

00551
21



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

“Dispersión de fases y transferencia de oxígeno en un
sistema modelo de fermentación multifásica conteniendo
proteína soluble”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A

I.BQ. Nancy Olivia Pulido Mayoral

Cuernavaca, Mor. Marzo del 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Enrique Galindo. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto IN105500, IN119598 así como a la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

3

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A mis padres y hermanas por su amor y su apoyo constante.

A mis amigos: Gaby, Anilú, Angie, Rol, Edgar, Carmen por su amor, alegría y por esta amistad tan nuestra que tendremos por siempre.

A mis compañeros y verdaderos amigos de los grupos EG y OTR.

Gracias Rubén.

Reconocimientos:

Al Dr. Enrique Galindo F. por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por su apoyo para la realización de ésta tesis y sus oportunos consejos.

A los miembros del Jurado, por la revisión de la tesis y comentarios :

Dr. Leobardo Serrano Carreón

Dra. Laura A. Palomares

Dr. Jaime Vernon Carter

Dr. Miguel Costas Basín

Dr. Enrique Galindo F.

Dr. Gabriel Corkidi, Ing. Blanca Taboada del laboratorio de imágenes, unidad Morelos (CCADT-UNAM) por la asesoría técnica. Al T. L. Mario Caro Bermúdez, a la Dra. María Soledad Córdova Aguilar por la asistencia técnica.

A la Dra. Claudia Patricia Larralde Corona por su asesoría en la realización de este trabajo, su apoyo, sus consejos y su invaluable amistad.

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	VI
NOMENCLATURA	VII
RESUMEN	1
1 INTRODUCCION	2
2 ANTECEDENTES	5
2.1 CULTIVOS MULTIFÁSICOS	5
2.1.1 Empleo y degradación de sustratos líquidos insolubles (accites) en cultivo sumergido	6
2.1.2 Métodos empleados para mejorar el mezclado y la transferencia de masa	8
2.2 DISPERSIONES EN SISTEMAS DE FERMENTACIÓN	9
2.2.1 Dispersión de aire	9
2.2.2 Dispersión de aceite	10
2.2.3 Parámetros que caracterizan una dispersión	11
2.3 ESTUDIOS DE DISPERSIÓN EN SISTEMAS MODELO	12
2.4 EMULSIONES	15
2.4.1 Agentes surfactantes en bioprocesos	17
2.4.1.1 Proteínas	19
2.4.1.2 Antiespumantes	20
2.5 TRANSFERENCIA DE OXÍGENO	21
2.5.1 Efecto de agentes surfactantes sobre el $k_L a$	23
2.5.1.1 Antiespumantes	23
2.5.1.2 Otros agentes surfactantes	28
2.5.2 Mecanismos para incrementar la transferencia de oxígeno	28
2.5.3 Modelo de estudio: producción de γ -decalactona por <i>Trichoderma harzianum</i>	29
3 OBJETIVOS	30
4 MATERIALES Y METODOS	31

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1	FERMENTACIÓN (PRODUCCIÓN DE γ-DECALACTONA)	31
4.1.1	Microorganismo	31
4.1.2	Obtención y conteo de esporas	31
4.1.3	Sistema de fermentación	31
4.2	MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE OPERACIÓN EN LOS ESTUDIOS DE DISPERSIÓN	32
4.2.1	Montaje del equipo	34
4.3	METODOS ANALÍTICOS	34
4.3.1	Determinación de proteína soluble (método de Bradford)	34
4.3.2	Características de las proteínas utilizadas	36
4.3.3	Determinación de actividad enzimática de lipasa	37
4.3.4	Cinética de producción de proteínas por <i>Trichoderma harzianum</i>	37
4.3.5	Determinación de la tensión superficial	38
4.4	SISTEMA DE ANÁLISIS DE IMÁGENES	41
4.4.1	Descripción del sistema de análisis de imágenes	41
4.4.1.1	Sistema óptico	41
4.4.1.2	Computadora	42
4.4.2	Arreglo experimental	43
4.4.3	Procesamiento digital de las imágenes	43
4.4.3.1	Captura, digitalización y almacenamiento	43
4.4.4	Calibración del estereomicroscopio	46
4.4.5	Procesamiento de imágenes para medir tamaños de gotas	46
4.5	MEDICION DEL $k_{L,a}$	48
4.6	CONSUMO DE POTENCIA	50
4.7	REPRODUCIBILIDAD DE LOS EXPERIMENTOS DE DISPERSIÓN	51
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5.1	DISPERSIÓN EN SISTEMAS DE DOS FASES	52
5.1.1	Efecto de la concentración de proteína sobre la dispersión de gotas de aceite	52
5.1.1.1	Albúmina de suero bovino (BSA)	52
5.1.1.2	Lipasa	54
5.2	DISPERSIÓN EN EL SISTEMA DE TRES FASES	60
5.2.1	Efecto de la presencia de aire en el tamaño de las gotas de aceite de ricino	61
5.2.2	Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre la dispersión de gotas de aceite	64
5.2.3	Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre la dispersión de las burbujas de aire	66
5.2.4	Localización de las burbujas de aire	69
5.2.4.1	Burbujas de aire en el seno del líquido	70
5.2.4.2	Burbujas de aire en el interior de las gotas de aceite	73
5.3	COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO	75
5.3.1	Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre el $k_{L,a}$	75

5.3.1.1	Evaluación del sistema difásico (aire-medio acuoso) y trifásico (aceite-aire-medio acuoso)	76
5.3.1.2	Comparación del $k_L a$ para el sistema difásico y trifásico	79
6	CONCLUSIONES	82
7	PERSPECTIVAS	84
8	REFERENCIAS	85
9	ANEXOS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Mecanismo de transferencia de masa en un sistema tetrafásico	8
Figura 2.2 Estabilización de las emulsiones por fuerzas interfaciales	16
Figura 2.3 Estabilización de emulsiones por partículas sólidas	17
Figura 2.4 Estabilización de emulsiones utilizando macromoléculas	17
Figura 2.5 Orientación de los agentes surfactantes en las interfases	18
Figura 2.6 Pasos involucrados en el transporte de oxígeno a partir de una burbuja de aire	22
Figura 4.1 Diagrama esquemático del tanque de mezclado	33
Figura 4.2 Curva patrón para la determinación de proteína.	35
Figura 4.3 Cinética de producción de proteínas en un cultivo de <i>T. harzianum</i> usando aceite de ricino como fuente de carbono	38
Figura 4.4 Equipo para la determinación de la tensión superficial	40
Figura 4.5 Plano de enfoque en la captura de imágenes	42
Figura 4.6 Fotografía del arreglo experimental (1),(2) computadora con tarjeta de digitalización, (3) cámara de video, (4) sincronizador, (5) cabezal de estereomicroscopio, (6) fuente de luz estroboscópica, (7) tanque de vidrio con tapa, (8) rotámetro, (9) sonda de luz estroboscópica	44
Figura 4.7 Botonera del programa Image-Pro [®] Plus	44
Figura 4.8 Calibración del estereomicroscopio	46
Figura 4.9 Procesamiento manual de imágenes para medir tamaños de gotas de aceite	47
Figura 4.10 Pasos del método de eliminación de oxígeno para la determinación de $k_{L,a}$	49
Figura 4.11 Ejemplo de la determinación de $k_{L,a}$	49
Figura 4.12 Reproducibilidad de pruebas para determinar tamaños de gotas de aceite	51
Figura 5.1. Dispersión de aceite de ricino como función de la concentración de a) BSA y b) Lipasa de germen de trigo	53
Figura 5.2. Diámetro Sauter de las gotas de aceite como función de la concentración de a)BSA y b) lipasa de g. de trigo en el sistema difásico	54
Figura 5.3. Imágenes de gotas de aceite en presencia de BSA, magnificación 8 X	55
Figura 5.4. Imágenes del sistema con lipasa de germen de trigo	57
Figura 5.5. Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre la tensión superficial	58
Figura 5.6. CMC para las diferentes proteínas: a) BSA y b) lipasa de germen de trigo	60

Figura 5.7. Imágenes de gotas de aceite y burbujas de aire para el sistema trifásico a)BSA y b)lipasa de germen de trigo	61
Figura 5.8. Efecto de la presencia de aire sobre el diámetro Sauter de gotas de aceite y en función de la concentración de proteína: a) BSA y b) lipasa de germen de trigo.	62
Figura 5.9. Diferencias en la apariencia de las gotas de aceite entre los sistemas no aireado (a) y aireado (b).	63
Figura 5.10. Dispersión de las gotas de aceite como función de la concentración de proteína en el sistema modelo trifásico : a) BSA, b) lipasa de germen de trigo	65
Figura 5.11. Efecto de la concentración de proteína sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite: a) BSA y b) lipasa de germen de trigo.	66
Figura 5.12. Localización de las burbujas de aire (dentro de gotas de aceite o libres en el seno del líquido).	67
Figura 5.13. Dispersión de las burbujas de aire como función de la concentración de proteína : a) BSA y b) lipasa de germen de trigo	68
Figura 5.14. Dispersión de las burbujas de aire (seno del líquido) como función de la concentración de proteína : a) BSA, b) lipasa de germen de trigo	71
Figura 5.15. Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre el diámetro Sauter de las burbujas libres	72
Figura 5.16. Dispersión de las burbujas de aire - dentro de gotas - como función de la concentración de proteína : a) BSA, b) lipasa de germen de trigo	74
Figura 5.17. Efecto de la concentración de proteína sobre el $k_L a$ en el sistema difásico	76
Figura 5.18. Efecto de la concentración de proteína sobre el $k_L a$ en el sistema trifásico	77

INDICE DE TABLAS

Tabla 4.1 Propiedades físicas de los líquidos utilizados	32
Tabla 4.2 Características de las proteínas utilizadas	36
Tabla 4.3 Macros para capturar, procesar y analizar imágenes	45
Tabla 5.1 Porcentaje (en volumen) de burbujas de aire dentro de gotas de aceite.	69
Tabla 5.2. Comparación de los valores de k_{LA} evaluando el efecto de la presencia o ausencia de aceite de ricino.	80

NOMENCLATURA

$k_{L,O}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno	[h ⁻¹]
a	Área interfacial por unidad de volumen	[m ² m ⁻³]
k_L	Coefficiente de transferencia de masa	[m h ⁻¹]
d_{32}	Diámetro Sauter	[μm]
Φ	Fracción volumétrica de la fase inmisible	[adimensional]
σ	Tensión interfacial/superficial	[dinas cm ⁻¹]
CMC	Concentración micelar crítica	[dinas cm ⁻¹]
S_p	Coefficiente de extendido	[dinas cm ⁻¹]
H_L	Altura del líquido	[cm]
D_i	Diámetro del impulsor	[cm]
P	Potencia en condiciones no aireadas	[kW m ⁻³]
P_g	Potencia en condiciones de aireación	[kW m ⁻³]
H	<i>Hold-up</i>	[adimensional]
D_T	Diámetro del tanque	[cm]

Subíndices

aG	Interfase aire-agua
aO	Interfase aceite-aire
aA	Interfase aceite-agua

RESUMEN

Algunas fermentaciones industriales utilizan aceites vegetales como fuentes de carbono; asimismo, la dispersión del aire en los procesos aerobios debe ser eficiente para satisfacer la demanda de oxígeno de los cultivos. Sin embargo, los procesos de transferencia ligados al grado de dispersión del aceite o del aire no han sido estudiados de manera sistemática. Esto es de vital importancia si se considera que éstos sistemas experimentan cambios en la tensión superficial principalmente ligados a la presencia de proteína soluble.

La distribución de tamaños de gotas de aceite de ricino y burbujas de aire se estudió (utilizando análisis de imágenes) como una función de la concentración de proteína soluble, en un sistema de dos fases (agua-aceite) y en un sistema de tres fases (agua-aceite-aire). La dispersión se realizó en un tanque agitado de 7 L, utilizando un sistema modelo que simula un caldo de fermentación agitado por una turbina Rushton, simulándose las condiciones de la fermentación para la producción de γ -decalactona por *Trichoderma harzianum*.

En los sistemas aireados se evaluó el efecto de la presencia de aire sobre el tamaño de las gotas de aceite así como el tamaño y localización de las burbujas de aire (ya sean libres o dentro de gotas) como función de la concentración de proteína.

Para el sistema difásico, la presencia de bajas concentraciones de proteína disminuye el diámetro de las gotas en la dispersión del aceite de ricino, observándose un efecto importante solo a bajas concentraciones de ella. En el sistema trifásico, la presencia de aire (0.5 vvm) ocasionó un incremento en el tamaño de las gotas con respecto al sistema sin aireación. En la dispersión de las gotas de aceite se observó una disminución en el diámetro Sauter al incrementar la concentración de proteína en el sistema (>0.002 g/L). Un comportamiento similar fue observado en el caso de las burbujas de aire en el seno del líquido. Se observó una reducción en la tensión superficial/interfacial por la presencia de proteína. A su vez las proteínas -por ser moléculas con carga- inducen ésta a la superficie de las gotas y/o burbujas, disminuyendo la frecuencia de acercamiento.

La localización de las burbujas fue dependiente del tipo (principalmente de su estructura) y concentración de proteína. Para la lipasa de germen de trigo, el porcentaje (volumen) de burbujas dentro de gotas incrementó (de 21 a 48 %) al aumentar la concentración de proteína; sin embargo, al utilizar la BSA se mantiene un porcentaje constante (21 %).

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}), se incrementó al incrementar gradualmente la concentración de proteína (< 0.5 g/L) al trabajar con la lipasa de germen de trigo, mientras que al utilizar la BSA en el mismo rango de concentraciones se observó una disminución del k_{La} al aumentar la concentración en el sistema (aire-medio acuoso-aire).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PAGINACION DISCONTINUA

1 INTRODUCCION

En la actualidad existen numerosos bioprocesos industriales que utilizan aceites vegetales como fuente de carbono. Ello es debido a su alto valor energético y a su bajo costo, en comparación con otras fuentes de carbono (*i.e.* carbohidratos) (Large *et al.*, 1998). Un ejemplo de estos sistemas es la producción de compuestos aromáticos por el hongo filamentoso *Trichoderma harzianum*, utilizando aceite de ricino.

El cultivo de *Trichoderma harzianum* en biorreactores para la producción de γ -decalactona (compuesto con aroma a durazno) en un medio acuoso y aceite de ricino, involucra un proceso hidrodinámicamente complejo de cuatro fases, heterogéneo y altamente viscoso (Serrano-Carreón *et al.*, 1997). Esta fermentación involucra el mezclado de dos fases inmiscibles (medio acuoso y aceite), una fase sólida (micelio) y una fase gaseosa (aire). Su utilización como fuente de carbono por parte del hongo involucra un proceso de hidrólisis (Sokolovská *et al.*, 1998), por la acción de lipasas, produciendo ácidos grasos.

La problemática de los sistemas multifásicos reside en buena medida en las características reológicas de sus caldos, los cuales ocasionan complejos problemas de mezclado, lo que resulta finalmente en una reducción de la transferencia de masa al sistema. Una herramienta para caracterizar estos problemas consiste en el estudio de las dispersiones líquido-gas, con la finalidad de conocer específicamente el fenómeno de transferencia de oxígeno en los caldos de cultivo dentro de un tanque agitado.

El valor del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}) es reconocido como uno de los criterios para el escalamiento de procesos de fermentación. Considerando que la transferencia de oxígeno es regularmente el paso limitante en diversos procesos, su valor influye determinantemente sobre la productividad de un biorreactor, ya que refleja la capacidad de éste para transferir oxígeno (Bailey y Ollis, 1986).

La adición de una fase inmisible puede alterar la tensión superficial, así como el comportamiento coalescente y la rigidez de las burbujas de aire, parámetros directamente relacionados con el coeficiente de transferencia de oxígeno y específicamente, el área interfacial (Vardar-Sukan, 1998). Esto es debido a que, cuando dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles se ponen en contacto, se genera una tensión interfacial en el límite de las dos capas del fluido. Las sustancias disueltas en la solución también ocasionan un cambio en la tensión superficial (Maron y Prutton, 1996): los electrolitos fuertes producen un incremento de la tensión superficial, mientras que algunos compuestos orgánicos (aceites, antiespumantes, etc.) tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial de la solución.

La dispersión de dos fases inmiscibles o de una fase líquida y una gaseosa puede ser cuantificada mediante análisis de imágenes. Este método consiste en la captura, digitalización y procesamiento de una imagen mediante un programa computacional. Los parámetros que generalmente se cuantifican tienen que ver con la forma, tamaño y densidad de color de la misma. La ventaja del análisis de imágenes es que es un método susceptible de ser realizado sin perturbar el sistema, además de que dicho proceso puede ser automatizado.

Existen reportes sobre la dispersión de sistemas inmiscibles (Dalmau *et al.* 1998; Zhou y Kresta, 1998); sin embargo, la naturaleza de los cultivos microbianos los hace más complejos y, en este campo,

prácticamente no hay información sobre los fenómenos básicos de transferencia interfacial, es decir, de parámetros implicados directamente en la transferencia de oxígeno en el medio y por lo tanto que afectan la productividad de un fermentador.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo principal la caracterización de las fases en un sistema de fermentación multifásico mediante el análisis de las dispersiones a nivel microscópico y tomando como modelo de estudio la producción de γ -decalactona por el hongo *Trichoderma harzianum*. Así mismo, se generó información para explicar el fenómeno de la transferencia de oxígeno en estos sistemas (multifásicos), evaluando el efecto de agentes tensoactivos sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$). Actualmente, integrantes del grupo del Dr. Galindo, realizan estudios sobre el efecto de otras variables (morfología fungal y viscosidad) sobre la dispersión del aceite de ricino y del aire, esperando obtener información que permita caracterizar el sistema en forma detallada. Ello, en última instancia, permitirá diseñar procesos de fermentación más eficientes

2 ANTECEDENTES

2.1 CULTIVOS MULTIFÁSICOS

Un gran número de bioprocesos industriales involucran sistemas multifásicos, los cuales requieren realizar dispersiones líquido-líquido y/o líquido-gas de forma eficiente. Los bioprocesos en donde está presente una segunda fase inmiscible han sido ampliamente utilizados para la producción de químicos de alta calidad (Schmid *et al.* 1998), para biotransformaciones que incluyen reacciones de oxidación-reducción específicas, como las utilizadas para la purificación de suelos contaminados (sistemas aceite-agua)(Morán *et al.* 2000) o bien para la producción de biosurfactantes (Kollmer *et al.* 1999). Otro ejemplo de éstos sistemas, es el uso de solventes orgánicos inmiscibles en agua, como la producción de aldehídos por bacterias, utilizando sistemas de dos fases, logrando extraer éstos *in situ* a partir de la fase acuosa (Molinari *et al.* 1999).

Los microorganismos miceliares desempeñan un papel de gran importancia en la industria de antibióticos, ácidos orgánicos, vitaminas, enzimas y recientemente en el mercado de compuestos de aroma (Mitard y Riba, 1988; Treskatis *et al.*, 1997). Las fermentaciones aeróbicas de organismos filamentosos cubre un amplio rango de procesos biológicos importantes. Las fermentaciones son particularmente complejas cuando la fuente de carbono u otro nutriente es inmiscible en agua. Las características físicas que presentan los cultivos miceliares son diferentes de aquellos que involucran cultivos microbianos (bacterias o levaduras), debido principalmente a la gran diversidad morfológica y fisiológica que desarrollan durante su crecimiento. Sin embargo, en la mayoría de los procesos fermentativos miceliares, estos crecen en forma de micelio disperso (Olsvik y Kristiansen, 1994),

provocando la formación de caldos altamente viscosos y no-Newtonianos, donde la transferencia de masa y la homogeneidad se ven drásticamente limitadas conforme avanza el proceso (Cui *et al.*, 1998).

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

La elección de la fuente de carbono en cultivos miceliares, al igual que en otros sistemas, depende regularmente del producto deseado y de su costo. Una gran variedad de sustratos son empleados, los cuales abarcan desde sustratos solubles ordinarios (glucosa, sacarosa, etc.), hasta compuestos insolubles (aceites, harinas, celulosa). Los sustratos insolubles pueden ser clasificados en dos categorías: sólidos (celulosa, almidón, harinas) y líquidos (aceites), englobando éstos últimos una gran cantidad de sustratos no solubles empleados industrialmente.

El uso de aceites naturales como fuentes de carbono en fermentaciones miceliares ha presentado algunas ventajas, incluyendo sus propiedades como antiespumante (Large *et al.*, 1998). Por otra parte los aceites son esenciales en la industria de los antibióticos (Elibol y Mavituna, 1997), ya que se ha reportado que mejoran la producción de compuestos solubles en aceite (Keudell *et al.*, 2000).

Por otro lado, estudios recientes demuestran que el metabolismo lipídico esta involucrado directamente en la biosíntesis de varios compuestos de aroma (lactonas). Bonnarme *et al.* (1997), empleando una gran diversidad de aceites vegetales como complementos nutricionales, reportaron la producción de la molécula de 6 pentil- α -pirona por el hongo *Trichoderma* sp. De igual manera, Serrano-Carreón *et al.* (1997) demostraron que el aceite de ricino, al ser utilizado como fuente única de carbono, indujo la síntesis de la γ -decalactona (compuesto con aroma a durazno) en cultivos de *Trichoderma harzianum* (desarrollados en bioreactores de laboratorio).

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

En la actualidad, los lípidos y los aceites son considerados componentes esenciales de los medios de fermentación debido a que poseen propiedades antiespumantes (Cavanagh *et al.*, 1994) y -como se mencionó previamente- constituyen una fuente alternativa de nutrientes, como fuente de carbono total (Rocha-Valadez *et al.*, 2000; Serrano-Carreón *et al.*, 1997) o parcial (Rols y Goma, 1991) que favorece la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, el uso de aceites genera problemas de mezclado y de transferencia de masa entre las diversas fases del sistema (medio de cultivo -fase acuosa-, aceite -fase orgánica-, biomasa filamentosa -fase sólida- y aire -fase gaseosa). Por otra parte, la reología compleja de los cultivos miceliares dificultan más el proceso de hidrólisis (Rocha-Valadez *et al.*, 2000).

El contacto entre las fases depende del área interfacial y por lo tanto es deseable incrementarla para que el sistema no tenga limitaciones de transferencia (Tsouris *et al.*, 1996). La transferencia de masa (oxígeno) se ve dominada por mecanismos que involucran flujos de masa en las interfases (*figura*

2.1). Sin embargo, se ha considerado que la limitación inicial y principal (paso limitante) en este tipo de procesos, reside en la heterogeneidad del sistema (Ison y Lilly, 1996).

El estudiar la dispersión de fases, esto es, conocer los tamaños de gotas y burbujas permite conocer el área interfacial y con ella es posible cuantificar la transferencia de masa entre las fases.

