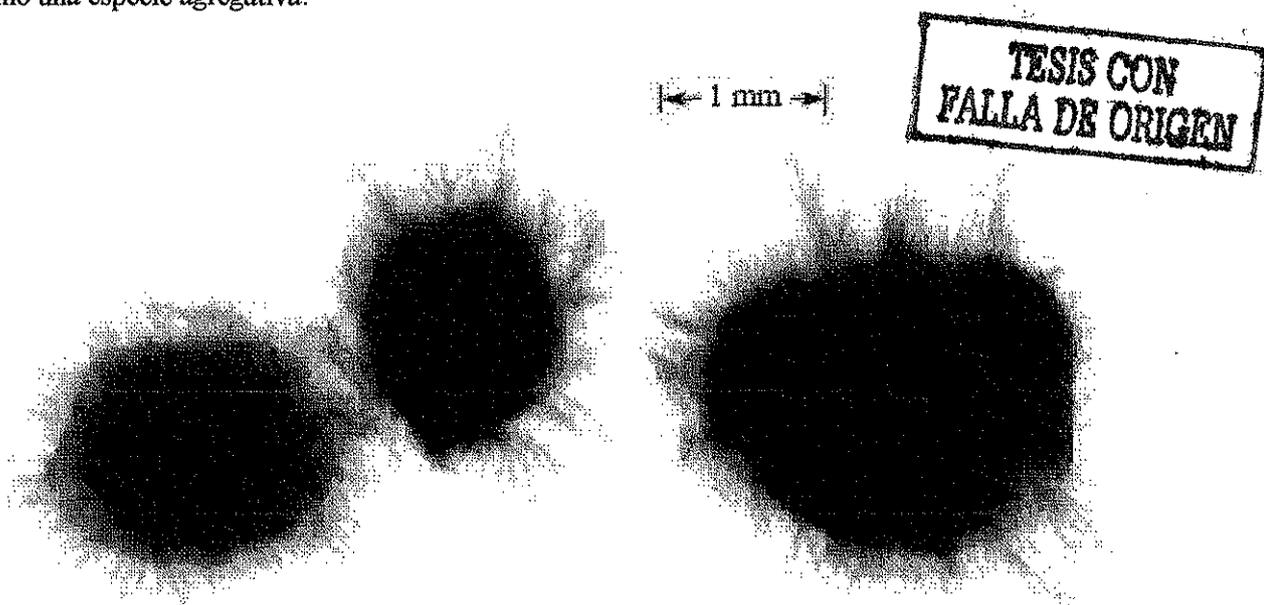


Figura 5.5. Morfología en *pellets* producida en matraces.

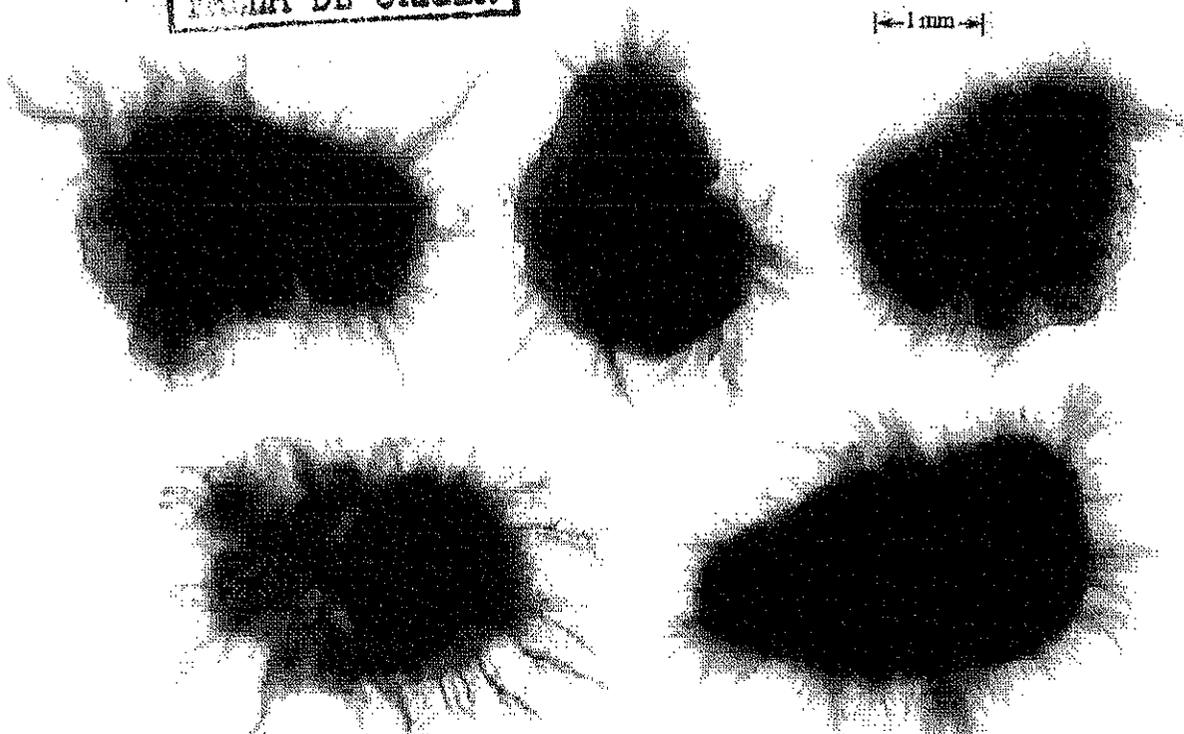


Figura 5.6. Formación de *pellets* por agregación de esporas.

Las figuras 5.7 y 5.8 muestran las distribuciones de diámetro y circularidad, respectivamente, para las morfologías en *pellets* y micelio disperso. Ambos parámetros mostraron ser adecuados para evidenciar las diferencias entre las dos morfologías producidas y para explicar los efectos de la morfología del micelio sobre la dispersión del aceite y del aire. En este caso, es importante mencionar que la circularidad del micelio se ha reportado que está directamente relacionada con los cambios en la viscosidad de las suspensiones. Se sabe que cuanto más se desvíe la forma de las partículas de la forma esférica, mayor será la viscosidad de la suspensión (Clarke, 1967). El diámetro del micelio puede ser de utilidad para relacionar la intensidad del impacto de los *pellets* con las gotas y burbujas dispersas en el sistema. Esto se abordará con detalle en la sección 5.2.1.

Como se ha mencionado anteriormente, un cambio en las condiciones de cultivo puede afectar la morfología miceliar (Reichl *et al*, 1992). Sin embargo, es difícil controlar exactamente las mismas condiciones en los diferentes cultivos. Para lograr la mayor reproducibilidad en las características morfológicas del micelio producido en los diferentes lotes de biomasa se siguió, hasta donde fue posible, el mismo protocolo experimental para las fermentaciones. Las figuras 5.9 y 5.10 muestran las distribuciones de los diámetros y de la circularidad, respectivamente, para dos poblaciones de *pellets* producidas en lotes diferentes e independientes. La morfología fue bastante reproducible, lo cual en parte fue debido a que los lotes de *pellets* fueron tamizados.

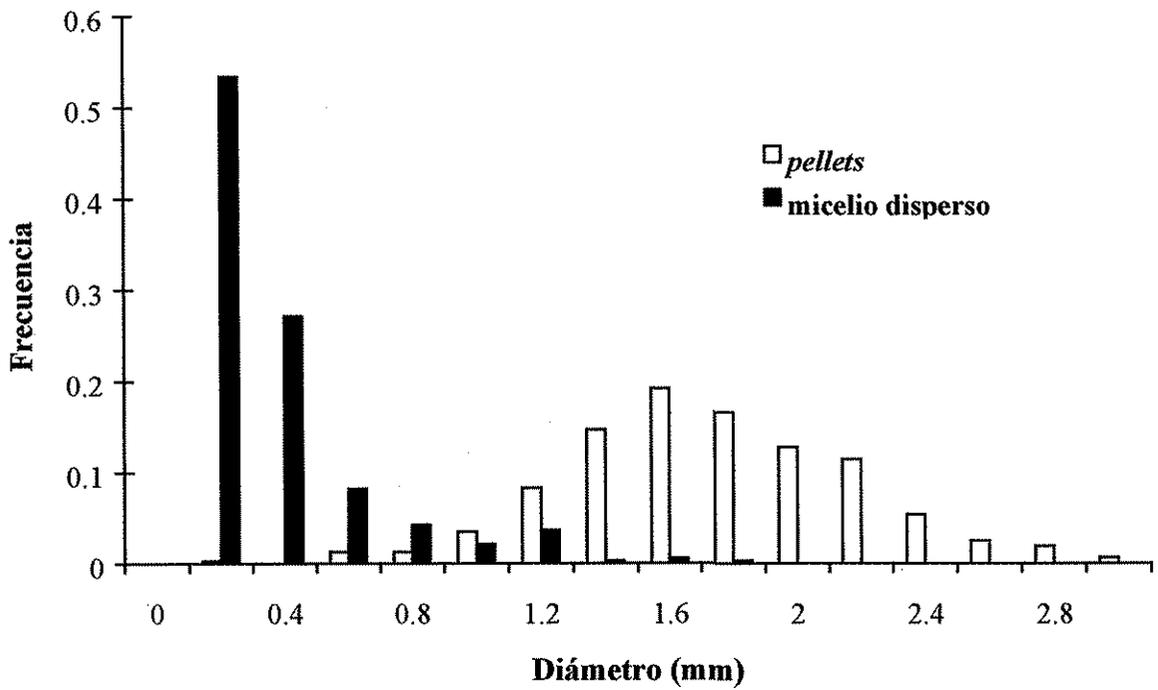


Figura 5.7. Distribuciones de diámetro promedio para micelio disperso y pellets

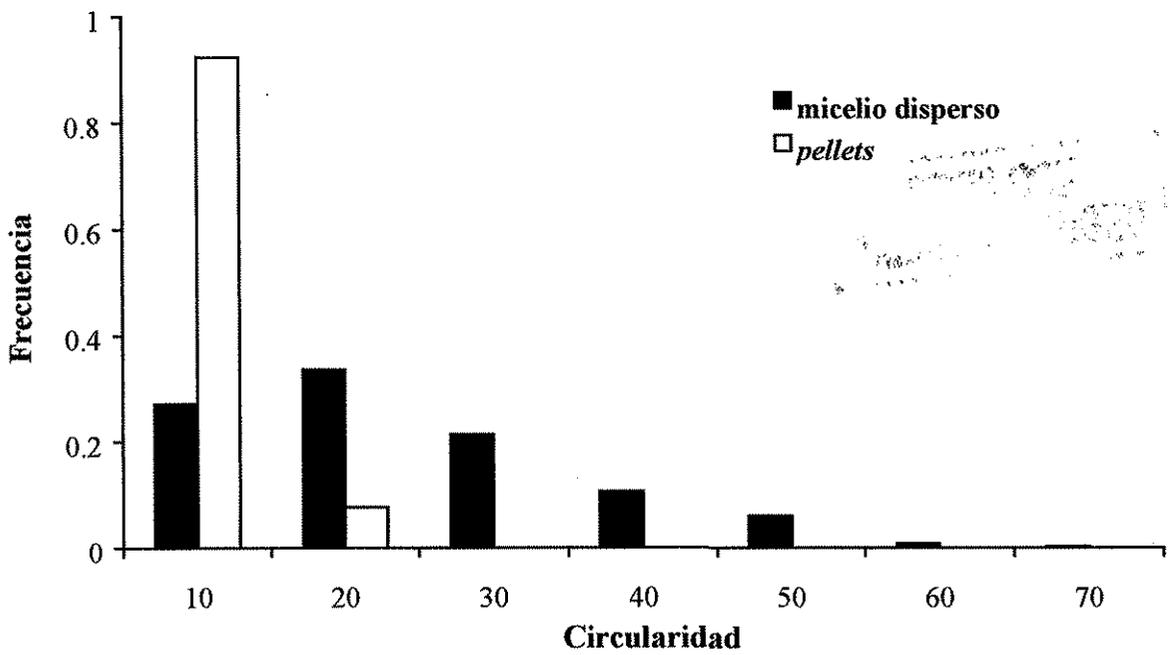


Figura 5.8. Distribuciones de circularidad para micelio disperso y pellets.

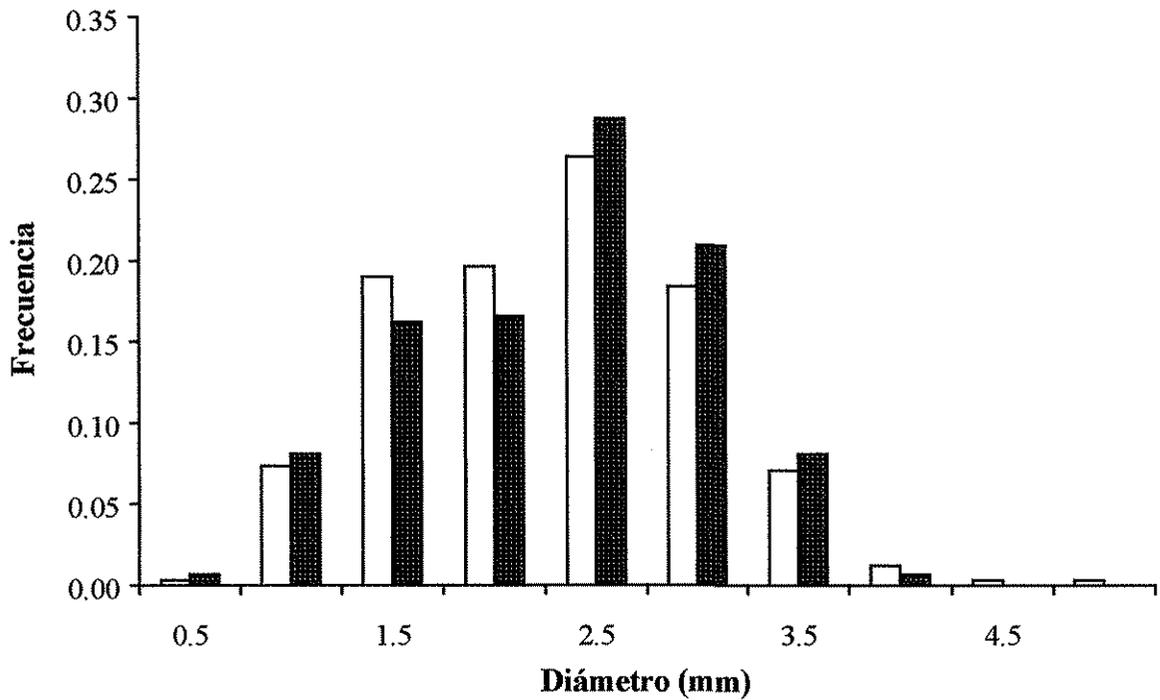


Figura 5.9. Reproducibilidad en las distribuciones de diámetro promedio de los *pellets* producidos en dos lotes diferentes.

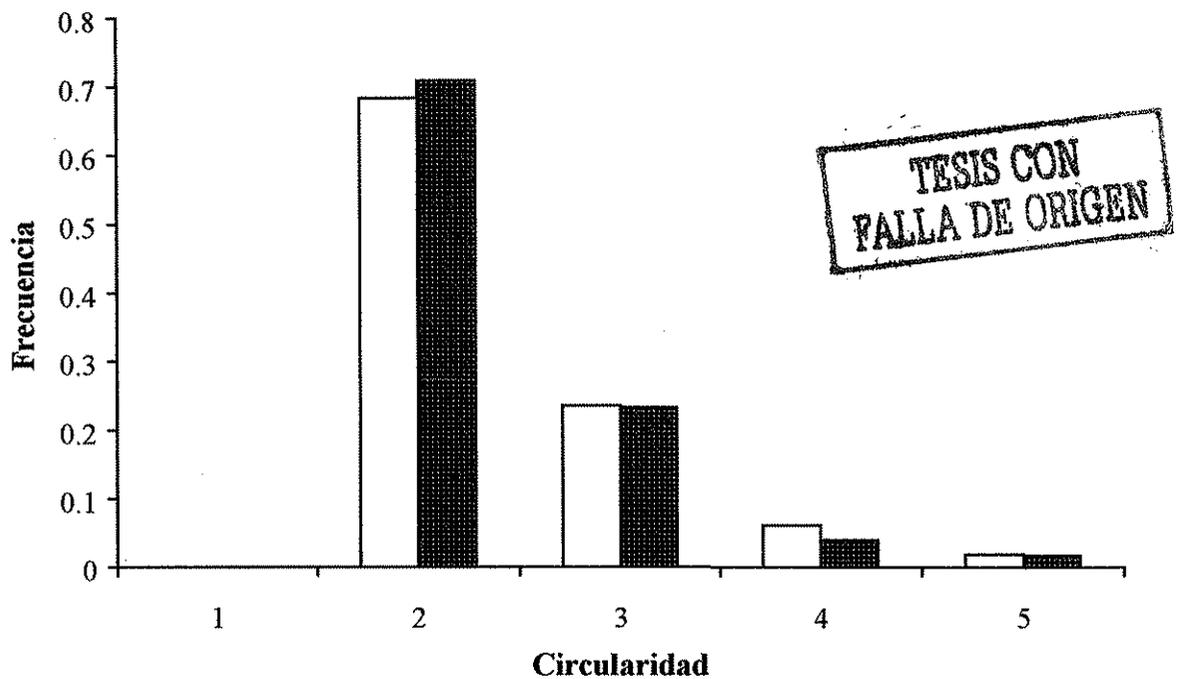


Figura 5.10. Reproducibilidad en las distribuciones de circularidad de los *pellets* producidos en dos lotes diferentes.

La figura 5.11 muestra los resultados de dos lotes independientes para las distribuciones de los diámetros de micelio disperso. La reproducibilidad fue aceptable en las características morfológicas de éste.

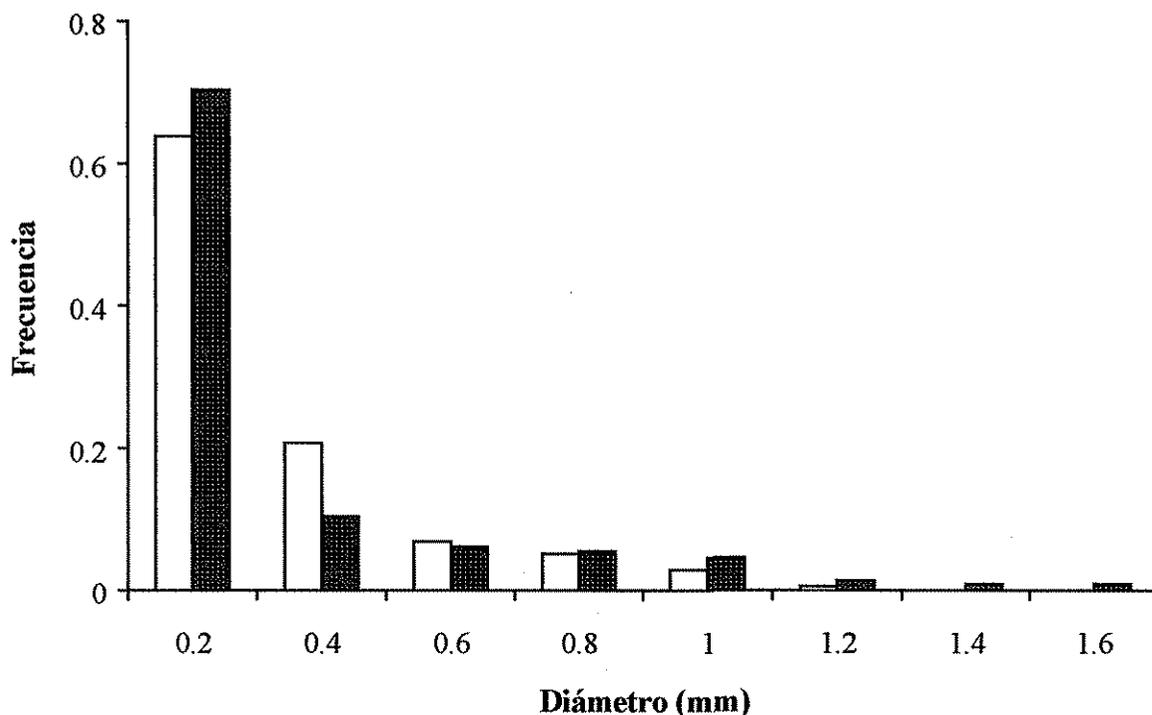


Figura 5.11. Reproducibilidad de las distribuciones de diámetro promedio de micelio disperso producido en dos lotes diferentes.

### 5.1.3. Reología de las suspensiones de biomasa

La figura 5.12 ilustra el índice de consistencia ( $K$ ) del modelo de la ley de la potencia como función de la concentración de biomasa (micelio disperso o *pellets*). Es claro que  $K$  aumenta al incrementar la concentración de micelio disperso, mientras que prácticamente no cambia al incrementar la concentración de *pellets*. La figura 5.13 ilustra el fenómeno de reodelgazamiento con micelio disperso como una disminución en el índice de flujo ( $n$ ) de la ley de la potencia al incrementarse la concentración de biomasa. Este comportamiento en el índice de consistencia y las características reodelgazantes de suspensiones es similar al obtenido con otros hongos filamentosos (Fatile, 1985, Berovic *et al.*, 1991). La figura 5.14 ilustra la variación en la viscosidad aparente del proceso con la concentración de biomasa. La viscosidad aparente fue calculada utilizando los índices de consistencia y de flujo determinados a partir de las mediciones reológicas.

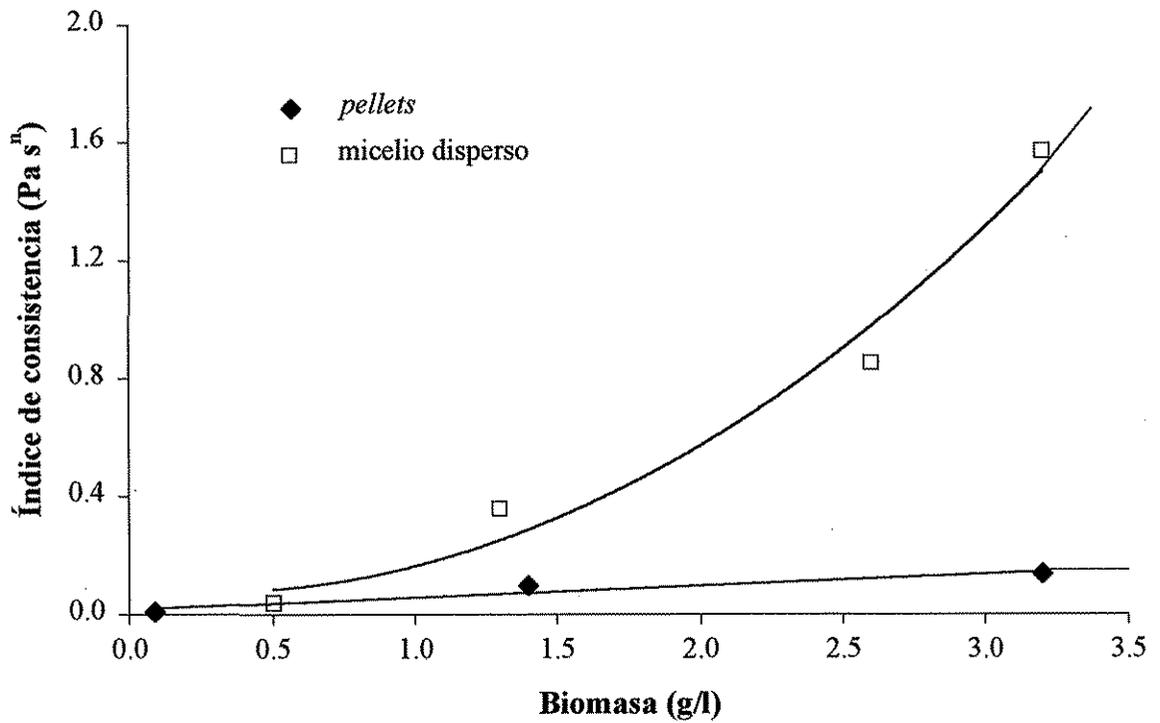


Figura 5.12. Índice de consistencia (K) de la ley de la potencia como función de la concentración y la morfología del micelio.

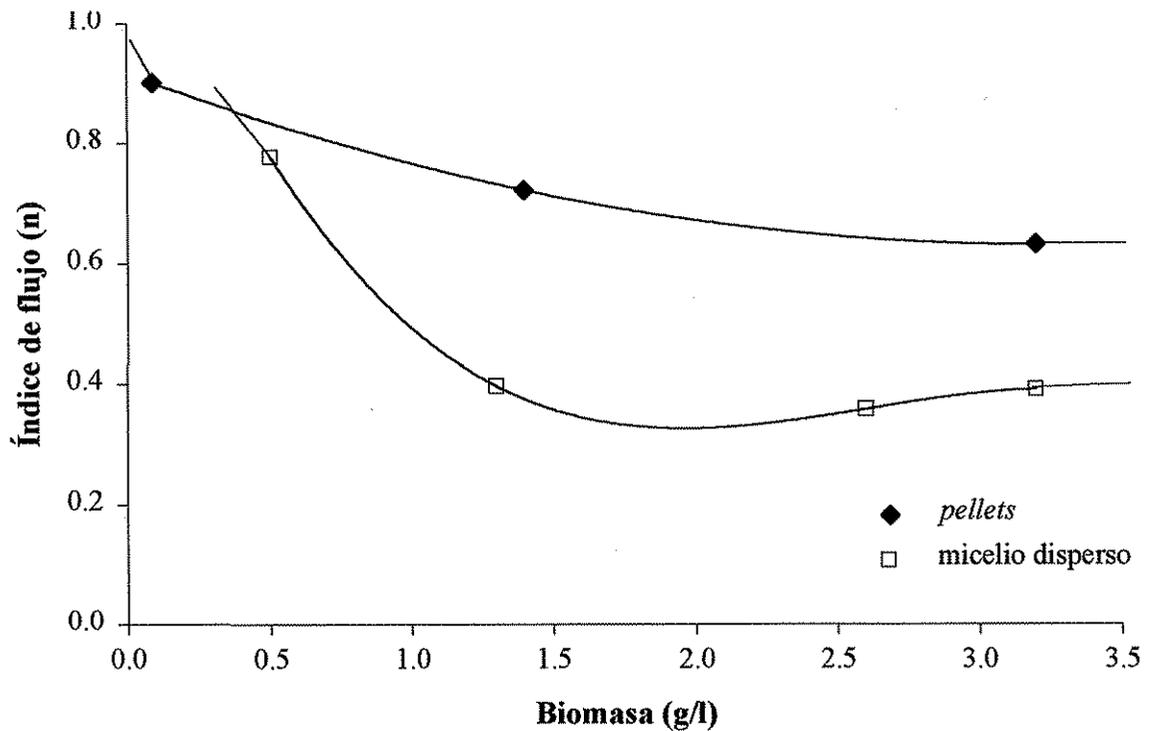


Figura 5.14. Índice de flujo (n) de la ley de la potencia como función de la concentración y la morfología del micelio.