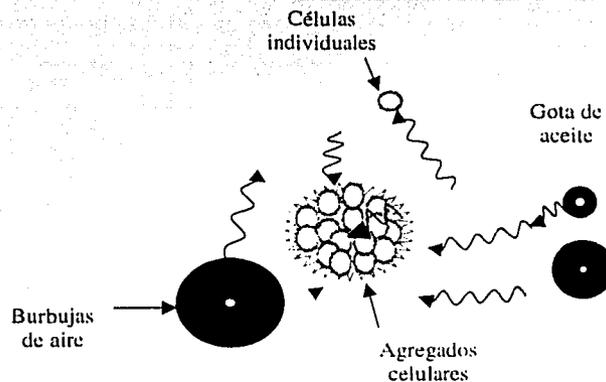


Figura 2.1 Mecanismo de transferencia de masa en un sistema tetrafásico

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

A pesar de los problemas que origina la compleja reología de los caldos miceliarios, existen alternativas para disminuir o eliminar esta problemática. El fundamento radica en mejorar la calidad del mezclado (y por lo tanto la homogeneidad del sistema). Una alternativa empleada con frecuencia es la de incrementar la velocidad de agitación conforme aumenta la viscosidad, ya sea al inicio o durante el cultivo, tratando de mejorar la transferencia de masa y de minimizar la heterogeneidad en el sistema. Lejeune y Baron (1995), para cultivos que producen celulasas por *Trichoderma reesei*,

señalan que la producción de éstas fue afectada por las condiciones de agitación imperantes en el sistema.

Sin embargo, se han reportado otros trabajos en donde la transferencia de masa (oxígeno) se incrementa por la presencia de una segunda fase líquida inmiscible en donde el gas presenta una alta solubilidad. Se ha observado que los aceites mejoran la producción de materiales liposolubles como vitaminas, esteroides, coenzimas y algunos productos farmacéuticos (Vandamme, 1992) cuando se adicionan al caldo de fermentación, lo cual está relacionado con la alta solubilidad del oxígeno en los aceites.

2.2 DISPERSIONES EN SISTEMAS DE FERMENTACIÓN

2.2.1 Dispersión de aire

En sistemas biológicos, la dispersión de aire en el medio de cultivo es de vital importancia para llevar a cabo procesos aerobios. La transferencia de oxígeno tiene lugar a través de la interfase gas-líquido y depende en gran medida de las características de las burbujas (tamaño y número) en el sistema. Su tamaño a su vez está determinado por la velocidad de agitación, el flujo de gases, la geometría del impulsor y del tanque, las propiedades del fluido y su reología (Tatterson, 1991).

Para obtener una mayor área de contacto se requieren burbujas pequeñas porque tienen una mayor relación área superficial/volumen. Además, poseen una velocidad de ascenso menor a las grandes, lo que permite que recirculen mejor y permanezcan el tiempo suficiente para lograr de forma eficiente la transferencia de masa (oxígeno).

Durante el tiempo que permanecen en el fermentador, se presenta un rompimiento de burbujas en la zona del impulsor. Al mismo tiempo, se presenta el fenómeno de coalescencia, que consiste en la unión de las burbujas, generando otras mayores. Cuando se encuentran microorganismos presentes, los mecanismos de dispersión se ven drásticamente modificados. Desafortunadamente, la mayor parte de los trabajos publicados sobre la dispersión de gases se han restringido a sistemas en los que la fase continua es el agua y es difícil aplicar directamente los resultados a otros sistemas más complejos (como los que se presentan en sistemas de fermentación). Los metabolitos producidos por las células, incluyendo las proteínas extracelulares, cambian la composición del medio y pueden variar la distribución de tamaños de burbujas (Adler *et al.* 1980).

Aún cuando el tamaño de las burbujas depende fuertemente de la concentración de solutos (fuerza iónica), no se ha encontrado una correlación general aplicable entre la tensión superficial y el tamaño de las burbujas (Machon *et al.* 1997).

Otra propiedad fisicoquímica de los sistemas de fermentación es la viscosidad. Un aumento en la viscosidad de la fase continua disminuye la eficiencia de mezclado, lo cual dificulta la ruptura de las burbujas que salen del difusor. Así, éstas ascienden rápidamente, disminuyendo la transferencia de masa (oxígeno), debido principalmente a que las burbujas grandes (producto del fenómeno anterior) poseen una área interfacial menor.

2.2.2 Dispersión de aceite

El tamaño de las gotas es función de la geometría de los sistemas, de las propiedades físicas de ambos líquidos (viscosidad, tensión superficial, hidrofobicidad, etc.), de la fracción volumétrica de la fase dispersa y de la energía que se provee al sistema (Tsouris *et al.* 1996). Del equilibrio resultante se obtendrá una distribución de tamaños de gotas (Pacck *et al.* 1999).

La viscosidad es un parámetro determinante en el tamaño de gotas. En una fase continua, en fermentaciones, éste parámetro se ve afectado por la creciente presencia de biomasa (principalmente la micelial) o la producción de macromoléculas (como exopolisacáridos). Cuando esto ocurre, no se puede lograr una composición homogénea en el sistema y aunque se sabe que existe un mínimo de energía para lograr una dispersión uniforme (Armenante y Huang, 1992), en sistemas biológicos, éste parámetro no siempre puede ser utilizado debido a la sensibilidad que algunos microorganismos y células muestran a las fuerzas de corte producto de la agitación.

2.2.3 Parámetros que caracterizan una dispersión

Entre los diámetros promedio considerados, el diámetro Sauter es el más utilizado, al relacionar el área interfacial por unidad de volumen, a , y el área para la transferencia de masa. Por consiguiente, determina la tasa de transferencia de energía, masa y/o reacción química en dispersiones (Pacek *et al.*, 1999). Sin embargo, el diámetro Sauter por sí solo no puede caracterizar una dispersión, en vista de que es posible obtener un mismo valor del diámetro promedio para distribuciones de tamaños diferentes (Zhou y Kresta, 1998). Por lo tanto para un mejor entendimiento de las dispersiones, además de medir el diámetro promedio Sauter, se cuantifica la distribución de tamaños.

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

$$d_{32} = \frac{\sum (d_i)^3 \Delta n_i}{\sum (d_i)^2 \Delta n_i} \quad (1)$$

donde:

d_i = Diámetro de cada burbuja o gota, μm .

n = Número de burbujas o gotas

El diámetro Sauter se obtiene a partir de mediciones del diámetro de gotas o burbujas; depende de la forma de la distribución de tamaño de gotas/burbujas (Zhou y Kresta, 1998b) y es -por definición - mayor que el diámetro aritmético y más dependiente de las burbujas/gotas de mayor tamaño (Machon *et al.* 1997).

En la tesis de Brito (2001) se puede encontrar una revisión completa de los diferentes parámetros útiles para caracterizar una dispersión .

2.3 ESTUDIOS DE DISPERSIÓN EN SISTEMAS MODELO

La influencia de los agentes surfactantes sobre el tamaño de las gotas y burbujas de aire ha sido abordado en varios estudios previos. Drogaris y Weiland (1983) investigaron la coalescencia de burbujas de aire en soluciones de ácidos grasos y *n*-alcoholes. En agua pura y en soluciones muy diluidas, la coalescencia dominó en el sistema. Sin embargo, la frecuencia de choque entre las burbujas fue eliminado (100 % a 0 %) a mayores concentraciones de soluto (ácidos grasos o alcoholes).

Dalmau *et al.* (1998) evaluaron la influencia del tamaño de las gotas de ácido oleico en la producción de lipasa por *Candida rugosa*. Sus resultados mostraron que el tamaño de las gotas (diámetro promedio) disminuyó de 3.5 μm a 1.0 μm al aumentar la velocidad de agitación (300- 800 rpm). Ésta disminución en el diámetro de las gotas favoreció la producción de lipasas extracelulares.

Machon *et al.* (1997) evaluaron el tamaño de las burbujas de aire en soluciones conteniendo electrolitos y alcohol, en tanques agitados. Observaron que al aumentar el valor de la tensión superficial por la presencia de los diferentes solutos (alcohol que disminuye la tensión superficial con

respecto a la del agua o los electrolitos que la aumentan), el diámetro Sauter de las burbujas se incrementó de 1000 μm a aproximadamente 2500 μm , utilizando una agitación de 770 rpm y una turbina Rushton.

Kollmer *et al.* (1999) evaluaron el efecto de la concentración de biosurfactantes sobre la tensión interfacial, el diámetro Sauter y la distribución de tamaños de gotas en dispersiones modelo, utilizando el sistema n-octano/agua. Sus resultados mostraron que al incrementar la concentración de biosurfactante, la tensión interfacial y el diámetro Sauter disminuyen hasta un valor mínimo (tensión interfacial = 25 mN/m). Las distribuciones de tamaños de gotas (densidad de probabilidad de número), muestran que la coalescencia desaparece debido a que las gotas son estabilizadas por la adsorción del biosurfactante en la interfase. Esto sucede al aumentar la concentración de biosurfactante en el sistema.

Gallego-Lizón y Pérez de Ortiz (2000) evaluaron el tamaño de gotas en emulsiones "líquido-membrana". Una emulsión "líquido-membrana" es un sistema de tres fases que está formada por dos fases de la misma naturaleza (generalmente acuosas), separadas por una tercera llamada "líquido-membrana", inmiscibles en las otras dos. Un sistema típico consiste en una emulsión de agua en aceite, estabilizada por la adición de un surfactante. Las variaciones en la tensión interfacial y la viscosidad fueron realizadas cambiando la concentración del surfactante. Los estudios evaluaron el efecto de la velocidad de agitación en el sistema. Los resultados muestran que al aumentar la velocidad de agitación se obtienen tamaños de glóbulos (producto de la emulsión), más pequeños. Sin embargo, muestran que ésta disminución en el diámetro (medido como $d_{3,2}$) no es debida únicamente a las propiedades fisicoquímicas de las emulsiones, sino también a los parámetros hidrodinámicos (velocidad de agitación, diámetro del impulsor, etc).

Janse *et al.* (1999) evaluaron el efecto de las fibras de pulpa de papel sobre el *hold-up* (fracción volumétrica retenida) del gas. Las conclusiones más importantes de éste estudio fueron, entre otras: a) las pulpas industriales contienen agentes activos a la superficie, los cuales tienen un efecto en la formación y preservación de burbujas pequeñas con una gran área interfacial, b) la generación de burbujas pequeñas es resultado de la combinación de utilizar un difusor con orificios pequeños y de la presencia de surfactantes, los cuales -al adherirse a la interfase- impiden la coalescencia.

Galindo *et al.* (2000) evaluaron el tamaño de gotas de aceite y burbujas de aire en sistemas modelo de hasta cuatro fases (aire-medio acuoso-aceite-micelio). En el sistema de dos fases, observaron que al incrementar la concentración de aceite en el medio, el diámetro Sauter de las gotas de aceite incrementaba de 750 μm (para 2 % de aceite) a 1250 μm (para 15 % de aceite). En el sistema trifásico (aire-aceite-medio acuoso), la introducción de aire al sistema incrementó drásticamente el tamaño de las gotas de aceite, debido principalmente a la introducción de burbujas en el interior de las gotas de aceite y a la caída en la potencia suministrada debida a la aireación. Por otro lado, en este mismo trabajo, fueron evidenciados algunos fenómenos de superficie y considerados como posibles parámetros involucrados ampliamente en la dispersión. Al adicionar Sudan III (colorante hidrófobo) y utilizando 10 % de aceite, no se observaron diferencias en el diámetro Sauter de las gotas de aceite entre los sistemas con aire y sin aire. Sumado a esto, no observaron diferencias características en la superficie de las gotas, las cuales habían sido observadas en los experimentos típicos con aireación. Con relación a las burbujas de aire, observaron que al aumentar la concentración de aceite, el diámetro de éstas fue decreciendo.

Zahradnik *et al.* (1999) estudiaron los fenómenos de coalescencia en soluciones de sacarosa, examinando el efecto de agentes surfactantes (alcoholes alifáticos) y demostraron que la coalescencia de las burbujas de aire es suprimida por la adición de éstos.

Bredwell *et al.* (1995) estudiaron la dispersión de microburbujas. Las microburbujas son pequeñas burbujas esféricas estabilizadas con surfactantes, con diámetros del orden de 100 μm , las cuales proporcionan un área superficial considerable. La capa de surfactante que rodea a las microburbujas genera una doble capa eléctrica que actúa como repulsor de otras burbujas, previniendo así la coalescencia. Los resultados mostraron que la concentración de surfactante es una variable importante en la formación de dispersiones estables; sin embargo, cuando la concentración de surfactante es mucho más baja que la concentración micelar crítica (concentración a la cual el surfactante forma una capa monomolecular en la interfase, Clarkson *et al.* 1999), las dispersiones estables de microburbujas no llegan a formarse.

2.4 EMULSIONES

Una emulsión es un sistema heterogéneo que consiste de al menos un líquido inmisible dispersado en otro en forma de gotas. La fase que se encuentra en forma de gotas se conoce como fase dispersa y la fase que constituye la matriz en la que las gotas son suspendidas se conoce como fase continua (Adamson, 1982). Las emulsiones son formadas por la aplicación de una energía externa (p.e. agitación)(Lee *et al.* 2002). Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables que tienden a separarse con el tiempo. Ésta inestabilidad es debida a la energía libre asociada a la interfase entre las fases. Al incrementarse el área interfacial (por la disminución del tamaño de partícula) se necesita más energía para mantener una emulsión y evitar la coalescencia. Las superficies de las gotas y burbujas de una emulsión pueden ser estabilizadas con surfactantes.

Algunas moléculas actúan como agentes activos a la superficie (llamados surfactantes o agentes emulsificantes) y pueden reducir la energía necesaria para mantener separadas las fases, previniendo la coalescencia y manteniendo la estabilidad de la emulsión. Los agentes surfactantes son necesarios para estabilizar el sistema. Algunos de los mecanismos de estabilización incluyen:

- *Disminución de la tensión superficial/interfacial.* Es la fuerza requerida para reducir el contacto entre dos fases (gas-líquido, líquido-líquido). Las moléculas en la fase acuosa son atraídas una a otra en todas direcciones. En la capa límite entre las dos fases, las moléculas están en contacto con otras moléculas y experimentan fuerzas desiguales entre las diferentes fases. Cuando se forma una emulsión, el área de contacto se incrementa, aumentando la tensión interfacial total. Así, las moléculas tienden a migrar de la interfase a la fase continua y reducen el área de contacto entre moléculas diferentes (*figura 2.2*).
- *Adición de partículas pequeñas.* Fragmentos de células, silica, etc., pueden estabilizar una emulsión, adsorbiéndose a la interfase para formar una barrera física alrededor de las gotas en la emulsión. Debe alcanzarse un balance entre la tensión interfacial del aceite y los sólidos y del agua y los sólidos (*figura 2.3*).
- *Adición de macromoléculas.* Algunas macromoléculas -como proteínas y gomas- forman películas alrededor de las gotas de la emulsión estableciendo una barrera física (*figura 2.4*), evitando así la coalescencia. Cuando se utilizan proteínas como agentes surfactantes, éstas se despliegan y reorientan (ver detalles en la sección 2.3.1.1).

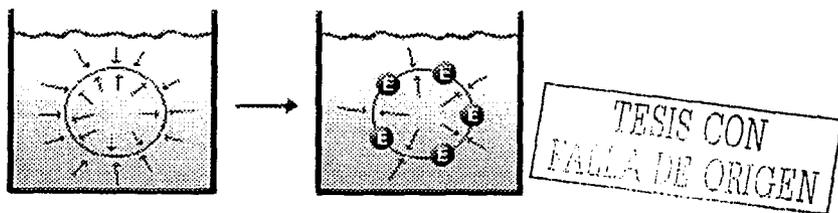


Figura 2.2. Estabilización de las emulsiones por fuerzas interfaciales



Figura 2.3. Estabilización de emulsiones por partículas sólidas

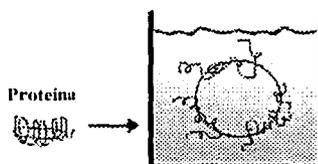


Figura 2.4. Estabilización de emulsiones utilizando macromoléculas

2.4.1 Agentes surfactantes en bioprocesos

Debido a que la tensión superficial de un líquido está determinada por la energía de las moléculas en la región interfacial, el desplazamiento de moléculas de la superficie líquida por solutos adsorbidos afectará directamente el valor de la tensión superficial. La relación entre la estructura química de una molécula adsorbida y la velocidad de adsorción, diferencia las clases de surfactantes y determina su utilidad (Adamson, 1982). Las propiedades de muchos agentes surfactantes son consecuencia de la forma y propiedades fisicoquímicas de éstas moléculas.

Los surfactantes son moléculas anfifílicas, es decir, poseen un extremo con características polares y otro no polar (Adamson, 1982). Por ello, las moléculas de surfactantes se alinean a la interfase aceite – agua, con el grupo hidrofílico en el agua y el tallo hidrófobo en el aceite (*figura 2.5*).

Los surfactantes tienden a formar agregados estables (micelas) en solución, siempre que su concentración esté por arriba de su concentración micelar crítica (CMC) y se absorben a las interfaces gas-líquido (Jordan *et al.* 1999). Los caldos de fermentación contienen numerosas sustancias activas a la superficie (surfactantes). Los biosurfactantes definen una clase de surfactantes que son sintetizados por microorganismos (*i.e.* proteínas, fosfolípidos, etc.).

El valor de tensión superficial mínima (σ_{\min}) para un surfactante será determinado por la concentración micelar crítica (CMC). La CMC es la concentración a la cual el surfactante forma una capa monomolecular en la interfase líquido-líquido o gas-líquido (Porter, 1994).

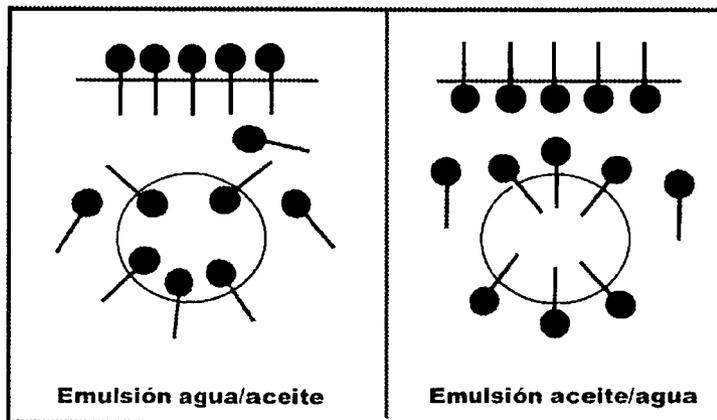


Figura 2.5. Orientación de los agentes surfactantes en las interfases

2.4.1.1 Proteínas

Las proteínas son moléculas activas a la superficie, las cuales tienen la propiedad de adsorberse a interfases agua-aire o aceite-agua, debido esencialmente a las propiedades hidrofóbicas de estas interfases. Esta adsorción estabiliza la lamela de la burbuja, reduciendo la tensión superficial (Clarkson *et al.* 1999).

Pezennec *et al.* (2000) han mostrado que el comportamiento de las proteínas en la interfase es influenciado principalmente por su rigidez estructural. Por ejemplo, las proteínas globulares (lizosima, albúmina de suero bovina, ovalbúmina) forman películas con alta rigidez. Tripp *et al.* (1994) describen el proceso de adsorción de las proteínas globulares (BSA, lizosima, citocromo C, ribonucleasa, caseína, etc.) considerando su naturaleza anfifílica y su estabilidad. Las proteínas globulares con un alto grado de estabilidad conformacional y poco flexibles son consideradas rígidas y resisten grandes cambios en su conformación. Por otro lado, las proteínas globulares llamadas “suaves” son relativamente flexibles y pueden reorientar su estructura terciaria para adsorberse con más facilidad en las interfases.

Otro factor que influye la adsorción de las proteínas en la interfase es el número y distribución de aminoácidos no polares sobre la superficie de las proteínas. La BSA es una proteína globular, considerada como “suave”. Tripp *et al.* (1995) reportan que la adsorción de la BSA a la interfase aire-agua es un proceso rápido.

Beverung *et al.* (1999) proponen que la adsorción de la proteína es inducida por las interacciones hidrofóbicas entre el aceite y los residuos hidrofóbicos de la superficie de la proteína. Altos niveles de proteína facilitan el desplegamiento. El tamaño y la anfifilicidad de la proteína, en contraste con la polaridad de las fases, determina la adsorción reversible o irreversible de estas.

Las propiedades de las proteínas difieren de las de los agentes surfactantes de bajo peso molecular (Prins y van't Riet, 1987) en que: 1) se adsorben a una interfase a muy bajas concentraciones, 2) son flexibles y pueden cambiar su conformación cuando se adsorben a la interfase.

Cuando la molécula de proteína se adsorbe, sufre un cambio conformacional conocido como desnaturalización superficial. Este desplegamiento es producto de la reorientación de las regiones hidrofóbicas de la molécula hacia la fase gaseosa (en el caso de interfases gas-líquido) (Clarkson *et al.*, 1999). Se ha observado la formación de películas viscoelásticas en la interfase aceite-agua debido a la adsorción de proteínas (Beverung *et al.*, 1999). Al adsorberse éstas a la interfase, conducen a la reducción de la tensión interfacial.

2.4.1.2 Antiespumantes

Al igual que las proteínas, los antiespumantes son sustancias activas a la superficie, las cuales disminuyen la elasticidad superficial de los líquidos y previenen la formación de espuma. Algunos de los antiespumantes utilizados en bioprocesos son: aceites, ácidos grasos, ésteres, alcoholes, poliglicoles, etc. y su modo de acción depende de la naturaleza del compuesto (Vardar-Sukan, 1998).

Los aceites naturales son sustancias orgánicas insolubles en agua, compuestas por triglicéridos- ester de glicerol con cadenas laterales de ácidos grasos saturados e insaturados - junto con algunos ácidos grasos libres-, los cuales son fácilmente metabolizables. La adición de agentes antiespumantes altera la tensión superficial, la fuerza iónica y la viscosidad, afectando así el comportamiento coalescente y la rigidez de las burbujas y por lo cual se incluyen como tensoactivos o surfactantes ya que al bajar la tensión superficial, influyen en la dispersión en los sistemas de fermentación.

Sin embargo, el principal efecto de la adición de los agentes antiespumantes en las fermentaciones es observado sobre la transferencia de oxígeno, como se describirá en la siguiente sección.

2.5 TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

Los objetivos más importantes de un biorreactor son la dispersión del gas en el seno del líquido (transferencia de oxígeno) y una adecuada interacción entre las fases (mezclado), debido a los requerimientos metabólicos de oxígeno por parte de los microorganismos.

En los bioprocesos aeróbicos, el gas – casi siempre aire - debe ser dispersado en un líquido (solución acuosa o suspensión) y el oxígeno debe disolverse. Un suministro de oxígeno suficiente para el crecimiento de las células es crítico, debido a la baja solubilidad del oxígeno en agua (Vardar-Sukan, 1990). La transferencia de oxígeno parece ser la limitación más severa en cultivos microbianos (Kawase *et al.*, 1997; Worden *et al.*, 1998).

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

La transferencia de oxígeno hacia el líquido y de éste al organismo se basa en la absorción del oxígeno desde la fase gaseosa hasta la fase líquida, la cual se puede dividir en las siguientes etapas (Bailey y Ollis, 1986) (*figura 2.6*):

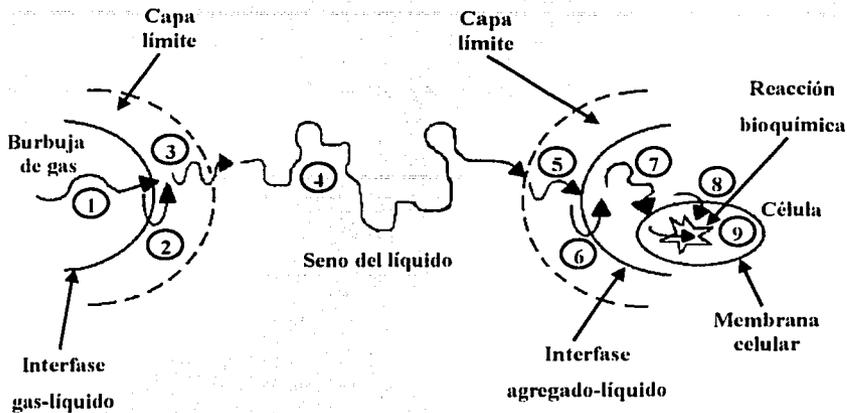


Figura 2.6. Pasos involucrados en el transporte de oxígeno a partir de una burbuja de aire

1. Difusión del oxígeno a partir de la burbuja de gas en la interfase gas-líquido.
2. Transporte a través de la interfase gas-líquido.
3. Difusión del oxígeno a través de la región del líquido adyacente a la burbuja de gas.
4. Transporte de oxígeno de la zona del líquido bien mezclado a la región del líquido no mezclado alrededor de las células.
5. Difusión de la región alrededor de las células.
6. Transporte a partir del líquido a las células o agregados celulares.
7. Transporte difusivo del oxígeno dentro de los agregados celulares.
8. Transporte a través de la membrana celular.

La transferencia de masa (en este caso de O_2) en el sistema, está representado por (Doran, 1999):

$$N_{A_{O_2}} = k_L a (C^* - C_L) \quad (2)$$

donde :

k_L = Coeficiente de transferencia de oxígeno [$m\ s^{-1}$]

a = Área interfacial por unidad de volumen del fluido [$m^2\ m^{-3}$]

C^* = Concentración de oxígeno en el equilibrio [$gmol\ m^{-3}$]

C_L = Concentración de oxígeno en el seno del líquido [$gmol\ m^{-3}$]

El área interfacial puede ser calculada conociendo el diámetro promedio Sauter (d_{32}). El diámetro promedio Sauter es un parámetro importante debido a que está directamente relacionado con el área interfacial, la cual determina la velocidad de transferencia de oxígeno en las dispersiones (Zhou y Kresta, 1998). Su valor puede ser calculado directamente obteniendo el tamaño de las burbujas de aire, utilizando por ejemplo, herramientas de análisis de imágenes.

Partiendo del valor del diámetro promedio Sauter, es posible calcular el área interfacial de acuerdo a :

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

En la cual, el valor de Φ representa la fracción volumétrica de la fase dispersa.

2.5.1 Efecto de agentes surfactantes sobre el $k_L a$

2.5.1.1 Antiespumantes

La adición de agentes antiespumantes es necesario en muchas fermentaciones y tiene un efecto importante y complejo sobre la transferencia de oxígeno (Morão *et al.* 1999). En forma más particular, el $k_L a$ es afectado en gran medida por el área interfacial (a) debido al comportamiento coalescente y las propiedades fisicoquímicas del medio y el k_L en función de los parámetros hidrodinámicos del

sistema, en especial la capa límite en la interfase gas-líquido. En algunos casos, la adición en exceso de los agentes surfactantes puede conducir a un incremento en la transferencia de oxígeno, especialmente si el agente antiespumante es también un nutriente, como en el caso de los aceites naturales (Rols y Goma, 1991). Sin embargo, este fenómeno no ha sido todavía totalmente explicado.

Galindo *et al.* (2000) sugieren que, en los sistemas con baja concentración de aceite, el tamaño de las burbujas se ve incrementado -conduciendo a un área interfacial menor – y por lo tanto una disminución en el $k_L a$.

Los agentes antiespumantes bajan la tensión superficial disminuyendo el diámetro de las burbujas y afectando tanto el diámetro Sauter (d_{32}) como el *hold-up*. Sin embargo, el tamaño promedio de las burbujas no depende únicamente de la agitación suministrada, sino también de las propiedades coalescentes del sistema. Así, la velocidad de coalescencia depende de las propiedades fisicoquímicas del líquido (densidad, viscosidad, tensión superficial). El efecto de la variación de la composición del medio sobre el comportamiento coalescente de las burbujas es de difícil predicción.

El efecto neto de la adición de un agente antiespumante depende de las etapas limitantes en el proceso de suministro de oxígeno. Esta limitación puede ocurrir: a) a través de la interfase (afectando principalmente el valor de k_L), o b) en el seno del líquido (afectando el área interfacial) (Vardar-Sukan, 1998).

Los agentes antiespumantes incrementan la coalescencia y reducen la transferencia de oxígeno, sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado una relación cuantitativa entre estos factores. Vardar-Sukan (1990) comparó el efecto de diferentes aceites (aceite de maíz y aceite de semillas de amapola) sobre

el $k_{L,a}$. En general, observó que el $k_{L,a}$ disminuía hasta un mínimo al incrementar la concentración de aceite.

Vardar –Sukan (1998) reportó también que la composición de la fase acuosa, sobre la cual se adiciona el antiespumante, influye los resultados sobre la transferencia de masa. Si el antiespumante es adicionado a una solución con sales, el $k_{L,a}$ disminuye significativamente, debido al incremento en la coalescencia. Si se adiciona proteína al medio, la velocidad de coalescencia disminuye debido al desplazamiento del antiespumante de la interfase gas-líquido.

Morão *et al.* (1999) encontraron que la adición de bajas concentraciones de antiespumantes disminuye marcadamente el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_{L,a}$). Los antiespumantes utilizados en sus estudios incluyeron el aceite de soya, la silicona y el polipropilenglicol. Las concentraciones de antiespumante utilizadas abarcaron un rango de 2 a 1000 ppm. Altas concentraciones de aceite de soya o bien de silicona (200-1000 ppm), mejoraron la transferencia de oxígeno. Al incrementarse la concentración de antiespumante, los efectos pueden explicarse mediante tres mecanismos: *a)* que la movilidad de las burbujas disminuya, *b)* que la coalescencia se incremente ó *c)* que la tensión superficial disminuya. Los primeros dos efectos disminuyen el valor de $k_{L,a}$ (específicamente afectan el valor del área interfacial), mientras que al disminuir la tensión superficial, se reduce el diámetro de las burbujas y se incrementa el área interfacial.

Rols y Goma (1991) estudiaron el efecto de la concentración de aceite de soya sobre la velocidad de transferencia de oxígeno en un medio para la producción de butanodiol, por la bacteria *A. aerogenes*. La presencia de aceite de soya en el medio de fermentación mejoró la capacidad de transferir el oxígeno. Para las condiciones empleadas en ese trabajo (0.27 vvm y 500 rpm), el uso de 19 % v/v de aceite de soya incrementó 1.48 veces el $k_{L,a}$ comparado con el sistema sin aceite.

Si la adición de aceite de soya influencia el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, entonces éste podría estar actuando en la interfase gas-líquido o bien dentro de la capa límite del gas.

Algunas de las posibles explicaciones incluyen (Rols y Goma, 1991):

- que el aceite puede actuar como agente activo a la superficie, bajando la tensión superficial de la fase acuosa y aumentando el área interfacial de la fase gaseosa
- que la solubilidad del oxígeno en aceite es mayor que su solubilidad en agua, las gotas de aceite localizadas en la capa límite (entre la fase acuosa y el gas), pueden incrementar la permeabilidad del oxígeno en esa capa
- que la fase oleosa puede actuar como un intermediario activo para el transporte de oxígeno de las burbujas de gas al agua (Rols *et al.*, 1990)

Rols y Goma (1991) sugieren que el mecanismo implicado en la mejora de la transferencia de oxígeno al trabajar con emulsiones -de hidrocarburos o perfluorocarbonos- es la formación de una capa de aceite como una película delgada en la interfase gas-líquido. Este fenómeno se rige por el "coeficiente de extendido" (S_p) que se define como la difusión de una gota de aceite sobre la interfase gas - líquido. Se expresa como :

$$S_p = \sigma_{AG} - (\sigma_{aG} + \sigma_{aA}) \quad (4)$$

donde:

σ_{AG} = Tensión superficial agua-aire

σ_{aG} = Tensión interfacial aceite- aire

σ_{aA} = Tensión interfacial aceite-agua

Cuando el valor de $Sp > 0$, el aceite se extenderá sobre la interfase aire-agua; si $Sp < 0$, el aceite simplemente flotará en la fase acuosa (Adamson, 1982). Rols y Goma (1991) determinaron el valor de $Sp = +37.4$ dinas/cm para el aceite de soya, lo cual sugiere que en el sistema de tres fases (aire-aceite-agua), las gotas de aceite podrían extenderse sobre la interfase gas-líquido. Este coeficiente (Sp) fue reportado también por Moran *et al.* (2000) al estudiar el efecto de la aireación sobre las gotas de bitumen (fracción de los hidrocarburos en tierras oleosas), obteniendo un valor de $Sp = 21$, para el sistema aire-bitumen.

Linck y Benes (1976) evaluaron el efecto de la fase aceitosa sobre el coeficiente de transferencia de masa (oxígeno). En emulsiones del tipo aceite-agua de n-alcános (sistema con coeficiente de extendido negativo) el valor de k_L no es afectado por la concentración de la fase aceitosa; sin embargo, al trabajar con emulsiones de ácido oleico-agua (sistema con coeficiente de extendido positivo) el k_L inicialmente disminuye y luego se incrementa al aumentar la fracción (v/v) de aceite en el sistema (de 0 a 0.22). La disminución inicial en el k_L es atribuida a efectos de la actividad superficial del ácido oleico, esto es, a bajas concentraciones de ácido oleico se presenta una acumulación de éste en la interfase gas-líquido, comportándose como una barrera para la difusión del oxígeno.

Kawase y Moo-Young (1990) reportaron que a bajas concentraciones de aceite, la eficiencia en la transferencia de oxígeno disminuye considerablemente. Sus resultados sugieren que el antiespumante podría estar afectando el valor de k_L y presentando un efecto menor sobre el área interfacial.

Liu *et al.* (1994) reportaron una tendencia a disminuir el valor del $k_L a$ al aumentar la concentración de aceite (aceite de ricino, aceite de olivo y manteca de cerdo) utilizando 200 rpm (0.5 % v/v y un $k_L a = 25.49 \text{ h}^{-1}$, para el aceite de ricino). Reportando un incremento del $k_L a$ solo al adicionar de 20 a 45 % de aceite de ricino en el sistema.

2.5.1.2 Otros agentes surfactantes

Koide *et al.* (1976) reportaron el efecto de agentes surfactantes como los alcoholes alifáticos. Los surfactantes disminuyen la transferencia de masa a partir de las burbujas en al menos dos formas (Koide *et al.*, 1976):

- 1) los surfactantes se adsorben en la interfase gas-líquido, retardando el flujo superficial por el gradiente de tensión superficial en la interfase y,
- 2) los surfactantes adsorbidos en la interfase gas-líquido se convierten en barreras para el paso de moléculas de gas en la interfase gas-líquido, lo que se conoce como resistencia superficial.

Koide *et al.*, (1976) estudiaron el efecto de alcoholes alifáticos como agentes activos a la superficie sobre la transferencia de oxígeno en soluciones acuosas. Al evaluar el valor de k_L con respecto a la concentración de alcohol utilizada, observaron que éste valor disminuye conforme se incrementa la concentración de alcohol en el sistema y que es más drástico en soluciones de alcohol con cadenas largas de carbonos.

2.5.2 Mecanismos para incrementar la transferencia de oxígeno

Debido a que la solubilidad del oxígeno en agua es muy baja, una forma de mejorar la velocidad de transferencia de oxígeno, consiste en utilizar "vectores" de oxígeno, en los cuales la solubilidad del oxígeno es mayor (Rols y Goma, 1990). Jianlong (2000) evaluó el uso de *n*-dodecano como vector de oxígeno en la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* y observó que al utilizar una fracción volumétrica del vector menor que el 4 %, el $k_L a$ incrementaba linealmente. El valor de S_p para éste sistema con *n*-dodecano fue igual a 0.6 dinas/cm. Además de aceites vegetales, se han utilizado perfluorocarbonos como portadores de oxígeno, aprovechando ventajas como la alta solubilidad del oxígeno en ellos (aproximadamente 20 veces comparada con la del agua) (Junker *et al.*, 1990).

2.5.3 Modelo de estudio: producción de γ -decalactona por *Trichoderma harzianum*

Trichoderma harzianum es un hongo filamentoso productor de diferentes compuestos de interés como lactonas (ésteres cíclicos) y algunas enzimas (lipasas, celulasas, etc.), entre otros. Bonnanrme *et al.* (1997) y Serrano-Carreón *et al.* (1997) demostraron que el hongo es capaz de producir lactonas a partir de diversos sustratos (*i.e.* glucosa y algunos aceites vegetales). *T. harzianum* produce dos lactonas características (γ -decalactona y 6-pentil- α -pirona) y su producción depende de la composición del medio de cultivo. Este proceso es sumamente complejo, ya que además de la reología desarrollada por el crecimiento filamentoso –la formación de caldos no Newtonianos- involucra el mezclado de cuatro fases inmiscibles. incrementando así los problemas de heterogeneidad y transferencia de oxígeno durante el proceso. En este sistema, es importante asegurar que el aceite de ricino se encuentre completamente incorporado en el medio acuoso. Considerando también que la presencia de diversos agentes tensoactivos producidos por el microorganismo (p.e. proteínas) contribuyen a modificar la tensión superficial/interfacial del sistema – parámetro fisicoquímico que afecta la dispersión en los sistemas de fermentación-, éste estudio es una contribución para caracterizar el sistema real. Este trabajo generó información acerca de la interacción entre fases, considerando la tensión superficial y evaluando su efecto sobre la dispersión de las fases y sobre la transferencia de oxígeno.

3 OBJETIVOS

GENERAL

- Caracterizar la dispersión de las fases inmisible y gaseosa y el coeficiente de transferencia de oxígeno en un sistema de fermentación modelo de 3 fases (aceite-medio acuoso-aire) como función del tipo y concentración de proteína soluble

ESPECÍFICOS

- Caracterizar la dispersión de aceite de ricino en un sistema modelo de 2 fases en función del tipo y concentración de proteína soluble.
- Caracterizar la dispersión de aceite de ricino y aire en un sistema modelo trifásico en función del tipo y concentración de proteína soluble.
- Evaluar el efecto de proteína soluble sobre la localización de las burbujas de gas, en el sistema modelo trifásico.
- Evaluar el efecto del tipo y concentración de proteína soluble sobre el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

4 MATERIALES Y METODOS

4.1 FERMENTACIÓN (PRODUCCIÓN DE γ -DECALACTONA)

4.1.1 Microorganismo

Se utilizó la cepa *Trichoderma harzianum* obtenida – en forma liofilizada - del *International Mycological Institute* (IMI 206040). La cepa se preservó en tubos de ensayo (*slants*) en medio de agar de dextrosa y papa (PDA, Bioxon) a 4°C.

4.1.2 Obtención y conteo de esporas

De la cepa preservada, se inoculó 1 cm² del medio sólido sobre una caja Petri con medio fresco. La caja se incubó a 29 °C durante 96 horas. Las esporas obtenidas se recuperaron con 2 mL de solución salina (NaCl 0.9 % con *Tween* 40 al 0.05 %). El conteo de esporas se realizó en una cámara de Neubauer, utilizando el objetivo 40X de un microscopio *Nikon Alphaphot* (modelo 2452). Para el desarrollo del inóculo se utilizó una concentración de 5×10^3 esporas / mL de medio de cultivo. La suspensión se adicionó en forma estéril al medio de cultivo.

4.1.3 Sistema de fermentación

El cultivo se llevó a cabo en un biorreactor de 14 L (*New Brunswick Scientific*, modelo MF14) utilizando un volumen de trabajo de 10 L. El fermentador consta de una jarra de 45 cm de altura y 21 cm de diámetro, flecha de acero inoxidable de 0.9 cm de diámetro y tres turbinas tipo Rushton ($Di = 0.3D_T$). El fermentador está equipado con un motor de 1/4 Hp y un controlador para la velocidad de agitación. Cuenta con un controlador de pH (*Ingold*, modelo 2300), conectado a un electrodo de pH (*Ingold*) y una bomba peristáltica (*Master Flex*, modelo 7014-20) para la adición de base (pH = 5.6). El control de la temperatura se llevó a cabo mediante un sistema de circulación de agua a través de las

mamparas del fermentador. El flujo de aire se controló con un rotámetro. El sistema consta de un analizador de oxígeno disuelto, conectado a un electrodo polarográfico de oxígeno (*Ingold*, modelo 170).

4.2 MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE OPERACIÓN EN LOS ESTUDIOS DE DISPERSIÓN

Para realizar los experimentos de dispersión se usó como fase continua una solución acuosa rica en sales con la siguiente composición (en g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5), KH_2PO_4 (7), Na_2HPO_4 (2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.067), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.008), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0001). La fase líquida inmisible utilizada fue aceite de ricino (5 %) grado industrial (*Drogueria Cosmopolita S.A.*) y la fase gaseosa fue aire a 1 kg/cm^2 de presión. Las propiedades físicas de las fases líquidas se resumen en la *tabla 4.1*. La viscosidad del aceite se midió experimentalmente utilizando un dispositivo de cilindros concéntricos DIN 125 en un reómetro (*Rheomat 120, Contraves*), a un gradiente de deformación de $\gamma = 100 \text{ s}^{-1}$ y a 29 °C.

Tabla 4.1 Propiedades físicas de los líquidos utilizados

Propiedad	Aceite	Solución acuosa
Viscosidad (mPa s)	490	1
Densidad (kgm^{-3})	960	1000

El sistema para la evaluación de las dispersiones está constituido por un equipo de aireación/agitación (*figura 4.1*) y un sistema de análisis de imágenes (Brito, 2001) que será descrito en una sección posterior. Se utilizó un tanque de vidrio de 6.7 L de volumen de trabajo, el cual es de configuración "estándar" ($D_T/H_L = 1$) y tiene cuatro *baffles* de $0.1D_T$.

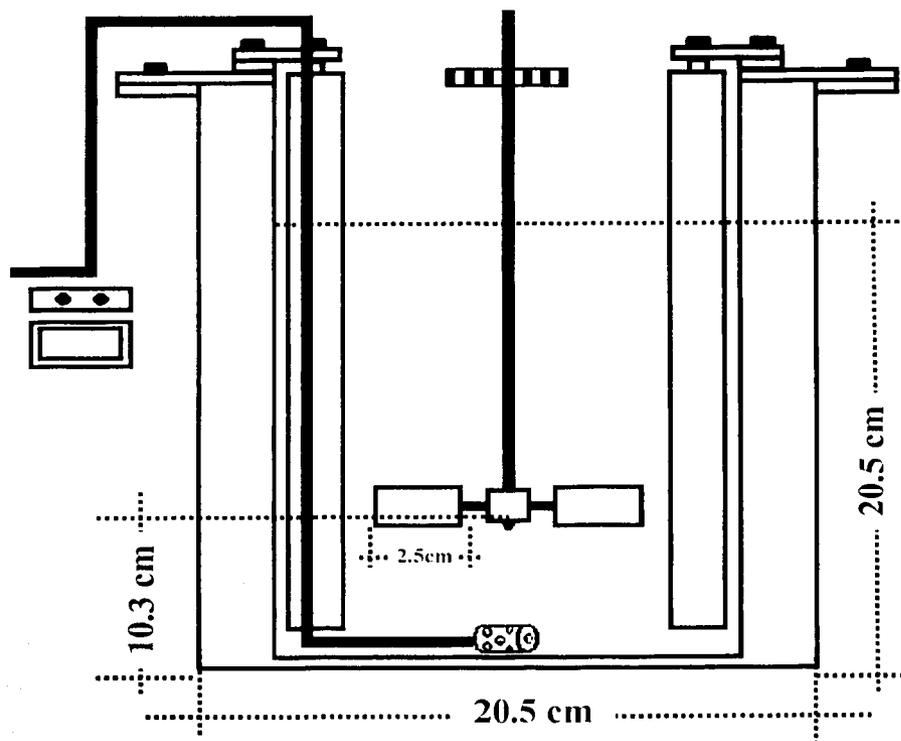


Figura 4.1 Diagrama esquemático del tanque de mezclado

El sistema, que ha sido descrito en detalle por Brito (2001), cuenta con una chaqueta cuadrada de acrílico para el control de la temperatura. La agitación está provista por un motor de corriente directa, de velocidad y torque variable, con una potencia nominal de 186 watts. La velocidad del impulsor se controla a través de dos potenciómetros, uno de ajuste fino y otro de ajuste grueso, medido con un transductor ferromagnético (*Power Instruments, Inc.* modelo 892-1800 OHM-SXC), un engrane (60 dientes) y un tacómetro (*Power Instruments, Inc.* modelo 1715VR).

En el sistema trifásico, la introducción de la fase gaseosa (aire) se realizó con la ayuda de un rotámetro (*Cole Parmer*, modelo FM044-40G) para medir el flujo. Se utilizó un difusor sinterizado de acero inoxidable (para HPLC, diámetro de poro = 20 μm). Se usó una turbina Rushton ($D_i = 0.5D_T$) como impulsor, colocado a 10 cm del fondo del tanque.

Se controló la temperatura a 29 ± 1 °C, ajustando la temperatura del agua de la chaqueta con un calentador de recirculación (*Polyscience*), ajustando a la vez la temperatura del tanque.

4.2.1 Montaje del equipo

Esta etapa incluyó el montaje del tanque de mezclado, *baffles*, flecha, impulsor, sonda de luz (y difusor en los casos que se utilizó aireación), así como todas las conexiones del sistema de análisis de imágenes. El medio acuoso (descrito previamente) así como 335 mL de aceite de ricino (5 % v/v de 6.7 litros) fueron adicionados al tanque de vidrio. En éste momento fue ajustada la velocidad de agitación (200 rpm) y la temperatura. El conjunto de condiciones se dejó estabilizar durante 30 minutos, periodo en el que se ajustó el enfoque y otros parámetros (brillo, contraste).

4.3 METODOS ANALÍTICOS

4.3.1 Determinación de proteína soluble (método de Bradford)

Este ensayo se basa en el método de Bradford. Es un procedimiento simple y preciso para la determinación de proteínas solubles. Involucra la adición de un colorante ácido a una solución de proteína. La interpolación con un curva estándar proporciona una medida relativa de la concentración de proteína (García *et al.*, 1998).

El procedimiento es como sigue:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Preparar 3 o 5 diluciones de una solución estándar de proteína, las cuales deben ser representativas de las muestras que serán analizadas.
- Adicionar 800 μL de cada muestra estándar en tubos de ensayo. Las soluciones son generalmente ensayadas por duplicado o triplicado.
- Adicionar 200 μL del colorante reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio Rad Catálogo No. 500-0006) a cada tubo y agitar en vortex.
- Incubar a temperatura ambiente de 25 a 30 minutos.
- Medir la absorbancia a 595 nm.
- Los valores de las muestras se extrapolaron de la curva patrón, la cual se elaboró utilizando soluciones de albúmina sérica bovina (BSA) en concentraciones de 2 a 20 $\mu\text{g/mL}$ (figura 4.2).