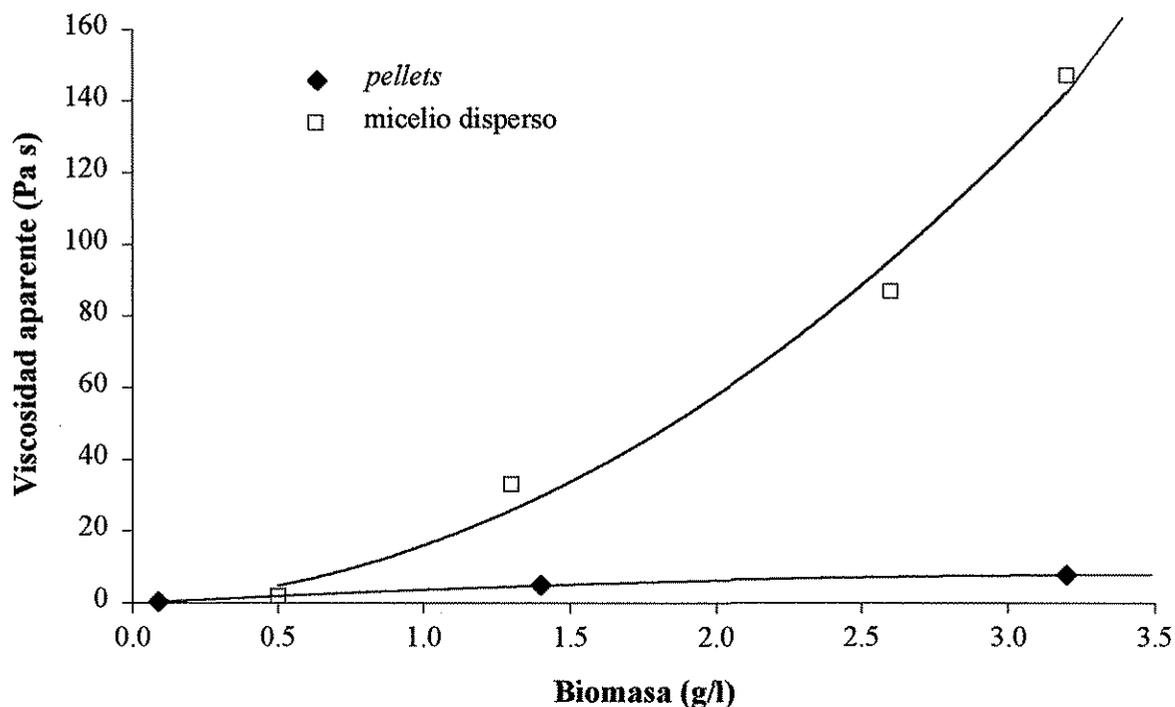


Figura 5.14. Viscosidad aparente del proceso como función de la concentración y la morfología del micelio

#### 5.1.4. Conclusiones respecto a la producción de biomasa

Se creció *Trichoderma harzianum* como micelio disperso y como *pellets* mediante la manipulación de las condiciones de cultivo. El micelio disperso se produjo en fermentadores de 14 litros, mientras que los *pellets* se produjeron en matraces de 500 ml. Una concentración de esporas en el inóculo alta y un pH inicial bajo favorecieron el crecimiento en la forma dispersa del hongo, mientras que una concentración de esporas en el inóculo baja y un pH inicial alto favorecieron la formación de *pellets*. A diferencia del medio de cultivo para producir el micelio disperso, el medio de cultivo para la producción de *pellets* no estuvo adicionado con PEG ni con extracto de levadura y el tiempo de cultivo fue mayor (108 h) con respecto al tiempo de cultivo para producir micelio disperso (72 h). Se observaron diferencias significativas en las distribuciones de diámetro promedio y circularidad entre los *pellets* y el micelio disperso. En el caso de los *pellets* el diámetro promedio fue mayor con respecto al del micelio disperso, mientras que para la circularidad fue lo contrario. Ambas morfologías se produjeron con las características morfológicas aceptables y las distribuciones de diámetro promedio y circularidad del micelio tuvieron una reproducibilidad aceptable.

## 5.2. Dispersión del aceite de ricino

### 5.2.1. Influencia de la morfología y de la concentración de micelio sobre la dispersión del aceite de ricino (sistema no aireado)

Uno de los objetivos principales del presente trabajo consistió en evaluar el efecto de la concentración y de la morfología del micelio sobre la dispersión del aceite de ricino. Las figuras 5.15 y 5.16 muestran imágenes típicas de la dispersión del aceite en el sistema modelo de tres fases (medio acuoso – aceite – micelio) con *pellets* y micelio disperso, respectivamente. En las imágenes de la figura 5.15 se pueden observar los *pellets* entre las gotas de aceite. Los *pellets* son de un tamaño mucho mayor que las gotas de aceite dispersas. Asimismo, en la figura 5.16 puede apreciarse el micelio disperso (micelio libre y agregados). En estos sistemas, la magnificación de 6X ( $M = 6$ ) mostró ser adecuada para medir toda la distribución de tamaños de gotas generada. Utilizando una magnificación de 4X el enfoque de las gotas más pequeñas no fue suficientemente claro, mientras que utilizando mayores magnificaciones algunas de las gotas más grandes quedaban fuera del campo enfocado.

La figura 5.17 muestra el diámetro Sauter de las gotas de aceite como función de la concentración y la morfología de la biomasa, en el sistema modelo de tres fases. Se observó que el tamaño de las gotas de aceite fue ligeramente menor en el sistema con *pellets* con respecto al sistema con micelio disperso. En el primero, el diámetro Sauter mínimo de las gotas estuvo alrededor de 550  $\mu\text{m}$  ( $\approx 0.25\text{-}0.5$  g/l de biomasa), mientras que en el sistema con micelio disperso estuvo alrededor de 600  $\mu\text{m}$ .

Para concentraciones de biomasa menores a 0.15 g/l, el diámetro Sauter para los sistemas con *pellets* o con micelio disperso presenta el mismo comportamiento: se observa la mayor disminución en éste parámetro. Para concentraciones de biomasa mayores de 0.15 g/l el diámetro Sauter de las gotas fue mayor para el sistema con micelio disperso con respecto al sistema con *pellets*. A partir de 0.15 g/l no parece haber una influencia importante de la concentración de biomasa sobre el diámetro Sauter, en el sistema con *pellets*, mientras que con micelio disperso se observó un ligero incremento en el diámetro Sauter de las gotas al incrementar la concentración de biomasa.

Generalmente la potencia suministrada se incrementa al incrementarse la viscosidad de la fase continua (Oldshue, 1981). Sin embargo, el comportamiento observado de las dispersiones (figura 5.17) no puede ser atribuido a cambios en el suministro de potencia ya que éste parámetro prácticamente no cambió en el rango de concentraciones de biomasa entre 0 – 1.6 g/l (figura 5.18).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

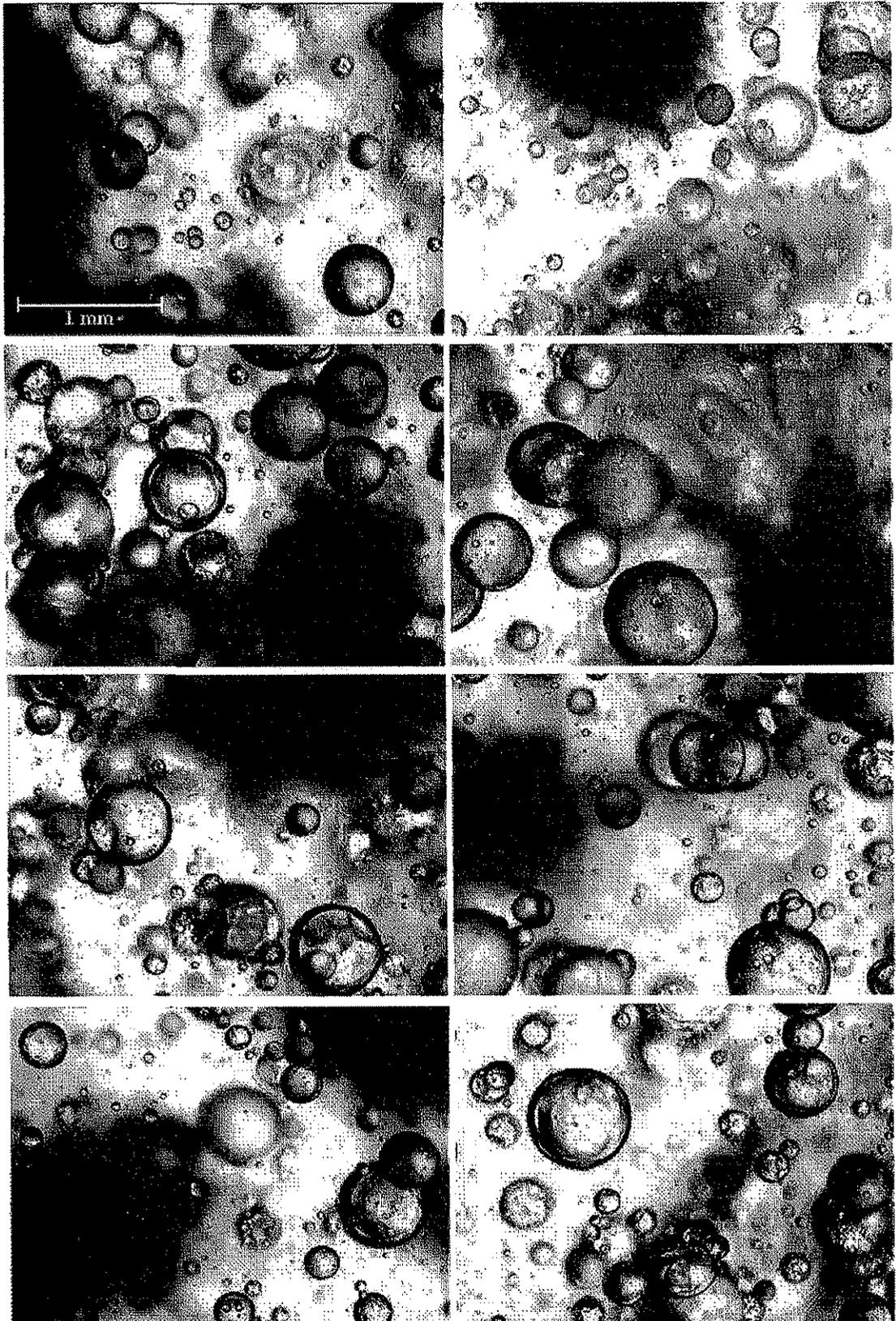


Figura 5.15. Imágenes típicas de la dispersión del aceite de ricino en el sistema de tres fases con pellets.

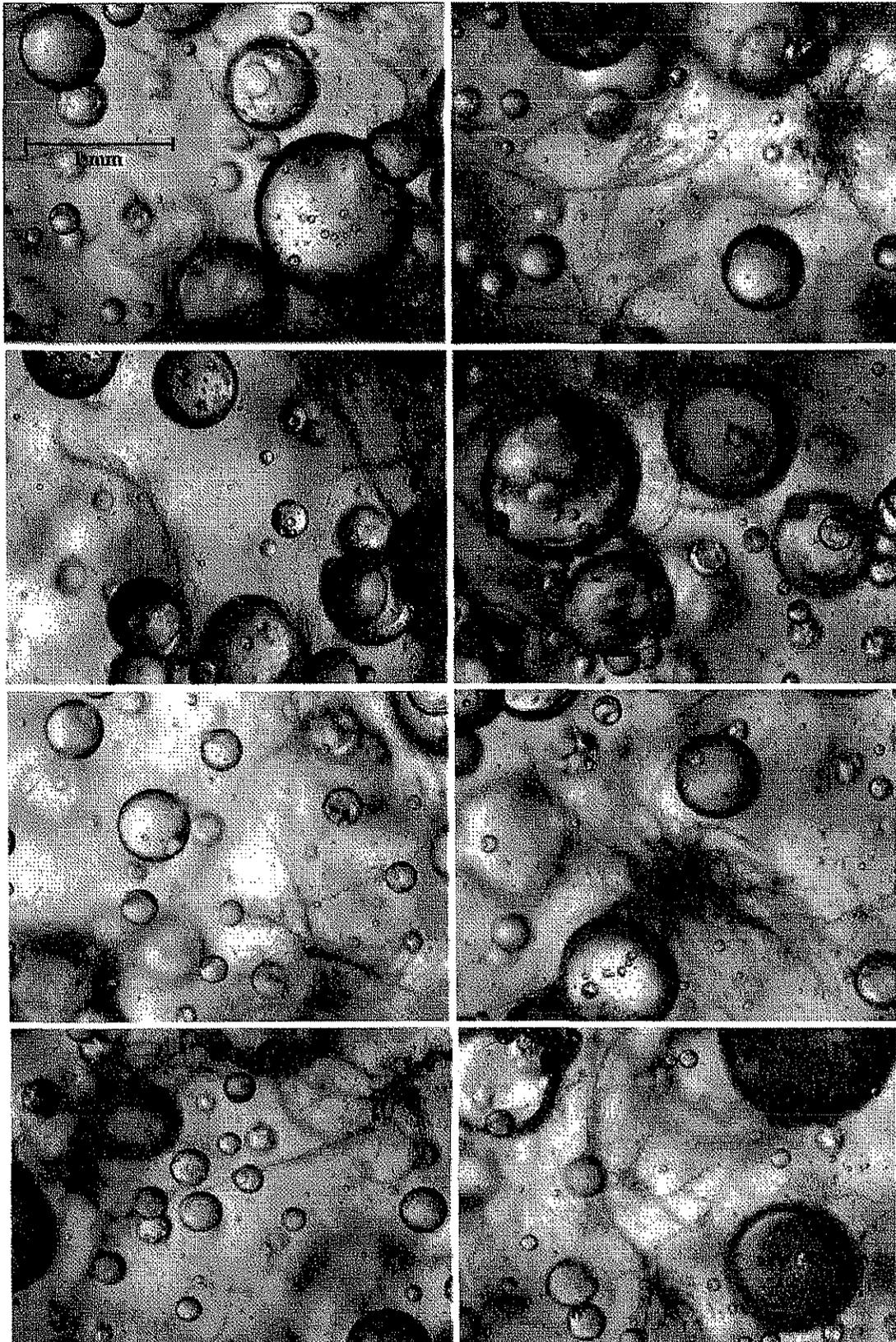


Figura 5.16. Imágenes típicas de la dispersión del aceite de ricino en el sistema de tres fases con micelio disperso.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

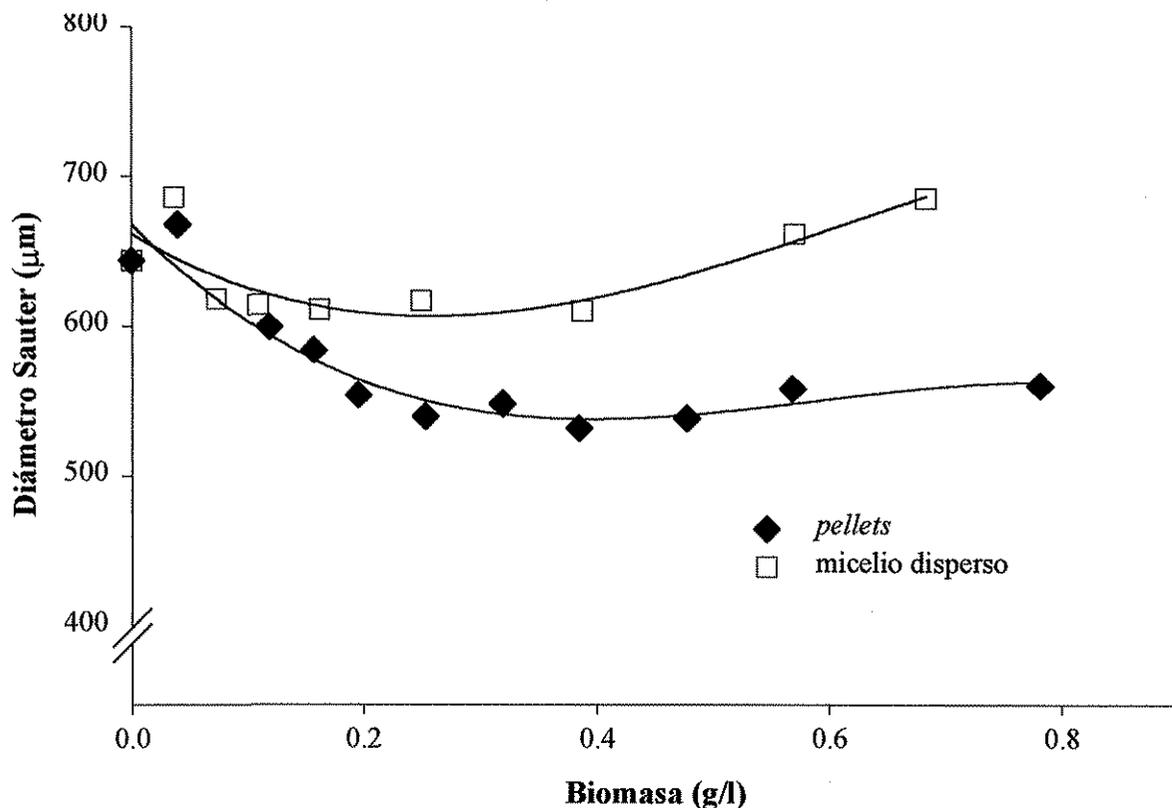


Figura 5.17. Efecto de la concentración y la morfología micelar sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite en el sistema de tres fases (no aireado).

Es esperable que el suministro de potencia será también constante al incrementar la concentración de biomasa en *pellets* (en el mismo rango de concentraciones de biomasa), ya que es bien conocido que el incremento en la viscosidad en una suspensión de *pellets* es menos significativo con respecto a una suspensión de micelio disperso (Pazouki y Panda, 2000).

El comportamiento observado en el diámetro Sauter de las gotas en el sistema modelo de tres fases puede ser cualitativamente explicado mediante diferentes mecanismos. Primero, la disminución en el tamaño de las gotas de aceite, en bajas concentraciones de biomasa, encontrada para la morfología en *pellets*, pudiera explicarse como sigue: los *pellets*, dado su tamaño y densidad, pudieran generar la ruptura de las gotas por el impacto *pellets* - gotas de aceite, dando lugar a tamaños de gotas más pequeños. El efecto de ruptura por partículas sólidas ya ha sido reportado para burbujas en tanques agitados (Kawase *et al*, 1997). Estos autores reportan que, para soluciones de carboximetilcelulosa (CMC), las burbujas grandes formadas por coalescencia fueron dispersadas por partículas esféricas sólidas de 2 mm de diámetro y con densidades de 1020 y 1200 kg/m<sup>3</sup>.

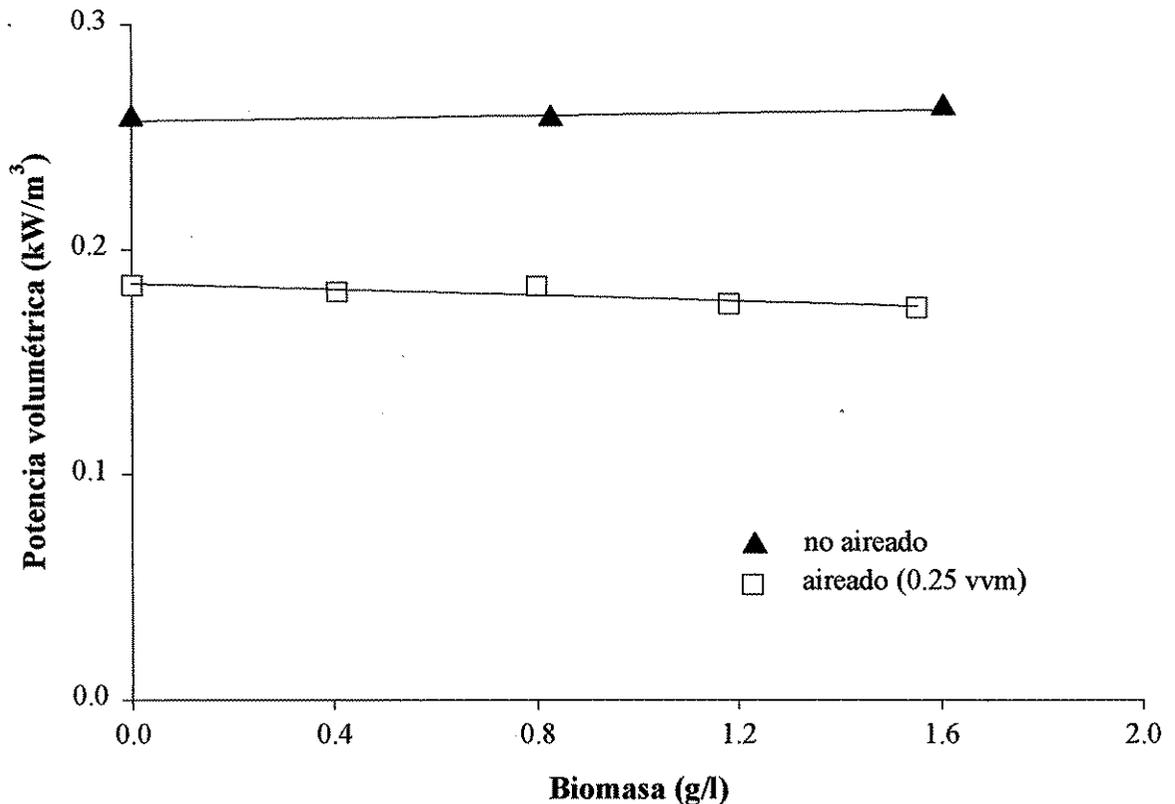


Figura 5.18. Efecto de la concentración de micelio disperso sobre el suministro de potencia en los sistemas no aireado y aireado.

Adicionalmente, Brilman *et al* (1999) y Gore y Crowe (1989) mencionan que las partículas grandes generan una estela de turbulencia detrás de sí mismas, incrementando así la turbulencia. En este caso, puede ser relevante la generación de una turbulencia adicional por la estela de turbulencia (*vortex shedding*) generada detrás de las partículas (*pellets*). Sin embargo, con el tipo de datos generados, es difícil probar que existe un efecto de la turbulencia sobre el tamaño de las gotas.

Por otro lado, Elgobashi (1994) menciona que al incrementar el área superficial de la fase sólida se incrementa la velocidad de disipación de energía. Schreck y Kleis (1993) sugieren que con partículas pequeñas es probable que la energía sea disipada por interacciones partícula-partícula, lo cual se ha reportado que es relevante para sistemas con partículas sólidas pequeñas y de forma irregular (Andersson y Rasmuson, 2000). Bennington y Bourne (1990) y Bennington y Thangavel (1993) reportaron una disminución en la intensidad de la turbulencia con la presencia de fibras de papel y con fibras de *nylon*, probablemente debido a las interacciones fibra-fibra que remueven energía de las *eddies* turbulentas. El efecto de las fibras de papel y de *nylon* sobre la turbulencia pudiera explicar el mismo efecto de las partículas de micelio disperso en la turbulencia (basándose

en la forma irregular de las fibras de papel y de *nylon* con las partículas de micelio, aunque la geometría de las partículas de micelio disperso es más compleja que las primeras). En este caso, las partículas de micelio disperso pudieran disminuir la intensidad de la turbulencia e incrementar la viscosidad de la fase acuosa (Rewatkar y Bennington, 2000).

Las figuras 5.19 y 5.20 muestran las gráficas de densidad de probabilidad de número de las gotas de aceite como función de la concentración de biomasa cuando se usaron *pellets* y micelio disperso, respectivamente. Se presentan las distribuciones para varias concentraciones de biomasa. En la figura 5.19 se puede observar que la presencia de los *pellets* en el sistema originó distribuciones ligeramente más hacia la izquierda con respecto al control (sin biomasa). También es evidente un número menor de gotas pequeñas y muy grandes (1270-1520  $\mu\text{m}$ ). Ello se refleja por una ligera disminución en la altura y en la cola de las distribuciones, respectivamente, al incrementar la concentración de biomasa.