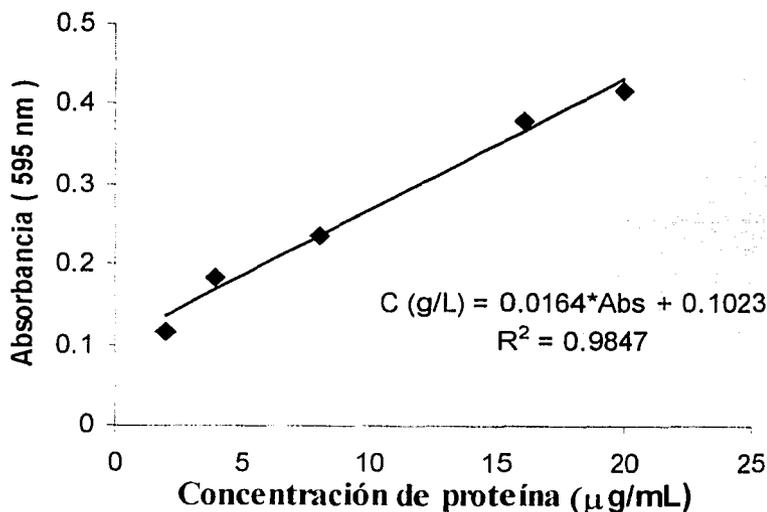


Figura 4.2 Curva patrón para la determinación de proteína.

4.3.2 Características de las proteínas utilizadas

Se estableció trabajar con dos proteínas de diferente hidrofobicidad (propiedad superficial de las proteínas). Considerando lo anterior se eligieron dos proteínas comerciales: albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma, 98% proteína) y la lipasa de germen de trigo (Sigma. Tipo 1).

La BSA es una proteína globular (PM = 67,000), su punto isoeléctrico es 4.9. El valor de hidrofobicidad para esta proteína es -205 kJ/mol (Sugimura *et al.* 2000). Es una proteína con la capacidad de transportar iones y ácidos grasos. Presenta en su estructura un gran número (17) de puentes disulfuro. La lipasa de germen de trigo tiene un PM= 42,000 y es inactiva sobre los triacilglicéridos (Beverung *et al.* 1999), factor importante para nuestros estudios, pues al utilizar aceite de ricino como fase inmisible (sustrato para las lipasas) podríamos tener interferencias debido a la producción de hidrolizados del aceite de ricino. Para corroborar lo anterior, se realizó la determinación de la actividad enzimática de la lipasa (ver más adelante). La preparación comercial presentó una pureza del 95 % (valor reportado por el proveedor). Las características de cada una de las proteínas se resumen en la *tabla 4.2*.

Tabla 4.2 Características de las proteínas utilizadas

	<i>Albúmina de suero bovino (BSA)</i>	<i>Lipasa (germen de trigo)</i>
PM (Da)	67,000	42,000
P.I.	4.9	4.1
Hidrofobicidad (kJ/mol)	-205*	-124*
Pureza (%)	99 %	95 %

* Valores reportados por Sugimura *et al.*, (2000)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3.3 Determinación de actividad enzimática de lipasa

La determinación de la actividad de la lipasa se realizó utilizando la técnica reportada por Sokolovska *et al.* (1998), descrita a continuación:

- Se mezclan 5 mL de la solución de proteína con 10 mL de buffer de fosfatos (pH = 7) y 15 mL de aceite de olivo en un matraz Erlenmeyer de 100 mL.
- Después de 60 minutos de incubación a 37 °C, se toman 8 mL de la emulsión, los cuales son centrifugados y el aceite hidrolizado es separado y mezclado con una mezcla de acetona-etanol para extraer los ácidos grasos libres.
- La concentración de ácidos grasos es determinada por titulación con NaOH 0.05 N, utilizando fenolftaleína como indicador.

4.3.4 Cinética de producción de proteínas por *Trichoderma harzianum*

Como una aproximación al sistema de fermentación real para la producción de γ -decalactona, se realizó un cultivo de *Trichoderma harzianum* usando aceite de ricino como fuente de carbono y se siguió la cinética de producción de proteínas (*figura 4.3*). El objetivo de esto fue establecer los valores de la concentración de proteína presentes en el caldo y utilizar valores similares en los estudios de dispersión en el sistema modelo. Como puede observarse en la *figura 4.3* en las primeras 48 horas se inicia la producción de proteínas. Los valores se encuentran por debajo de los 0.35 g/L, alcanzando un máximo a las 150 horas. A partir de estos resultados de la cinética se estableció como límite superior el valor de la concentración más alta obtenida en la fermentación real, analizándose un rango de concentraciones de 0.002 a 0.5 g/L.

4.3.5 Determinación de la tensión superficial

La tensión superficial se midió en un tensiómetro FISCHER, modelo 20, el cual es utilizado para determinar la tensión superficial e interfacial aparente de líquidos, utilizando el método del anillo (du Noüy) reportado por Clarkson *et al.* (1999). En éste método, un anillo de platino-iridio de dimensiones conocidas se suspende de un brazo, éste último se mantiene en posición horizontal, aplicando torsión sobre un alambre de acero inoxidable. Incrementando la torsión en el alambre se eleva el brazo y el anillo, el cual acarrea la película del líquido en el cual está sumergido. La fuerza necesaria para romper con el anillo la interfase es el valor de la tensión superficial.

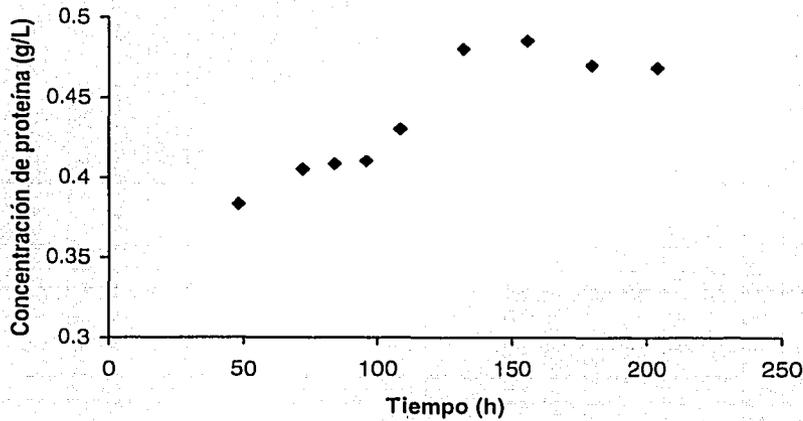


Figura 4.3 Cinética de producción de proteínas en un cultivo de *T. harzianum* usando aceite de ricino como fuente de carbono

➤ Calibración

La calibración del tensiómetro se realiza de la siguiente manera:

1. Colocar el anillo en el gancho ubicado en el extremo izquierdo del brazo.
2. Cortar un trozo de papel pequeño y colocarlo sobre el anillo para que actúe como una plataforma . el cual será utilizado para la calibración y deberá ser de masa conocida.
3. Liberar el brazo de torsión y ajustar hasta que el índice y su imagen se encuentren exactamente en línea con la línea de referencia en el espejo.
4. Es necesario determinar la exactitud de la calibración a partir de la lectura obtenida. La tensión superficial aparente está dada por:

$$S = Mg / 2L \quad (5)$$

donde:

M = peso del trozo de papel (g)

g = aceleración de la gravedad (cm/s²)

L = diámetro de la circunferencia del anillo (cm)

S = tensión superficial aparente (dinas/cm)

Si la lectura del disco difiere del valor calculado, entonces la longitud del brazo de torsión debe ser ajustada hasta que los dos valores coincidan.

➤ Operación

Para realizar la determinación de tensión superficial, deben prepararse la muestra y el tensiómetro. La muestra puede ser colocada en un dispositivo de vidrio, de al menos 4.5 cm de diámetro. Al utilizar aceite, cualquier residuo será removido con benceno y después enjuagado con acetona y agua

destilada. El anillo deberá ser remojado en acetona y dejar que ésta se evapore. Este procedimiento debe seguirse aún cuando no se utilicen aceites.

➤ **Medición (figura 4.4)**

El anillo es colocado en el gancho ubicado en el extremo del brazo. El líquido a medir es transferido al recipiente de vidrio y colocado sobre la tabla de muestreo. Ésta última es elevada hasta que el anillo está inmerso en la muestra líquida. Una distancia de inmersión de 0.32 cm es considerada suficiente. El brazo de torsión es liberado y el instrumento ajustado a cero. Debe mantenerse el anillo en el líquido durante su manipulación, subiendo o bajando la tabla de muestreo si es necesario. Al bajar la tabla de muestreo (hasta que el anillo se encuentra en la superficie del líquido) debe ajustarse con el botón sobre el lado derecho para mantener la línea de referencia con la marca del espejo. Continuar con los dos ajustes simultáneos hasta que la película de la superficie es separada del resto del líquido. La lectura en este punto de rompimiento es la tensión superficial aparente.

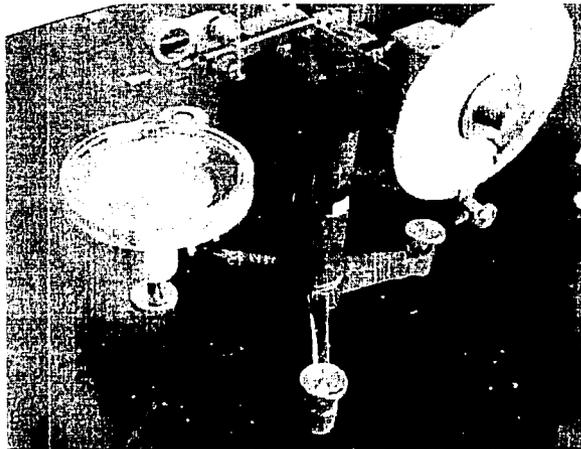


Figura 4.4 Equipo para la determinación de la tensión superficial

➤ Factor de corrección

Para obtener los valores reales de la tensión superficial se utiliza la siguiente relación:

$$S = P \times F$$

donde S es el valor verdadero, P el valor aparente y F el factor de corrección. El factor de corrección depende del tamaño del anillo y de la densidad de las fases involucradas. El factor de corrección obtenido (ver anexo), fue $F = 0,925$ para los experimentos realizados.

4.4 SISTEMA DE ANÁLISIS DE IMÁGENES

El análisis de imágenes consiste fundamentalmente en el procesamiento de imágenes con una computadora. Surgió como una combinación de las nuevas técnicas de video y computacionales que se aplican para la cuantificación de los tamaños de gotas (Pacck *et al.*, 1999) y burbujas (Machon *et al.*, 1997). Recientemente, Galindo *et al.* (2000) obtuvieron imágenes claras y fácilmente analizables de gotas y burbujas en un sistema modelo de fermentación de hasta cuatro fases.

4.4.1 Descripción del sistema de análisis de imágenes

Se utilizó el sistema desarrollado en nuestro laboratorio y que ha sido descrito en detalle por Brito (2001). A continuación se presenta un resumen de las características del sistema.

4.4.1.1 Sistema óptico

Consta de un estereomicroscopio *Olympus SZ4045ESD* con un rango de *zoom* de 1.8 a 11X, como lente de aumento, el cual está montado sobre un soporte *Olympus SZSTB1ESD*. Permite hasta 110 mm de distancia de enfoque. Éste parámetro es importante cuando se requiere una distancia de trabajo amplia (distancia del punto de enfoque a la lente). En este caso, la chaqueta se encuentra entre el tanque y el estereomicroscopio y es necesaria esa separación, de lo contrario, la chaqueta no permitiría enfocar el interior del tanque (*figura 4.5*). La sonda fue ubicada en la zona de descarga del impulsor.

La adquisición de las imágenes se llevó a cabo con una cámara de video *Hitachi KP-D50 Color NTSC Digital*, diseñada para producir imágenes de alta calidad en análisis de imágenes. Para acoplar la cámara al estereomicroscopio se usó un triocular *Olympus SZ-CTV* (Brito, 2001). La fuente de luz fue un estroboscopio modelo MVS-2600 (EG&G Optoelectronics), con una sonda de fibra óptica sumergible de 1 m de longitud y un diámetro de salida de luz de 0.4 mm.

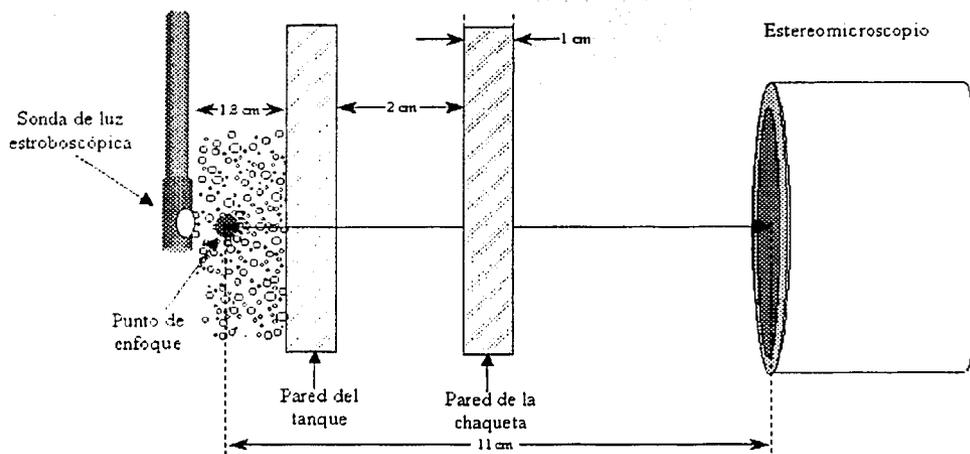


Figura 4.5 Plano de enfoque en la captura de imágenes

4.4.1.2 Computadora

Se usó una computadora equipada con una tarjeta digitalizadora de imágenes *Flash Point® 128* (*Integral Technologies*), que cuenta con entradas de video y permite el ajuste de color, brillo, saturación y contraste a los niveles deseados. Se utilizó el programa comercial de análisis de imágenes *Image-Pro® Plus v.4.1* (*Media Cybernetics, USA*) para adquirir y procesar las imágenes.

4.4.2 Arreglo experimental

En la *figura 4.6* se presenta una fotografía del arreglo experimental. La iluminación consistió en una sonda de luz estroboscópica sincronizada a la cámara de video acoplada a un estereomicroscopio y una computadora que controla todas las operaciones.

4.4.3 Procesamiento digital de las imágenes

Utilizando una cámara de video conectada a un cabezal de un estereomicroscopio, es posible obtener y capturar imágenes amplificadas de una pequeña sección del interior del tanque de mezclado (*figura 4.4*). Una vez que se ha obtenido la imagen en la computadora, se procede a evaluar el tamaño de cada gota de aceite o de burbuja de aire que se observa, mediante el programa comercial de procesamiento de imágenes Image-Pro[®] Plus (Media Cybernetics, EUA), haciendo uso de la calibración adecuada (conversión de píxeles a μm) y de las funciones integradas o adaptadas del programa.

4.4.3.1 Captura, digitalización y almacenamiento

Para captar adecuadamente las imágenes, es necesario enfocar el punto que ilumina la sonda, lo cual se hace manualmente. Se creó una botonera que tiene asociadas algunas *macros*. En la *figura 4.7* se muestra la botonera creada. El nombre, la descripción detallada y el icono asociado a cada una de las macros se describen en la *tabla 4.3*.

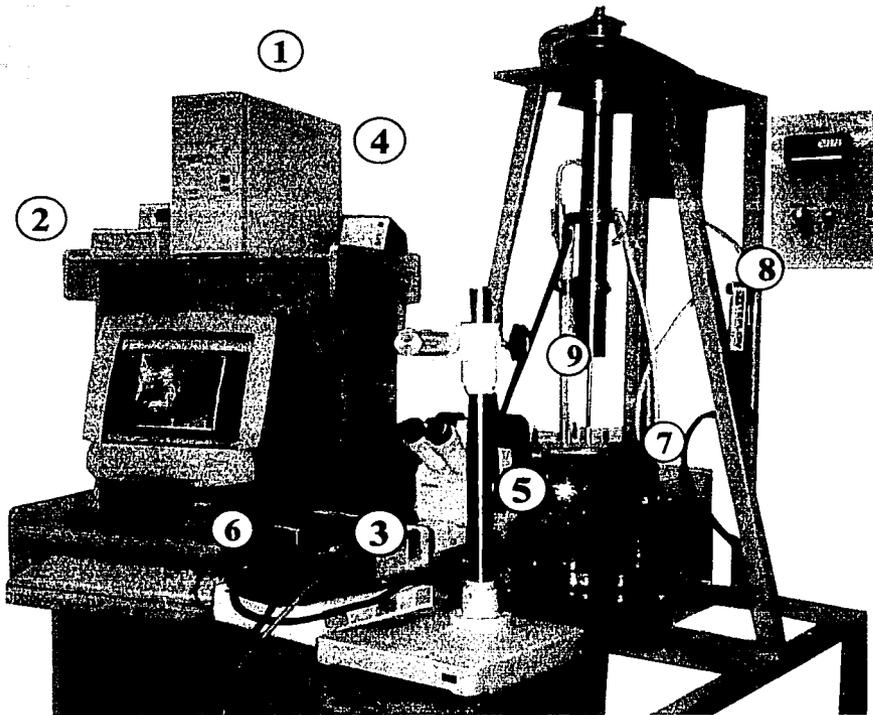


Figura 4.6. Fotografía del arreglo experimental (1),(2) computadora con tarjeta de digitalización, (3) cámara de video, (4) sincronizador, (5) cabezal de estereomicroscopio, (6) fuente de luz estroboscópica, (7) tanque de vidrio con tapa, (8) rotámetro, (9) sonda de luz estroboscópica

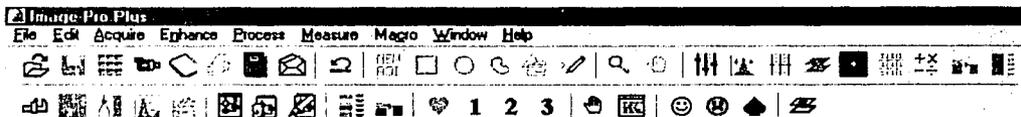


Figura 4.7 Botonera del programa Image-Pro® Plus

Tabla 4.3 Macros para capturar, procesar y analizar imágenes

	Nombre	Descripción
	Prende	Enciende el estroboscopio
	Apaga	Apaga el estroboscopio
	Captura	Enciende el estroboscopio, captura 50 imágenes, reduce su tamaño al 50 %, les asigna un nombre y las almacena en el disco duro de la computadora
	Gris claro	Convierte a escala de grises, homogeniza el fondo, aplica un filtro (imágenes con un zoom de 2.5X)
	Gris oscuro	Convierte a escala de grises, homogeneiza el fondo, aplica un filtro (imágenes a un zoom 4X)
	Manda	Envía los datos a la hoja de cálculo <i>Excel</i> ® para su posterior análisis
	Umbral Default	Define automáticamente el umbral de segmentación y detección de los objetos
	Elige	Selección manual de objetos de interés y automática de objetos restantes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4.4 Calibración del estereomicroscopio

Un pixel es la unidad constitutiva de una imagen digital. Cada imagen procesada tiene 320 x 240 pixeles. La equivalencia de éstos a milímetros se determinó - para cada magnificación - con una cámara de Neubauer. Sabiendo que la cuadrícula de la cámara es de 0.05 mm, se determinó la equivalencia en pixeles del espacio de la cuadrícula y con los valores obtenidos se hizo una regresión lineal (*figura 4.8*). Los detalles han sido descritos por Brito (2001).

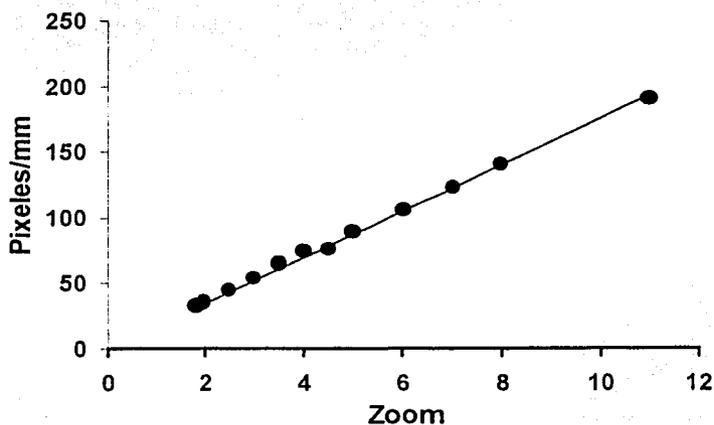


Figura 4.8. Calibración del estereomicroscopio

4.4.5 Procesamiento de imágenes para medir tamaños de gotas

Aunque las imágenes de gotas son fácilmente observables utilizando el estereomicroscopio, no es posible una segmentación semiautomática. La principal dificultad radica en que la mayoría de las gotas están muy cerca unas de otras y las funciones del programa no pueden discriminar entre uno y otro objeto. Por lo tanto, fue necesario usar las herramientas de medición manual del programa *Image-Pro® Plus* con el fin de cuantificar el tamaño de las gotas (*figura 4.9*).

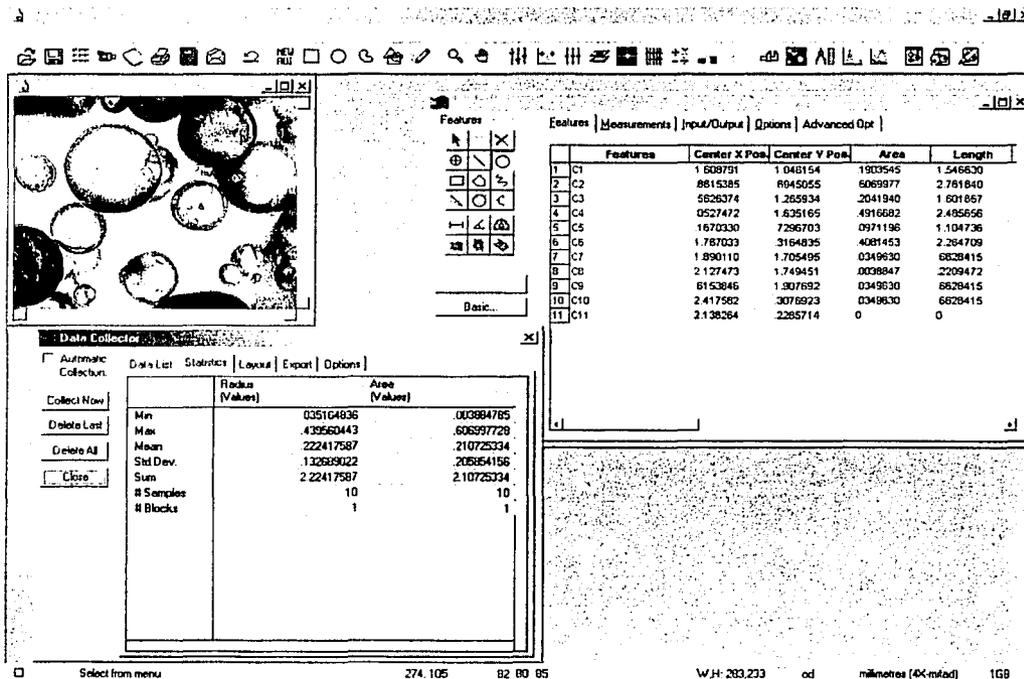


Figura 4.9 Procesamiento manual de imágenes para medir tamaños de gotas de aceite

El procedimiento (Brito, 2001) se resume a continuación:

1. Activar la calibración que corresponda al zoom con el que se tomaron las imágenes.
2. Abrir las ventanas *Measurements* y *Data collector* del menú principal *Measure*.
3. En la ventana *Measurements*, definir la herramienta de medición manual a utilizar.
4. Recopilar las mediciones en el colector de datos (*Data collector*). Esta función permite acumular la información de múltiples imágenes analizadas.
5. Repetir desde el paso 4 para cada imagen, hasta que se hayan medido al menos 500 gotas.
6. Exportar los datos a la hoja de cálculo (*Excel*) para su posterior análisis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.5 MEDICION DEL $k_{L,a}$

La medición del $k_{L,a}$ se realizó utilizando el método de degasificación reportado por Sobotka *et al.* (1982). Éste se basa en la medición del cambio de la concentración de oxígeno disuelto en el líquido. El oxígeno disuelto se midió usando un electrodo polarográfico *Mettler Toledo*, 4100.