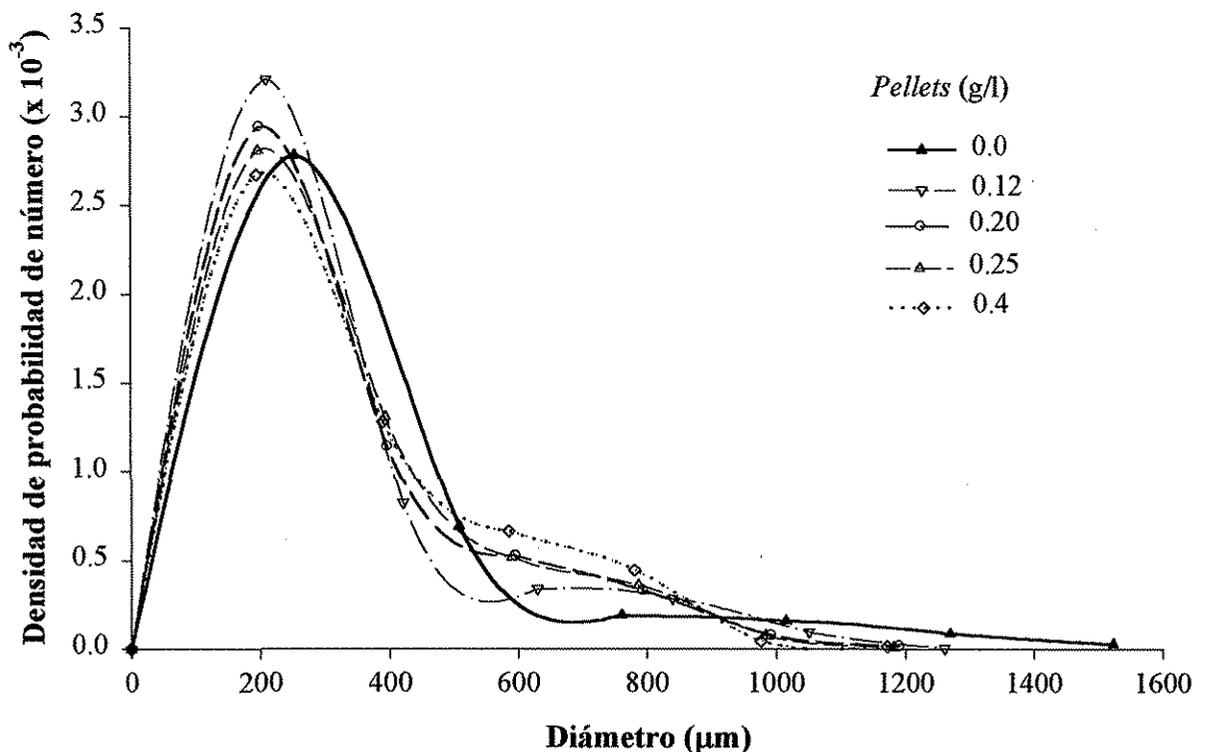
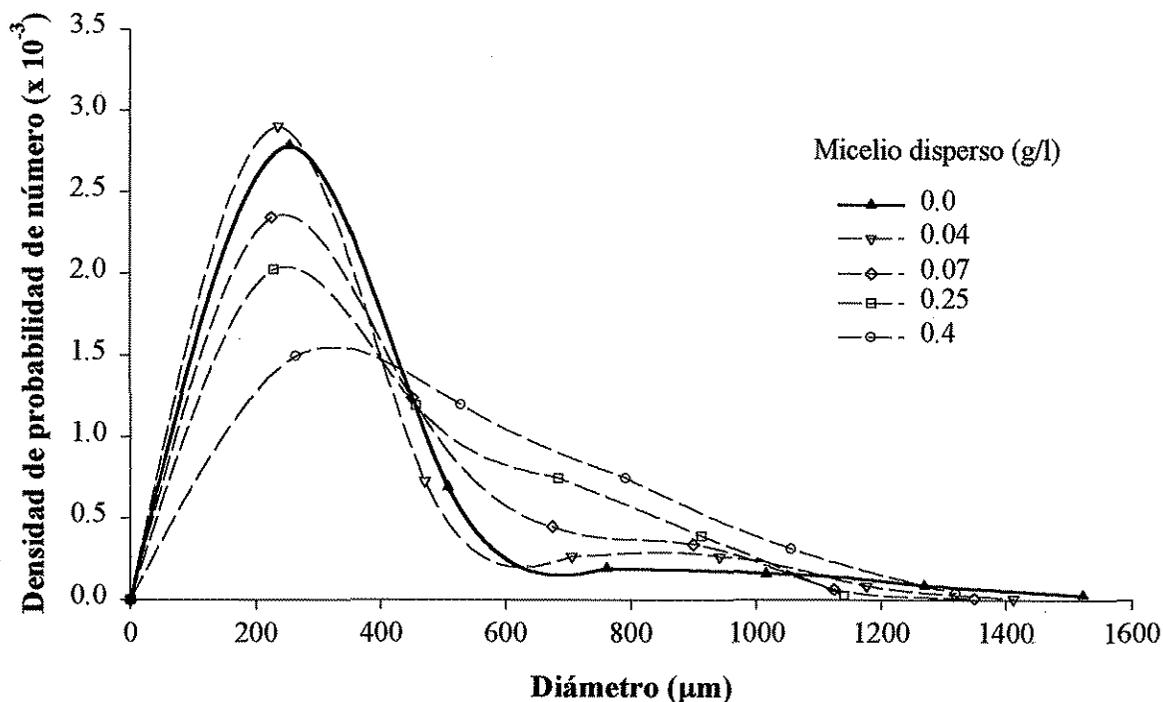


Figura 5.19. Efecto de la concentración de biomasa (*pellets*) sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema no aireado).



**Figura 5.20.** Efecto de la concentración de biomasa (micelio disperso) sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema no aireado).

En la figura 5.20 puede observarse una distribución de tamaños de gotas más amplia conforme se incrementó la concentración de micelio disperso. Esto es consistente con los reportes de la literatura en el sentido de que la distribución de tamaños de una fase dispersa se amplía debido a una mayor viscosidad y a las características no-Newtonianas de la fase acuosa (Nienow y Elson, 1988; Shimizu *et al.*, 1999). En vista de la mayor viscosidad generada con el micelio disperso con respecto a los *pellets* (figura 5.13), pueden esperarse mayores tamaños de gotas debido a una mayor coalescencia.

La figura 5.21 muestra gráficas comparativas del efecto de la morfología sobre la distribución de tamaño de las gotas, para dos concentraciones de biomasa (0.4 y 0.6 g/l). Puede apreciarse una diferencia significativa en las distribuciones para ambas morfologías. En el sistema con *pellets*, las distribuciones se encontraron más hacia la izquierda y con una mayor altura con respecto a las del micelio disperso. Para 0.4 g/l, el diámetro Sauter de las gotas para el sistema con *pellets* fue de 532  $\mu\text{m}$ , mientras que fue de 610  $\mu\text{m}$  para el sistema con micelio disperso (ver figura 5.17). Cuando se usó el micelio disperso, las distribuciones fueron más amplias (e incluso bimodales, ver figura 5.21b) que cuando se incorporaron *pellets* al sistema. La ampliación de la distribución del tamaño de gotas se discutió anteriormente. El comportamiento bimodal de las distribuciones se atribuye al hecho de que en las fases continuas no-Newtonianas una gota se dispersa en gotas grandes y gotas muy pequeñas, más que en gotas del mismo tamaño (Chhabra, 1993 citado por Shimizu *et al.*, 1999).

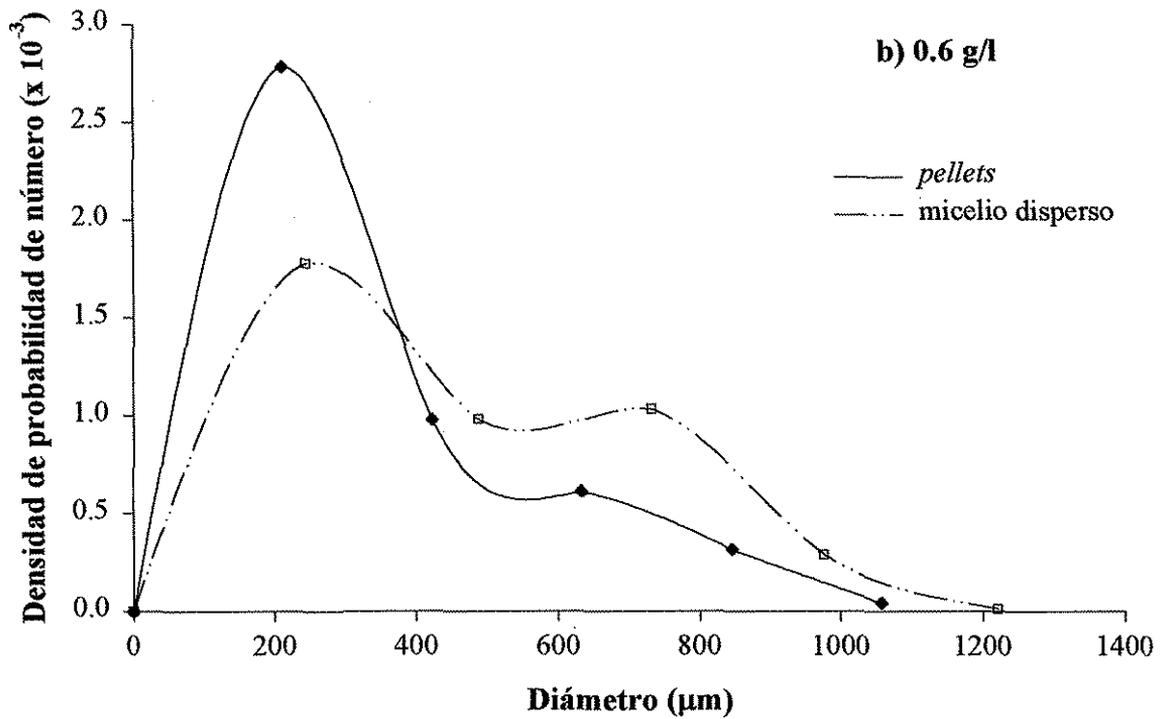
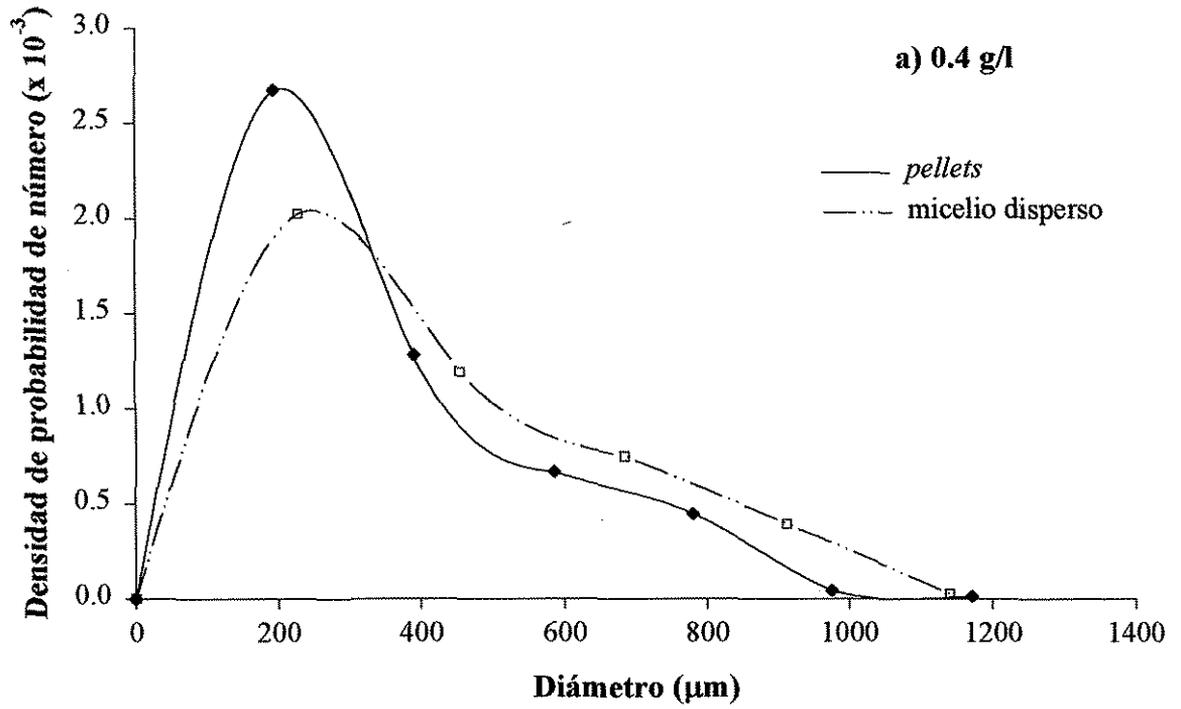


Figura 5.21. Efecto de la morfología de la biomasa sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema no aireado), a) 0.4 g/l, b) 0.6 g/l.

### 5.2.2. Influencia de la morfología y de la concentración de micelio sobre la dispersión del aceite de ricino (sistema aireado)

Las figuras 5.22 y 5.23 muestran imágenes típicas de la dispersión de aceite y de aire cuando se incorporaron al sistema *pellets* o micelio disperso, respectivamente, en el sistema modelo de cuatro fases (medio acuoso – aceite de ricino – aire – micelio de *Trichoderma harzianum*).

La figura 5.24 muestra el diámetro Sauter de las gotas de aceite como función de la concentración y la morfología de la biomasa, para el sistema de cuatro fases. La morfología en *pellets* no mostró un efecto significativo en el diámetro Sauter en el rango de concentraciones de biomasa estudiado, mientras que en el sistema con micelio disperso se observó una disminución (1220 a 927  $\mu\text{m}$ ) en éste parámetro conforme se incrementó la concentración de biomasa (de 0 a 1.32 g/l). La disminución en el diámetro Sauter de las gotas al incrementarse la concentración de micelio disperso, concuerda con los resultados obtenidos por Galindo *et al* (2000), bajo condiciones muy similares a las utilizadas en el presente estudio, excepto que la concentración de aceite en el sistema fue de 10 % (v/v) y el rango de concentraciones de biomasa estudiado fue hasta 5 g/l. Es importante mencionar que en el trabajo de Galindo *et al* (2000) la morfología miceliar no fue caracterizada en detalle; sin embargo, la información proporcionada (comunicación personal) fue que la morfología de la biomasa estuvo principalmente constituida por agregados laxos.

Con el propósito de observar si el suministro de potencia tenía algún efecto sobre el tamaño de las gotas, se determinó este parámetro en el sistema aireado con micelio disperso (ver figura 5.18). El suministro de potencia no presentó cambios significativos en el rango de concentraciones de biomasa de 0.4 a 1.6 g/l. A partir de estos datos es esperable que la potencia suministrada en suspensiones de *pellets* no presente cambios significativos, en este rango de concentraciones de biomasa. Estos resultados sugieren que la diferencia en el diámetro Sauter entre ambas morfologías no puede ser atribuido a diferencias en la potencia suministrada. El suministro de potencia fue menor en el sistema aireado con respecto al no aireado, lo cual se discutirá en la sección 5.3.1.

En varias de las imágenes capturadas (ver figura 5.25) se observó la adhesión de micelio disperso a las burbujas de aire. Este hecho probablemente inhibió la coalescencia de burbujas y/o gotas de aceite o la interacción gota-burbuja y, en consecuencia, promovió una disminución en el tamaño de gota en el sistema con micelio disperso. Se ha reportado (Nienow *et al*, 1986) que partículas sólidas pequeñas se pueden adherir a la superficie de las burbujas, disminuyendo la coalescencia. El fenómeno de adhesión de partículas sólidas a las burbujas ha sido reportado para el caso de partículas hidrofóbicas (Pelton y Piette, 1992), las cuales tienden a adherirse a las burbujas, más que

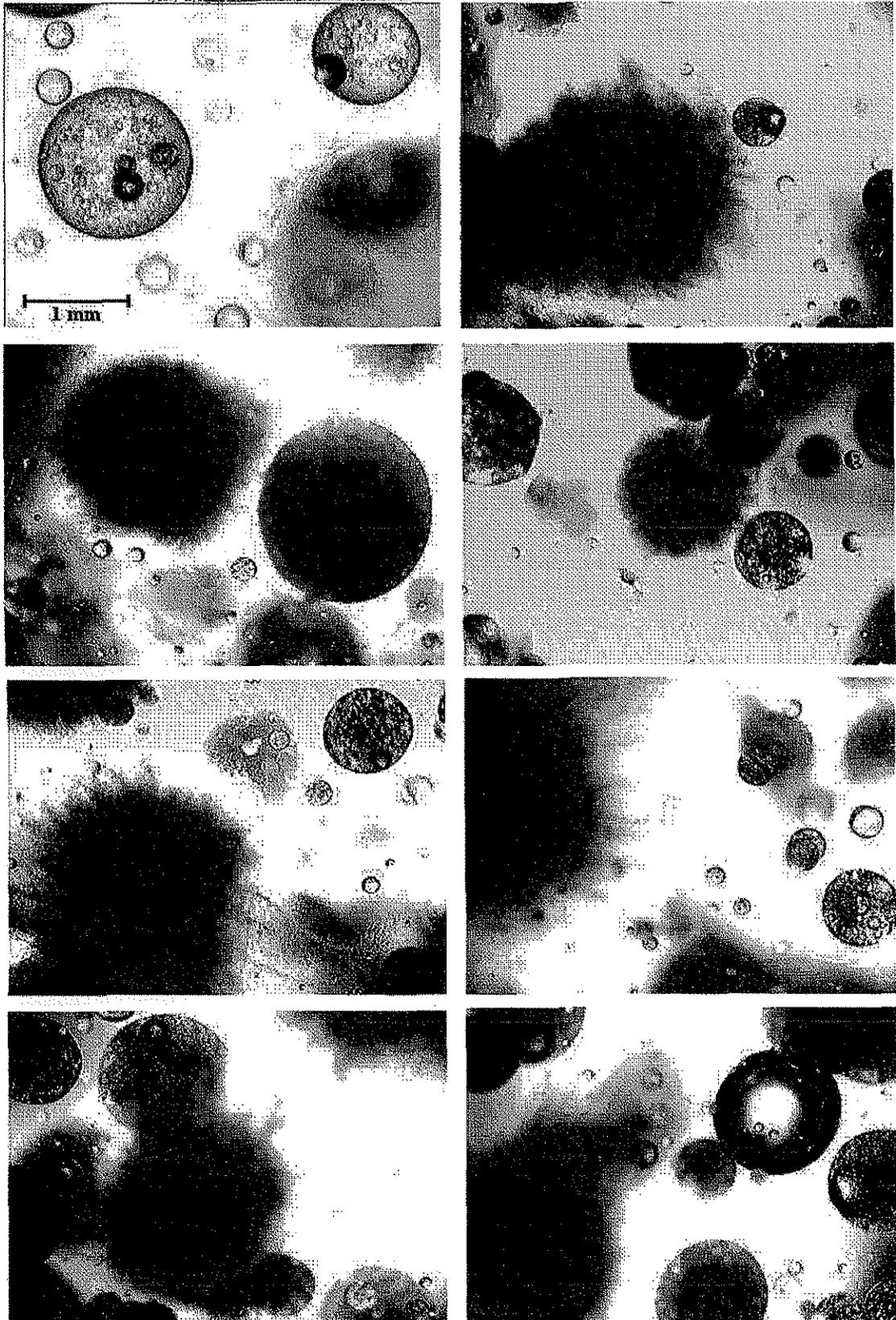


Figura 5.22. Imágenes típicas de la dispersión de aceite y aire en el sistema aireado con *pellets*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

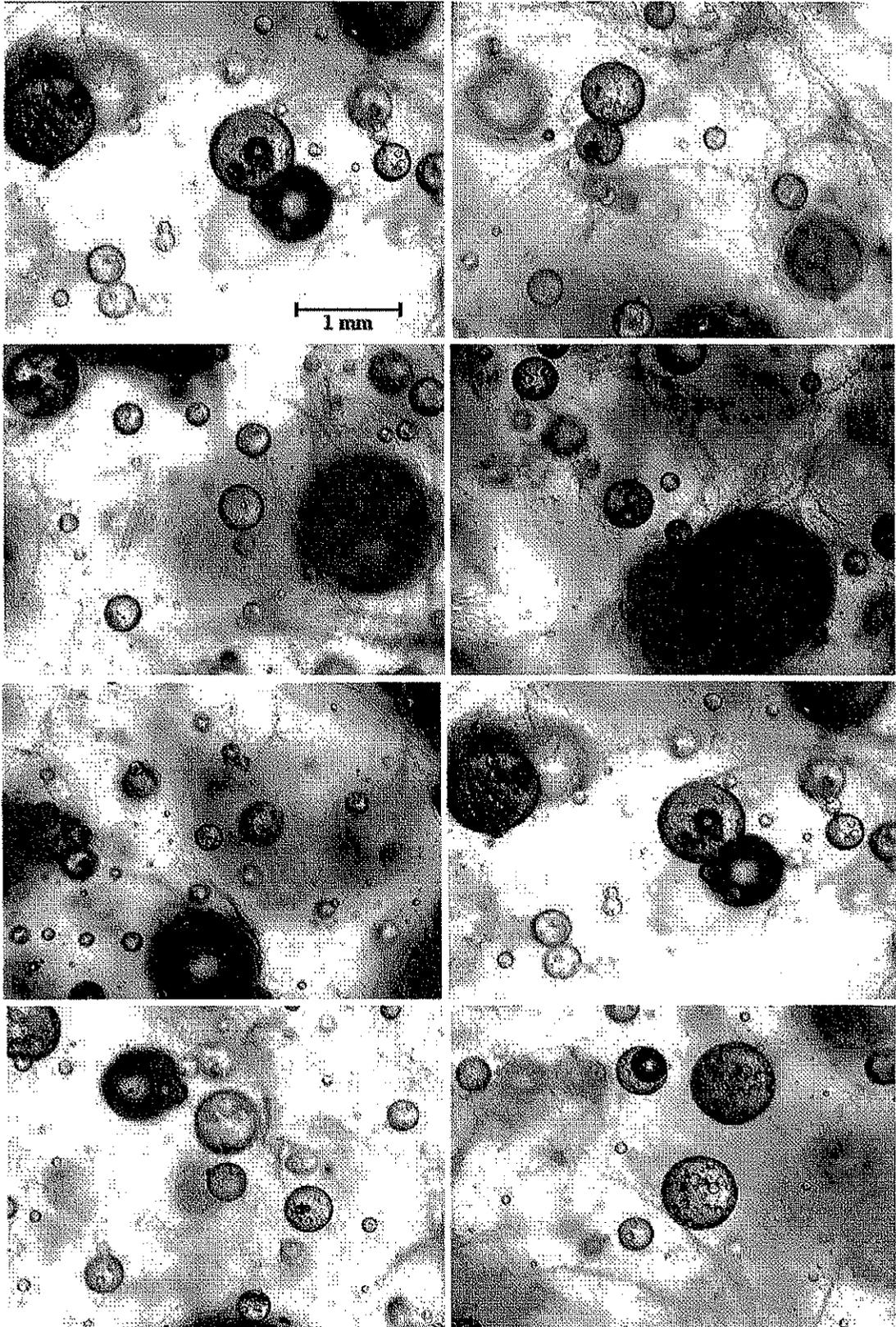


Figura 5.23. Imágenes típicas de la dispersión del aceite y del aire en el sistema aireado con micelio disperso.

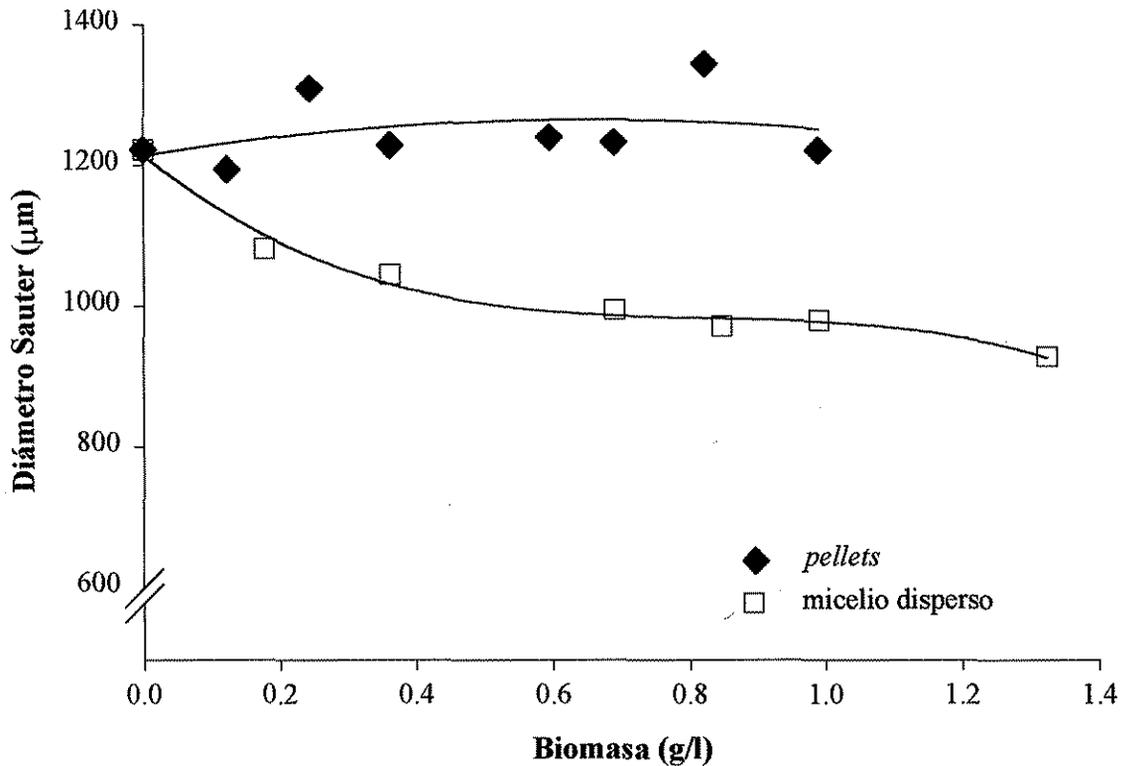


Figura 5.24. Efecto de la concentración y de la morfología micelar sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite en el sistema aireado (0.25 vvm).

estar suspendidas en el medio acuoso. Con respecto a esto, se ha reportado la naturaleza hidrofóbica de las membranas celulares de hongos miceliales (Doyle y Rosenberg, 1990) y es esperable la adhesión del micelio a las burbujas de aire. Para otro sistema se ha reportado que la naturaleza turbulenta del medio acuoso impide una adhesión de partículas de carbón activado a las burbujas (Roizard *et al*, 1999). En nuestro caso, varias de las imágenes muestran claramente la adhesión de micelio disperso a las burbujas de aire e incluso a las gotas de aceite (ver figura 5.25).

Las figuras 5.26 y 5.27 muestran las gráficas de densidad de probabilidad de número como función de la concentración de biomasa para la morfología en *pellets* y micelio disperso, respectivamente. Al igual que en la figura 5.24, en la figura 5.26 se puede observar que no hay un efecto significativo de la concentración de biomasa en las distribuciones de tamaño de las gotas, para la morfología en *pellets*, con respecto al sistema sin biomasa (control). Por otro lado, las distribuciones más hacia la izquierda y de mayor altura de la figura 5.27 (con respecto al control) del sistema con micelio disperso se reflejaron en la disminución en el diámetro Sauter de las gotas al incrementar la concentración de biomasa (mostrado en la figura 5.24).