El oxígeno en el sistema fue removido utilizando N_2 como gas inerte. La dependencia del oxígeno disuelto con respecto al tiempo está dado por:

$$dc_L / dt = k_{L,a} (C^* - C_L) \quad (6)$$

Sin embargo, en éste caso, $C_L = 0$, haciendo que la integración de la ecuación (6) sea:

$$\ln (C^* - C_{L2}) / C^* - C_{L1} = -k_{L,a} (t_2 - t_1) \quad (7)$$

Cuando el oxígeno disuelto ha sido totalmente eliminado, $C_L = 0$ a $t_1=0$, la ecuación (7) adopta la forma siguiente:

$$\ln (1 - C_{L,t} / C^*) = -k_{L,a} t \quad (8)$$

La *figura 4.10* resume los pasos necesarios para llevar a cabo la medición (Quintero, 1981). Primero se elimina el oxígeno mediante burbujeo de nitrógeno en lugar de aire; una vez que $C_L = 0$, se airea de nuevo y se toman mediciones de C_L a diferentes tiempos. Si se grafican estos valores de acuerdo a la ecuación (8), se obtiene la *figura 4.11*, en donde la pendiente es igual a $-k_{L,a}$.

El electrodo de oxígeno disuelto fue colocado arriba de la punta del impulsor: respetando ésta ubicación en todos los experimentos. El sistema se considera como homogéneo (completamente mezclado).

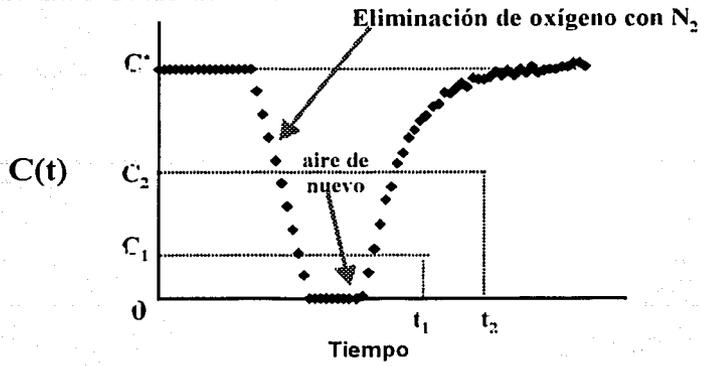


Figura 4.10 Pasos del método de eliminación de oxígeno para la determinación de $k_L a$

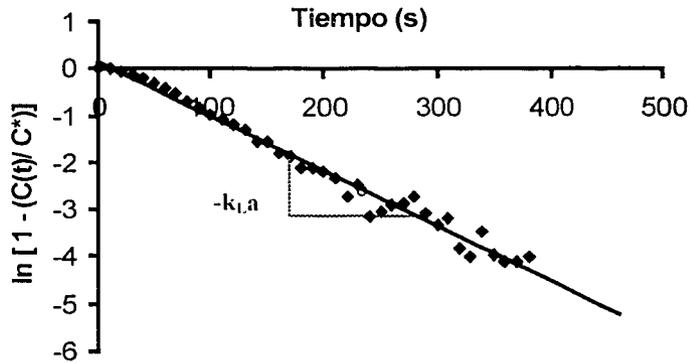


Figura 4.11 Ejemplo de la determinación de $k_L a$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.6 CONSUMO DE POTENCIA

El valor de la potencia suministrada al sistema se obtuvo experimentalmente mediante un dinamómetro de cojinete neumático (Reséndiz *et al.*, 1991), utilizando las mismas condiciones de operación del sistema modelo. El principio de funcionamiento ha sido detallado por Reséndiz *et al.*, (1991) y se describe brevemente a continuación.

El agitador rotacional imparte una fuerza mecánica a la cual presenta resistencia el líquido del interior del tanque. Este líquido, a su vez, produce un torque sobre el impulsor, el cual se transmite al motor a través de la flecha de agitación. Este torque de reacción causa que el sistema de agitación rote sobre su soporte, en dirección contraria a la del impulsor. Esto permite que el torque sea medido mediante la fuerza transmitida a una plataforma graduada, por medio de un acoplamiento mecánico. A partir de estas mediciones, la potencia se puede obtener como:

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

o bien,

$$P = (F)(B)(\omega) \quad (9)$$

donde P es la potencia (watts), F es la fuerza (kg), B es el brazo de palanca (m) y ω la velocidad angular (s^{-1}).

A su vez,

$$\omega = 2\pi N \quad (10)$$

y N es la velocidad de rotación del impulsor (s^{-1}).

4.7 REPRODUCIBILIDAD DE LOS EXPERIMENTOS 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 el sistema trifásico (medio acuoso – aceite de ricino-aire). La *figura 4.12* muestra los diámetros Sauter así como las distribuciones de tamaño de gotas determinados para dos experimentos independientes realizados bajo las mismas condiciones (impulsor Rushton, 200 rpm, 0.5 vvm, 5 % aceite de ricino y 0.02 g/L de proteína).

Los resultados de diámetro Sauter, así como las distribuciones de tamaño de las gotas mostraron alta reproducibilidad (ver figura *figura 4.12*).

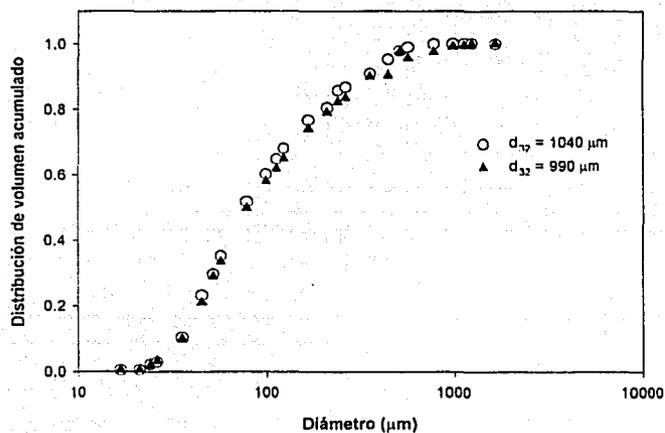


Figura 4.12 Reproducibilidad de pruebas para determinar tamaños de gotas de aceite

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DISPERSIÓN EN SISTEMAS DE DOS FASES

5.1.1 Efecto de la concentración de proteína sobre la dispersión de gotas de aceite

La caracterización de las dispersiones se hizo en términos del diámetro Sauter y de distribuciones de volumen acumulado. En éstas últimas se puede observar como el volumen de la fase dispersa, se distribuye en un eje de tamaños de gotas o burbujas (Ramkrishna *et al.*, 1995). Este tipo de gráficas permiten comparar distribuciones de tamaños de partícula al emplear dos o más condiciones.

5.1.1.1 Albúmina de suero bovino (BSA)

Como se ilustra en la *figura 5.1a*, las tres concentraciones de proteína utilizadas, modifican la tendencia de la gráfica de distribución de volumen hacia la izquierda del control, lo cual representa una disminución en el diámetro de las gotas de aceite.

La *figura 5.2a* muestra el diámetro Sauter de las gotas de aceite como función de la concentración de proteína, en el sistema difásico. Se observó que el tamaño de las gotas (d_{32}) de aceite disminuyó de 612 μm para el control (sin proteína) hasta 450 μm (como promedio) para las tres concentraciones de proteína utilizadas. Se observa una caída dramática en el d_{32} al adicionar proteína al sistema (0.002 g/L), sin embargo, después de esta caída en el d_{32} , su valor permanece constante.

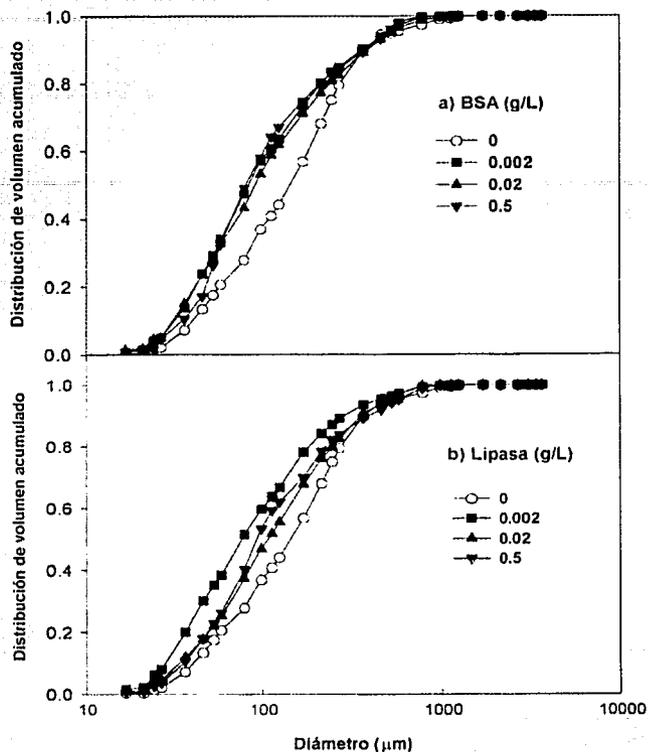


Figura 5.1. *Dispersión de aceite de ricino como función de la concentración de a) BSA y b) Lipasa de germen de trigo*

La *figura 5.3* muestra algunas imágenes típicas del sistema, para los experimentos en donde se utilizó BSA, de la dispersión del aceite de ricino. Como puede observarse, las imágenes de las gotas presentan una superficie “lisa” claramente observable, similar a la observada en trabajos previos (Galindo *et al.* 2000; Lucatero, 2002), bajo condiciones no aireadas. Estos datos serán comparados con aquellos obtenidos en el sistema aireado en una sección posterior.

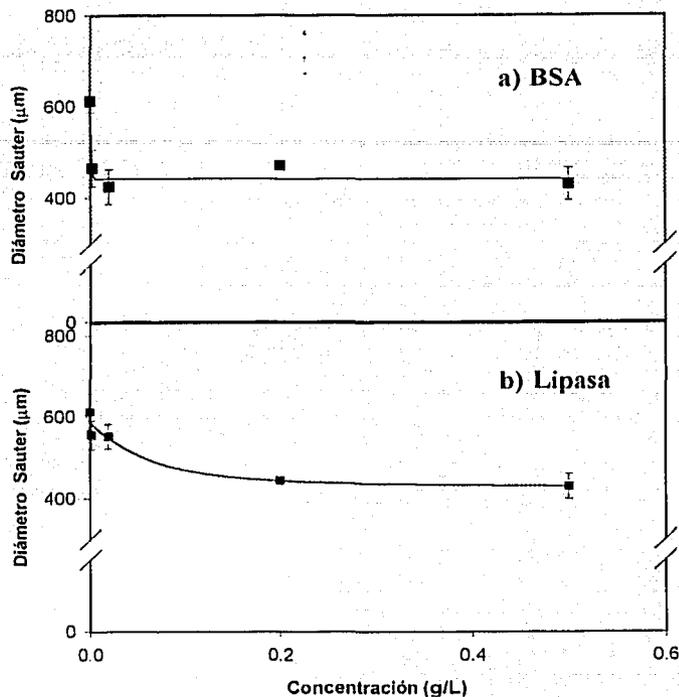
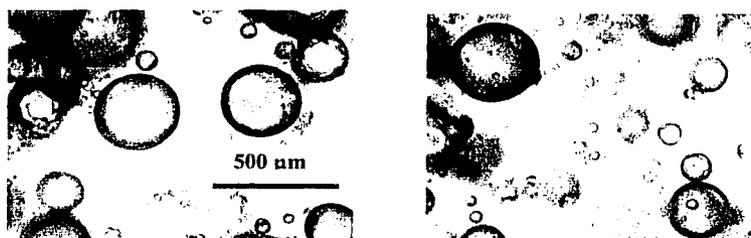


Figura 5.2. Diámetro Sauter de las gotas de aceite como función de la concentración de a) BSA y b) lipasa de g. de trigo en el sistema difusivo

5.1.1.2 Lipasa

Como puede observarse en la *figura 5.1b* y en la *figura 5.2b*, la presencia de la lipasa reduce el diámetro de las gotas en la dispersión del aceite de ricino para el sistema de dos fases. Los resultados para la lipasa en éste sistema, indican que al incrementar la concentración de proteína (hasta 0.5 g/L) se observa una disminución del diámetro Sauter de las gotas de aceite, efecto similar al observado con

la BSA (sección 5.1.1.1), al utilizar una concentración igual. Los resultados indican que a concentraciones menores de 0.02 g/L, el efecto de ambas proteínas es fuertemente dependiente de la concentración y posiblemente de sus características superficiales (determinadas por su conformación, ver anexo 2).



Control (sin proteína)

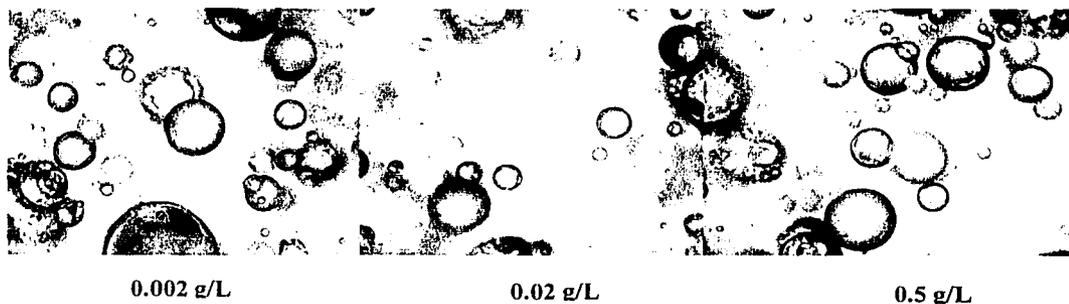


Figura 5.3. Imágenes de gotas de aceite en presencia de BSA, magnificación 8 X

La *figura 5.4* muestra algunas imágenes típicas del sistema con lipasa de germen de trigo. En estos sistemas, puede observarse una diferencia en las imágenes en el sistema con lipasa, en las cuales se observa menor contraste al ser comparadas con el control (sin proteína).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para entender el efecto de las proteínas en la interfase del sistema aceite – medio acuoso, consideremos que Adamson (1982) ha reportado que la efectividad de cualquier agente surfactante adsorbido a una película puede ser debida a:

- a) que las moléculas adsorbidas pueden reducir la energía del sistema dispersado, bajando la tensión superficial/interfacial del sistema
- b) la formación de una barrera rígida o altamente viscosa en la interfase, capaz de prevenir o retardar la coalescencia de las gotas que chocan como resultado de la agitación mecánica y,
- c) que las moléculas que poseen una carga eléctrica (*i.e.* proteínas con residuos cargados eléctricamente), imparten ésta carga a la superficie de las gotas, dando como resultado la formación de una doble capa eléctrica que disminuye la frecuencia de acercamiento de las gotas, evitando así la coalescencia.

Kollmer *et al.* (1999) evaluaron la influencia de biosurfactantes sobre dispersiones de n-octano/agua. Reportaron que incrementando la concentración de biosurfactante, la tensión superficial y el d_{32} disminuyen a un mínimo, logrando alcanzar una máxima concentración de surfactante en la interfase. Esto es coincidente con los resultados reportados en el presente trabajo, en el sentido que al incrementar la concentración de proteína (surfactante) en el sistema se alcanza un valor constante ($\sim 450 \mu\text{m}$) de los tamaños de gotas de aceite. Además ambas proteínas disminuyen la tensión superficial; sin embargo, los efectos más dramáticos se observan con la BSA (a bajas concentraciones, $\sim 0.002 \text{ g/L}$), la cual al ser adicionada al sistema de dos fases reduce el diámetro de las gotas hasta un mínimo ($450 \mu\text{m}$).

Con base en los resultados del efecto de la BSA y la lipasa sobre la dispersión del aceite de ricino se puede inferir que:

- 1) Concentraciones menores de 0.02 g/L de proteína disminuyen la tensión superficial (*figura 5.5*), facilitando con esto el rompimiento de las gotas por el impulsor.
- 2) Que a concentraciones mayores de 0.02 g/L de proteína se logre un recubrimiento de las gotas con la proteína, disminuyendo así la coalescencia. Clarkson *et al.* (1999) reportaron que las proteínas pueden formar interacciones intermoleculares en la interfase, formando películas cohesivas, las cuales son resistentes a la deformación.

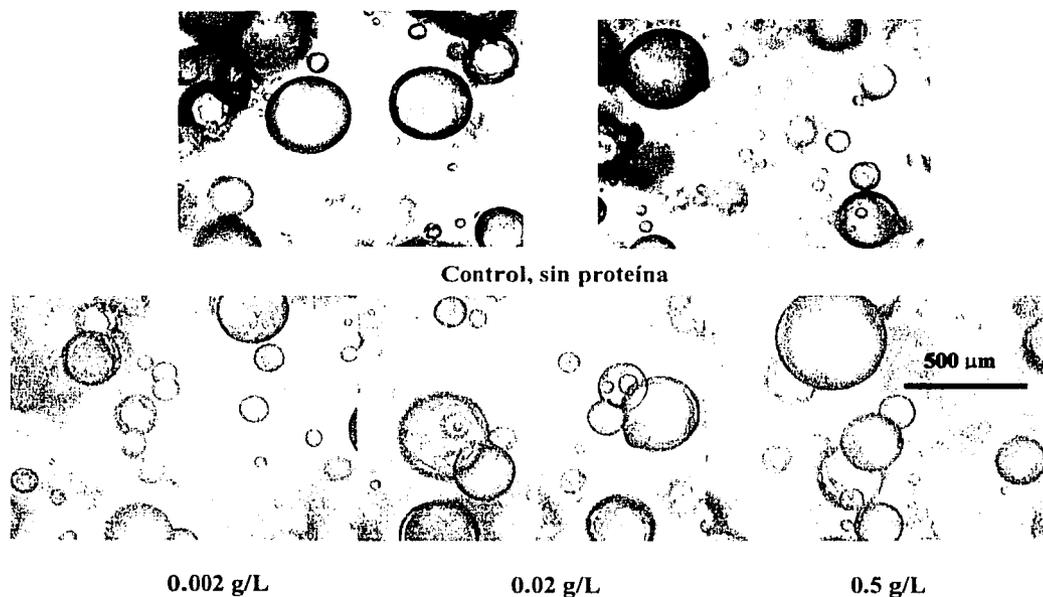


Figura 5.4. Imágenes del sistema con lipasa de germen de trigo

Algunos trabajos previos reportan que al utilizar BSA (Clarkson *et al.* 1999; Tripp *et al.* 1995) a bajas concentraciones se logra recubrir el área entre las interfases (esto es debido a la reorientación de sus zonas polares y no polares) y se alcanza la concentración micelar crítica (CMC), la cual se define como la concentración a la cual cambia la pendiente del gráfico de tensión superficial contra logaritmo de la concentración (*figura 5.6*), alcanzando una pendiente de cero. Algunos estudios han reportado

(Tripp *et al.*, 1995) que el valor de CMC de una proteína es dependiente de dos parámetros principalmente: del peso molecular de las proteínas y de la rigidez estructural de la molécula de proteína.

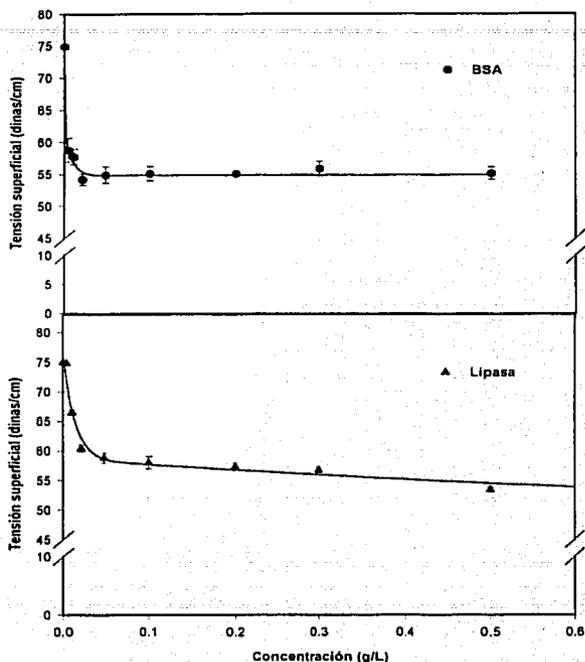


Figura 5.5. Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre la tensión superficial

Esto sugiere que la BSA es una proteína que presenta gran afinidad por las superficies, en este caso por la superficie hidrófoba (aceite). Para explicar esta afinidad, se ha reportado que algunas proteínas como la BSA se difunden rápidamente a partir del seno del líquido a la fase gaseosa y se adsorben a ésta, alcanzando así un valor de CMC (Clarkson *et al.* reportan un valor de 0.03 g/L). En contraparte,

la lipasa, no alcanza éste valor a las concentraciones estudiadas en el presente trabajo. Clarkson *et al.* (1999) proponen también que el comportamiento observado al utilizar la BSA puede ser debido a que es una proteína activa a las superficies (tiene gran capacidad como agente surfactante) – a diferencia de otras proteínas- y a que, dada su conformación estructural, podría presentar un alto grado de flexibilidad, permitiéndole desplegarse y adsorberse rápidamente a la interfase (gas-líquido o líquido-líquido). Lo anterior ha sido reportado por Clarkson *et al.* (1999) y por Tripp (1995). Sus estudios demostraron que la actividad superficial de las proteínas, esto es, la capacidad de adsorberse a las interfases, es dependiente de su reorientación molecular y de los cambios conformacionales que experimentan estas moléculas. En estos sistemas, la tensión superficial es función tanto de la concentración de surfactante adsorbido como de su conformación. Por lo tanto, al correlacionar los datos de los reportes previos con aquellos descritos en este trabajo, puede sugerirse que las características estructurales (conformación y distribución de aminoácidos polares y no polares) de ambas proteínas (ver anexo 2) están ocasionando efectos marcadamente diferentes a bajas concentraciones, posiblemente debido a que no solo la concentración está provocando una disminución menor o mayor (en el caso de la lipasa y la BSA respectivamente) en la tensión superficial y en el diámetro Sauter (*figuras 5.2a*, *5.2b* y *5.5*) sino que se presenta un arreglo conformacional durante el proceso de adsorción. Clarkson *et al.* (1999) reportaron también que cuando la molécula de proteína es adsorbida, ésta sufre un cambio conformacional conocido como “desnaturalización superficial”. Este desplegamiento conduce a una reorientación de las regiones hidrófobas de la molécula hacia la fase gaseosa y las regiones hidrófilas hacia el agua, estabilizando así las gotas de aceite o bien las burbujas de aire.

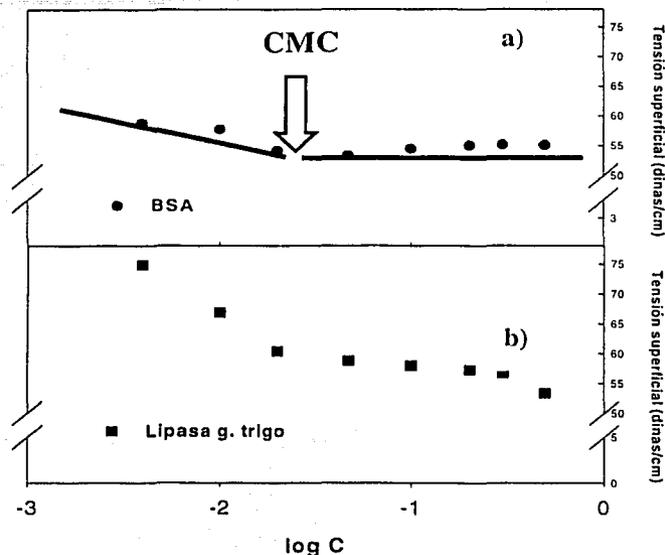


Figura 5.6. CMC para las diferentes proteínas: a) BSA y b) lipasa de germen de trigo

5.2 DISPERSIÓN EN EL SISTEMA DE TRES FASES

Las condiciones empleadas para el sistema trifásico fueron similares a las utilizadas en la sección anterior, solo que en éste sistema se utilizó una corriente de aire como gas, alimentado a un flujo de 0.5 vvm. En la *figura 5.7* se presentan algunas imágenes típicas para el sistema trifásico utilizando BSA y lipasa de germen de trigo. Es posible identificar claramente las gotas de aceite, las burbujas de aire en el seno del líquido así como las burbujas de aire en el interior de las gotas de aceite.

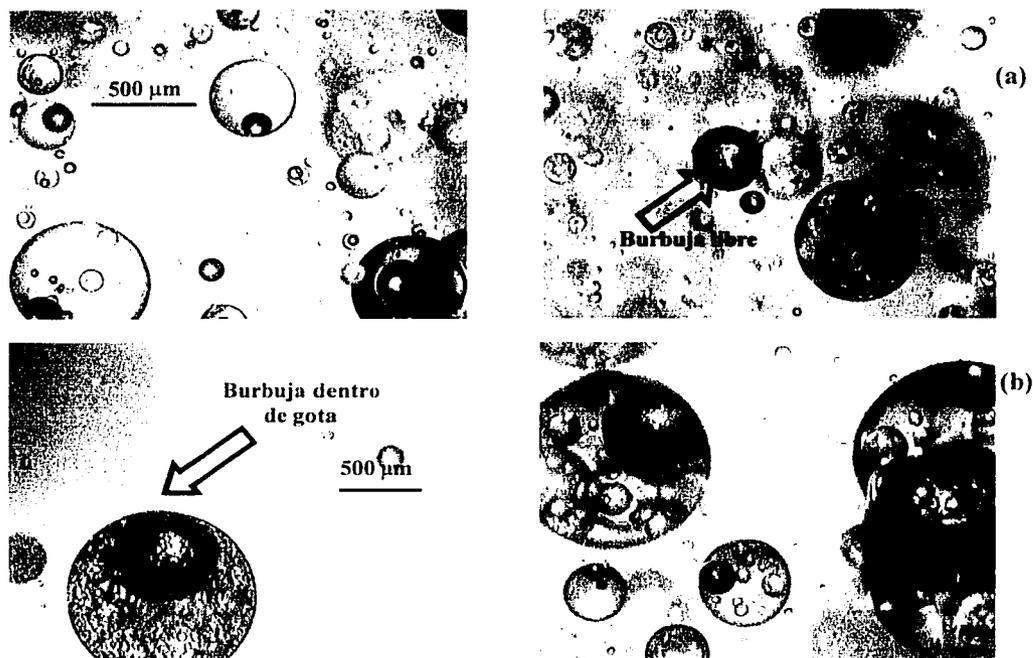


Figura 5.7. Imágenes de gotas de aceite y burbujas de aire para el sistema trifásico a) BSA y b) lipasa de germen de trigo

5.2.1 Efecto de la presencia de aire en el tamaño de las gotas de aceite de ricino

El efecto de la aireación sobre la dispersión de las gotas de aceite se muestra en la *figura 5.8*, en la cual se presentan los diámetros Sauter a las diferentes concentraciones de proteína en los sistemas aireado y sin aireación. 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 proteína utilizados. El incremento en el d_{32} de las gotas en presencia de aire (0.5 vvm) es congruente con la caída de potencia debida a la aireación. Para los sistemas sin aire, la potencia fue de 0.25 kW/m^3 y fue de 0.19 kW/m^3 bajo condiciones aireadas. Otro fenómeno que puede explicar el incremento del d_{32} de las gotas, es la

introducción de burbujas de aire dentro de las gotas de aceite. Lo anterior fue reportado por Galindo *et al.* (2000) así como por Lucatero (2002) en sistemas trifásicos.

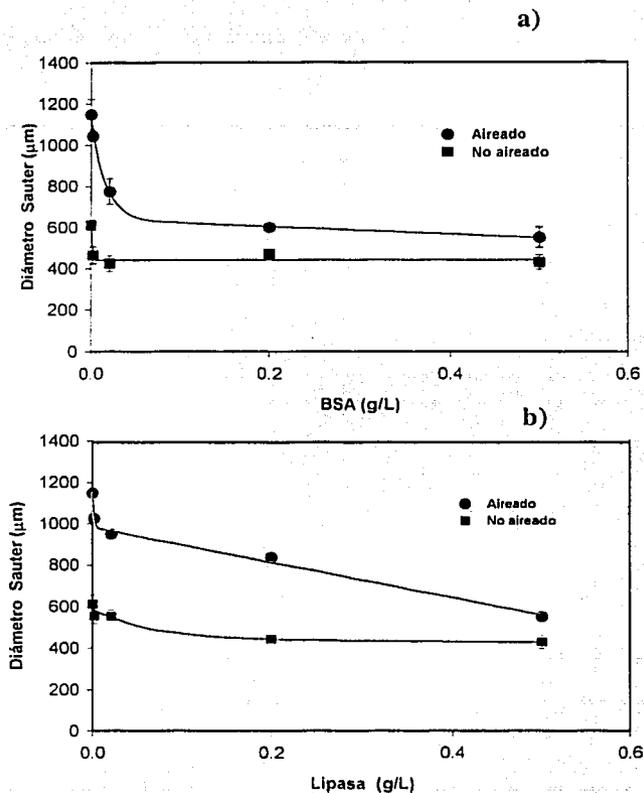


Figura 5.8. Efecto de la presencia de aire sobre el diámetro Sauter de gotas de aceite y en función de la concentración de proteína: a) BSA y b) lipasa de germen de trigo

En la *figura 5.9* se muestran imágenes típicas del sistema bajo condiciones aireadas (*imagen a*) y no aireadas (*imagen b*). Al comparar las gotas de aceite entre ambos sistemas, se observan características muy particulares. Primero, la superficie de las gotas en el caso del sistema difásico es lisa, mientras

que en el sistema trifásico (con aireación) la superficie es rugosa, y segundo, el diámetro de las gotas se incrementa al introducir aire al sistema, como se mostró en la *figura 5.8*. Este fenómeno fue también observado por Galindo *et al.*, (2000) y por Lucatero (2002). Algunos reportes identifican este fenómeno como una dispersión múltiple. Una dispersión múltiple es formada cuando la fase continua forma gotas dentro de las gotas de otra fase (Lee *et al.*, 2002). La formación de las estructuras mostradas en la *figura 5.9b* podría ser consecuencia de la coalescencia y ruptura de las gotas (Lee *et al.*, 2002; Sajjadi *et al.*, 2002).



Figura 5.9. Diferencias en la apariencia de las gotas de aceite entre los sistemas no aireado (a) y aireado (b)

Sajjadi *et al.* (2002) reportan que la inclusión de gotas de la fase continua (medio acuoso) dentro de la fase inmisible es función de la presencia de surfactante en la fase dispersa. Mencionan dos mecanismos que determinan éste fenómeno. El primero es la formación de las gotas internas cuando la fase continua es atrapada entre las gotas coalesciendo. El segundo mecanismo sugiere que la inclusión podría ocurrir por la deformación de las gotas de aceite, con lo cual se facilitaría la introducción de la fase continua.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.2 Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre la dispersión de gotas de aceite

La caracterización de la dispersión de las gotas de aceite en el sistema modelo trifásico se muestra en la *figura 5.10a* para la BSA y en la *figura 5.10b* para la lipasa de germen de trigo. En estos sistema, la dispersión de las gotas de aceite se ve favorecida por la mayor concentración de cualquiera de las dos proteínas. Es importante recordar que la lipasa es una enzima, la cual presenta un sitio de unión a su posible sustrato (alguno o alguno de los compuestos presentes en el aceite de ricino). Los resultados mostrados en la *figura 5.11b* sugieren que dadas las características estructurales de la lipasa, ésta migra principalmente hacia la interfase inmisible, orientando su sitio de unión hacia el sustrato, por lo que utilizando concentraciones por arriba de 0.02 g/L, se logra reducir significativamente el tamaño de las gotas de aceite. El d_{32} de las gotas en este sistema (*figura 5.11b*) se reducen de 1150 μm para el control (sin proteína) hasta 550 μm al utilizar 0.5 g/L de lipasa.

A diferencia del comportamiento de la BSA en el sistema difásico, en el sistema trifásico se presenta una posición de los datos diferente, entre cada una de las concentraciones de proteína (con respecto al control). En la *figura 5.10a* se observa como el corrimiento hacia la izquierda de las curvas (con respecto al control) es dependiente de la concentración de proteína. Como se ha reportado anteriormente (Clarkson *et al.*, 1999; Tripp *et al.*, 1995; Beverung *et al.*, 1999) la BSA es una proteína activa a las superficies, la cual a diferencia de la lipasa, no presenta en su estructura un sitio de unión específico por el aceite. Así, en el sistema trifásico, la BSA migrará inespecíficamente hacia las interfases presentes (no olvidar que tanto la fase gaseosa como la fase aceitosa son hidrofóbicas), lo cual no significa que deje de interactuar con alguna de las interfases. Beverung *et al.* (1999) han propuesto que los residuos hidrofóbicos presentan una mayor afinidad por la interfase aceitosa que por la gaseosa (ambas fases son hidrofobas) y que éste efecto es dependiente de la hidrofobicidad y la

estabilidad conformacional de las proteínas. Los d_{32} de las gotas en este sistema van de 1150 μm para el control, hasta aproximadamente 600 μm (para 0.5 g/L de proteína) (figura 5.11a).

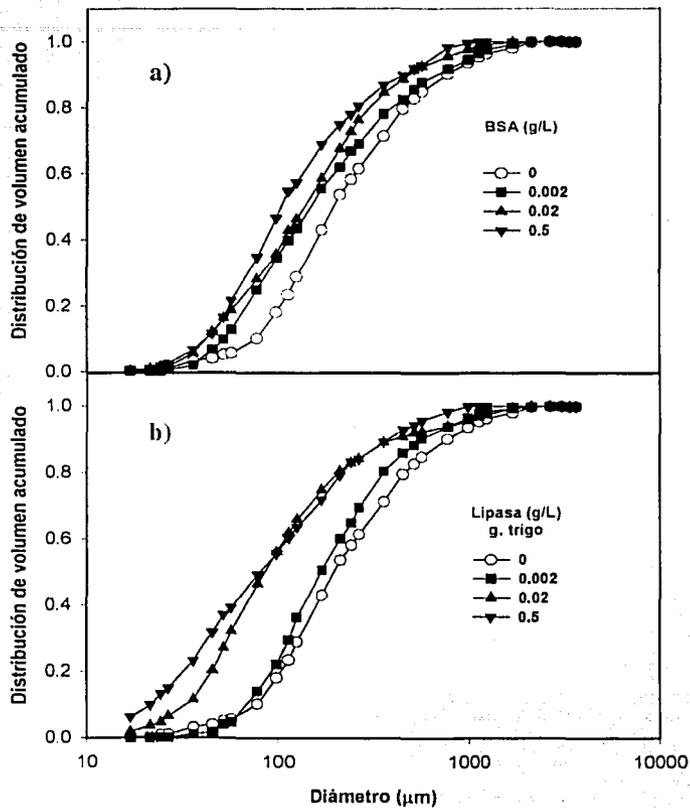


Figura 5.10. Dispersión de las gotas de aceite como función de la concentración de proteína en el sistema modelo trifásico : a) BSA, b) lipasa de germen de trigo

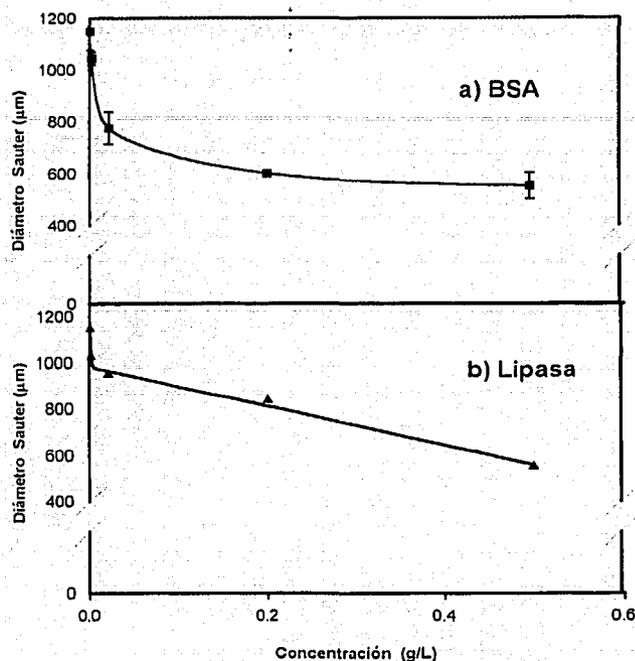


Figura 5.11. Efecto de la concentración de proteína sobre el diámetro Sauter de las gotas de aceite: a) BSA y b) lipasa de germen de trigo.

5.2.3 Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre la dispersión de las burbujas de aire

Para un sistema trifásico similar al empleado en éste trabajo, Galindo *et al.* (2000), Larralde-Corona *et al.* (2002) y Lucatero (2002) han reportado la presencia de burbujas de aire dentro de las gotas de aceite. Dadas las características de las imágenes obtenidas, resulta fácil cuantificar las burbujas dentro

de las gotas y las burbujas en el seno del líquido (*figura 5.12*) y poder realizar el análisis considerando éstos dos grupos. Los resultados del análisis de la dispersión de éstos, así como su discusión, se presentan a continuación.

Como panorama general, evaluando el efecto de la concentración de proteína sobre la dispersión de las burbujas de aire podemos observar (*figura 5.13a*) que al aumentar la concentración de la BSA, disminuye el diámetro de las burbujas; sin embargo, el efecto de la lipasa sobre el diámetro de las burbujas parece ser independiente de la concentración (*figura 5.13b*). En la siguiente sección se describirá en detalle el efecto de las proteínas sobre las burbujas de aire en el seno del líquido y las burbujas de aire en el interior de gotas de aceite.

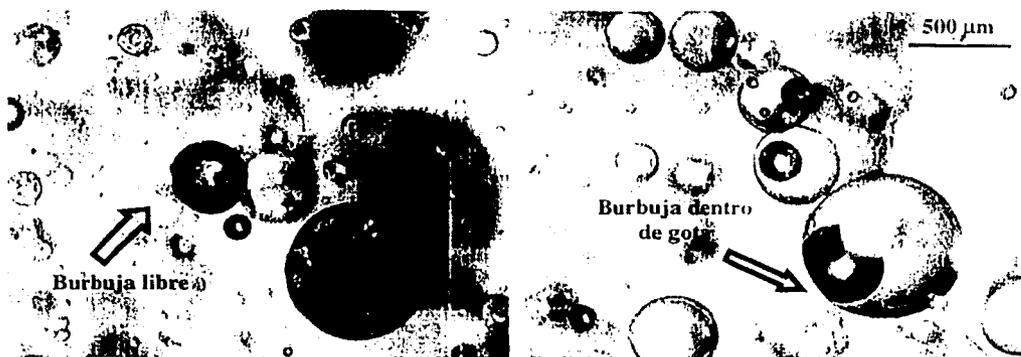


Figura 5.12. Localización de las burbujas de aire (dentro de gotas de aceite o libres en el seno del líquido).

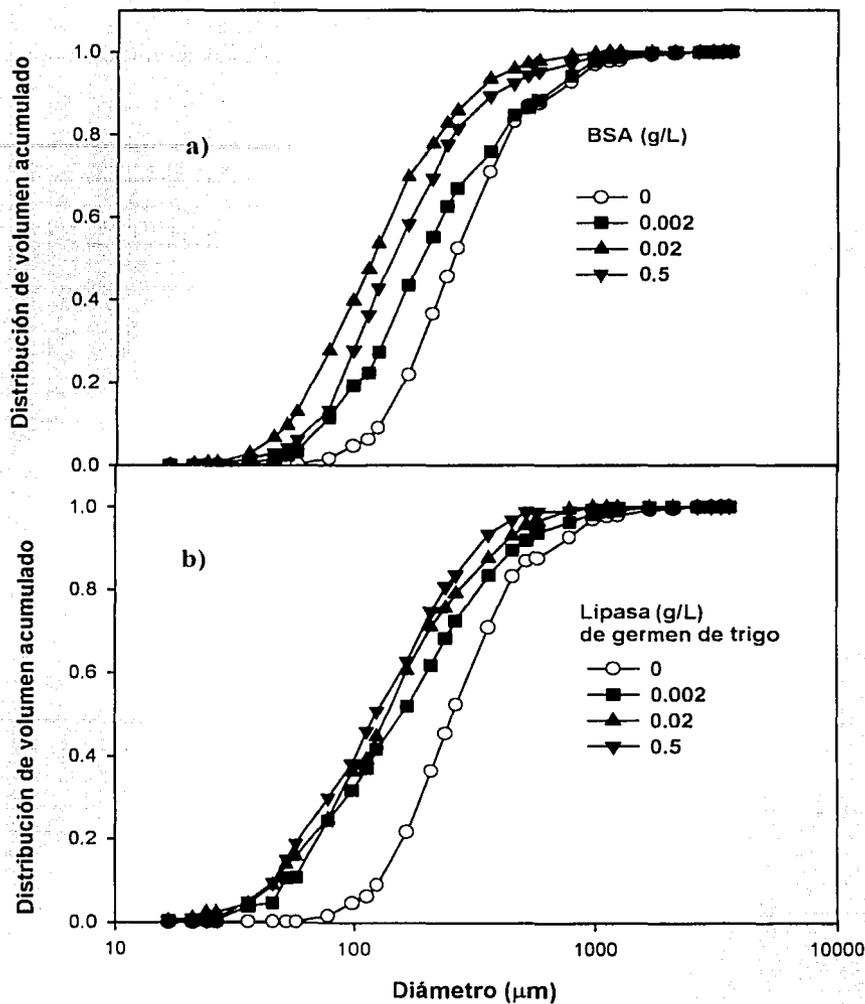


Figura 5.13. Dispersión de las burbujas de aire como función de la concentración de proteína : a) BSA y b) lipasa de germen de trigo

5.2.4 Localización de las burbujas de aire

Como se mencionó en la sección 5.2.3, se ha observado la presencia de burbujas de aire dentro de gotas de aceite y burbujas en el seno del líquido (*figura 5.12*). La proporción de burbujas de aire (dentro de gotas de aceite) se muestra en la *tabla 5.1*. A medida que aumenta la concentración de la lipasa en el sistema, se incrementó el porcentaje (en volumen) de burbujas de aire dentro de las gotas de aceite. El incremento va desde 21 hasta 48 %, mientras que al utilizar la BSA, se obtuvo un valor constante (~21%). Éste comportamiento puede ser explicado considerando el valor de la CMC (*figura 5.6*). A las concentraciones utilizadas, la BSA alcanza su CMC mientras que la lipasa no presenta ésta característica. Clarkson *et al.* (1999) reportaron que las proteínas pueden formar interacciones intermoleculares en la interfase, formando películas cohesivas, las cuales son resistentes a la deformación. Asimismo, Adamson (1982) ha reportado que éstas moléculas de surfactante pueden crear una barrera rígida o altamente viscosa en la interfase, capaz de prevenir o retardar la coalescencia de las gotas que chocan como resultado de la agitación mecánica.

Concentración g/L	PORCENTAJE EN VOLUMEN	
	BSA	Lipasa
0	21	21
0.002	15	18
0.02	19	45
0.5	17	48

Tabla 5.1 . Porcentaje (en volumen) de burbujas de aire dentro de gotas de aceite

Los resultados sugieren que una vez que el sistema con proteína ha alcanzado la CMC, forma en la interfase líquido-gas una barrera rígida, lo que posiblemente está impidiendo o dificultando la entrada de las burbujas de aire en las gotas de aceite, debido a que la orientación del extremo hidrófobo del surfactante es siempre hacia el interior del aceite o bien del aire (por ser ambos hidrófobos). Por su

parte, los extremos hidrófilos están orientados hacia la fase acuosa (hacia el exterior), ocasionando la repulsión entre ellas e impidiendo su entrada en las gotas de aceite. Esto explicaría los resultados del sistema conteniendo BSA. En el caso de la lipasa de germen de trigo, el valor de CMC no se alcanza, por lo que la interacción entre la interfase aceite y aire no está saturada y, posiblemente -desde el punto de vista estructural (conformación)-, ésta proteína no constituya una barrera (en la interfase) al paso de las burbujas al interior de las gotas de aceite.

Un posible mecanismo es que debido a la interacción de la lipasa con el aceite (dada su hidrofobicidad) ésta actuará como acarreador de las burbujas de aire al interior de las gotas. Sin embargo, con el fin de entender completamente éste fenómeno, será necesario realizar estudios específicos de interacción de la proteína con las interfases.

5.2.4.1 Burbujas de aire en el seno del líquido

En ésta sección se analiza la dispersión de las burbujas libres (en el seno del líquido). En la *figura 5.14* se observa el efecto de las diferentes concentraciones de proteína (BSA y lipasa de germen de trigo) sobre la dispersión de las burbujas de aire en el seno del líquido. Puede observarse que ambas proteínas modifican drásticamente las curvas de volumen acumulado, efecto que es marcado a altas concentraciones de ellas.