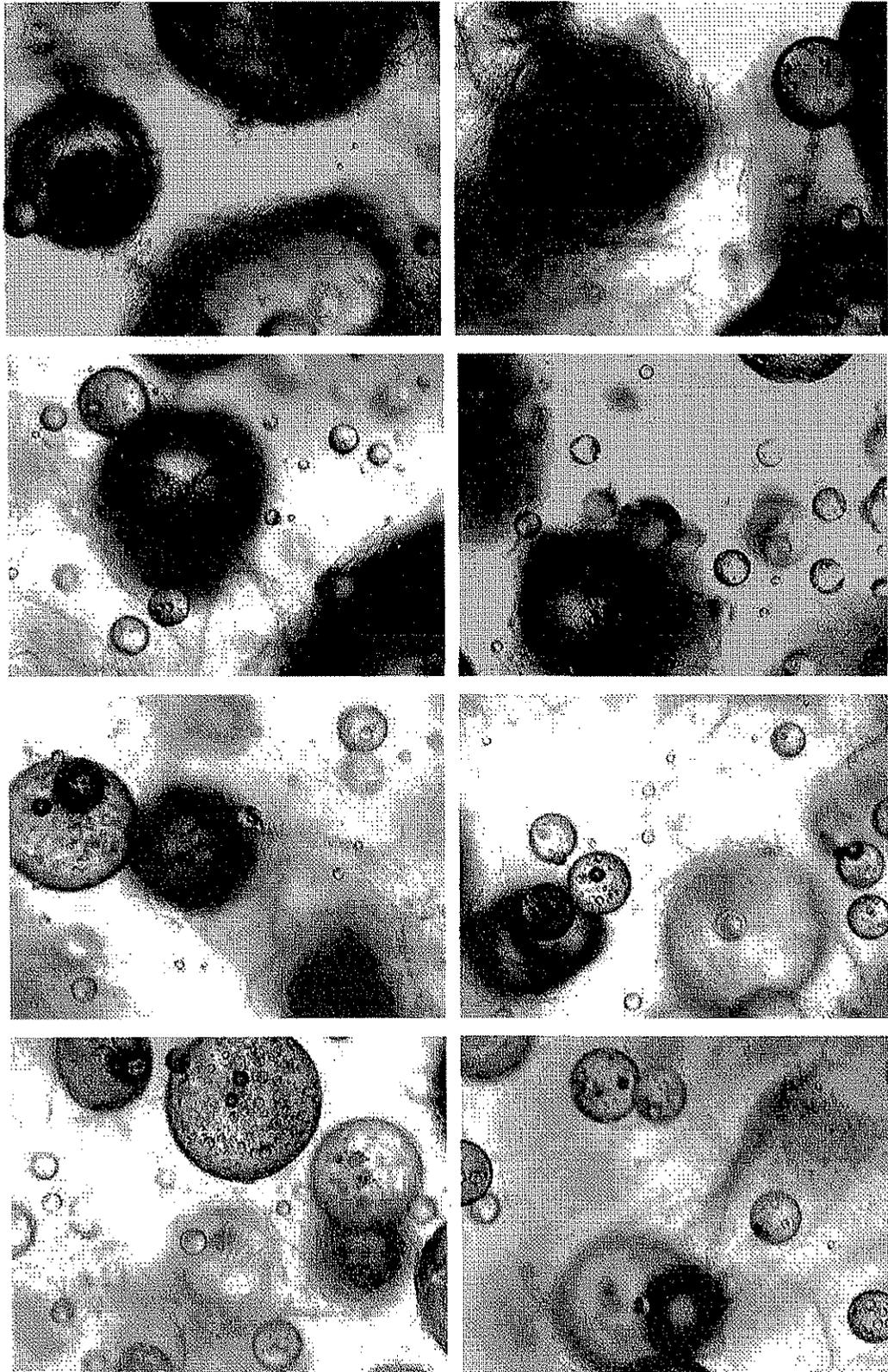


Figura 5.25. Adhesión del micelio disperso a las burbujas de aire.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

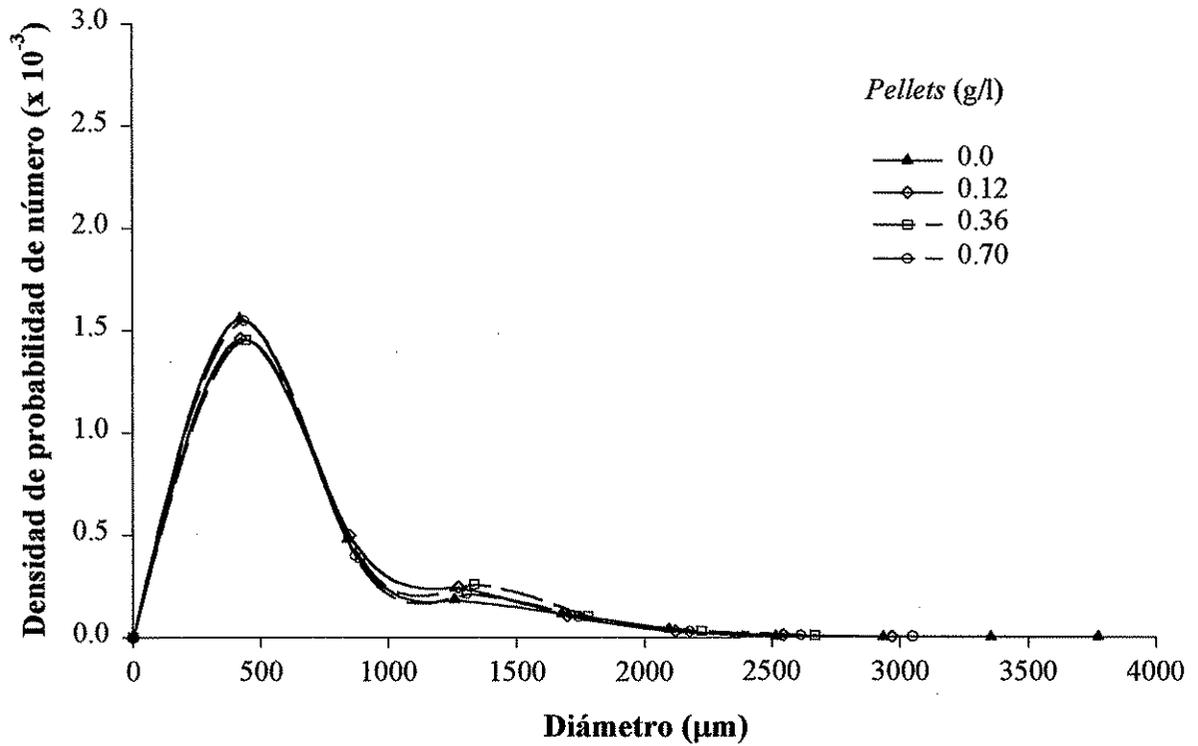


Figura 5.26. Efecto de la concentración de biomasa (*pellets*) sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema aireado, 0.25 vvm).

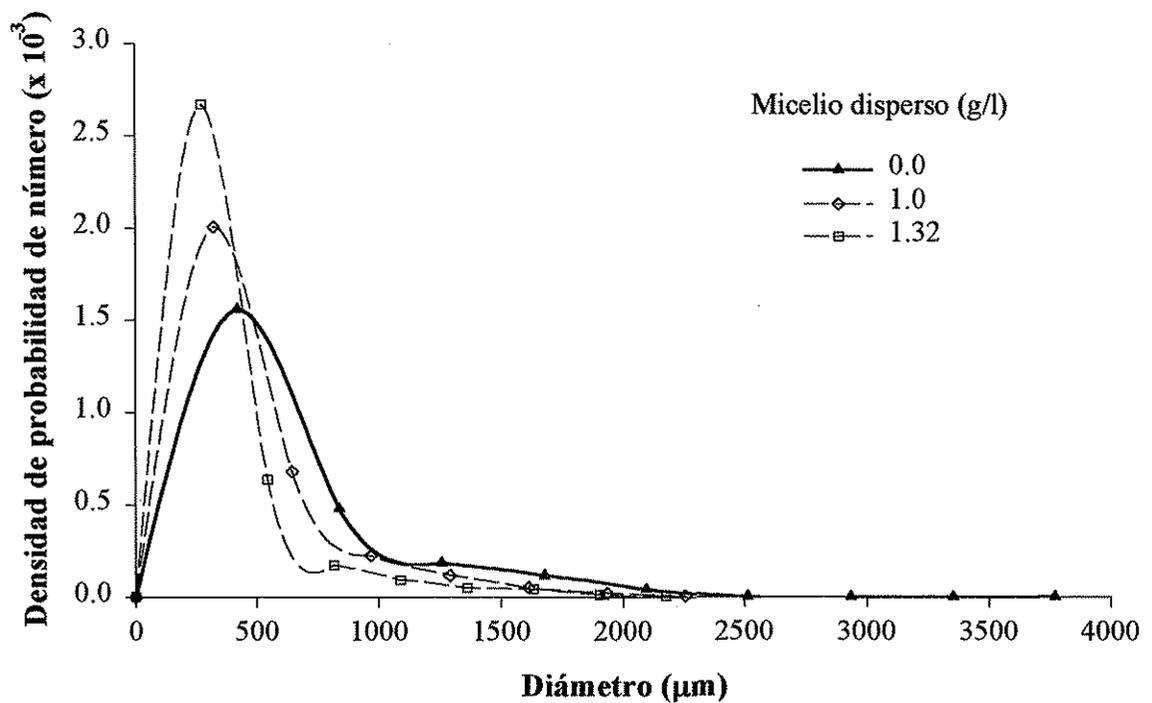


Figura 5.27. Efecto de la concentración de biomasa (micelio disperso) sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema aireado, 0.25 vvm).

Es posible que exista otro mecanismo (posiblemente de mayor importancia que la adhesión del micelio a las burbujas y/o gotas) que pudiera explicar la disminución en el diámetro Sauter de las gotas al incrementar la concentración de micelio disperso. Éste podría estar relacionado con las características reoadelgazantes y la mayor viscosidad de suspensiones de micelio disperso con respecto a las suspensiones de *pellets*, las cuales se presentaron en las figuras 5.13 y 5.14, respectivamente. Se sabe que la viscosidad en los sistemas con micelio disperso origina una mayor coalescencia (Pazouki y Panda, 2000) y, en consecuencia, mayores tamaños de gotas y burbujas. Para las gotas y burbujas grandes resulta más difícil que sigan los patrones de flujo generados por el impulsor (ver figura 5.28) y presentan, por lo tanto, una tendencia a ascender por el centro del tanque de mezclado. Las gotas y burbujas más pequeñas, que siguen más fácilmente los patrones de flujo generados por el impulsor (Roman y Tudose, 1997a), se esperaría que se concentren en la región cercana a la pared del tanque.

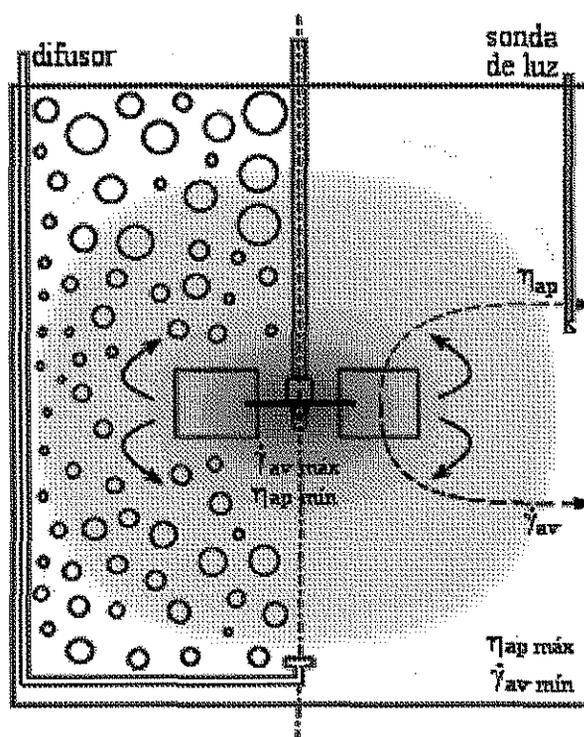


Figura 5.28. Patrones de flujo de un tanque agitado con micelio disperso.

Adicionalmente, Nienow y Elson (1988), Zhao *et al* (1999) y Shimuzu *et al* (1999) mencionan que una mayor viscosidad y el comportamiento de un flujo no-Newtoniano de la fase continua, respectivamente, originan una ampliación de la distribución del tamaño de la fase dispersa (gotas o burbujas). En las fases continuas no-Newtonianas, una gota usualmente se dispersa en gotas grandes y gotas muy pequeñas, lo cual también puede resultar en la formación de gotas muy pequeñas

(Chhabra, 1993 citado por Shimizu *et al*, 1999). El hecho anterior sugiere que se formaría una distribución de tamaños de gotas cada vez más amplia al incrementarse la concentración de micelio disperso en el sistema. De acuerdo con los patrones de flujo generados por el impulsor, solamente las gotas y/o burbujas pequeñas se concentrarán en las cercanías de la pared y serían las cuantificadas por la sonda de luz (dada su posición dentro del tanque) (ver **figura 4.9**). Las características viscosas y reoadelgazantes del sistema con micelio disperso y el hecho de que sólo se cuantifican las gotas y/o las burbujas en las cercanías de la pared podría explicar la disminución en el diámetro Sauter de las gotas en el sistema con micelio disperso, ilustrado en la **figura 5.24**.

Por otro lado, la viscosidad de suspensiones de *pellets* prácticamente no se incrementa con la concentración de biomasa (**figura 5.13**), lo que explicaría que el diámetro Sauter de las gotas no presente cambios significativos al incrementarse la concentración de biomasa (**figura 5.24**).

El “acanalamiento” de las gotas y/o burbujas grandes por el centro del tanque de mezclado sugiere una “segregación” del aceite y del aire al incrementar la concentración de micelio disperso en el sistema. No fue posible una observación más directa de la zona del impulsor debido a la opacidad de las suspensiones. Sin embargo, a mayores concentraciones de micelio disperso, fue posible observar la ruptura de burbujas grandes en la superficie del líquido, en las cercanías de la flecha del tanque de mezclado. Debe destacarse que esto no fue observado en las cercanías de la pared (ver **figura 5.29**). Para lograr un mejor contraste entre el medio acuoso y las fases dispersas, en la **figura 5.29** el medio acuoso ha sido teñido con azul de metileno al final del experimento. Esta observación sugiere una disminución en la cantidad de gas disperso ( $\phi_g$ ) en el tanque de mezclado (debido a la segregación de ésta fase) al incrementar la concentración de micelio disperso. El efecto fue más evidente para las burbujas, las cuales se rompen en la superficie (**figura 5.29**). Sin embargo, para el caso del aceite, éste efecto fue también evidente ya que se observó una ligera acumulación de esta fase en la superficie del líquido (alrededor de la flecha), al incrementar la concentración de micelio disperso. Ello sugiere un acanalamiento de ésta fase, o la ascensión de gotas de mayor diámetro por el centro del tanque, aunque menos significativo que en el caso de las burbujas.

La segregación de las fases dispersas y el acanalamiento de las gotas y/o burbujas más grandes por el centro del tanque de mezclado, que se observaron en altas concentraciones de micelio disperso, son congruentes con los efectos que se han reportado respecto al efecto de partículas sólidas sobre el *holdup* del gas y respecto al efecto del incremento en la viscosidad sobre la dispersión de la fase gaseosa en otros sistemas. Rewatkar y Bennington (2000) mencionaron que la cantidad de gas disperso en toda la suspensión disminuye conforme se incrementa la concentración de fibras de papel en reactores agitados. Janse *et al* (1999) reportaron una disminución en el *holdup* del gas con

un incremento (relativo al agua) en la concentración de fibras de papel. Lindsay *et al* (1995) y Reese *et al* (1996) mencionan que las burbujas grandes (generadas por coalescencia) ascienden más rápido que las burbujas pequeñas, presentando un tiempo de retención reducido y, por lo tanto, un menor *holdup* del gas. Banisi *et al* (1995b) indicaron que probablemente el incremento en la viscosidad debido a la presencia de sólidos, origina una estabilización y un mayor tamaño de la estela de turbulencia generada detrás de las burbujas en ascensión, lo cual ocasiona que la velocidad de ascensión de las burbujas cercanas a una estela de turbulencia sea mayor. La mayor velocidad de ascensión (un incremento de hasta un 40 % con respecto al sistema aire-agua) resultante, reduce el  $\Phi_g$ .

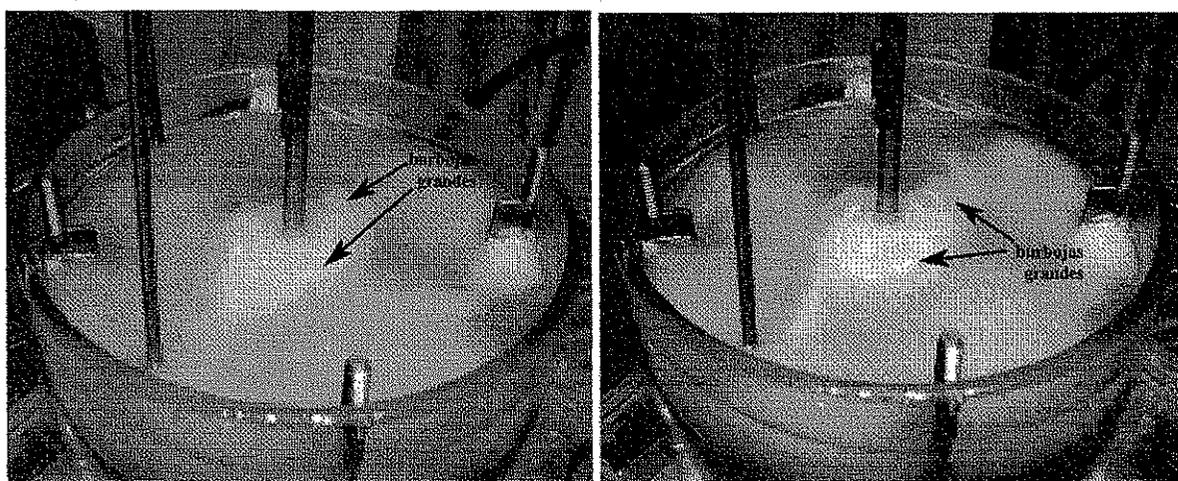


Figura 5.29. Acanalamiento de las burbujas grandes en el sistema con micelio disperso.

Se ha reportado (Vlaev y Martinov, 1998) que en presencia de fluidos reoadelgazantes, la velocidad del líquido disminuye exponencialmente con la distancia radial desde la punta del impulsor. Este hecho dificulta el transporte de burbujas a la pared del tanque y ésta región concentra solamente una parte de burbujas muy pequeñas. Lo anterior ha sido confirmado por Kawase *et al* (1997) y por McFarlane y Nienow (1996) para soluciones viscosas y reodelgazantes de CMC. Estos autores mencionan que observaciones visuales en soluciones de CMC indican la formación de burbujas grandes (por coalescencia), las cuales ascendieron cerca del centro del reactor agitado.

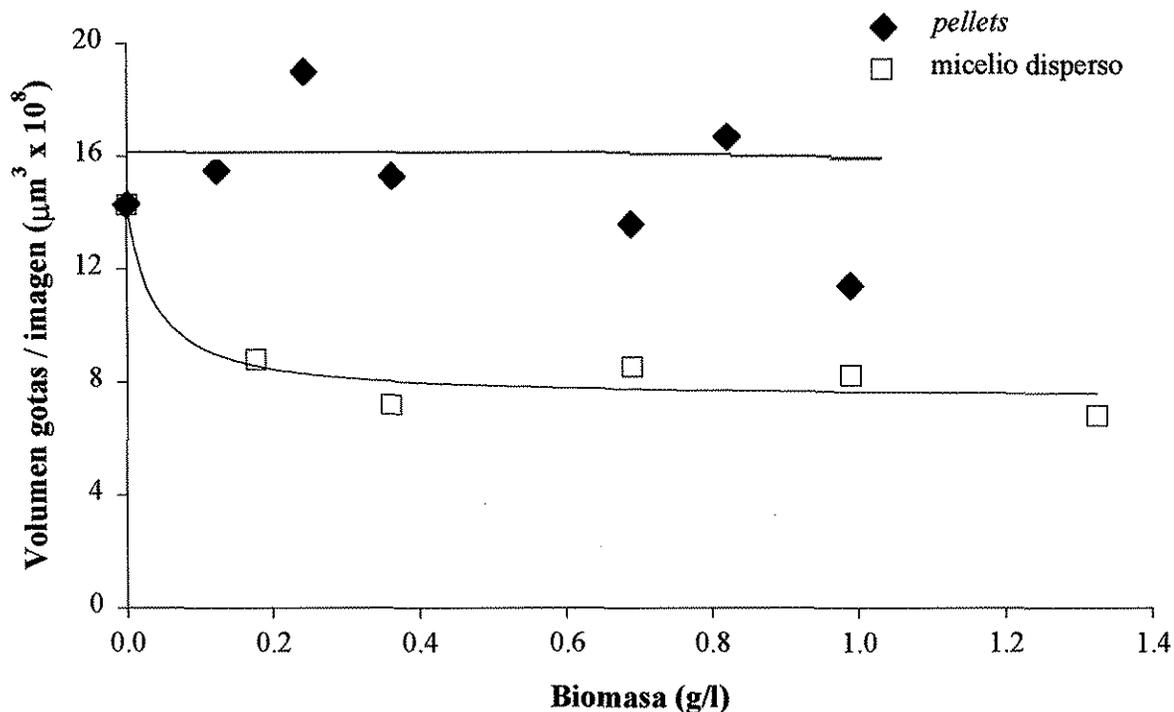
El mecanismo propuesto de que en las cercanías de la pared del tanque de mezclado se concentren las gotas y/o burbujas más pequeñas solamente, sugiere que el volumen de aceite o de aire disperso en esa zona será menor. Una forma de estimar la cantidad de aceite de ricino o de aire disperso en la zona de captura de las imágenes (lo cual no es posible apreciar a partir de las gráficas de distribución de tamaños) fue la determinación del volumen ocupado por las gotas o burbujas *por*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

*imagen*. Éste parámetro es calculado a partir de dividir la sumatoria del volumen ocupado por los objetos de un conjunto de imágenes analizadas entre el número de éstas.

Se determinó el volumen de las gotas *por imagen* al incrementar la concentración de biomasa (ver **figura 5.30**). Los resultados sugieren que existe una menor cantidad de aceite disperso en el medio (o al menos en la cercanías de la pared del tanque de mezclado) al incrementarse la concentración de biomasa, en el sistema con micelio disperso. En el sistema con *pellets*, el volumen de las gotas por imagen permaneció prácticamente constante, lo cual indica que la cantidad de aceite y aire disperso no cambiaron (en la zona de muestreo) al incrementarse la concentración de biomasa.

La **figura 5.31** ilustra el efecto de la morfología de la biomasa sobre la distribución de tamaño de las gotas, en el sistema de cuatro fases, para dos concentraciones de biomasa (0.36 y 1.0 g/l). Puede apreciarse una diferencia significativa en las distribuciones de las gotas entre ambas morfologías. Las distribuciones para el caso de los *pellets* son más amplias que para el micelio disperso. Por otro lado, el micelio disperso muestra distribuciones con una mayor altura y más hacia la izquierda con respecto a las obtenidas para el sistema con *pellets*.



**Figura 5.30.** Variación en el volumen de las gotas por imagen con la concentración y la morfología miceliar (sistema aireado, 0.25 vvm).

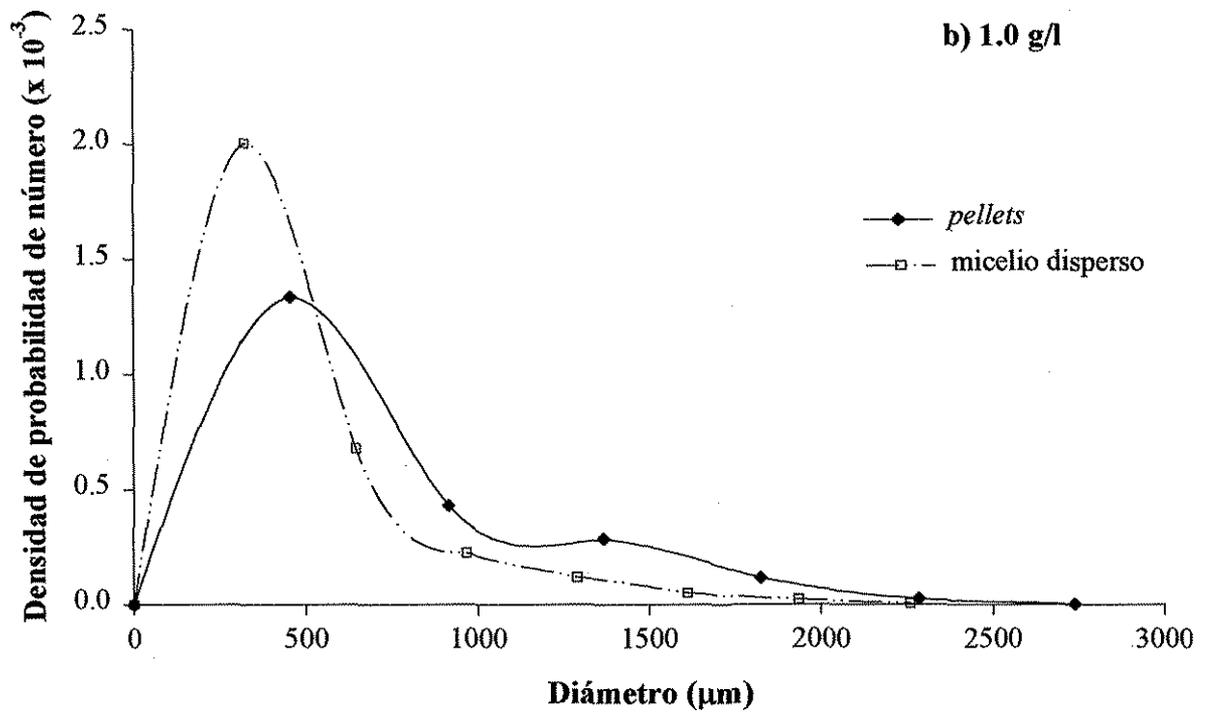
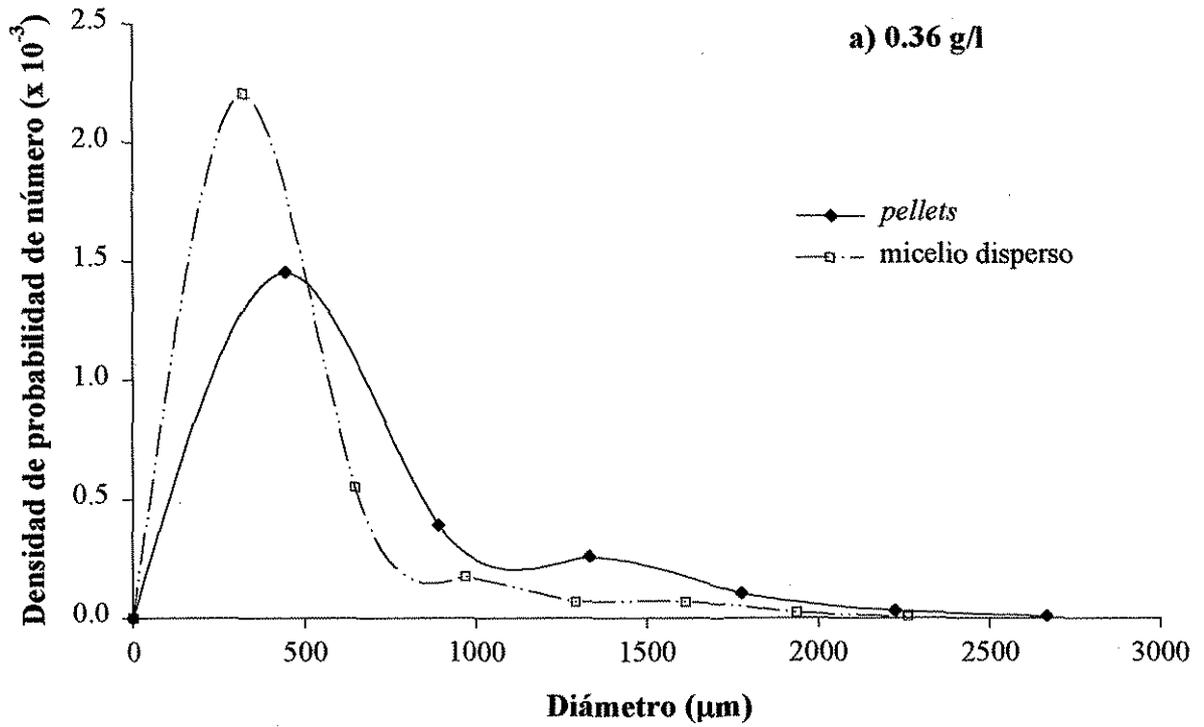


Figura 5.31. Efecto de la morfología micelar sobre las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (sistema aireado, 0.25 vvm) para dos concentraciones de biomasa.

Comparando las distribuciones de tamaño de las gotas en ambas concentraciones de micelio disperso, se puede ver que son muy similares, al igual que en el sistema con *pellets*. Lo anterior indica que la concentración de biomasa no tuvo un efecto significativo sobre la distribución de tamaños de las gotas, para esas dos concentraciones de biomasa.

### **5.2.3. Conclusiones respecto a la dispersión del aceite como función de la morfología de la biomasa**

La morfología de *Trichoderma harzianum* afectó la dispersión del aceite de ricino. En el sistema no aireado, los *pellets* presentaron tamaños de gotas más pequeños con respecto al sistema con micelio disperso. El menor tamaño de las gotas obtenido en el sistema con *pellets* con respecto al sistema con micelio disperso se explicó en términos del impacto entre los *pellets* con las gotas de aceite, lo que pudo dar lugar a tamaños de gota más pequeños. Los mayores tamaños de gotas en el sistema con micelio disperso fueron atribuidos al incremento en la viscosidad de la fase acuosa con esta morfología, lo cual causó una mayor coalescencia de las gotas y, en consecuencia, tamaños de gotas más grandes con respecto al sistema con *pellets*.

En el sistema aireado, se observaron tamaños de gotas más pequeños en el sistema con micelio disperso que en el sistema con *pellets*. El menor tamaño de las gotas en el sistema con micelio disperso se explicó por el hecho de que en la zona de la pared del tanque se concentran las gotas más pequeñas y son las cuantificadas (por estar la sonda de luz localizada en esta zona). En el sistema con *pellets* no parece haber una concentración de las gotas pequeñas en las cercanías de la pared del tanque y, en consecuencia, el diámetro Sauter de las gotas no mostró cambios significativos al incrementar la concentración de biomasa.

## **5.3. Dispersión del aire**

### **5.3.1. Efecto de la presencia de aire en el tamaño de las gotas de aceite**

La introducción de aire en el sistema (0.25 vvm, 1.675 l aire / minuto) causó un incremento en el diámetro Sauter de las gotas de aceite con respecto al sistema sin aire. Las figuras 5.32 y 5.33 comparan el diámetro Sauter de las gotas obtenido bajo condiciones no aireadas y aireadas, tanto para el sistema con *pellets*, como para el sistema con micelio disperso.

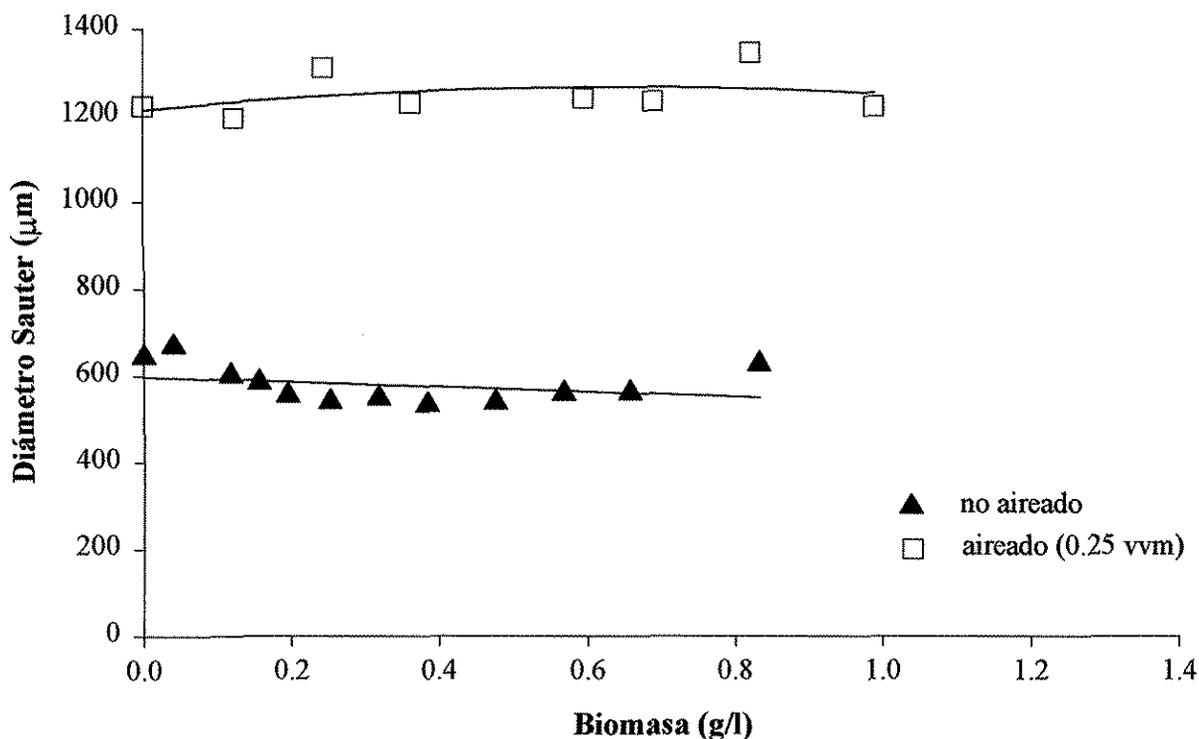


Figura 5.32. Efecto de la aireación (0.25 vvm) sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite (sistemas con *pellets*).

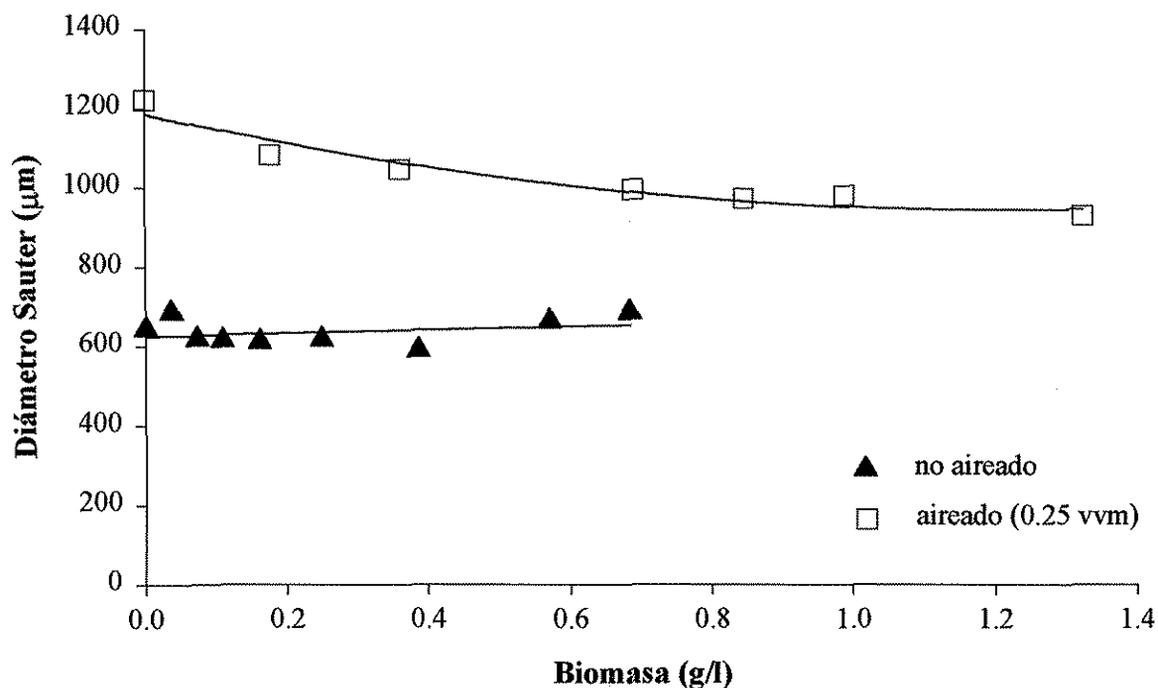
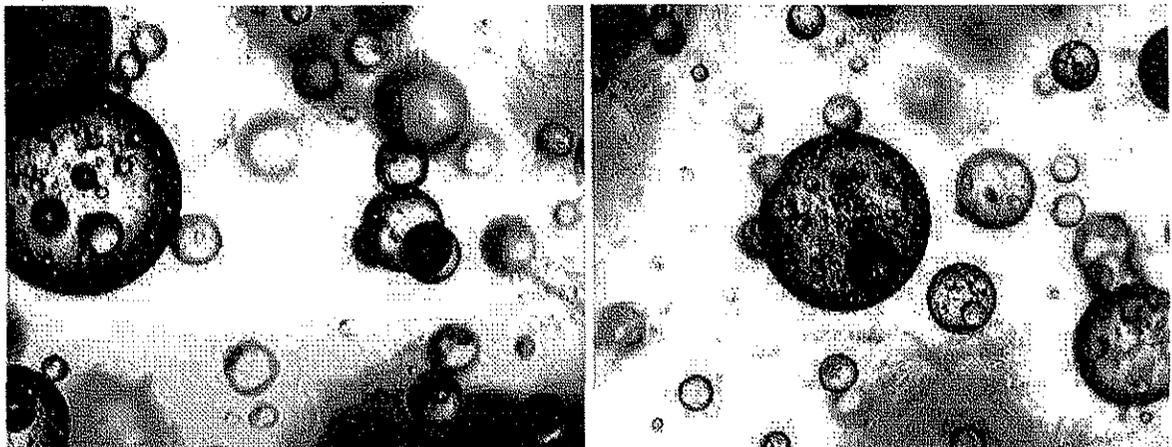


Figura 5.33. Efecto de la aireación (0.25 vvm) sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite (sistemas con micelio disperso).

El incremento en el diámetro Sauter de las gotas en presencia de aire es congruente con la caída en la potencia debida a la aireación, la cual se ilustró en la **figura 5.18**. Para los sistemas sin biomasa, la potencia suministrada fue de  $0.25 \text{ kW/m}^3$  en condiciones no aireadas y de  $0.18 \text{ kW/m}^3$  en condiciones aireadas. Esto representa una caída en la potencia ( $P_g/P = 0.74$ ) debido a la presencia de aire en el sistema. Esta disminución en la potencia ( $0.07 \text{ kW/m}^3$ ) fue seguramente determinante en el mayor diámetro Sauter de las gotas.

Otro fenómeno que puede estar determinando el incremento del diámetro Sauter de las gotas de aceite debido a la aireación se refiere a la introducción de burbujas dentro de gotas de aceite. Como se ilustra en la **figura 5.34**, se observó que algunas de las burbujas parecen estar dentro de las gotas; sin embargo, existe la posibilidad de que se encuentren enfrente de las gotas en el tanque de mezclado y no necesariamente dentro de ellas. El fenómeno de la presencia de burbujas dentro de gotas también ha sido observado por Galindo *et al* (2000) para el mismo sistema (aceite de ricino-aire-medio acuoso). Estos autores, haciendo un seguimiento -cuadro por cuadro- de grabaciones en video de sus experimentos, observaron que las burbujas de aire estaban efectivamente dentro de las gotas de aceite, ya que ambas se movían juntas (especialmente cuando se interrumpió la agitación y la aireación). Estas estructuras de aceite-aire ascendieron más rápido que las gotas sin burbujas. Los autores mencionan que el mecanismo por el cual las burbujas se introducen en las gotas no está completamente claro, pero pudiera estar asociado a un “atrapamiento” de las burbujas por estructuras irregulares y grandes de aceite que fueron observadas en sus experimentos.



**Figura 5.34.** Imágenes de burbujas de aire dentro de gotas de aceite.

El diámetro Sauter de las gotas en el sistema aireado fue mayor con respecto al sistema no aireado para todo el rango de concentraciones de biomasa estudiado y para ambas morfologías. Considerando los sistemas sin biomasa, es posible observar un aumento de aproximadamente 550

$\mu\text{m}$  en el diámetro Sauter de las gotas en el sistema aireado ( $d_{32} \approx 1220 \mu\text{m}$ ) con respecto al sistema no aireado ( $d_{32} \approx 644 \mu\text{m}$ ).

En el sistema con *pellets*, la presencia de aire en el sistema causó un incremento de aproximadamente  $550 \mu\text{m}$  en el diámetro Sauter con respecto al sistema sin aire (alrededor de un 46 % mayor con respecto al sistema no aireado), en todo el rango de concentraciones de biomasa estudiado. En los sistemas con micelio disperso, la diferencia en el diámetro Sauter de las gotas entre los sistemas no aireado y aireado disminuyó al incrementar la concentración de biomasa (ver **figura 5.33**). Para los sistemas sin biomasa, la presencia de aire causó un incremento en el tamaño de las gotas de aproximadamente  $550 \mu\text{m}$ , mientras que para una concentración de micelio disperso de  $0.65 \text{ g/l}$  la presencia de aire causó un incremento de aproximadamente  $300 \mu\text{m}$  en el diámetro Sauter de las gotas con respecto al sistema no aireado (ver **figura 5.33**).

Adicionalmente, el suministro de aire en el sistema causó diferencias en la apariencia de la superficie de las gotas con respecto al sistema no aireado. La **figura 5.35** muestra imágenes comparando ambos sistemas. En condiciones no aireadas, las gotas de aceite mostraron una superficie lisa (imágenes a-d), mientras que en el sistema aireado la superficie de las gotas se caracterizó por tener muchas gotas pequeñas aparentemente unidas a ésta (imágenes e-h). Este fenómeno también fue observado por Galindo *et al* (2000). Esta apariencia de las gotas también pudiera tratarse de una dispersión múltiple, probablemente con gotas del medio acuoso dentro de la gota de aceite.

### 5.3.2. Localización de las burbujas de aire

Como se mencionó en la sección 5.3, se ha observado la presencia de las burbujas de aire dentro de gotas de aceite (ver **figura 5.34**). En esta sección se determinó la localización de las burbujas (ya sea dentro de gotas o libres en el medio acuoso, ver **figura 5.36**) como función de la concentración y de la morfología miceliar. Los resultados se presentan en la **figura 5.37**. Se estimó el porcentaje en volumen de las burbujas dentro de las gotas, determinado con respecto al volumen total de las burbujas (dentro de gotas y libres). En el sistema con *pellets*, el porcentaje de burbujas dentro de gotas no mostró cambios significativos al incrementar la concentración de biomasa y osciló alrededor del 40 %. Con micelio disperso se observó un incremento (del  $\sim 40$  al  $\sim 75$  %) en la proporción de burbujas dentro de gotas al incrementar la concentración de biomasa.

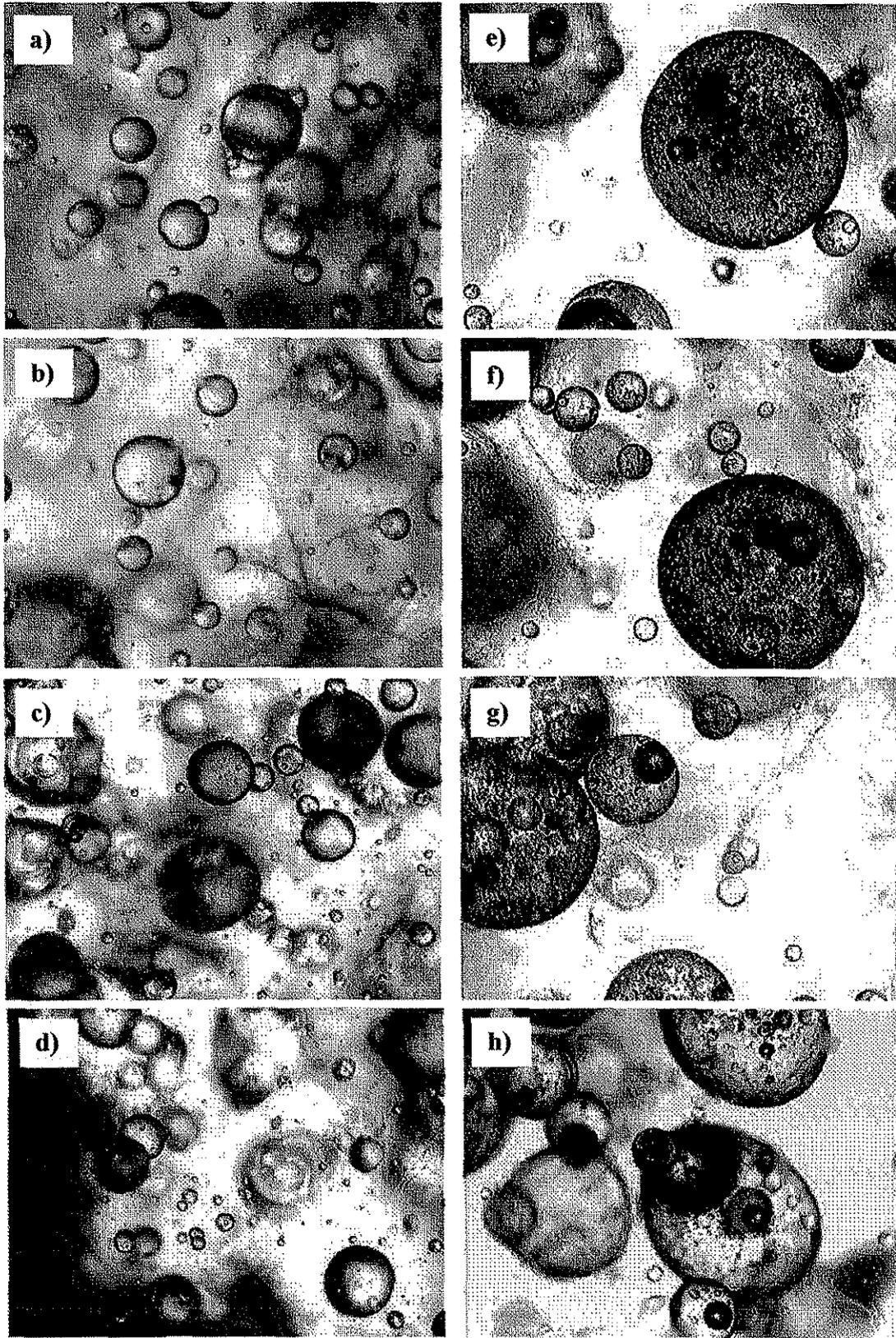


Figura 5.35. Diferencias en la apariencia de la superficie de las gotas de aceite entre los sistemas no aireado (imágenes a-d) y aireado (imágenes e-h).

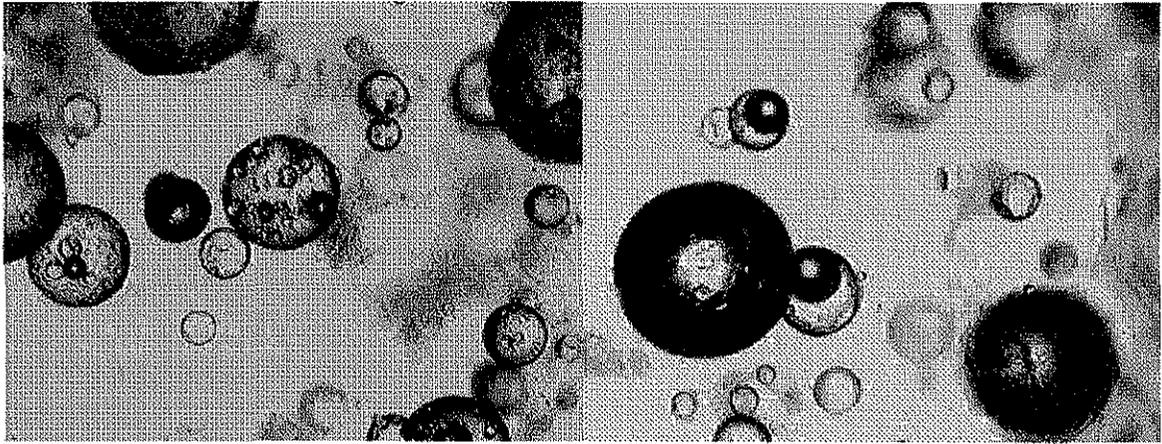


Figura 5.36. Localización de las burbujas de aire (ya sea dentro de gotas de aceite o libres en el medio acuoso).

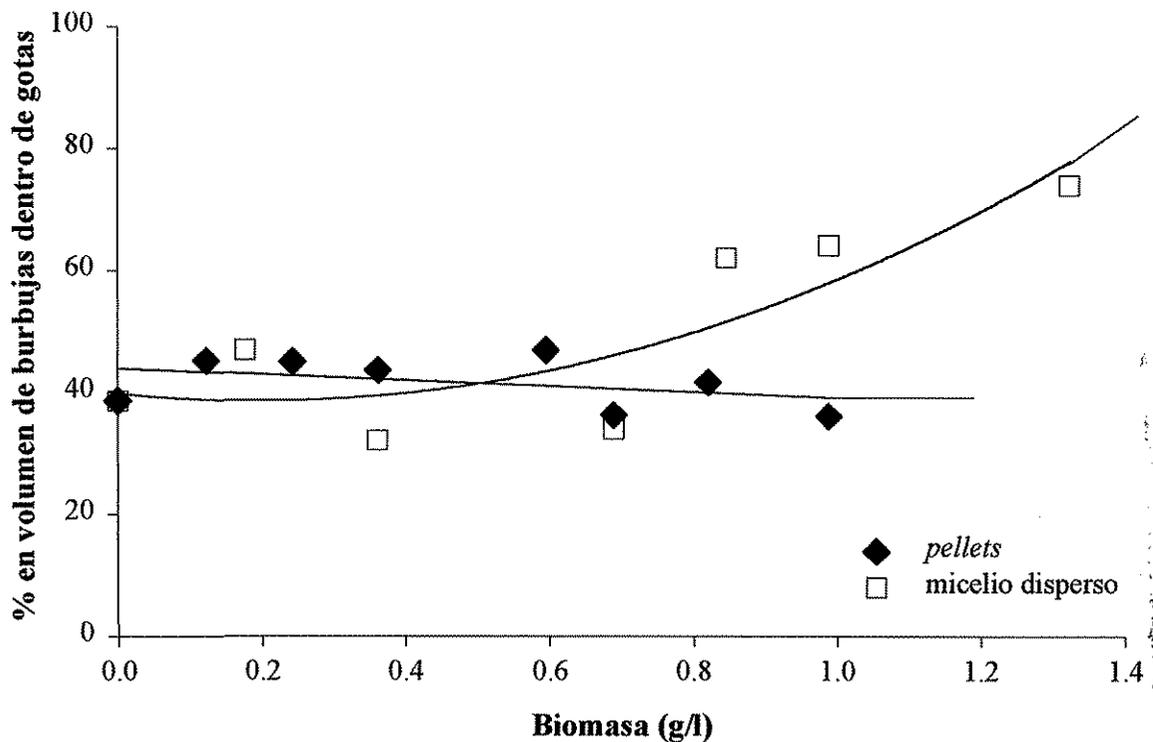


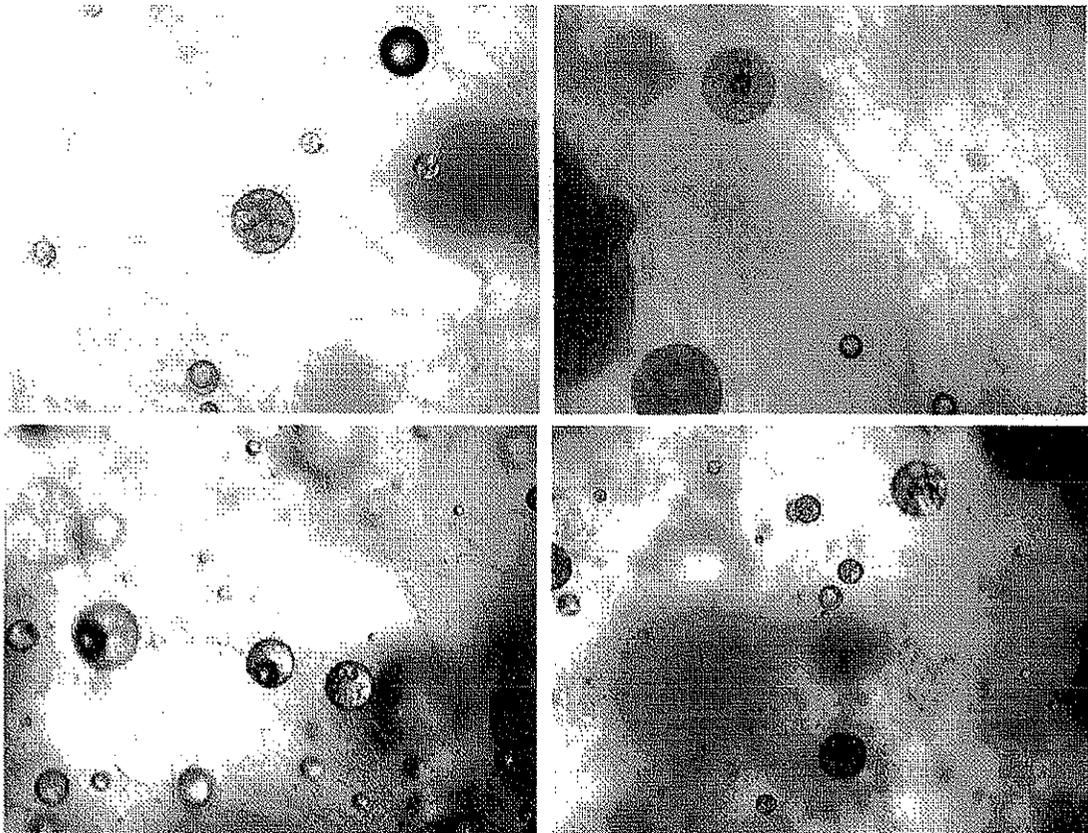
Figura 5.37. Porcentaje (en volumen) de burbujas dentro de gotas como función de la concentración y la morfología del micelio.

La figura 5.38 ilustra imágenes del sistema con una concentración de micelio disperso de 1.32 g/l, con un bajo número de burbujas libres. El número de objetos por imagen resulta útil para estimar la cantidad relativa de los objetos, lo cual no es posible apreciar en las distribuciones de tamaño. La figura 5.39 ilustra el número de burbujas libres y de burbujas dentro de gotas *por imagen* para el

sistema con micelio disperso. La marcada disminución en el número, así como en el tamaño (ver sección 5.3.3) de las burbujas libres sugirió que, al incrementar la concentración de micelio disperso, el volumen total de las burbujas (dentro de gotas y libres) disminuiría debido al tamaño más pequeño y al número más bajo de las burbujas libres. La **figura 5.40** ilustra una disminución más significativa en el volumen *por imagen* de las burbujas totales con respecto al de las burbujas dentro de gotas. Al calcular la relación del volumen de las burbujas dentro de gotas entre el volumen de las burbujas totales (graficado en la **figura 5.37**) mediante la siguiente expresión,

$$\% \text{ en volumen de burbujas dentro de gotas} = \frac{\text{volumen de las burbujas dentro de gotas}}{\text{volumen de las burbujas totales}} * 100$$

éste se incrementa del  $\sim 40$  al  $\sim 75$  %, con la concentración de biomasa. Sin embargo, este incremento fue una consecuencia del bajo número y del tamaño más pequeño de las burbujas libres, lo cual causó una disminución en el volumen de las burbujas totales, mientras que el volumen de las burbujas dentro de gotas no cambió significativamente (ver **figura 5.40**). Lo anterior causó un incremento en el cociente de la relación anterior (porcentaje de burbujas dentro de gotas ilustrado en la **figura 5.37**) con la concentración de biomasa.



**Figura 5.38.** Imágenes con pocas burbujas libres en altas concentraciones de micelio disperso.

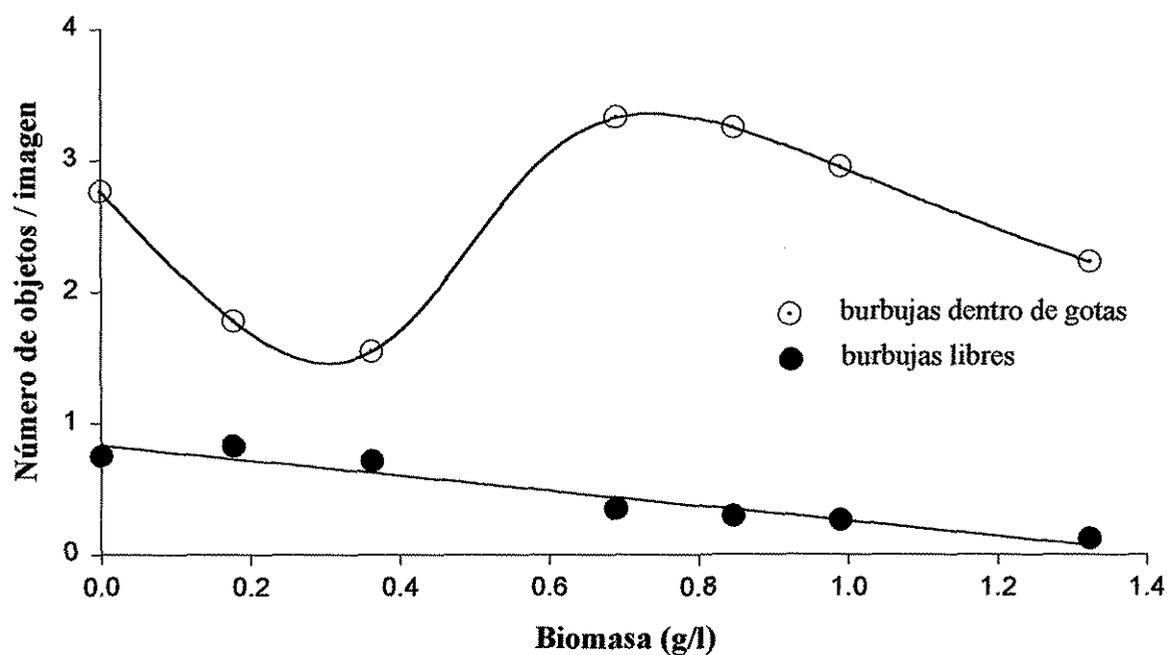


Figura 5.39. Disminución en el número de burbujas libres por imagen al incrementar la concentración de micelio disperso.

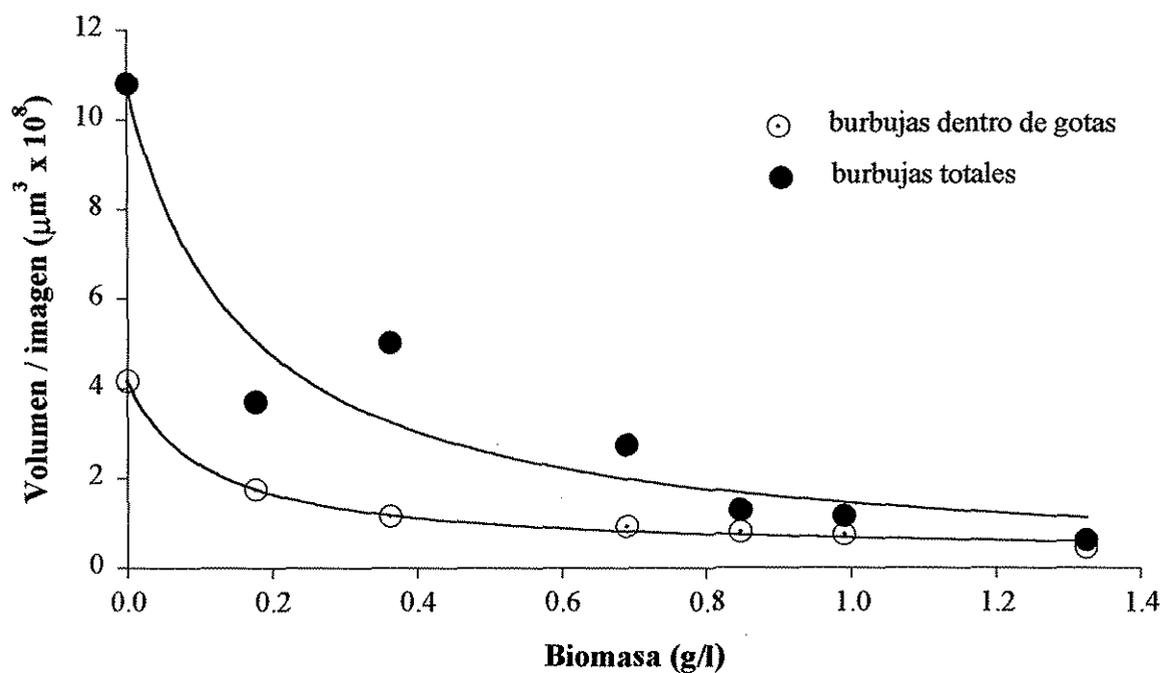


Figura 5.40. Volumen por imagen de las burbujas dentro de gotas y de las burbujas totales en el sistema aireado (0.25 vvm) con micelio disperso.

En el sistema con *pellets*, el volumen de burbujas dentro de gotas y el de burbujas totales *por imagen* no presentan una tendencia clara con respecto a la concentración de biomasa (figura 5.41). Sin embargo es claro que no se observó una disminución importante en el volumen por imagen de las burbujas dentro de gotas ni de las burbujas totales, resaltando el hecho de que en este caso (*pellets*) la segregación no es un fenómeno de relevancia.

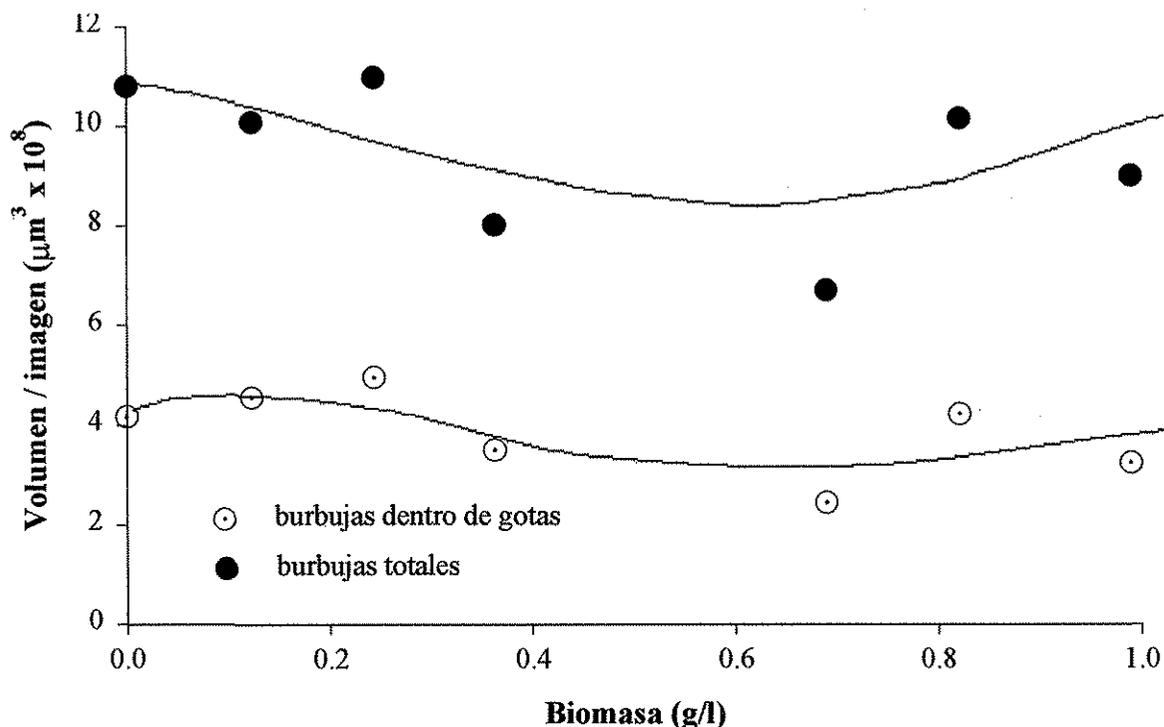


Figura 5.41. Volumen por imagen de las burbujas dentro de gotas y de las burbujas totales en el sistema aireado (0.25 vvm) con *pellets*.

### 5.3.3. Efecto de la morfología y la concentración del micelio sobre el tamaño de las burbujas libres

En la figura 5.36 se presentaron imágenes de burbujas dentro de gotas de aceite así como de burbujas libres dispersas en el medio acuoso. En esta sección se analiza la dispersión de las burbujas libres. La figura 5.42 muestra el efecto de la concentración y de la morfología del micelio sobre la dispersión de las burbujas libres, en el sistema de cuatro fases. El diámetro Sauter para las burbujas libres prácticamente no cambió conforme se incrementó la concentración de biomasa, en el sistema con *pellets*. En el sistema con micelio disperso se observó una disminución en el diámetro Sauter de las burbujas libres al incrementarse la concentración de biomasa. El diámetro Sauter de

las burbujas libres en el sistema sin biomasa fue de 817  $\mu\text{m}$ , mientras que para una concentración de micelio disperso a partir de 0.2 g/l, el diámetro Sauter de las burbujas libres fue de entre 420 y 600  $\mu\text{m}$  (figura 5.42).

La disminución en el diámetro Sauter de las burbujas libres, en el sistema con micelio disperso, puede explicarse mediante el fenómeno de “acanalamiento” (anteriormente mencionado) de las burbujas grandes por el centro del tanque al incrementarse la concentración de micelio disperso en el sistema. Se ha propuesto que la mayor viscosidad debida al incremento de la concentración de micelio disperso en el sistema, genera mayor coalescencia y, en consecuencia, burbujas de mayor tamaño. Como ha sido mencionado anteriormente, es más difícil que las burbujas más grandes sigan los patrones de flujo generados por el impulsor (Roman y Tudose, 1997a) y más bien presentarían una tendencia a ascender por el centro del tanque. Este fenómeno ha sido observado visualmente en los experimentos descritos en este documento: se ha detectado una mayor ruptura de burbujas grandes en la superficie del líquido y alrededor de la flecha, en el sistema con micelio disperso. La ruptura de las burbujas más grandes ocurre alrededor de la flecha y no se observó en las cercanías de la pared del tanque de mezclado (ver figura 5.29).

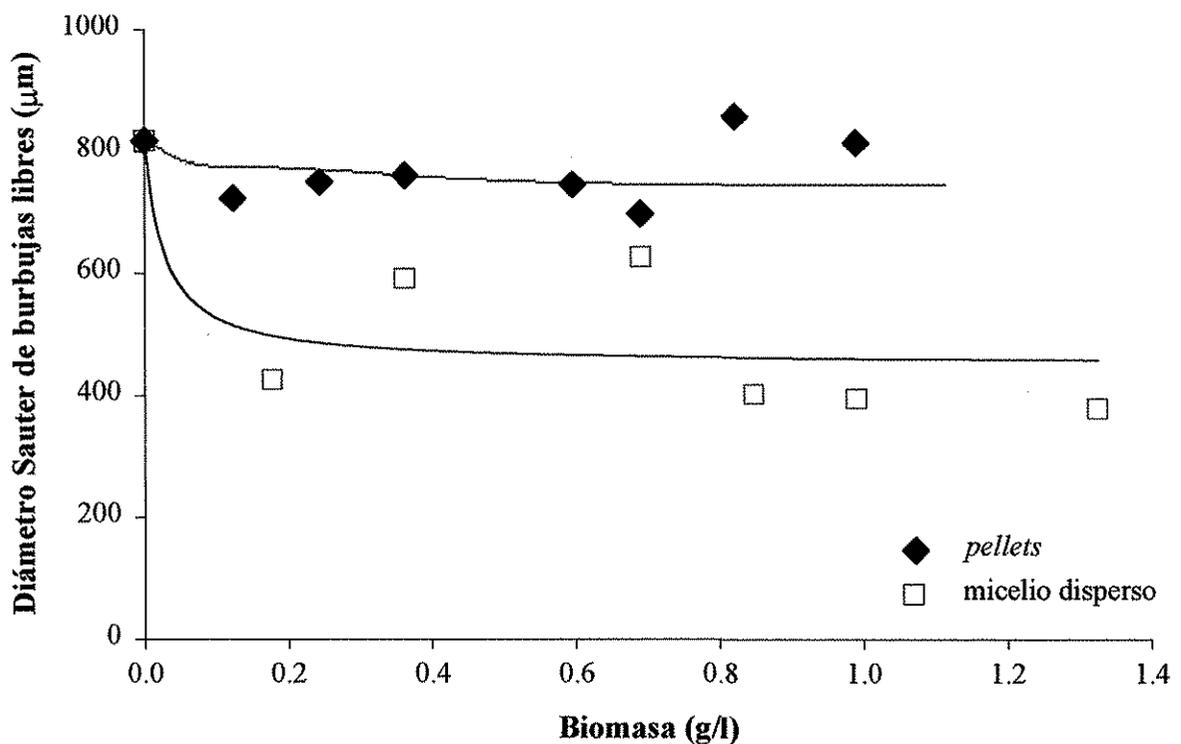
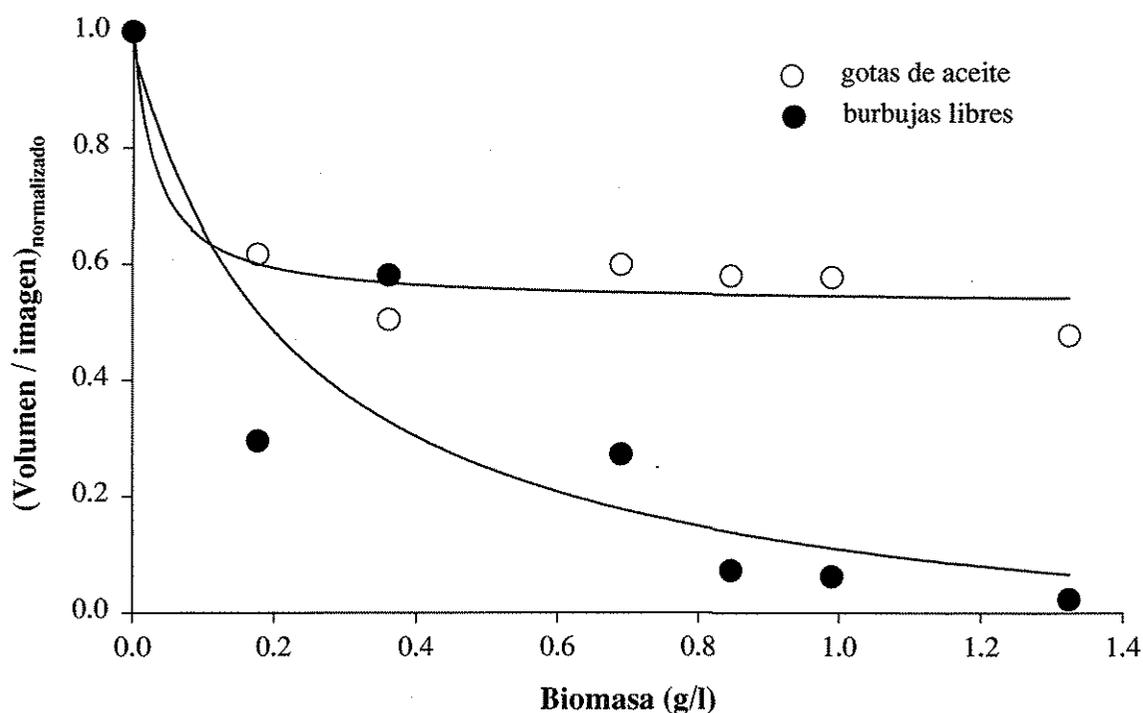


Figura 5.42. Efecto de la concentración y de la morfología miceliar sobre el diámetro Sauter de las burbujas libres (sistema aireado, 0.25 vvm) ( $M = 4$ ).

En la **figura 5.43** se ilustra que la disminución en el volumen *por imagen* (normalizado con respecto al sistema sin biomasa) de las burbujas libres es más pronunciada con respecto a la de las gotas, al incrementar la concentración de micelio disperso. Lo anterior puede ser explicado por la considerable menor densidad del aire con respecto a la del aceite de ricino, lo cual causa que las burbujas presenten una mayor resistencia que las gotas a seguir los patrones de flujo generados por el impulsor. Como consecuencia del hecho anterior, es esperable un “acanalamiento” más significativo de la fase gaseosa con respecto a la del aceite y una disminución en el volumen de las burbujas libres *por imagen* más significativa que para las gotas en la zona de la pared (ver **figura 5.43**). En el sistema con *pellets* no hay cambios significativos en el volumen de las burbujas libres ni en el de las gotas de aceite *por imagen*, con la concentración de biomasa (ver **figura 5.44**).



**Figura 5.43.** Volumen por imagen normalizado (con respecto al sistema sin biomasa) de gotas y burbujas libres en el sistema aireado (0.25 vvm) con micelio disperso.

#### 5.3.4. Efecto de la morfología y la concentración del micelio sobre el tamaño de las burbujas dentro de gotas

Bajo todas las condiciones aireadas, las burbujas dentro de gotas fueron más pequeñas que las burbujas libres (ver **figuras 5.45 y 5.46**). Probablemente porque dentro del aceite del aceite de alta viscosidad ( $\mu = 560$  mPas), la burbuja se encuentra “inmovilizada” y es incapaz de coalescer.

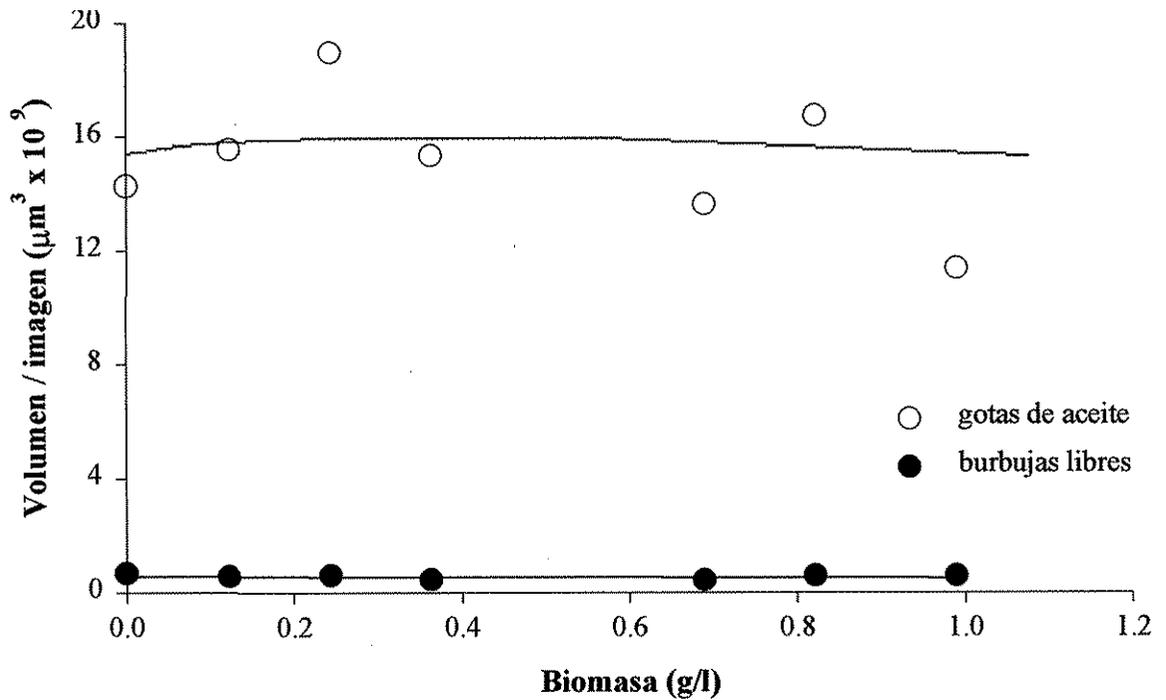


Figura 5.44. Volumen por imagen de gotas y burbujas libres en el sistema aireado (0.25 vvm) con *pellets*.

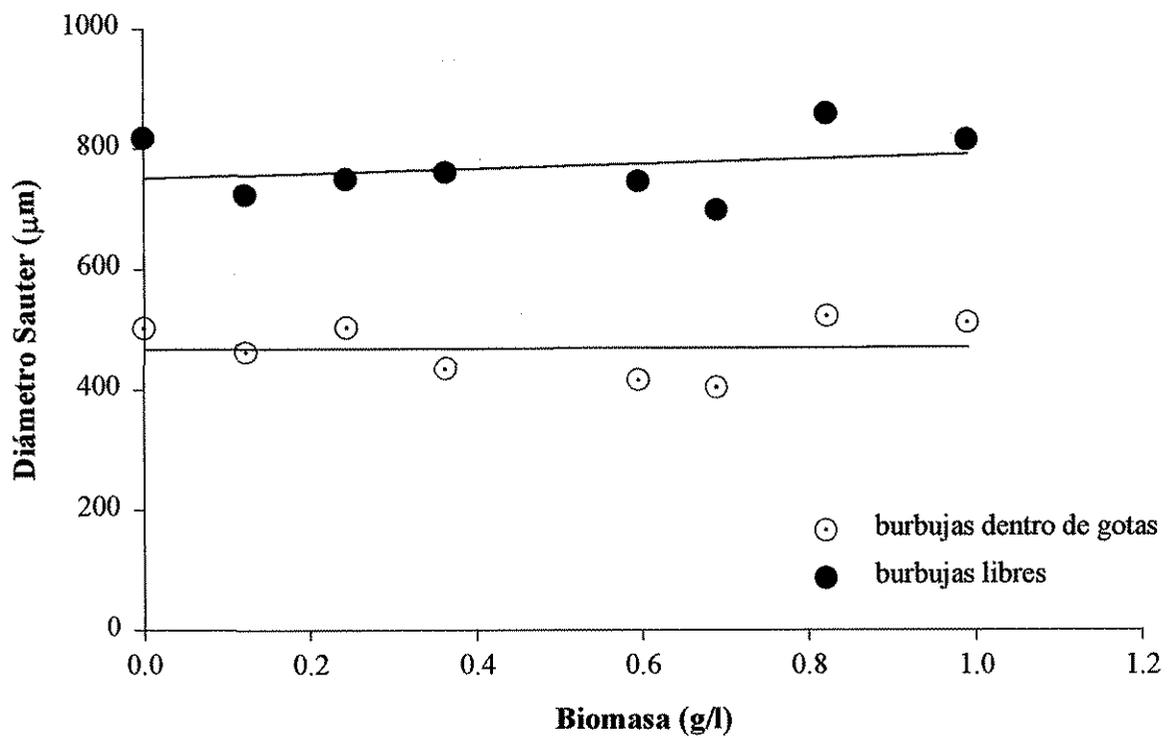


Figura 5.45. Diámetro Sauter de las burbujas dentro de gotas y burbujas libres en el sistema aireado (0.25 vvm) con *pellets*.

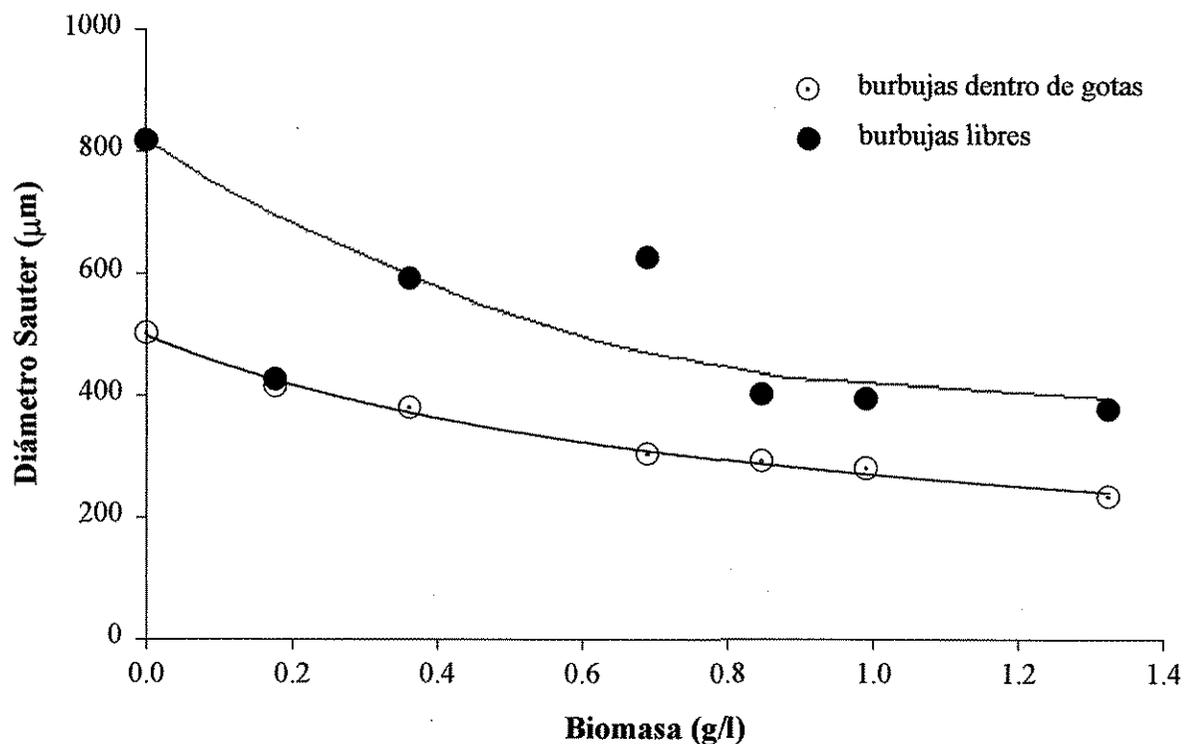


Figura 5.46. Diámetro Sauter de las burbujas dentro de gotas y burbujas libres en el sistema aireado (0.25 vvm) con micelio disperso.

En el sistema con *pellets*, el  $d_{32}$  de las burbujas libres fue aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  mayor que el  $d_{32}$  de las burbujas dentro de gotas, en todo el rango de concentraciones de biomasa analizado (figura 5.45). En el sistema con micelio disperso, la diferencia entre el  $d_{32}$  de las burbujas libres y dentro de gotas disminuyó con la concentración de biomasa (figura 5.46).

La figura 5.47 ilustra el efecto de la concentración y de la morfología de la biomasa sobre el diámetro Sauter de las burbujas de aire que se encuentran dentro de las gotas de aceite. En el sistema con *pellets* no se observó un efecto de la concentración de biomasa en el tamaño de las burbujas dentro de las gotas. En el sistema con micelio disperso, el tamaño de las burbujas dentro de gotas disminuyó conforme se incrementó la concentración de biomasa.

La figura 5.48 ilustra el efecto de la concentración de micelio disperso en las distribuciones de tamaño de las burbujas dentro de gotas. Las distribuciones se recorrieron hacia la izquierda y se incrementó su altura conforme se incrementó la concentración de biomasa. La figura 5.49 muestra el efecto de la morfología sobre las distribuciones de las burbujas dentro de gotas para una concentración de biomasa de 1.0 g/l. Puede apreciarse una diferencia significativa en los datos obtenidos con las dos morfologías de biomasa. La distribución para el sistema con *pellets* es más

amplia que para el sistema con micelio disperso. Este último muestra una distribución más hacia la izquierda y una mayor altura con respecto a la del sistema con *pellets*.

Para explicar el comportamiento del diámetro Sauter y de las distribuciones de las burbujas dentro de gotas (ilustrado en las figuras 5.47-5.49) en este trabajo se proponen algunos mecanismos que pudieran ocurrir. La disminución observada en el diámetro Sauter de las burbujas dentro de gotas en el sistema con micelio disperso puede esperarse debido a que las gotas y burbujas pequeñas se concentran en las cercanías de la pared del tanque al incrementar la concentración de micelio disperso (lo cual se mencionó anteriormente). En las gotas pequeñas, es menos probable que se introduzcan burbujas grandes por simple impedimento estérico. Se esperaría entonces que se introdujeran las burbujas pequeñas, las cuales, además son las que se encuentran en la zona de muestreo. Ello resulta en la disminución del diámetro Sauter de las burbujas dentro de las gotas. En el sistema con *pellets*, no se observaron cambios significativos en el diámetro Sauter de las burbujas dentro de las gotas con la concentración de biomasa. En este sistema, el incremento en la viscosidad de la fase acuosa no es muy significativa como en el caso del sistema con micelio disperso y, por lo tanto, las fases dispersas no presentarían una tendencia a ascender por el centro del tanque agitado.

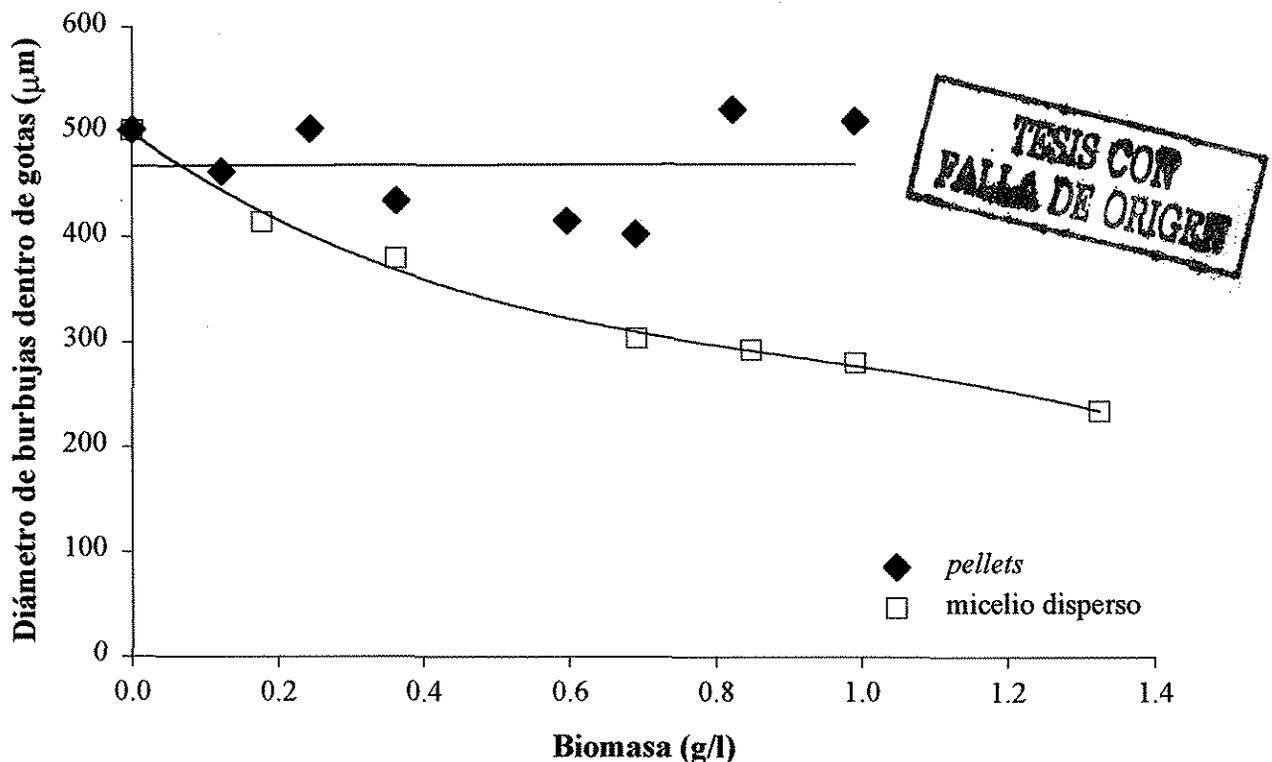


Figura 5.47. Efecto de la concentración y de la morfología micelar sobre el diámetro Sauter de las burbujas dentro de gotas.

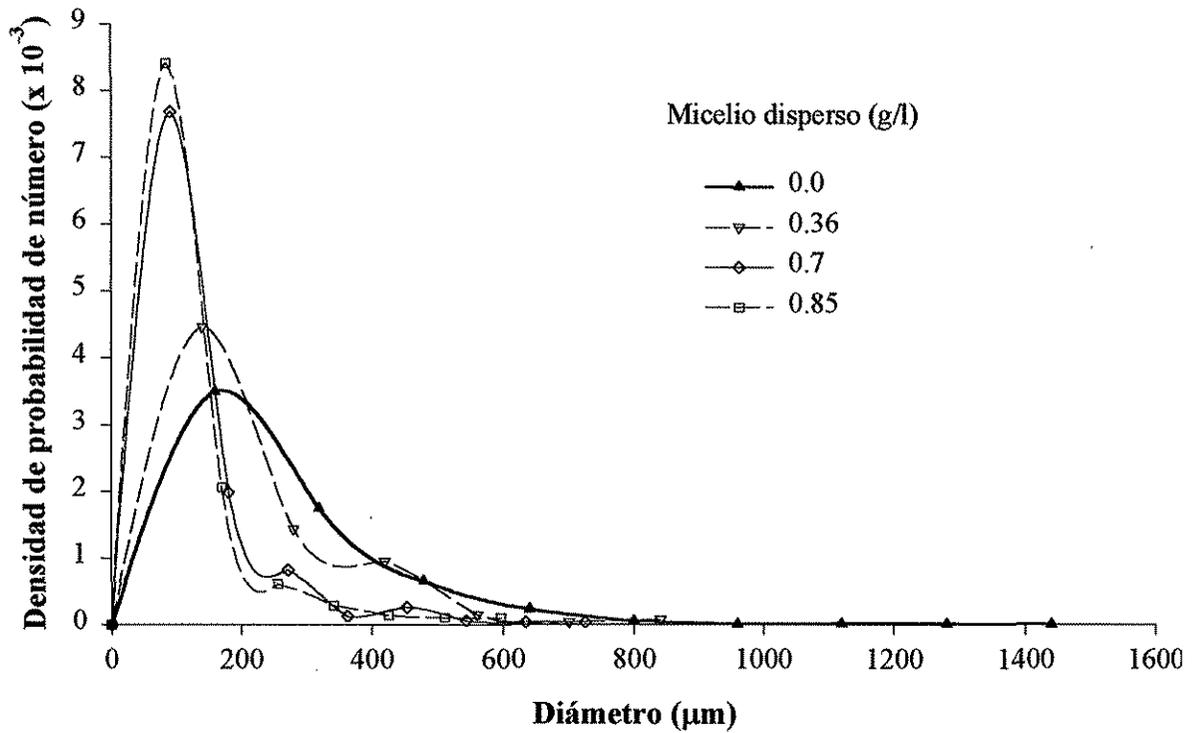


Figura 5.48. Efecto de la concentración de biomasa (micelio disperso) sobre la distribución de tamaños de burbujas dentro de gotas de aceite (sistema aireado, 0.25 vvm).

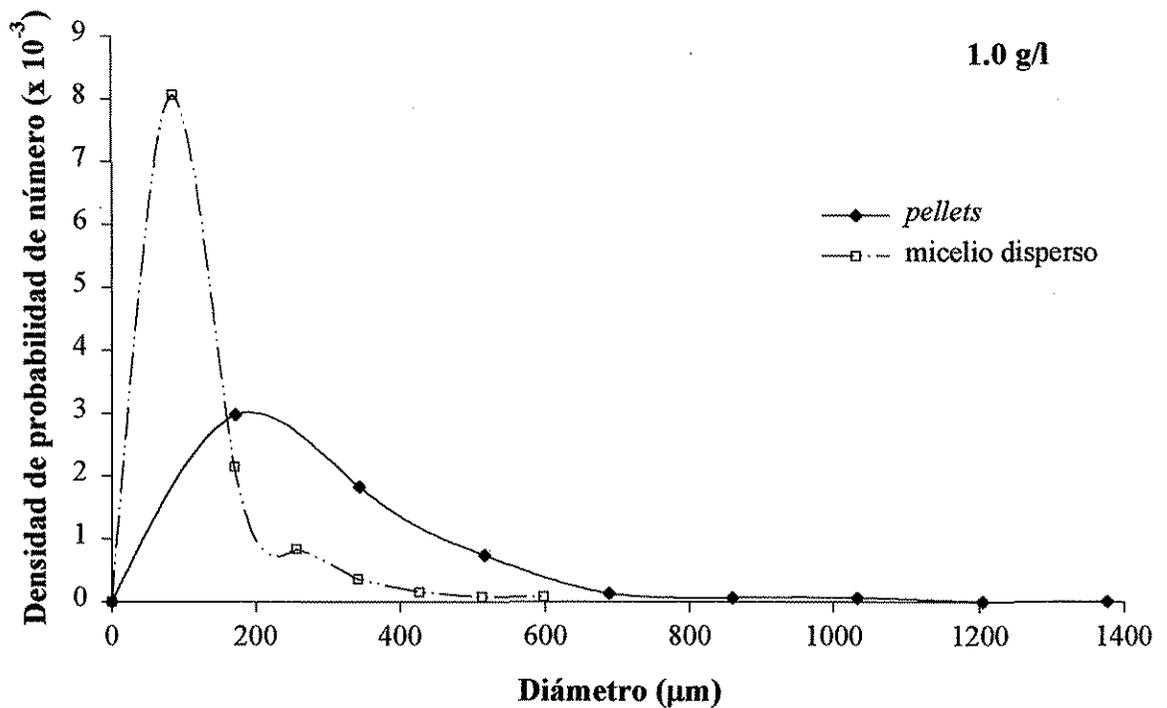


Figura 5.49. Efecto de la morfología de la biomasa (1.0 g/l) sobre la distribución de tamaños de las burbujas dentro de gotas (sistema aireado, 0.25 vvm).

### 5.3.5. Conclusiones respecto a la dispersión y localización de burbujas de aire

La presencia de aire en el sistema causó un incremento en el diámetro Sauter de las gotas con respecto al sistema sin aire, como resultado de una caída en la potencia y de la introducción de burbujas de aire dentro de las gotas. Se observaron diferencias en la superficie de las gotas. En el sistema aireado, la superficie de las gotas presentó muchas gotitas aparentemente adheridas a ésta, mientras que en el sistema sin aire las gotas presentaron una superficie lisa.

Con respecto al porcentaje (en volumen) de burbujas dentro de gotas, éste parámetro no cambió en el sistema con *pellets*, mientras que el sistema con micelio disperso se incrementó con la concentración de biomasa. Éste incremento pudo ser causado por una disminución más pronunciada en el volumen total de las burbujas con respecto al de las burbujas dentro de gotas, y en consecuencia, la relación entre ambos volúmenes, representada como el porcentaje de burbujas dentro de gotas, se incrementó.

El diámetro Sauter de las burbujas (libres y dentro de gotas) fue menor en el sistema con micelio disperso que con *pellets*. El menor tamaño de las burbujas libres en el sistema con micelio disperso se explicó en términos del acanalamiento (observación visual) de las burbujas grandes por el centro del tanque de mezclado, lo cual no se observó en el sistema con *pellets*.

## 6. CONCLUSIONES GLOBALES

### Producción de biomasa

- Se identificaron las mejores condiciones de cultivo para la producción de micelio disperso en fermentadores de 14 l y de *pellets* en matraces de 500 ml por *Trichoderma harzianum*.

### Dispersión del aceite de ricino en el sistema no aireado (medio acuoso – aceite – micelio)

- La morfología miceliar no tuvo efecto sobre el  $d_{32}$  de las gotas de aceite en concentraciones de biomasa menores de 0.15 g/l. En mayores concentraciones de biomasa, el  $d_{32}$  de las gotas fue mayor en el sistema con micelio disperso con respecto al sistema con *pellets*. El incremento en la concentración de biomasa causó un incremento en el  $d_{32}$  de las gotas en el sistema con micelio disperso, mientras que en el sistema con *pellets*, éste parámetro no mostró cambios significativos con la concentración de biomasa.

### Dispersión del aceite de ricino en el sistema aireado (medio acuoso – aceite – aire – micelio)

- El  $d_{32}$  de las gotas no mostró cambios significativos al incrementarse la concentración de *pellets*, mientras que en el sistema con micelio disperso, se observó una disminución en el tamaño de las gotas conforme se incrementó la concentración de biomasa.

### Tamaño y localización de las burbujas de aire

- En el sistema aireado, la presencia de aire causó un incremento en el tamaño de las gotas de aceite en todos los casos (con o sin biomasa, con *pellets* o micelio disperso).
- Cuando se usaron *pellets*, el porcentaje (en volumen) de las burbujas dentro de las gotas se mantuvo prácticamente constante ( $\approx 40\%$ ) con la concentración de biomasa. En el sistema con micelio disperso, se observó un incremento (del 40 al 75 % aproximadamente) en el porcentaje en volumen de burbujas dentro de gotas, en el rango de concentraciones de biomasa analizado.
- El diámetro Sauter de las burbujas (dentro de gotas y libres) no mostró cambios significativos al incrementarse la concentración de *pellets*. En el sistema con micelio disperso se observó una disminución en el diámetro Sauter de las burbujas (dentro de gotas y libres) al incrementarse la concentración de biomasa.

De manera general, los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que la morfología y la concentración de micelio son importantes en la dispersión tanto de aceite de ricino

como del aire en un biorreactor agitado. En primera instancia se hubiera esperado obtener mayores tamaños de gotas y burbujas en el sistema con micelio disperso que en el sistema con *pellets*, debido a la mayor viscosidad y a las características reoadelgazantes de las suspensiones con micelio disperso. Sin embargo, los resultados indican una disminución en el tamaño de las gotas y las burbujas. En el presente trabajo se propone que ésto puede ser debido a que la distribución de tamaños de las gotas y de las burbujas no sería la misma en las diferentes regiones del tanque de mezclado. La mayor viscosidad (producida por concentraciones crecientes de micelio disperso) provoca segregación, lo cual conduce a que en la región de muestreo sea más probable encontrar gotas y burbujas más pequeñas ya que son éstas las que más fácilmente seguirán los patrones de flujo generados por el impulsor. Los diámetros Sauter obtenidos son, en consecuencia, sólo válidos para la zona donde se encuentra localizada la sonda de luz (en las cercanías de la pared del tanque de mezclado).

## 7. SUGERENCIAS Y PERSPECTIVAS

Debido a los límites operacionales del sistema, no fue posible analizar la dispersión del aceite de ricino y del aire en mayores concentraciones de biomasa, debido al oscurecimiento de las imágenes. Sin embargo, con el objetivo de simular las condiciones de fermentación, se sugiere evaluar el efecto de la morfología miceliar sobre la dispersión del aceite de ricino y del aire en concentraciones de biomasa mayores a las estudiadas en el presente trabajo. Para el problema de oscurecimiento de las imágenes con mayores concentraciones de biomasa pudiera emplearse una lente colimadora, lo cual ya ha sido recomendado por Brito-Albavera (2001) para una mejor operación del sistema.

En el presente trabajo la potencia volumétrica suministrada fue muy baja (0.18-0.26 W/l) con respecto a la utilizada en fermentadores de escala laboratorio. Por lo tanto, sería interesante estudiar la dispersión del aceite de ricino y del aire en rangos de potencia volumétrica más amplios y que sean típicos de los usados en la industria ( $\sim 1 \text{ kW/m}^3$ ). Sin embargo, para analizar un rango de suministro de potencia más amplio es necesario optimizar el sistema de análisis de imágenes actual para obtener imágenes claras para su procesamiento digital. También sería recomendable evaluar la dispersión del aceite de ricino y del aire con diferentes configuraciones de impulsor/difusor.

Una parte de la discusión del presente trabajo fue la hipótesis de que el impacto de los *pellets* grandes y compactos con las gotas de aceite generó tamaños de gotas más pequeños. Sin embargo, no se presentaron evidencias de este fenómeno. Una forma de ver si éste fenómeno se presenta o no, implicaría tomar un video y lograr un seguimiento -cuadro por cuadro-, de tal manera que se observe si el impacto *pellets*-gotas de aceite es suficiente para generar una re-dispersión de gotas.

Sería útil también la caracterización de la dispersión en diferentes puntos del tanque. Bajo las condiciones de operación utilizadas es probable que exista heterogeneidad y que la dispersión caracterizada en un solo punto no sea representativa del tanque completo. La caracterización de la dispersión en diferentes puntos del tanque podría lograrse mediante en montaje de una sonda de fibra óptica, la cual estaría muy cerca de la sonda de luz estroboscópica. Ambas sondas podrían moverse juntas, capturando imágenes en diferentes puntos del tanque.

Por otro lado, las características viscosas y reodelgazantes de los caldos de fermentación miceliar afectan las dispersiones del aceite de ricino y del aire. Con respecto a esto, sería importante la simulación (por ejemplo, mediante técnicas de dinámica de fluidos computacional, CFD) de las variaciones en la viscosidad aparente como función de la localización dentro del tanque de mezclado, y su correlación con posibles datos experimentales.

## 8. REFERENCIAS

- Adler I, Buchholz H, Voigt J, Wittler R, Schugerl K (1980) Bubble coalescence behavior in biological media: I. *Hansenula polymorpha* cultivation broths. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**:249-260.
- Akita K, Yoshida F (1973) Gas holdup and volumetric mass transfer coefficient in bubble columns. Effect of liquid properties. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.* **12**:76-80.
- Amanullah A, Justen P, Davies A, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR (2000) Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Engng. J.* **5**:109-114.
- Andersson SR, Rasmuson A (2000) Flow measurements on a turbulent fiber suspension by laser doppler anemometry. *AIChE J.* **46**:1106-1119.
- Armenante PM, Huang YT (1992) Experimental determination of the minimum agitation speed for complete liquid-liquid dispersion in mechanically agitated vessels. *Ind. Eng. Chem. Res.* **31**:1398-1406.
- Banisi S, Finch JA, Laplante AR, Weber ME (1995a) Effect of solid particles on gas holdup in flotation columns. I. Measurement. *Chem. Eng. Sci.* **50**:2329-2334.
- Banisi S, Finch JA, Laplante AR, Weber ME (1995b) Effect of solid particles on gas holdup in flotation columns. II. Investigation of mechanisms of gas holdup reduction in presence of solids. *Chem. Eng. Sci.* **50**:2335-2342.
- Barresi AA (1997) Experimental investigation of interaction between turbulent liquid flow and solid particles and its effects on fast reactions. *Chem. Eng. Sci.* **52**:807-814.
- Bennett JW (1998) Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.* **66**:101-107.
- Bennington CPJ, Bourne JR (1990) Effect of suspended fibers on macro-mixing and micro-mixing in a stirred tank reactor. *Chem. Eng. Sci.* **92**:183-197.
- Bennington CPJ, Thangavel VK (1993) The use of a mixing-sensitive chemical reaction for the study of pulp fiber suspension mixing. *Can. J. Chem. Eng.* **71**:667-675.
- Berovic M, Cimerman A, Steiner W, Kolojini T (1991) Submerged citric acid fermentation: rheological properties of *Aspergillus niger* in a stirred tank reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:579-581.
- Bonnarme P, Djian A, Latrasse A., Féron G, Ginies C, Durand A, Le Queré JL (1997) Production of 6-pentyl- $\alpha$ -pirone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J. Biotechnol.* **56**:143-150.
- Braun S, Vecht-Lifshitz SE (1991) Mycelial morphology and metabolite production. *TIBTECH* **9**:63-68.
- Brehm A, Ledakowicz S, Kokuun R (1984) Effect of suspended inert solid particles on gas-liquid mass transfer in stirred vessel. *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Cong. CHISA, Praga.*
- Brilman DWF, Antink R, van Swaaij WPM, Versteeg GF (1999) Experimental study of the effect of bubbles, drops and particles on the product distribution for a mixing sensitive, parallel-consecutive reaction system. *Chem. Eng. Sci.* **54**:2325-2337.
- Brito-Albavera MT (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*, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Carlsen M, Spohr AB, Nielsen J, Villadsen J (1996) Morphology and physiology of an  $\alpha$ -amilase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations. *Biotechnol. Bioeng.* **49**:266-276.
- Chen HT, Middleman S (1967) Drop size distributions in agitated liquid-liquid systems. *AIChE J.* **13**:989-998.
- Chhabra RP (1993) Bubbles, drops, and particles in non-Newtonian fluids. *CRC Press*, Florida.
- Choi DB, Park EY, Okabe M (2000) Dependence of apparent viscosity on mycelial morphology of *Streptomyces fradiae* culture in various nitrogen sources. *Biotechnol. Prog.* **16**:525-532.
- Clarke B (1967) Rheology of coarse settling suspensions. *Trans. Inst. Chem. Eng.* **45**:T251-T256.
- Cox PW, Paul GC, Thomas CR (1998) Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiology* **144**:817-827.
- Cox PW, Thomas CR (1992) Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **39**:945-952.
- Cui YQ, Van der Lans RGJM, Lyuben KChAM (1998) Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **57**:409-419.
- Daglas D, Stamatoudis M (2000) Effect of impeller vertical position on drop sizes in agitated dispersions. *Chem Eng. Technol.* **23**:437-440.
- Dalmau E, Sánchez A, Montesinos JL, Valero F, LaFuente FJ, Casas C (1998) Study of drop size frequencies in a microbial growth system with aqueous-organic culture medium: lipase production from *Candida rugosa*. *J. Biotechnol.* **59**:183-192.
- Dalmau E, Montesinos JL, Loti M, Casas C (2000) Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**:657-663.
- Das TR, Bandopadhyay A, Parthasarathy R, Kumar R (1985) Gas-liquid interfacial area in stirred vessels: the effect of a immiscible liquid phase. *Chem. Eng. Sci.* **40**:209-214.
- Davies RW (1991) Expression of heterologous genes in filamentous fungi. In: Peberdy JR, Caten CE, Ogden JE, Bennett JW (Eds), *Applied Molecular Genetics of Fungi*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 103-117.
- Derevich IV (1987) The velocity fluctuation spectrum of a gas with particles in the case of uniform isotropic turbulence. *Fluid Dyn.* **22** (1) (Translation from *Izv. Akad. Nauk SSSR Mech. Zhid. I Gaza*, no. 1:59, 1987).
- Domingues FC, Queiroz JA, Cabral JMS, Fonseca LP (2000) The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb. Technol.* **26**:394-401.
- Doyle R, Rosenberg M (1990) Microbial cell surface hydrophobicity. *American Society for Microbiology*, Washington, U.S.A.
- Elad Y, Chet I, Henis Y (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. *Can. J. Microb.* **28**:719-725.
- Elgobashi S (1994) On predicting particle-laden turbulent flows. *Appl. Scientific Res.* **52**:309-329.
- Elibol M, Mavituna F (1997) Characteristics of antibiotic production in a multiphase system. *Proc. Biochem.* **32**:417-422.

- Fatile IA (1985) Rheological characteristics of suspensions of *Aspergillus niger*: correlation of rheological parameters with microbial concentration and shape of the mycelial aggregate. *Appl. Microbial Biotechnol.* **21**:60-64.
- Galindo E, Pacek AW, Nienow AW (2000) A study of drop and bubble sizes in a simulated, mycelial fermentation broth of up to four phases. *Biotechnol. Bioeng.* **69**:213-221.
- Gervais P, Molin P, Grajek W (1988) Influence of the water activity of a solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.* **31**:457-463.
- Godoy-Silva RD (1998) Efecto de la geometría del impulsor sobre el crecimiento, reología y producción de aromas por *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido. *Tesis de Maestría en Biotecnología*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.
- Goldberg I, Stieglitz B (1985) Improved rate of fumaric acid production by tweens and vegetable oils in *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 1067-1069.
- Gore RA, Crowe CT (1989) Effect of particle size on modulating turbulence intensity. *Int. J. Multiphase Flow.* **15**:279-285.
- Haran S, Schickler H, Chet I (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microb.* **142**:2321-2331.
- Hewitt CJ, Boon LA, McFarlane CM, Nienow AW (1998) The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **59**:612-620.
- Hinze JO (1955) Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting dispersion process. *AIChE J.* **1**:289.
- Ho CS, Ju LK, Baddour RF (1990) Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of *n*-hexadecane. *Biotechnol. Bioeng.* **36**:1110-1118.
- Hotop S, Moller J, Niehoff J, Schugerl K (1993) Influence of the preculture conditions on the pellet size distribution of *Penicillium chrysogenum* cultivations. *Proc. Biochem.* **28**:99-104.
- Ison AP, Lilly MD (1996) The utilization of lipids during industrial fermentations. In: *Procc. 10<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium* (Sydney, Australia), pp. 26.
- Jamialahmadi M, Steinhagen HM (1991) Effect of solid particles on gas holdup in bubble columns. *Can J. Chem. Eng.* **69**:390-393.
- Janse P, Gomez CO, Finch JA (1999) Effect of pulp fibers on gas holdup in a flotation column. *Can. J. Chem. Eng.* **77**:22-25.
- Johansen CL, Coolen L, Hunik JH (1998) Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Biotechnol. Prog.* **14**:233-240.
- Joosten GEH, Schilder JGM, Janssen JJ (1977) The influence of suspended solid material on the gas-liquid mass transfer in stirred gas-liquid contactors. *Chem. Eng. Sci.* **32**:563-566.
- Joshi JB, Elias CB, Patole MS (1996) Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Chem. Eng. J.* **62**:121-141.
- Justen P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR (1996) Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.* **52**:672-684.
- Justen P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR (1998) A mathematical model for agitation-induced fragmentation of *Penicillium chrysogenum*. *Bioproc. Eng.* **18**:7-16.

- Kaireddy VK, Al Taweel AM (1990) An improved light attenuation technique for measuring large interfacial areas. *Can. J. Chem. Eng.* **68**:690-693.
- Kang Y, Fan LT, Min BT, Kim SD (1991) Promotion of oxygen transfer in three-phase fluidized-bed bioreactors by floating bubble breakers. *Biotechnol. Bioeng.* **37**:580-586.
- Kawase Y, Araki T, Shimizu K, Miura H (1997) Gas-liquid mass transfer in three-phase stirred tank reactors: Newtonian and non-Newtonian fluids. *Can. J. Chem. Eng.* **75**:1159-1164.
- Keudell KC, Huang JK, Wen L, Klopfenstein WE, Bagby MO, Lanser AC, Plattner RD, Peterson RE, Weisleder D (2000) Fatty acids enhanced tubercylin production by *Pseudomonas* strain 2HS. *Microbios* **102**:27-38.
- Kim SD, Kim DY, Han JH (1994) Dispersed phase characteristics in three phase (liquid-liquid-solid) fluidized bed. *Can. J. Chem. Eng.* **72**:222-228.
- Kim SD, Lee MJ, Han JH (1989) Axial dispersion characteristics of three (liquid-liquid-solid) phase fluidized beds. *Can. J. Chem. Eng.* **67**:276-289.
- Kresta S (1998) Turbulence in stirred tanks: anisotropic, approximate, and applied. *Can. J. Chem. Eng.* **76**:563-576.
- Large, KP, Ison, AP, Williams, DJ (1998) The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biotechnol.* **63**:111-119.
- Larralde P, Córdova MS, Galindo E (2002) Distribution of the free and oil-trapped air bubbles in simulated broths containing fungal biomass. *Can. J. Chem. Eng.* (sometido).
- Lawton P, Whitaker A, Odell D, Stowell JD (1989) Actinomycete morphology in shaken culture. *Can. J. Microb.* **35**:881-889.
- Li CY, Cheng CY, Chen TL (2001) Production of *Acinetobacter radioresistens* lipase using Tween 80 as the carbon source. *Enzyme Microb. Technol.* **29**:258-263.
- Li HZ, Mouline Y, Choplin L, Midoux N (1997) Rheological simulation of in-line bubble interactions. *AIChE J.* **43**:265-267.
- Lindsay JD, Ghiaasiaan SM, Abdel-Khalik SI (1995) Macroscopic flow structures in a bubbling paper pulp – water slurry. *Ind. Eng. Chem. Res.* **34**:3342-3354.
- Markopoulos J, Kadoglou E, Papaevangelou D, Zavitsanou A (2000) Regional mean bubble diameters and gas holdup in agitated gas-liquid contactors. *Chem. Eng. Technol.* **23**:337-339.
- McFarlane CM, Nienow AW (1996) Studies of high solidity ratio hydrofoil impellers for aerated bioreactors. 4. Comparison of impeller types. *Biotechnol. Prog.* **12**:9-15.
- Mehra A, Sharma MM (1986) Absorption with reaction: effect of emulsified second liquid phase. *Chem. Eng. Sci.* **40**:2382-2385.
- Metz B, de Bruijn EW, van Suijdam JC (1981) Method for quantitative representation of the morphology of moulds. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:149-162.
- Metz B, Kossen NWF (1977) The growth of molds in the form of pellets-A literature review. *Biotechnol. Bioeng.* **19**:781-799.
- Metz B, Kossen NWF, van Suijdam JC (1979) The rheology of mould suspensions. *Adv. Biochem. Eng.* **11**:103-156.
- Mlynek Y, Resnick W (1972) On local holdup and average drop size in a liquid-liquid stirred system. *Can. J. Chem. Eng.* **50**:134-135.
- Mohseni M, Allen DG (1995) The effect of particle morphology and concentration on the directly measured yield stress in filamentous suspensions. *Biotechnol. Bioeng.* **48**:257-265.

- Muller C, Spohr AB, Nielsen J (2000) Role of substrate concentration in mitosis and hyphal extension of *Aspergillus*. *Biotechnol. Bioeng.* **67**:390-397.
- Nielsen J, Johansen CL, Jacobsen M, Krabben P, Villadsen J (1995) Pellet formation and fragmentation in submerged cultures of *Penicillium chrysogenum* and its relation to penicillin production. *Biotechnol. Prog.* **11**:93-98.
- Nienow AW, Elson TP (1988) Aspects of mixing in rheologically complex fluids. *Chem. Eng. Res. Des.* **66**:5-15.
- Nienow AW, Konno M, Bujalski W (1986) Studies on three-phase mixing: a review and recent results. *Chem. Eng. Res. Des.* **64**:35-42.
- Oldshue JY (1981) Fluid Mixing Technology. New York. *McGraw-Hill*.
- Olsvik E, Kristiansen B (1994) Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnol. Adv.* **12**:1-39.
- Olsvik E, Tucker KG, Thomas CR, Kristiansen B (1993) Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnol. Bioeng.* **42**:1046-1052.
- Ozkan O, Calimli A, Berber R, Oguz H (2000) Effect of inert solid particles at low concentrations on gas-liquid mass transfer in mechanically agitated reactors. *Chem. Eng. Sci.* **55**:2737-2740.
- Pacek AW, Man CC, Nienow AW (1998) On the Sauter mean diameter and size distributions in turbulent liquid/liquid dispersions in a stirred vessel. *Chem. Eng. Sci.* **53**:2005-2011.
- Pacek AW, Moore IPT, Nienow AW, Calabrese RV (1994) A video technique for measuring dynamics of liquid-liquid dispersion during phase inversion. *AIChE J.* **40**:1940-1949.
- Packer HL, Thomas CR (1990) Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **35**:870-881.
- Padmavathi G, Rao KR (1992) Effect of liquid viscosity on gas holdup in a reversed flow jet loop reactor. *Can. J. Chem. Eng.* **70**:800-802.
- Paglianti A, Takenaka K, Bujalski W, Takahashi K (2000) Estimation of gas hold-up in aerated vessels. *Can. J. Chem. Eng.* **78**:386-392.
- Parthasarathy R, Ahmed N (1994) Sauter mean and maximum bubble diameters in aerated stirred vessels. *Trans I. Chem. E.* **72**:565-572.
- Pazouki M, Panda T (2000) Understanding the morphology of fungi. *Bioproc. Eng.* **22**:127-143.
- Peberdy JF (1994) Protein secretion in filamentous fungi-trying to understand a highly productive black box. *Trends Biotechnol.* **12**:50-57.
- Pedersen AG, Bundgaard-Nielsen M, Nielsen J, Villadsen J (1993) Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **41**:162-164.
- Pelton R, Piette R (1992) Air bubble holdup in quiescent wood pulp suspensions. *Can. J. Chem. Eng.* **70**:660-663.
- Podgórska W, Baldyga J (2001) Scale-up effects on the drop size distribution of liquid-liquid dispersions in agitated vessels. *Chem. Eng. Sci.* **56**:741-746.
- Prokop A, Bajpai RK (1992) The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. *Adv. Appl. Microbiol.* **37**:165-232.
- Reese J, Jiang P, Fan LS (1996) Bubble characteristics in three-phase systems used for pulp and paper processing. *Chem. Eng. Sci.* **51**:2501-2510.
- Reichl U, King R, Gilles ED (1992) Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **39**:164-170.

- Reséndiz R, Martínez A, Ascanio G, Galindo E (1991) A new pneumatic bearing dynamometer for power input measurement in stirred tanks. *Chem. Eng. Technol.* **14**:105-108.
- Revilla G, Lepez-Nieto MJ, Luengo JM, Martín JF (1984) Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J. Antibiot.* **37**:781-789.
- Rewatkar YB, Bennington CPJ (2000) Gas-liquid mass transfer in a low and medium consistency pulp suspensions. *Can. J. Chem. Eng.* **78**:504-512.
- Riley GL, Tucker KG, Paul GC, Thomas CR (2000) Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnol. Bioeng.* **68**:160-172.
- Rocha-Valadez (1999) Efecto de la geometría de impulsor / difusor sobre el cultivo tetrafásico de *Trichoderma harzianum*. *Tesis de Maestría en Biotecnología*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.
- Rocha-Valadez JA, Galindo E, Serrano-Carreón L (2000) Effect of the impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. *Bioproc. Eng.* **23**:403-410.
- Roels JA., Van den Berg J, Voncken RM (1974) The rheology of mycelial broths. *Biotechnol. Bioeng.* **16**:181-208.
- Roizard C, Poncin S, Lapicque F, Py X, Midoux N (1999) Behavior of fine particles in the vicinity of a gas bubble in a stagnant and a moving fluid. *Chem. Eng. Sci.* **54**:2317-2323.
- Rols JL, Gomá G (1991) Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil-in-water dispersions. *Biotechnol. Lett.* **13**:7-12.
- Roman RV, Tudose RZ (1997a) Studies on transfer processes in mixing vessels: power consumption of the modified Rushton turbine agitators in three-phase systems. *Bioproc. Eng.* **17**:307-316.
- Roman RV, Tudose RZ (1997b) Studies on transfer processes in mixing vessels: effect of particles on gas-liquid mass transfer using modified Rushton turbine agitators. *Bioproc. Eng.* **17**:361-365.
- Saberi S, Shakourzadeh K, Bastoul D, Militzer J (1995) Bubble size and velocity measurement in gas-liquid systems: Application of fiber optic technique to pilot plant scale. *Can. J. Chem. Eng.* **73**:253-257.
- Schreck S, Kleis SJ (1993) Modification of grid-generated turbulence by solid-particles. *J. Fluid Mech.* **249**:665-688.
- Serrano-Carreón L, Hathout Y, Bensoussan M, Belin JM (1992) Production of 6-pentil- $\alpha$ -piron by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnol. Lett.* **14**:1019-1024.
- Serrano-Carreón L, Flores C, Galindo E (1997)  $\gamma$ -Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in a stirred bioreactor. *Biotechnol. Prog.* **13**:205-208.
- Shimizu K, Minekawa K, Hirose T, Kawase Y (1999) Drop breakage in stirred tanks with Newtonian and non-Newtonian fluid systems. *Chem. Eng. J.* **72**:117-124.
- Smith JJ, Lilly MD, Fox RI (1990) The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**:1011-1023.
- Su WW, He BJ (1997) Secreted enzyme production by fungal pellets in a perfusion bioreactor. *J. Biotechnol.* **54**:43-52.
- Taboada B, Corkidi G (2002) Images acquisition of multiphase dispersion proceses. *Instrument. Develop.* (sometido).

- Takahashi J, Yamada K (1960) Studies on the effects of some physical conditions on the submerged mold culture. Part III. Relations between the morphological forms of molds and the viscosity of mycelial suspensions. *J. Agric. Chem. Jpn.* **34**:100-103.
- Tatterson GB (1991) Gas dispersion in agitated tanks. En: *Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks*, Mc Graw-Hill, USA, pp. 417-529.
- Thomas CR (1992) Image analysis: putting filamentous microorganisms in the picture. *TIBTECH.* **10**:343-348.
- Trinci APJ (1970) Kinetics of the growth of mycelial pellets of *Aspergillus nidulans*. *Arch. Microbiol.* **73**:353-367.
- Tucker KG, Kelly T, Delgrazia P, Thomas CR (1992) Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnol. Prog.* **8**:353-359.
- Tucker KG, Thomas CR (1993) Effect of biomass concentration and morphology on the rheological parameters of *Penicillium chrysogenum* fermentation broths. *Trans I. Chem. E. Part C* **71**:111-117.
- Tsustsumi A, Nieh JY, Fan LS (1991) Particle wettability effect on bubble wake dynamics in gas-liquid-solid fluidization. *Chem. Eng. Sci.* **46**:2381-2384.
- van Suijdam JC, Metz B (1981) Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnol. Bioeng.* **23**:111-148.
- Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S (1990) Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**:890-896.
- Vlaev SD, Martinov M (1998) Non-uniformity of gas dispersion in turbine-generated viscoelastic circulation flow. *Can. J. Chem. Eng.* **76**:405-412.
- Wardell JN, Bushell ME (1999) Kinetics and manipulation of hyphal breakage and its effect on antibiotic production. *Enzyme Microb. Technol.* **25**:404-410.
- Wiebe MG, Trinci APJ (1991) Dilution rate as a determinant of mycelial morphology in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **38**:75-81.
- Wongwicharn A, McNeil B, Harvey LM (1999) Effect of oxygen enrichment on morphology, growth, and heterologous protein production in chemostat cultures of *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnol. Bioeng.* **65**:416-424.
- Yang FC, Ke YF, Kuo SS (2000) Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by *Ganoderma lucidum* in shake flask cultures. *Enzyme Microb. Technol.* **27**:295-301.
- Yang YK, Morikawa M, Shimizu H, Shioya S, Suga K, Nihira T, Yamada Y (1996) Image analysis of mycelial morphology in virginiamycin production by batch culture of *Streptomyces virginiae*. *J. Ferment. Bioeng.* **81**:7-12.
- Zhao S, Kuttuva SG, Ju LK (1999) Oxygen transfer characteristics of multiple-phase dispersions simulating water-in-oil xanthan fermentations. *Bioproc. Eng.* **20**:313-323.
- Zhou G, Kresta SM (1998a) Evolution of drop size distribution in liquid-liquid dispersions for various impellers. *Chem. Eng. Sci.* **53**:2099-2113.
- Zhou G, Kresta S (1998b) Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. *Chem. Eng. Sci.* **53**:2063-2079.

**Apéndice A. Definición de parámetros usados en la caracterización morfológica de hongos filamentosos.**

Parámetro	unidad	Fórmula	Comentarios
Área o área proyectada	$\mu\text{m}^2$		Es el área de proyección de un objeto tridimensional en una imagen bidimensional
Perímetro	$\mu\text{m}$		Es la longitud de la frontera de un objeto
Diámetro promedio	$\mu\text{m}$		Es el promedio de las longitudes de trazos a través del centro de gravedad del micelio
Tamaño	$\mu\text{m}$	$S = \frac{2 \cdot \text{área}}{\text{perímetro}}$	
Circularidad o rugosidad	adimensional	$R = \frac{(\text{perímetro})^2}{4\pi \cdot \text{área}}$	Describe la desviación de un objeto de un círculo
Diámetro equivalente	$\mu\text{m}$	$\text{Deq} = 2 \cdot \sqrt{\frac{A}{\pi}}$	Es el diámetro de un círculo de la misma área que el <i>pellet</i> completo
Eje oval mayor	$\mu\text{m}$	$\text{OMA}^* = 2 \cdot 8 \sqrt{\frac{16 \cdot \text{MAX}^3}{\pi^2 \cdot \text{MIN}}}$	
Densidad anular	%	$\left[ \frac{\text{área del pellet} - \text{área del centro}}{100} \right] / \left[ \frac{\text{área convexa del pellet} - \text{área convexa del centro}}{100} \right]$	Es una medida de la densidad de crecimiento en la región anular
Longitud de la unidad de crecimiento de hifa	$\mu\text{m}$	longitud total / número de puntas	
Compactabilidad, C	adimensional	(área / área del agregado con los espacios llenos)	Es el área de un agregado dividida entre el área convexa
Longitud adimensional promedio, $L_e^*$	$\mu\text{m}$	Longitud de la hifa principal / diámetro de la hifa	
Unidad de crecimiento promedio de la hifa, $L_{hgu}$	$\mu\text{m}$	Longitud total / número de puntas	
Longitud de la hifa principal	$\mu\text{m}$		Es la longitud de punta a punta de la hifa principal (la de mayor longitud en un árbol miceliar)
Longitud total	$\mu\text{m}$		Es la suma de la longitud de la hifa principal y de las longitudes de todas las ramificaciones en un árbol miceliar
Perímetro convexo	$\mu\text{m}$		Es la longitud del perímetro obtenido llenando todos los huecos del micelio
Área convexa	$\mu\text{m}^2$		Área dentro del perímetro convexo
Relación de área convexa	adimensional		Relación del área convexa del centro de un <i>pellet</i> con respecto de la del <i>pellet</i> completo.

\* Ver Yang *et al* (1996).

## Apéndice B. Procesamiento digital de las imágenes en la caracterización morfológica del micelio

Mediante el uso de una cámara de video conectada al microscopio, es posible capturar la imagen de un campo en el portaobjetos. Ésta se envía a la computadora, para su procesamiento subsecuente, el cual se resume de manera muy general a continuación. Para una descripción más detallada se sugiere la revisión del manual del programa.

Una vez que se inicia el programa *Image Pro Plus 4.0* se activa el botón  ubicado en la barra de herramientas, el cual desplegará la ventana de captura de imágenes siguiente (representada en su forma minimizada). Ésta ventana cuenta con barras de ajuste de brillo y contraste (lado derecho de la ventana), las cuales pueden usarse para mejorar la calidad de la imagen.

Como segundo paso, se presiona el botón "start", acción que desplegará la ventana con el campo enfocado actualmente en el microscopio



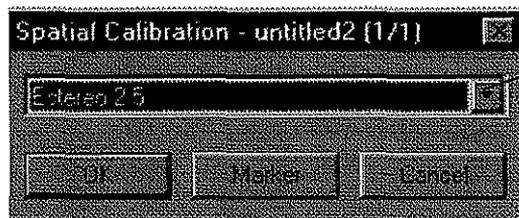
El tercer paso consiste en la captura de la imagen en línea. Esta acción se logra haciendo clic en el botón "snap". Esta acción convierte el botón "start" en "stop". El botón ahora "stop" se presiona para quitar la adquisición en línea y dar lugar al procesamiento de la imagen capturada.

El siguiente paso consiste en el delimitado o binarización de la imagen original. El objetivo de éste proceso se encuentra resumido en la **figura 2.3** de la sección 2.1.3.1 del texto principal. El proceso

de binarización se logra haciendo clic en  (una vez) o  (dos veces), los cuales tienen valores de gris límite diferentes. Aunque el último se utiliza más en la determinación de viabilidad, también es útil para binarizar imágenes de la morfología en *pellets*, más que de micelio disperso. El procesamiento siguiente se lleva a cabo en ésta imagen binaria.

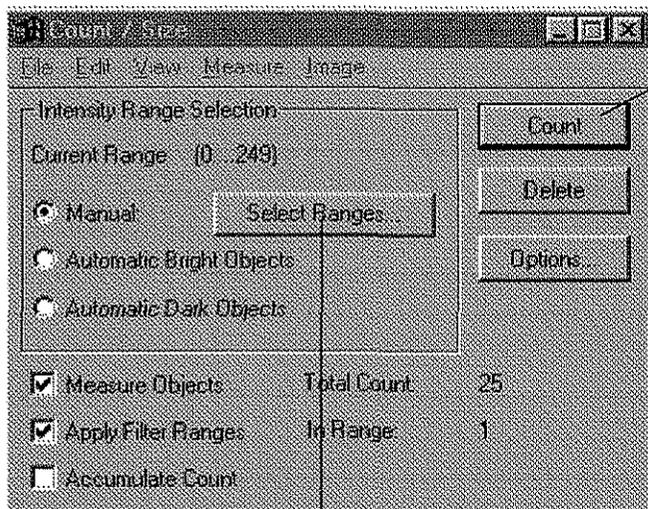
Las partículas de polvo o basura en la imagen pueden eliminarse mediante valores límite asignados de los parámetros morfológicos, los cuales determinan si el objeto es aceptado o rechazado.

Antes de realizar las mediciones del micelio se hace la selección de la calibración correspondiente a la magnificación actual, a través del menú *measure / calibration / select spatial*, acción que desplegará la ventana siguiente:

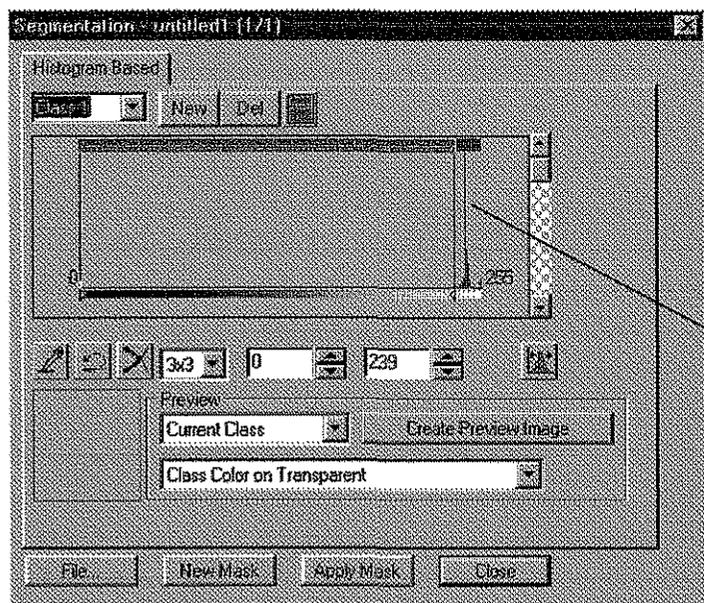
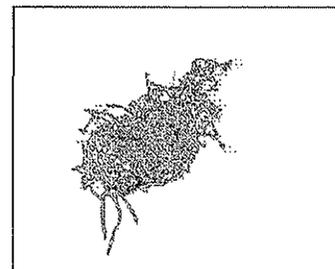


El despliegue de éste cuadro de lista muestra todas las calibraciones, tanto del microscopio, como del estereomicroscopio.

Para la medición de los parámetros morfológicos es necesario desplegar la ventana *count / size* (en el menú *measure / count / size*) y es la siguiente:



Una vez seleccionados los valores de grises, el botón "count" mostrará la imagen inferior, haciendo doble clic sobre el objeto se muestra una ventana con las dimensiones (mm o  $\mu\text{m}$ ) del micelio



La selección de valores de grises se hace arrastrando la línea roja a la izquierda o derecha viendo al mismo tiempo que no queden regiones de micelio cubiertas parcialmente de color rojo. Esto se muestra en la foto superior de micelio.



La binarización de la imagen también se puede realizar utilizando las macros **1**, **2** o **3**, ubicadas en la barra de herramientas (diseñadas *ad hoc*), las cuales tienen umbrales de escala de grises diferentes. El uso de éstas evita el proceso de ajuste de la escala de grises manualmente en el histograma, tal como se mostró en la figura anterior.

Las dimensiones del micelio se envían a una hoja de cálculo de Excel<sup>®</sup> utilizando el botón  ubicado en la barra de herramientas.

**Apéndice C. Calibraciones para las magnificaciones del estereomicroscopio SZ1145 ESD.**

<b>Magnificación</b>	<b>Pixeles / mm</b>
1.8	32.6773
2.0	35.7227
2.5	43.0
3.0	53.0
3.5	65.0
4.0	74.0
4.5	80.0
5.0	89.0
6.0	105.0428
7.0	122.2581
8.0	139.0036
11.0	190.0026