Estos resultados sugieren que, en el sistema trifásico, las proteínas presentan dos comportamientos dependiendo de sus características estructurales: la lipasa (una enzima), por encontrarse en un sistema con interfases altamente hidrofóbicas, está migrando hacia ambas superficies, aunque de manera más significativa migrará hacia la fase aceitosa, al cual reconoce como posible sustrato (*figura 5.10b*). Por otro lado, se infiere que la BSA no migra hacia la interfase aceitosa, sugiriendo que presenta más

afinidad hacia la interfase gaseosa (ver *figura 5.14a*), comparada con su efecto sobre el aceite (*figura 5.10a*), efecto que es especialmente marcado al utilizar concentraciones mayores a 0.002 g/L.

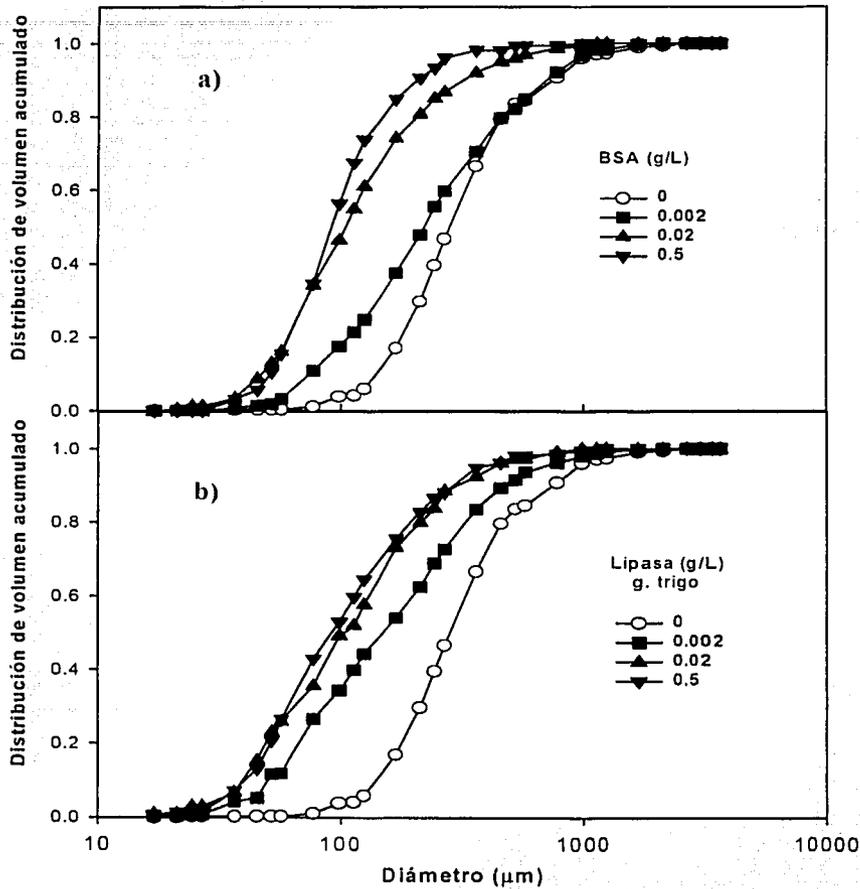


Figura 5.14. Dispersión de las burbujas de aire (seno del líquido) como función de la concentración de proteína : a) BSA, b) lipasa de germen de trigo

En la *figura 5.15* se muestra que el d_{32} disminuye de 1100 μm para el control (sin proteína) hasta 350 μm al utilizar 0.5 g/L, de BSA, mientras que para el sistema con lipasa los diámetros van desde 1100 μm para el control, hasta 550 μm (al utilizar 0.5 g/L).

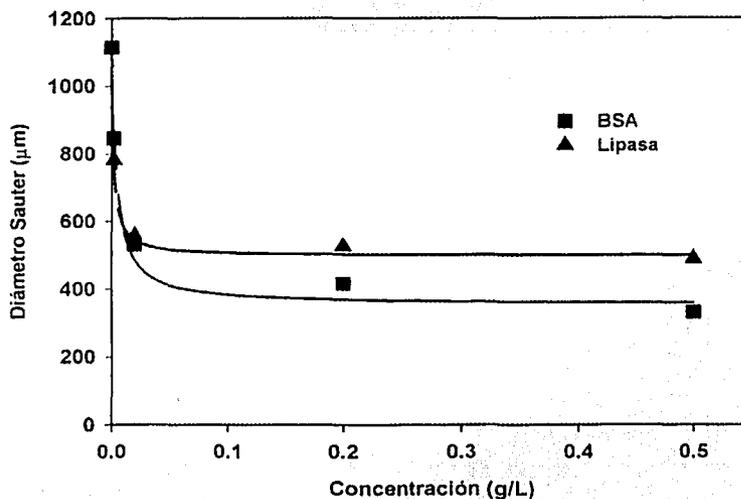


Figura 5.15. Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre el diámetro Sauter de las burbujas libres

La disminución en el diámetro Sauter de las burbujas libres puede explicarse en términos de la tensión superficial: una reducción en la tensión superficial/interfacial por la presencia de proteína, permite al sistema generar burbujas más pequeñas debido al rompimiento de éstas (trabajo realizado por el impulsor). Por otro lado, algunos estudios en sistemas en los cuales se encuentran surfactantes, como el reportado por Janse *et al.* (1999) en el que utilizaron sistemas que contienen pulpa de papel industrial (en columnas de burbujeo), observaron que los agentes surfactantes presentes tienen un efecto sobre la conservación del tamaño de las burbujas y concluyen que la formación de burbujas

pequeñas es el resultado de la combinación de utilizar un difusor con orificios pequeños (como el sinterizado) y de la presencia de surfactantes (los cuales actúan estabilizando la interfase de las burbujas). De igual forma, Bredwell *et al.* (1995) reportan que la capa de surfactante que rodea a las microburbujas, genera una doble capa eléctrica que actúa como repulsor de otras burbujas, previniendo la coalescencia y obteniéndose así burbujas de menor diámetro. Zhou *et al.* (2000) observaron que la liberación de surfactantes en los sistemas aceite-aire-agua producía dos efectos importantes: 1) la reducción de la tensión superficial, la cual promueve la formación de burbujas pequeñas y 2) la adsorción de los surfactantes en la interfase estabilizan las burbujas generadas.

Con base en éstos reportes y con los resultados obtenidos en éste trabajo, se confirma la afinidad de ambas proteínas por la interfase gaseosa, efecto particularmente importante al utilizar 0.5 g/L de BSA .

5.2.4.2 Burbujas de aire en el interior de las gotas de aceite

Bajo todas las condiciones, las burbujas dentro de gotas fueron más pequeñas que las burbujas libres. El comportamiento observado de las burbujas de aire dentro de las gotas de aceite se presenta en la *figura 5.16* para ambas proteínas (lipasa de germen de trigo y BSA). Al utilizar la BSA -a diferentes concentraciones-, la distribución de volumen acumulado no presenta diferencias; sin embargo, con respecto al control (sin proteína) se observa un corrimiento hacia la izquierda, lo cual indica menores diámetros de las burbujas. Para la lipasa de germen de trigo, las diferentes concentraciones y el control se encuentran prácticamente en la misma posición del gráfico: no se observó disminución en el diámetro de las burbujas en éste sistema.

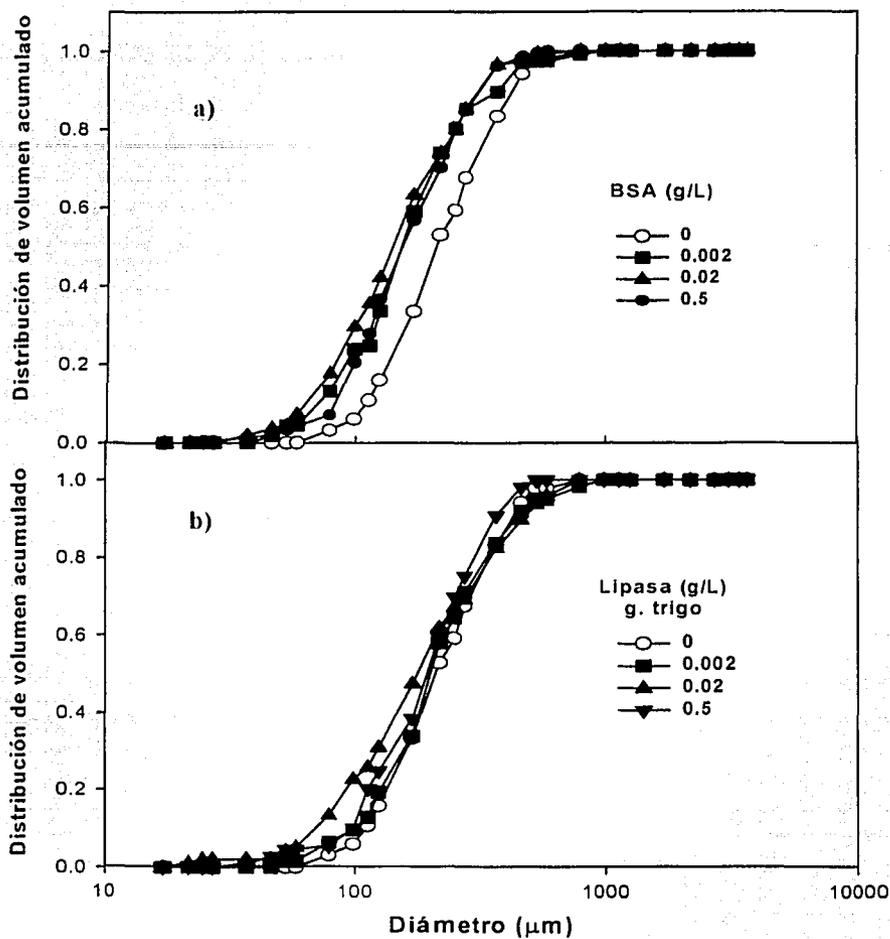


Figura 5.16. Dispersión de las burbujas de aire - dentro de gotas - como función de la concentración de proteína : a) BSA, b) lipasa de germen de trigo

Una explicación al fenómeno de la introducción de las burbujas de aire en el interior de las gotas de aceite ha sido reportado por Galindo *et al.* (2000) quienes sugieren que el mecanismo por el cual se encuentran burbujas dentro de las gotas, podría estar asociado a un "atrapamiento" de las burbujas por las gotas de aceite y a su "inmovilización" en el interior del aceite de alta viscosidad, donde éstas son incapaces de coalescer (Lucatero, 2002). Basado en los principios termodinámicos se ha reportado (Moran *et al.* 2000) que la extensión de un fluido sobre un sustrato puede predecirse utilizando el *coeficiente de extendido* del líquido (S_p , definido en la sección 2.5.1.1): un valor de S_p positivo implica un extendido espontáneo del líquido sobre la fase gaseosa. En el sistema utilizado por Moran *et al.* - aire-bitumen- (un sistema similar al de éste trabajo: aire- aceite) observaron que un coeficiente positivo implica que al ponerse en contacto el aire y el bitumen da inicio a un proceso espontáneo de involucramiento de la burbuja hasta que ésta es "atrapada" por el aceite, lo cual podría explicar el fenómeno observado en estos estudios para el sistema aire-aceite (Galindo *et al.* 2000; Lucatero, 2002, Larralde-Corona *et al.* 2002).

5.3 COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

5.3.1 Efecto de la concentración y tipo de proteína sobre el $k_{L,a}$

La evaluación del efecto de la concentración de proteína sobre el $k_{L,a}$ se llevó a cabo para el sistema modelo trifásico (aceite - medio acuoso - aire) y el difásico (medio acuoso - aire). Se ha reportado (Morão *et al.* 1999; Rols y Goma, 1991; Liu *et al.*, 1994) la función del aceite como agente tensoactivo, por lo que se evaluó su efecto sobre el $k_{L,a}$, utilizándose un control en el cual no había aceite (se sabe que la presencia de proteínas y aceites influyen el valor del $k_{L,a}$) (Prins y van't Riet, 1987; Vardar-Sukan, 1998). Los resultados serán discutidos en la siguiente sección.

5.3.1.1 Evaluación del sistema difásico (aire-medio acuoso) y trifásico (aceite-aire-medio acuoso)

Fue posible medir el $k_{L,a}$ en el sistema difásico hasta una concentración de proteína de 0.02 g/L (*figura 5.17*), ya que utilizando concentraciones mayores a 0.02 g/L, la formación de espuma impidió hacer mediciones confiables.

La *figura 5.17* evidenció dos comportamientos diferentes para cada una de las proteínas. Para la BSA se observa un valor constante del $k_{L,a}$ al aumentar la concentración de proteína en el sistema (dentro del rango estudiado) con respecto al control (sin proteína). Al utilizar la lipasa de germen de trigo, los valores para el $k_{L,a}$ incrementan conforme la concentración de la proteína aumenta.

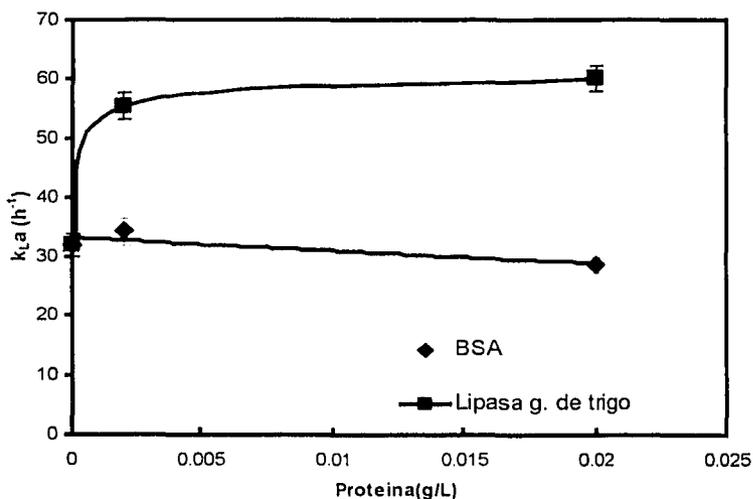


Figura 5.17. Efecto de la concentración de proteína sobre el $k_{L,a}$ en el sistema difásico

En la *figura 5.18* se presentan los resultados de $k_{L,a}$ para cada una de las proteínas en el sistema trifásico. Utilizando la lipasa de germen de trigo, se observó un incremento en el valor del $k_{L,a}$ al

aumentar la concentración de proteína del sistema (de 10.8 h^{-1} para el control sin proteína a 25.2 h^{-1} al utilizar 0.5 g/L de proteína). Por su parte, utilizando BSA se observó un incremento seguido por una disminución en el valor del $k_L a$ (hasta alcanzar el valor de 12.8 h^{-1}) al utilizar 0.5 g/L , el cual fue similar al obtenido en el experimento control (sin proteína).

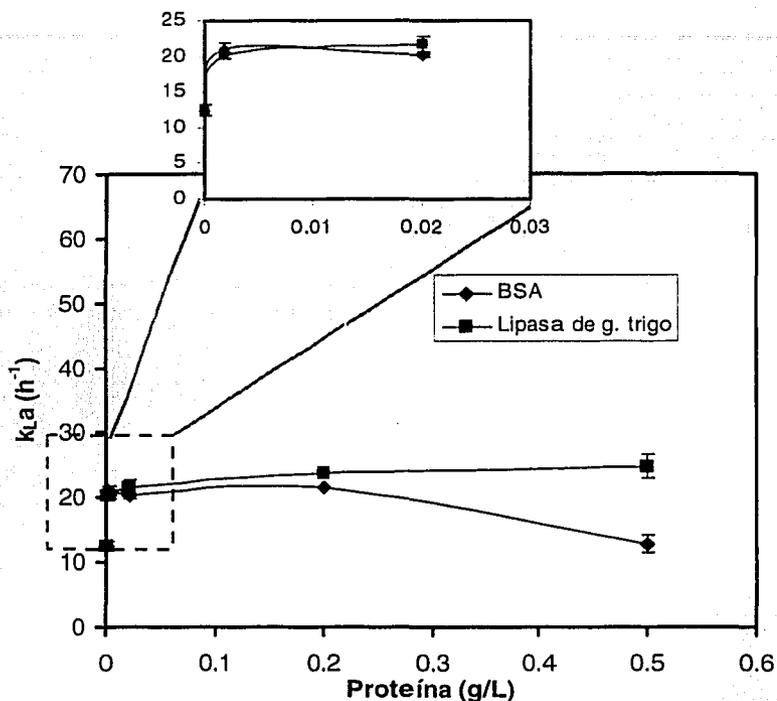


Figura 5.18. Efecto de la concentración de proteína sobre el $k_L a$ en el sistema trifásico

Estos resultados pueden inferirse en términos del efecto de la proteína como agente surfactante sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno (k_L) y el área interfacial (a), parámetros que integran el $k_L a$. El k_L es afectado por las condiciones hidrodinámicas del sistema y puede constituir el principal paso limitante en la transferencia de oxígeno (ver *figura 2.6*, sección 2.5), mientras que el área interfacial representa el área de transferencia disponible de oxígeno, entre mayor sea, mayor será la transferencia

de oxígeno al sistema. La cuantificación del d_{32} permite inferir el efecto de las proteínas sobre el área interfacial, con relación a esto, Kollmer *et al.* (1999) reportan que la presencia de biosurfactantes permite estabilizar las interfases, debido a una adsorción del surfactante a éstas, lo cual trae como consecuencia que las burbujas no coalescan y de esta forma, el área interfacial se incrementa (menor d_{32}). Por otro lado, Koide *et al.* (1976) reporta que algunos surfactantes disminuyen la transferencia de oxígeno ya que estos se adsorben a la interfase gas-líquido y que éstos, adsorbidos en la interfase gas-líquido, se convierten en barreras al paso de moléculas de gas a través de la interfase, convirtiéndose posiblemente en una resistencia para la difusión del oxígeno. Adamson reporta la formación de una barrera rígida o viscosa en la interfase, en presencia de surfactantes, la cual podría constituir en el caso de la BSA, una limitación difusional. Bredwell y Worden (1998) observaron una disminución en el k_L en presencia de surfactantes debido a que la concentración de éste puede influir en el espesor de la pared de líquido que rodea a las burbujas de gas. Sin embargo, en los estudios mencionados (Koide *et al.*, 1976 ; Bredwell y Worden, 1998) no se han utilizado proteínas como surfactantes, las cuales, como se describió en la sección 5.2.4 (para el caso específico de la lipasa de germen de trigo y la BSA) tienen estructuras y comportamientos muy específicos en las interfases.

Con base en los resultados obtenidos en éste trabajo y a los reportes de la literatura puede sugerirse que, dependiendo de las características estructurales de las proteínas, el área interfacial (a) se incrementa por la disminución de la tensión superficial y la estabilización de la interfase gaseosa por la presencia de proteínas (moléculas con carga que imparten ésta a la superficie de las burbujas evitando la coalescencia). Como se mostró en la *figura 5.15* (sección 5.2.4), el d_{32} de las burbujas de aire disminuye al aumentar la concentración de proteína en el sistema (esto para ambas proteínas), por lo cual el valor de a se incrementaría. Este fenómeno ha sido reportado por Morão *et al.* (1999), Rols y Goma (1991) y Jianlong (2000).

En el primer caso, al incrementarse el área interfacial, se observaría un incremento en el $k_{L,a}$ conforme mayor sea la cantidad de proteína. Sin embargo, solo a concentraciones menores de 0.5 g/L se observa éste comportamiento (con ambas proteínas) y al utilizar 0.5 g/L de BSA no se incrementa el $k_{L,a}$. Así, el mayor efecto de la BSA (concentraciones > 0.2 g/L) se esperaría que fuera sobre la interfase gas-líquido, por lo cual el valor de $k_{L,a}$ no se incrementaría como en el caso de la lipasa (en ambos sistemas: difásico y trifásico).

La proporción de burbujas dentro de gotas muestra un incremento al utilizar lipasa (de 21 a 45 %), mientras que al utilizar la BSA se mantiene constante (~21 %). Esto implica una mayor proporción de aire en la fase inmisible al utilizar lipasa, lo que podría sugerir un aumento en la transferencia de oxígeno (reportado por Elibol y Mavituna, 1997; Rols y Goma, 1991). Sin embargo, el atrapamiento de las burbujas en el interior de las gotas podría no contribuir al incremento del $k_{L,a}$, debido a que la difusión del oxígeno de las gotas de aceite hacia el seno del líquido podría representar una barrera.

5.3.1.2 Comparación del $k_{L,a}$ para el sistema difásico y trifásico

La *tabla 5.2* presenta la comparación de los valores de $k_{L,a}$ para el sistema trifásico (medio acuoso-aceite-aire) y para el difásico (medio acuoso- aire). Como puede observarse, la tendencia de los valores para el sistema difásico y trifásico es similar: se incrementa con lipasa y se mantiene constante al utilizar la BSA. Sin embargo, es importante notar que para ambas proteínas, el $k_{L,a}$ fue siempre mayor en el sistema difásico que en el trifásico (en el rango de concentraciones utilizadas en este estudio). Morão *et al.* (1999) reportan que la adición de aceite -como antiespumante- afecta el valor del $k_{L,a}$ incrementando la coalescencia. No debe olvidarse que el sistema con sales es un sistema no coalescente, por lo que el diámetro de las burbujas es mayor en comparación al sistema con aceite, en el cual se promueve la coalescencia, incrementándose así, el diámetro de las burbujas y de esta forma disminuyendo el área interfacial.

Tabla 5.2 $k_{L,a}$ (en h^{-1}) como función de la concentración de proteína para los sistemas con y sin aceite

Concentración (g/L)	BSA		Lipasa	
	(sin aceite)	(con aceite)	(sin aceite)	(con aceite)
0	31.9 ± 1.9	12.4 ± 0.8	31.9 ± 1.9	12.4 ± 0.8
0.002	34.2 ± 2.2	21.1 ± 0.8	55.3 ± 2.3	20.2 ± 0.4
0.02	28.8 ± 1.3	20.2 ± 0.3	60 ± 2.1	21.6 ± 1.2
0.5	---	12.8 ± 1.3	---	24.8 ± 1.7

En términos de la presencia de aceite los resultados (*tabla 5.2*) muestran que en el sistema sin proteína (control) se observa una disminución drástica del $k_{L,a}$ en el sistema (60 % con respecto al sistema sin aceite). Al adicionar bajas concentraciones de BSA (0.002 y 0.02) al sistema sin aceite, se observa un ligero incremento en el $k_{L,a}$. Al comparar el efecto de la adición de BSA a los sistemas con y sin aceite se observa un incremento en el $k_{L,a}$ al utilizar 0.002 g/L, efecto menos evidente al utilizar 0.02 g/L.

Al utilizar lipasa, se presenta una marcada tendencia a incrementar el valor del $k_{L,a}$, en el sistema sin aceite comparado con el sistema con aceite. Por otro lado, al comparar el incremento de la concentración de proteína en los sistemas con y sin aceite muestran que, utilizando 0.002 g/L se

incrementa drásticamente el valor del $k_{L,a}$ en el sistema sin aceite comparado con el sistema con aceite al adicionar la misma concentración de proteína. Un efecto similar sobre el $k_{L,a}$ es observado al adicionar 0.02 g/L, es decir, incrementando la concentración de proteína en el sistema.

Estos resultados evidencian un mecanismo complejo de transferencia de oxígeno el cual es dependiente no solo de la presencia de proteína sino también de la presencia o ausencia de aceite.

6 CONCLUSIONES

Los resultados aquí obtenidos sugieren que tanto la concentración como el tipo (hidrofóbica o hidrofílica) de proteína influyeron de forma importante en la dispersión de las fases y el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.

Con lo que respecta a la dispersión del sistema de dos fases se concluye que la presencia de proteína redujo el d_{32} de las gotas de aceite y que a concentraciones mayores a 0.002 g/L se observó un valor constante del diámetro. Se sugiere que ésto pueda ser debido a que las proteínas están actuando como agente activos a la superficie, reduciendo la tensión superficial/interfacial y a su vez -por ser moléculas con carga- imparten ésta a la superficie de las gotas, dando como resultado la formación de una doble capa eléctrica que disminuye la frecuencia de acercamiento de las gotas, evitando así la coalescencia.

Para el sistema de tres fases (aceite-medio acuoso-aire) se encontró que al aumentar la concentración de proteína en el sistema se observó una reducción en el diámetro (d_{32}) de gotas y burbujas. Los resultados para la fases inmisible y gaseosa, sugieren que las características estructurales de las proteínas impactan de forma diferente, infiriéndose un reconocimiento específico de la lipasa (enzima) hacia la interfase aceitosa (posible sustrato) y un reconocimiento no específico de la BSA hacia la interfase gaseosa.

Con respecto a la localización de las burbujas de aire (dentro y fuera de gotas de aceite), se observó que al utilizar la lipasa de germen de trigo, el porcentaje (en volumen) de las burbujas de gas dentro de las gotas de aceite se incrementó drásticamente (de 21 % a 48 %) a medida que aumentó su

concentración en el sistema. A diferencia, al utilizar la BSA, el porcentaje de las burbujas de aire dentro de las gotas es constante (-21 %).

Al aumentar la concentración de proteína en el sistema (hasta 0.5 g/L), el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) se incrementó -de forma importante- al utilizar lipasa, mientras que para la BSA, los valores de $k_L a$ disminuyen al incrementar la concentración de proteína. Esto indica que una vez que el sistema con BSA ha alcanzado su CMC (concentración micelar crítica), la interfase líquido-gas se encuentra saturada, mientras que no se observa éste fenómeno con la lipasa.

7 PERSPECTIVAS

El estudio desarrollado en el presente trabajo solo proporciona información muy general del sistema. Sin embargo da un indicio de algunas estrategias a seguir. Siguiendo con ésta línea surgen algunas propuestas: primero un estudio detallado, para comprender la interacción compleja de las fases presentes en el sistema de fermentación (aceite-medio acuoso-aceite, aceite-aire). Como segundo punto, la realización de un modelo matemático integrando los mecanismos de transferencia de masa, la cual constituiría una herramienta poderosa para la caracterización de sistemas con tales mecanismos complejos de transferencia. Por último, tratar de caracterizar *in situ* la dispersión de gotas de aceite y burbujas de aire, sin embargo debido a los límites operacionales del sistema, no ha sido posible analizar la dispersión, debido al oscurecimiento de las imágenes. Los resultados de este estudio podrían correlacionarse con las observaciones *in situ*, así como con otros trabajos realizados a la par de éste, tratando de realizar una caracterización integral del sistema de producción elegido, y con la perspectiva de poder explicar otros sistemas con la misma complejidad.

8 REFERENCIAS

- Adamson, W. A. (1982). **Physical Chemistry of Surfaces**. 4a. ed., Wiley-Interscience Publication, 1982.
- Adler, L., Buchholz, H., Voigt, J. Wittler, R. and Schügerl, K. (1980). Bubble coalescence behavior in biological media: I. *Hansenula polymorpha* cultivation broths. **Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 9: 249-260.
- Armenante, P.M. and Huang, Y.T. (1992). Experimental determination of minimum agitation speed for complete liquid-liquid dispersions in mechanically agitated vessels. **Ind. Eng. Chem. Res.** 31(4): 1398-1406.
- Atkinson, B. and Mavituna, F. (1991). Stoichiometric aspects of microbial metabolism, Microbial activity, gas-liquid mass transfer. **Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, second edition.** 72(A): 677-685.
- Bailey, J.E. and Ollis, D.F. (1986). Transport Phenomena in Bioprocess Systems. Design and Analysis of Biological Reactors. **Biochemical Engineering Fundamentals.** Mc Graw-Hill, Chap. 8 y 9, p. 457-657.
- Beverung, C.J., Radke, C.J. and Blanch, H.W. (1999). Protein adsorption at the oil / water interface: characterization of adsorption kinetics by dynamic interfacial tension measurements. **Bioph. Chem.** 81: 59-80.
- Bonnarme, P., Djian, A., Latrasse, A., Feron, G., Giniès, C., Durand, A. and LeQuéré, J. L. (1997). Production of 6-pentyl- α -pirona by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. **J. Biotechnol.** 56: 143-150.
- Bredwell, M. D., Telgenhoff, M. D. and Worden, R. M. (1995). Formation and coalescence properties of microbubbles. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 51/52: 501-509.
- Brito, A. M. T. (2001). Montaje de una 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.
- Cavanagh, M.E., Ison, A.P., Lilly, M.D., Carleysmith, S.W. and Edwards, J. (1994). The utilization of lipids during streptomycete fermentations. **Trans. I. Chem. E (A).** 72: 14-16.
- Clarkson, J.R., Cui, Z.F. and Darton, R.C. (1999) Protein denaturation in foam II. **J. Colloid Interface Sci.** 215: 333-338.
- Cui, Y. Q., van der Lans, R.G. and Luyben, K.C.A. (1998). Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnol. Bioeng.** 57(4): 409-419.

- Dalmau, E., Sánchez, A., Montesinos, J.L., Valero, F. La Fuente, F.J. and Casas, C. (1998): Study of drop size frequencies in a microbial growth system with aqueous-organic culture medium: lipase production by *Candida rugosa*. **J. Biotechnol.** 59: 183-192.
- Doran, P. (1999). *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press. Cap. 9. p 197-198.
- Drogaris, G. and Weiland, P. (1983). Coalescence behaviour of gas bubbles in aqueous solutions of *n*-alcohols and fatty acids. **Chem. Eng. Sci.** 38 (9):1501-1506.
- Elibol, M. and Mavituna F. (1997). Characteristics of antibiotic production in a multiphase system. **Proc. Biochem.** 40: 417-422.
- Galindo, E., Paccck, A.W. and Nienow, A.W. (2000). Study of drop and bubble sizes in a simulated mycelial fermentation broth of up to four phases. **Biotechnol. Bioeng.** 69 (2) 213-221.
- Gallego-Lizón, T. and Pérez de Ortiz, S.E. (2000). Drop sizes in liquid membrane dispersions. **Ind. Eng. Chem. Res.** 39: 5020-5028.
- García, A. H. y Vázquez-Duhalt R. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. **Biotecnología**, 3: 77-88.
- Ison, A.P. and Lilly, M.D. (1996) The utilization of lipids during industrial fermentations. **Abstract Book, 10th International Biotechnology Symposium**. Sydney, Australia, p. 26.
- Janse, P., Gómez C.O. and Finch, J.A. (1999) Effect of pulp fibers on gas hold-up in a flotation column. **Can. J. Chem. Eng.** 77 : 22-25.
- Jianlong, W. (2000). Enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* using *n*-dodecane as an oxygen - vector. **Process Biochem.** 35:1079-1083.
- Jordan, R.N., Nichols, E.P. and Cunningham, A.B. (1999). The role of (bio)surfactant sorption in promoting the bioavailability of nutrients localized at the solid-water interface. **Wat. Sci. Technol.** 39(7): 91-98.
- Junker, B.H., Hatton, A.T. and Wang, D.I. (1990). Oxygen transfer enhancement in aqueous/perfluorocarbon fermentation systems: I. Experimental observations. **Biotechnol. Bioeng.** 35: 578-585.
- Kawase, Y. and Moo Young, M. (1990). The effect of antifoam agents on mass transfer in bioreactors. **Biopr. Eng.** 5:169-173.
- Kawase, Y., Araki, T., Shimizu, K. and Miura, H. (1997). Gas-liquid mass transfer in three-phase stirred tank reactors: Newtonian and non-Newtonian fluids. **Can. J. Chem. Eng.** 75: 1159-1164.
- Keudell, K.C. Huang, J. K., Wen, L., Klopfenstein, W.E., Bagby, M.O., Lanscr, A.C., Plattner, R. D., Peterson, R. E. and Weisleder, D. (2000). Fatty acids enhanced tubermycin production by *Pseudomonas* strain 2HS. **Microbios.** 102: 27-38.

- Kollmer, A., Schmid, A., von Rohr, R., and Sonnleitner, B. (1999). On liquid-liquid mass transfer in two-liquid-phase fermentations. *Biopr. Eng.* 20: 441-448.
- Koide, K., Hayashi, T., Sumino, K. and Iwamoto, S. (1976). Mass transfer from single bubbles in aqueous solutions of surfactants. *Chem. Eng. Sci.* 31: 963-967.
- Large, K.P., Ison, A.P. and Williams, D.J. (1998). The effect of agitation rate on lipid utilization and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biotechnol.*, 63: 111-119.
- Larralde-Corona, C.P., Córdova, M.S. and Galindo, E. (2002). Distribution of the free and oil-trapped air bubbles in simulated broths containing fungal biomass. *Can. J. Chem. Eng.* (in press).
- Lejeune, R. and Baron, G.V. (1995). Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 249-258.
- Lee, J.M., Lim, K.H. and Smith, D.H. (2002). Formation of two-phase multiple emulsions by inclusion of continuous phase into dispersed phase. *Langmuir*, 15.
- Linek, V. and Benes, P. (1976). A study of the mechanism of gas absorption into oil-water emulsions. *Chem. Eng. Sci.* 31: 1037-1046.
- Liu, S.H., Chiung, W. C. and Wang, Y. C. (1994). Effect of lard oil, olive oil and castor oil on oxygen transfer in an agitated fermentor. *Biotechnol. Tech.* 8(1): 17-20.
- Lucatero, C.S. (2002). Dispersión de aceite de ricino y aire en presencia de micelio disperso y *pellets* de *Trichoderma harzianum*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Machon, V., Pacek, A.W. and Nienow, A.W. (1997). Bubble sizes in electrolyte and alcohol solutions in a turbulent stirred vessel. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 75: 339-348.
- Maron, S.H. and Prutton, C.F. (1996). Fundamentos de Fisicoquímica. Limusa. Cap. 20. p. 813-849.
- Mitard, A. and Riba, J.P. (1988). Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnol. Bioeng.* 32:835-840.
- Molinari, F., Gandolfi, R., Aragozzini, F., Leon, R. and Prazeres, M. F.D. (1999). Biotransformation in two-liquid-phase systems. Production of phenylacetaldehyde by oxidation of 2-phenylethanol with acetic acid bacteria. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 729-735.
- Morán, K., Yeung, A. and Masliyah, J. (2000). Factors affecting the aeration of small bitumen droplets. *Can. J. Chem. Eng.* 78:625-634.
- Morão, A., Maia, C.I., Fonseca, M.R.M., Vasconcelos, J.M.T. and Alves, S.S. (1999). Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters. *Biopr. Eng.* 20:165-172.
- Olsvik, E. and Kristiansen, B. (1994). Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnol. Adv.* 12:1-39.

- Pacek, A.W., Man, A.C. and Nienow, A.W. (1999). On the Sauter mean diameter and size distributions in turbulent liquid/liquid dispersions in a stirred vessel. *Chem. Eng. Sci.* 53 (11) : 2005-2011.
- Peberdy, J.F. (1994). Protein secretion in filamentous fungi-trying to understand a highly productive black box. *TIBTECH.* 12:50-57
- Pezenec, S., Gauthier, F., Alonso, C., Graner, F., Croguennec, T., Brulé, G. and Renault, A. (2000). The protein net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air-water interface. *Food Hyd.* 14: 463-472.
- Porter, M.R. (1994). *Handbook of Surfactants*, 2nd edition, London, U.K, Chapman & Hall.
- Prins, A. and van't Riet, K. (1987). Proteins and surface effects in fermentation: foam, antifoam and mass transfer. *TIBTECH.* 5: 296-301.
- Quintero, R. R. (1981). *Ingeniería bioquímica. Teoría y aplicaciones*. Ed. Alhambra Mexicana. México, D.F., pág.
- Ramkrishna, D. and Sathyagal, A. (1995). Analysis of dispersed-phase systems: Fresh perspective. *AIChE J.* 41: 35-44.
- Rao, S.C.. and Damodaran, S. (2000). Is surface pressure a measure of interfacial water activity? Evidence from protein adsorption behavior at interfaces. *Langmuir*, 16, 9648-9477.
- Reséndiz, R., Martínez, A., Ascanio, G. and Galindo, E. (1991). A new pneumatic bearing dynamometer for power input measurement in stirred tanks. *Chem. Eng. Technol.* 14: 105-108.
- Rocha-Valadez J.A., Galindo, E. and Serrano-Carreón L. (2000). Effect of impeller-sparger configuration over *Trichoderma harzianum* growth in four-phases cultures under constant dissolved oxygen. *Biopr. Eng.* 23:403-410.
- Rols, J.L. and Goma, G. (1991). Enhanced oxygen transfer rates in fermentation using soybean oil in water dispersions. *Biotechnol. Lett.* 13(1): 7-12
- Rols, J.L., Condoret, J.S., Fonade, C. and Goma, G. (1990). Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentations using emulsified oxygen-vectors. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 427-435.
- Sajjadi, S., Zerfa, M. and Brooks, B. W. (2002). Dynamic behavior of drops in oil/water/oil dispersions. *Chem. Eng. Sci.* 57: 663-675.
- Serrano-Carreón L., Flores, C. and Galindo, E. (1997). γ -Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in stirred bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 13(2): 205-208.
- Schmid, A., Kollmer, A. and Witholt, B. Effects of biosurfactant and emulsification on two-liquid phase *Pseudomonas oleovorans* cultures and cell-free emulsions containing n-decane. *Enzyme Microb. Technol.* 22: 487-493.

- Sobotka, M., Prokop, A., Dunn, I. J. and Einsele, (1982). A review of methods for the measurement of oxygen transfer in microbial systems. **Ann. Rep. Ferment. Proc.** Academic Press, London, vol. 5, p. 127-210.
- Sokolovská, I., Albasi, C., Riba, J. and Báles, V. (1998). Production of extracellular lipase by *Candida cylindracea* CBS 6330. **Biopr. Eng.** 19:179-186.
- Sugimura, Y., Fukunaga, K., Matsuno, T., Nakao, K., Goto, M. and Nakashio, F. (2000). A study on the surface hydrophobicity of lipases. **Biochem. Eng. J.** 5: 123-128.
- Tatterson, G.B. Gas dispersion in agitated tanks. In: **Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks**, Mc. Graw-Hill, USA. pp. 417-529.
- Treskatis, S.K., Orgeldinger, H.W. and Gilles, E.D. (1997). Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. **Biotechnol. Bioeng.** 53(2): 192-201.
- Tripp, B.C., Magda, J.J. and Andrade, D.J. (1995). Adsorption of globular proteins at the air/water interface as measured via dynamic surface tension: concentration dependence, mass-transfer considerations and adsorption kinetics. **J. Colloid Interface Sci.** 173: 16-27.
- Tsouris, C., Lizama, H.M., Spurrier, M.A., Takeuchi, T.L. and Scott, T.C. (1996). Hydrodynamics of bioreactor systems for liquid-liquid contacting. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 57/58 : 581-592.
- Vandamme, E. J. (1992) Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 53(4): 313-327.
- Vardar-Sukan, F. (1990). Effects of natural oils on oxygen mass transfer rates in biomed. **Procc. Asia-Pacific Biochem. Eng. Conf.** '90, pág. 22-25.
- Vardar-Sukan, F. (1998). Foaming: consequences, prevention and destruction. **Biotechnol. Adv.** 16: 913-948.
- Weete, J.D. Lipid Biochemistry of Fungi and other Organisms, (1980) J.D. Weete and J. W. Darrell (Eds.). Plenum Press, New York.
- Worden, M. R. and Bredwell, M. D.(1998). Mass - transfer properties of microbubbles. 2 Analysis using a dynamic model. **Biotechnol. Prog.** 14:39-46.
- Zahradnik, J., Kuncová, G. and Fialová, M. (1999) The effect of surface active additives on bubble coalescence and gas holdup in viscous aerated batches. **Chem. Eng. Sci.** 54: 2401-2408.
- Zhou, G. and Kresta, S. M. (1998). Evolution of drop size distribution in liquid-liquid dispersions for various impellers. **Chem. Eng. Sci.** 53(11): 2099-2113.

9 ANEXOS

ANEXO 1. Factor de corrección para los valores de tensión superficial (Cat. No. 14-812, Fisher Scientific).

Las lecturas obtenidas del tensiómetro (FISCHER) proporcionan un valor de tensión superficial aparente. Para obtener el valor real debe utilizarse la relación :

$$S = P \times F$$

Donde S es el valor real, P el valor aparente y F es un factor de corrección. El factor de corrección es calculado a partir de la siguiente expresión:

$$F = 0.7250 + \sqrt{0.01452 * P / C^2 (D-d) + 0.04534 - 1.679 r / R}$$

Donde:

F = factor de corrección

R = radio del anillo

r = radio del alambre del anillo

P = lectura aparente

D, d = densidad de las fases

K = 0.04534 - 1.679 r/R

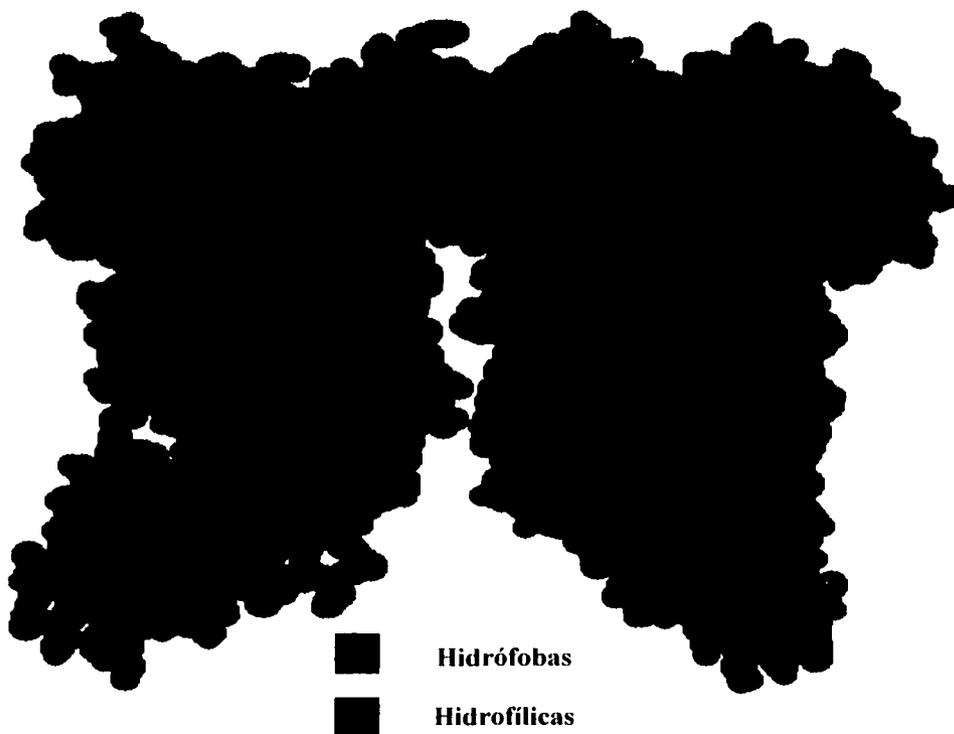
C = circunferencia del anillo (5.915 cm)

a = 0.725

b = 0.0009075

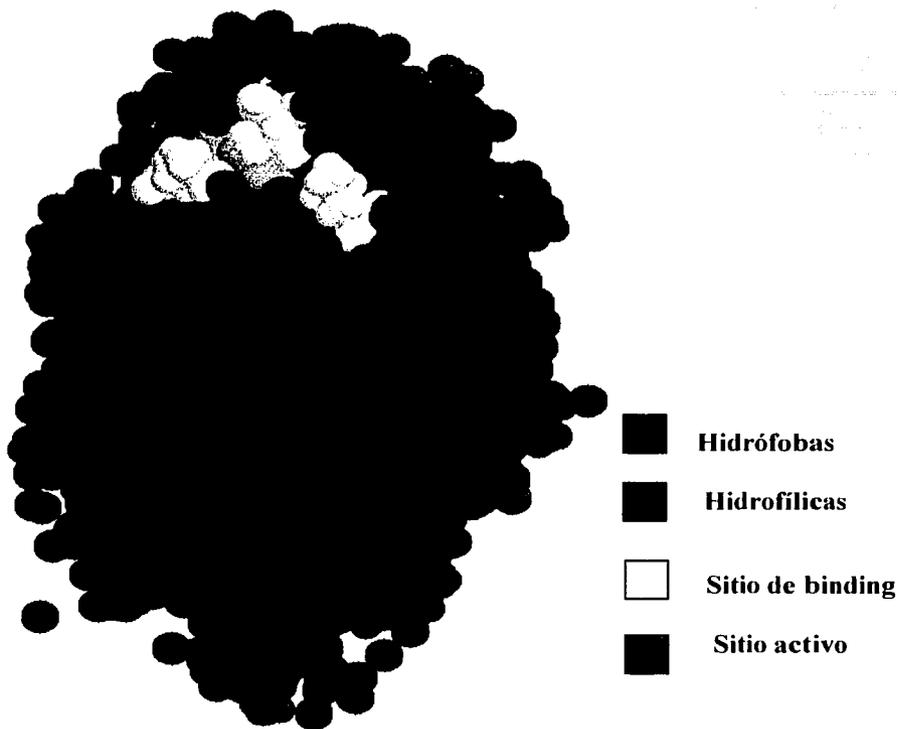
Los valores de a , b y K son constantes universales de todos los anillos. La relación R/r es de 52.987484 para el anillo utilizado en estos estudios.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO 2. Estructura de las proteínas. Distribución de las regiones hidrófobas e hidrofílicas.**Albúmina de suero bovino**

Puede observarse una distribución bastante homogénea de las regiones hidrofílicas e hidrófobas. Se ha reportado (Clarkson *et al.*, 1999) que en la interfase se presenta un desplegamiento, esto es una orientación de las zonas hidrófobas hacia el aceite y las zonas hidrofílicas hacia el agua.

Triacilglicerol lipasa



A diferencia de la BSA, la lipasa presenta una zona hidrofílica expuesta al solvente y en el interior de la estructura se encuentra la región hidrófoba. Presenta un sitio de actividad catalítica (el cual para el presente estudio fue inactivado) y un sitio de binding o sitio de reconocimiento del sustrato. Se sugiere un reconocimiento específico de éste sitio con el aceite, sin la posible ocurrencia de un desplegamiento de la proteína como en el caso de la BSA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN