



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Dispersión de aceite y aire en un tanque de mezclado bajo condiciones de potencia constante y concentraciones variables de surfactantes (proteína) y sólidos (biomasa micelar)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

I. Q. Diego Humberto Cuervo Amaya

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Enrique Galindo Fentanes

[Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Marcela Ayala Aceves

[Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.](#)

Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera

[Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.](#)

Ciudad de México, abril, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Ingeniería de Bioprocesos del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, bajo la asesoría del Dr. Enrique Galindo Fentanes y la asesoría técnica de la Dra. María Soledad Córdova Aguilar

Para la realización de este trabajo se contó con el financiamiento del CONACyT (proyectos 129676, 240438 y beca de maestría 226172) y de la DGAPA-UNAM (PAPIIT IT201014).

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al finalizar este trabajo quiero agradecer:

Al Dr. Enrique Galindo Fentanes, por persistir en su obra de enseñarnos a ver el bosque y no quedarnos en las ramas.

A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera y a la Dra. Marcela Ayala Aceves, miembros del Comité Tutor, por sus valiosos aportes y apoyo en este proceso de formación.

A los miembros del Comité Sinodal, porque su perspectiva ayudó a mejorar este trabajo y sus comentarios siempre me indicaron como continuar en este gran camino que es la ciencia.

Dr. Gabriel Corkidi Blanco

Dr. Edmundo Castillo Rosales

Dr. Jaime Arturo Pimentel Cabrera

Dr. Gabriel Ascanio Gasca

Dr. René Sanjuan Galindo

A los miembros del grupo Galindo, por sus comentarios en los seminarios y su acompañamiento en todo este ciclo. En especial a la Dra. Celia Flores Ocampo, el Dr. Leobardo Serrano Carreón, Leticia Díaz Aldama, la M. C. Alehlí Holguín Salas y a la Dra. Magdalena Brito.

A la Dra. Ana Muñoz y a los miembros de la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del IBt - UNAM, la Ing. Verónica Albiter Hernández, la QFB. Myriam Ortiz García y el Biol. Mario Alberto Caro Bermúdez, por su apoyo técnico.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A Dios, porque sus caminos son misteriosos y me permite seguirlos con el trabajo honesto de mis manos.

A Alan, por ser la alegría en mis días grises.

A Carlos Humberto, padre, mi mejor amigo, porque sustentas todo lo que soy.

A mi familia. Con la que nací y a aquella que los años me han dado. En especial a José Mendoza y Lilia Peralta.

A mi hermana Catherine, por sus recomendaciones.

A los grandes amigos que México me ha brindado y que me han acompañado lejos de casa: Itzel Gaytan, Rodolfo Valle, Francisco Gasteazoro, Maritza López, Ignacio Regla, Adrián Cristóbal, Monserrat Sandoval, Marco Asomoza, Emiliano Cantón, Jorge González Ríos, Nataly Bolaño y Uriel Mendoza.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	3
2	ANTECEDENTES	7
2.1	Sistemas multifásicos	7
2.1.1	Formación de estructuras	8
2.1.2	Efecto de la agitación	11
2.2	Producción de γ -decalactona por el hongo <i>Trichoderma harzianum</i> como modelo de estudio de sistemas multifásicos	13
2.3	Métodos experimentales empleados en la descripción de estructuras dispersas en tanques de mezclado.	15
2.3.1	Análisis de partículas por Anemometría de fase Doppler (PDA) o de diferencia en la fase Doppler.....	15
2.3.2	Velocimetría de partículas mediante imágenes (PIV).....	18
2.3.3	Micro-estereoscopia en 3D.	19
3	JUSTIFICACIÓN	23
4	OBJETIVOS	25
4.1	Objetivo general	25
4.2	Objetivos específicos.....	25
5	MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1	Producción y conservación de material de trabajo (biomasa) y su caracterización morfológica	26
5.1.1	Siembra en tubos inclinados	28
5.1.2	Siembra en cajas y preparación del inóculo	28
5.1.3	Cultivo en fermentador	29
5.1.4	Recuperación de biomasa	32
5.1.5	Concentración de biomasa.....	32
5.1.6	Caracterización morfológica del hongo	33
5.1.6.1	Preparación de la muestra	33

5.1.6.2	Toma de imágenes y segmentación.....	33
5.1.6.3	Morfología de los agregados micelares presentes en las pastas concentradas de biomasa.....	35
5.2	Caracterización fisicoquímica de los fluidos y mezclas de trabajo (concentración de proteína, tensión superficial y viscosidad).....	38
5.2.1	Determinación de proteína por el método de Lowry	38
5.2.2	Medición de tensión superficial e interfacial	38
5.2.2.1	Limpieza del material para la medición de propiedades de superficie	40
5.2.2.2	Tensión superficial	41
5.2.2.3	Tensión interfacial	42
5.2.3	Ensayos reológicos	43
5.3	Mediciones de potencia en la dispersión.....	46
5.4	Sistema de micro-estereoscopía para la adquisición de imágenes de la dispersión.	52
5.4.1	Tanque y condiciones de mezclado	52
5.4.2	Equipo de adquisición de imágenes.....	53
5.5	Análisis de imágenes estereoscópicas y tratamiento estadístico de los datos.....	57
5.5.1	Procesamiento de imágenes estereoscópicas	57
5.5.2	Tratamiento estadístico de tamaños de estructura (gotas y burbujas)	60
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
6.1	Contenido de proteína en las mezclas multifásicas.....	63
6.2	Caracterización reológica de las mezclas estudiadas.	64
6.3	Velocidades de agitación usadas para asegurar una potencia gaseada volumétrica (P_g/V) de 0.19 kW/m^3	66
6.3.1	Caracterización del equipo utilizado en la medición de potencia.	66
6.3.2	Potencia gaseada en sistemas con biomasa y proteína.....	68
6.4	Comportamiento de las tensiones de interfase.....	77
6.4.1	Tensión superficial agua – aire (σ_{W-A})	78
6.4.2	Tensión interfacial agua – aceite (σ_{W-O})	81

6.4.3	Tensión superficial aceite – aire (σ_{O-A})	81
6.5	Análisis de las imágenes adquiridas.....	82
6.6	Efecto de la biomasa y la proteína en la dispersión	87
6.6.1	Efecto del tamaño de los agregados del hongo en la dispersión.	87
6.6.2	Dispersión de aire libre.....	88
6.6.3	Dispersión de aceite	97
6.6.4	Características de las burbujas de aire incluidas en aceite	102
7	CONCLUSIONES	106
8	BIBLIOGRAFÍA	108
	ANEXO I: RESUMEN PRESENTADO EN EL XIV CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA.....	113
	ANEXO II: CARTEL PRESENTADO EN LA XXIII CONFERENCIA DEL FORO NORTEAMERICANO DE MEZCLADO (NAMF).....	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Imagen tipo de la dispersión trifásica característica del modelo de estudio de <i>T. harzianum</i> . Se muestra la imagen original en 2D y se ejemplifican las diferentes estructuras formadas. Imagen tomada en una mezcla de medio acuoso con aceite de ricino, aireación y sin biomasa.....	4
Figura 2.1. Deformación (A) y dispersión (B) de las fases dispersas por acción de los esfuerzos cortantes en la fase continua (τ_c). λ es el tamaño del remolino más pequeño o microescala de Kolmogorov.....	9
Figura 2.2. Fuerzas de resistencia a la deformación de una estructura de fase dispersa (gota o burbuja). A) Fuerza de resistencia debida a la tensión interfacial (σ). B) Resistencia a la deformación debida a la acción de la viscosidad (μ), expresada como un perfil de velocidades hipotético en el seno del fluido de la estructura.	10
Figura 2.3. Fenómenos de cambio de tamaño de estructuras de fases dispersas. A) Dispersión o rompimiento. B) Coalescencia. C) Suspensión.....	12
Figura 2.4. Esquema de la ubicación de los detectores, el emisor y el sistema de coordenadas usados en PDA. Adaptado de Papadopoulos y Arik (2004).	16
Figura 2.5. Diferencia de fase para dos estructuras de diferente diámetro en un sistema PDA. Adaptado de Papadopoulos y Arik (2004).	17
Figura 2.6. Esquema general de un sistema PIV clásico.	18
Figura 2.7. Perspectivas de dos posibles escenarios propuestos por la imagen en 2D de una dispersión: A) Inclusión de una burbuja en una gota de aceite; B) Solapamiento de la imagen de una burbuja de aire en frente de la imagen de una gota de aceite.	20
Figura 2.8. Modelo teórico del sistema de micro-estereoscopia. a) Vista superior del sistema; b) Vista lateral del sistema, mostrando un plano B que contiene al origen del sistema de coordenadas de la cámara izquierda y a la partícula en estudio (p_i). Tomado de Corkidi <i>et al.</i> (2008).	21

Figura 2.9. Esquema para la determinación de inclusiones de burbujas de aire (C ₂) en gotas de aceite (C ₁), teniendo en cuenta la tolerancia mínima de inclusión. Tomado de Corkidi <i>et al.</i> (2008).	22
Figura 5.1. Diagrama del flujo de información usado en este trabajo.....	27
Figura 5.2. Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> en tubos inclinados.	28
Figura 5.3. Esporulación de <i>Trichoderma harzianum</i> en cultivo en caja.	29
Figura 5.4. Micelio de <i>T. harzianum</i> visto con una magnificación de 4x.....	34
Figura 5.5. Agregado de micelio de <i>T. harzianum</i> seleccionado durante el análisis morfológico usando el <i>software</i> IPP.	34
Figura 5.6. Distribución de diámetros promedio de agregados de micelio de <i>T. harzianum</i> cultivados a diferentes potencias iniciales.	35
Figura 5.7. Distribución del porcentaje de circularidad de agregados de micelio de <i>T. harzianum</i> cultivados a diferentes potencias iniciales.	36
Figura 5.8. Curva patrón para determinar proteína por el método de Lowry.	39
Figura 5.9. Esquema del tensiómetro Tantec ST-PLUS utilizado para la medición de propiedades de superficie. Tomado y adaptado del manual original suministrado con el equipo.	39
Figura 5.10. Flameado de una placa de iridio - platino para su limpieza total antes de la medición de propiedades de superficie.	40
Figura 5.11. Esquema de la placa de iridio-platino arrastrando la interfase durante una medición de tensión superficial. La figura fue hecha exagerando la curvatura de la interfase para enfatizar el fenómeno.....	42
Figura 5.12. Determinación de tensión interfacial por el método de placa Wilhelmy (para estas fotografías se usó un fluido coloreado de baja densidad con fines demostrativos).	43
Figura 5.13. Esquema y dimensiones del impulsor helicoidal IH2 usado en la caracterización reológica.....	44
Figura 5.14. Par motor medido con el impulsor IH2 al agitar fluidos newtonianos con diferentes viscosidades.	45

Figura 5.15. Número de potencia (P_o) en función del número de Reynolds (Re); curva característica del sistema de impulsor helicoidal IH2 y vaso usados en este trabajo.	46
Figura 5.16. Sistema de motor y cojinete neumático usados en la medición de potencia.....	47
Figura 5.17. Componentes del sistema de medición de potencia.	49
Figura 5.18. Cojinete neumático.....	49
Figura 5.19. Esquema de dimensiones de los tanques utilizados para medir potencia volumétrica (A) y del sistema de micro-estereoscopía (B).	50
Figura 5.20. A) Burbujas de aire distorsionadas, vistas a través de un tanque cilíndrico. Tomado de Taboada <i>et al.</i> (2003). B) Burbujas vistas a través de una chaqueta con agua para corregir el efecto de la curvatura del tanque.	53
Figura 5.21. A) Ejemplo de imagen estereoscópica, B) canal cyan y C) estructuras presentes.	54
Figura 5.22. Sistema de micro-estereoscopía con cámaras no alineadas.	55
Figura 5.23. Guía para la calibración de los ejes horizontal y vertical de las cámaras.	56
Figura 5.24. Patrón de alineación de cámaras. Se giraron las cámaras para que sus ejes horizontales estuvieran alineados.	56
Figura 5.25. Separación de imágenes estereoscópicas, detallando la zona de visión en 3D. En este ejemplo se observa cómo la aplicación “Stereo v 4.0.” permite hacer corrección de altura para objetos segmentados en imágenes que no están alineadas verticalmente.	57
Figura 5.26 Limitante experimental de la técnica de micro-estereoscopía 3D. Solo las burbujas incluidas cercanas a la superficie proximal de la gota de aceite o aquellas en un primer plano pueden ser segmentadas sin interferencia.	59
Figura 6.1. Comportamiento reológico de mezclas conteniendo medio acuoso, micelio de <i>Trichoderma harzianum</i> (con proteína soluble asociada) y aceite de ricino 5 % v/v.	65

Figura 6.2. Curvas de potencia gaseada de la solución acuosa, usando dos tanques de igual diámetro, diferente altura y diferente separación entre las mamparas y la pared del tanque. Suministro de aire: 0.5 vvm..... 67

Figura 6.3. Evolución del número de potencia sin aireación por el difusor con respecto a distintas velocidades de agitación, para una turbina Rushton con relación $W/D = 4/21$, en el tanque B. A) Comportamiento típico para una turbina Rushton; B) Acercamiento para determinar el efecto de la aireación superficial sobre el suministro de potencia. 69

Figura 6.4. Evolución de la potencia gaseada (0.5 vvm) del medio acuoso con aceite de ricino (5 % v/v) a distintas concentraciones de proteína total y sin biomasa. Ensayo realizado en el tanque A. 70

Figura 6.5. Evolución de la potencia gaseada (0.5 vvm) del medio acuoso con aceite de ricino (5 % v/v) y 0.5 g/l de biomasa, a distintas concentraciones de proteína total. Ensayo realizado en el tanque A. 71

Figura 6.6. Evolución de la potencia gaseada (0.5 vvm) del medio acuoso con aceite de ricino (5 % v/v) y 5 g/l de biomasa, a distintas concentraciones de proteína total. Ensayo realizado en el tanque A. 72

Figura 6.7. Potencia gaseada volumétrica a 200 RPM y 0.5 vvm, de sistemas conteniendo biomasa y proteína a distintas concentraciones. Ensayo realizado en el tanque A con 5 % v/v de aceite de ricino. 73

Figura 6.8. Velocidad calculada de agitación necesaria para entregar una potencia gaseada volumétrica de 0.19 kW/m^3 a sistemas con una aireación de 0.5 vvm conteniendo biomasa y proteína total en distintas concentraciones. Datos de la Tabla 6.3, calculados con la Ecuación 6-1 con constantes de la Tabla 6.4 76

Figura 6.9. Influencia del aceite de ricino (5 % v/v) en la tensión superficial del medio acuoso a diferentes concentraciones de BSA. 78

Figura 6.10. Tensión superficial del medio acuoso “contaminado” con aceite a distintas concentraciones de proteína total y biomasa (para las concentraciones específicas de proteína ver la Tabla 6.2). 79

Figura 6.11. Comportamiento de la tensión superficial del medio acuoso (σ_{W-A}) con proteínas en mezclas con y sin aceite..... 80

Figura 6.12. Tensión interfacial agua - aceite (W-O) a distintas concentraciones de proteína total en la fase acuosa y diferentes concentraciones de biomasa..... 81

Figura 6.13. Tensión superficial del aceite de ricino luego de estar en contacto con soluciones acuosas conteniendo diferentes concentraciones de proteína total y diferentes concentraciones de biomasa. 82

Figura 6.14. Imágenes de micro-estereoscopía de una mezcla de medio acuoso y aceite (5 % v/v) con aireación (0.5 vvm). Magnificación 6 X. Cada imagen estereoscópica tiene debajo, en blanco y negro, su componente cian que permite observar a detalle las estructuras. ... 83

Figura 6.15. Imágenes de micro-estereoscopía de una mezcla de medio acuoso y aceite (5 % v/v) con aireación (0.5 vvm) y BSA. Magnificación 6 X. Cada imagen estereoscópica tiene debajo, en blanco y negro, su componente cian que permite observar a detalle las estructuras. ... 84

Figura 6.16. Imágenes de micro-estereoscopía de una mezcla de medio acuoso y aceite (5 % v/v) con aireación (0.5 vvm), proteína soluble y biomasa (0.5 g/l). Magnificación 6 X. Cada imagen estereoscópica tiene debajo, en blanco y negro, su componente cian que permite observar a detalle las estructuras. 85

Figura 6.17. Imágenes de micro-estereoscopía de una mezcla de medio acuoso y aceite (5 % v/v) con aireación (0.5 vvm), proteína soluble y biomasa (5 g/l). Magnificación 6 X. Cada imagen estereoscópica tiene debajo, en blanco y negro, su componente cian que permite observar a detalle las estructuras. 86

Figura 6.18. Diámetro Sauter (d_{32}) de burbujas de aire libres en sistemas conteniendo biomasa de diferentes lotes en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	88
Figura 6.19. Diámetro Sauter (d_{32}) de burbujas de aire libres a distintas concentraciones de biomasa y proteína en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	89
Figura 6.20. Distribución de probabilidad de número (DPN) de diámetros de burbujas libres en sistemas sin biomasa, con BSA y con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	90
Figura 6.21. Distribución de volumen acumulado de burbujas de aire libres en sistemas sin biomasa, con BSA y con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	91
Figura 6.22. Efecto de la presencia de biomasa en una concentración de 0.5 g/l en el tamaño de las burbujas de aire libre en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	93
Figura 6.23. Comparación de las distribuciones de volumen acumulado de burbujas de aire libres en mezclas con proteína y 0.5 g/l de biomasa, en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	94
Figura 6.24. Cambio en el diámetro Sauter de sistemas conteniendo 5 g/l de micelio y un duplicado (1.36 g/l de proteína) en el que se retiraron los sólidos. Con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	95
Figura 6.25. Distribuciones de Densidad de Probabilidad de Número (DPN) de burbujas de aire libres a diferentes concentraciones de proteína y biomasa. Comparación para sistemas con concentraciones altas de biomasa y con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	96
Figura 6.26. Distribución de volumen acumulado de burbujas de aire libres en sistemas conteniendo proteína y biomasa. Efecto de las concentraciones altas de biomasa. Sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).....	97

Figura 6.27. Diámetro Sauter (d_{32}) de gotas de aceite a distintas concentraciones de biomasa y proteína en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$)..... 98

Figura 6.28. Distribución de Densidad de Probabilidad de Número (DPN) de gotas de aceite en sistemas con biomasa y proteína. Efecto de la adición de biomasa en una concentración alta. Sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$). 101

Figura 6.29. Distribución de volumen acumulado de gotas de aceite en sistemas con biomasa y proteína. Efecto de la adición de biomasa en una concentración alta (5 g/l). Sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$)..... 101

Figura 6.30. Distribución de volumen acumulado de gotas de aceite en sistemas con biomasa y proteína. Efecto de la adición de biomasa en una concentración baja (0.5 g/l). Sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$). 102

Figura 6.31. Diámetro Sauter (d_{32}) de burbujas de aire incluidas en gotas de aceite a diferentes concentraciones de proteína en sistemas agitados a potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$)..... 103

Figura 6.32. Diámetro Sauter (d_{32}) de burbujas de aire incluidas en gotas de aceite a diferentes concentraciones de biomasa y proteína total en sistemas agitados a potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$). 104

Figura 6.33. Porcentaje de burbujas incluidas en gotas de aceite a diferentes concentraciones de biomasa y proteína en sistemas agitados a potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ W/m}^3$)..... 105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 5.1. Composición del medio mineral utilizado para la producción de <i>Trichoderma harzianum</i>	30
Tabla 5.2. Fuentes de nitrógeno de los cultivos de <i>T. harzianum</i> para la producción de esporas (lote 1) y biomasa (lote 2).	31
Tabla 5.3. Diferencias en las condiciones de operación de los lotes de fermentación.....	31
Tabla 5.4. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de los diámetros promedio de los agregados de micelio de <i>T. harzianum</i> de los lotes 1 y 2.	36
Tabla 5.5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de las circularidades de los agregados de micelio de <i>T. harzianum</i> de los lotes 1 y 2.	37
Tabla 5.6. Características de los fluidos utilizados en la caracterización del impulsor IH2	45
Tabla 5.7. Longitudes características del sistema tanque - agitador utilizado en la medición de potencia volumétrica (tanque A) y en el sistema de micro-estereoscopia (tanque B).	51
Tabla 6.1. Resultados de la determinación de proteína soluble en las pastas concentradas de biomasa usadas en este trabajo	63
Tabla 6.2. Composición de las mezclas analizadas en este trabajo. Todas con aceite de ricino (5 % v/v) y 0.5 vvm de aireación.....	64
Tabla 6.3. Velocidades de agitación (RPM) necesarias para suministrar una potencia de 0.19 kW/m ³ a un volumen de 6.7 l con diferentes concentraciones de proteína total y biomasa.	74
Tabla 6.4. Constantes para el cálculo de potencia en sistemas conteniendo biomasa y proteína en diferentes concentraciones. Siguiendo el modelo de la Ecuación 6-1: $P_g/V = a * N^b$. Siendo P_g/V : Potencia gaseada [kW.m ⁻³]; N: Velocidad de agitación [RPM]; a: constante de ajuste [(kW.min.m ⁻³) ^b] y b: constante de ajuste [-].....	75
Tabla 6.5. Propiedades físicas de los fluidos utilizados en las dispersiones.	99

NOMENCLATURA

- a Constante de ajuste regresión potencial [(kW.min.m⁻³)^b]
- *ANOVA* Análisis de Varianza.
- B Ancho de la mampara en un tanque de agitación [m]
- b Constante de ajuste regresión potencial [-]
Brazo de palanca [m]
- *BSA* Albúmina de Suero Bovino.
- C Distancia entre el impulsor y el fondo del tanque de agitación [m]
- C_F Distancia entre el difusor de aire y el impulsor en el tanque de agitación [m]
- C_L Largo de las paletas del impulsor que está afuera del disco [m]
- C_m Distancia entre las mamparas y la pared del tanque de agitación [m]
- C_n Coordenadas del centro del lente de la cámara “n” en el sistema de micro-estereoscopía en 3D.
- C_T Distancia entre las mamparas y el fondo del tanque de agitación [m]
- *CABI* Centro Internacional para la Agricultura y los Bioprocesos.
- *CCD* Dispositivo de Carga Acoplada.
- D Diámetro del impulsor [m]
- D_D Diámetro del disco del impulsor [m]
- *DPN* Densidad de Probabilidad de Número.
- D_{xyz} Distancia euclídea entre el centro de una gota y una partícula que tiene incluida (en su interior) [m]
- d Diámetro [m]
- $d_{32}, d_{3,2}$ Diámetro promedio Sauter [m]
- d_j Diámetro de la clase “j” en estadística descriptiva.
- E Trabajo [J]
- e Grosor de la hélice de un impulsor helicoidal [m]
- F Estadístico de la distribución de probabilidad de Fisher usado en el *ANOVA*.

	Fuerza	[N]
• Fr	Número de Froude	[-]
• f	Distancia focal de las cámaras en el sistema de micro-estereoscopía. Frecuencia de clase en estadística descriptiva.	
• $f_{r,j}$	Frecuencia relativa de la clase “j” en estadística descriptiva.	
• g	Aceleración de la gravedad	[m.s ⁻²]
• h	Altura total de las hélices de un impulsor helicoidal	[m]
• H_L	Altura del líquido en el tanque de agitación	[m]
• H_T	Altura del tanque de agitación	[m]
• i	Intervalo de clase en estadística descriptiva	
• IH2	Impulsor Helicoidal de dos aspas usado para ensayos reológicos.	
• IMI	Instituto Micológico Internacional, actualmente CABI.	
• IPP	<i>Image Pro Plus (software).</i>	
• j	Variable para contar clases en estadística descriptiva.	
• K	índice de consistencia de la ley de potencia	[Pa.s ⁿ]
• k_{La}	Coeficiente de transferencia de oxígeno	[h ⁻¹]
• L	Largo de las paletas del impulsor	[m]
• M	Par motor	[N.m]
	Ancho de las mamparas del tanque de agitación	[m]
• m	Número total de clases en estadística descriptiva.	
• N	Velocidad de agitación	[RPM], [s ⁻¹]
• Na	Número de aireación	[-]
• n	Índice de flujo de la ley de potencia	[-]
	Tamaño de muestra en estadística descriptiva	
• P	Potencia	[kW/m ³]
• P_0	Potencia no gaseada	[kW/m ³]
	Número de potencia	[-]
• P_g	Potencia gaseada	[kW/m ³]
• p_i	Partícula de interés.	
• PDA	Análisis de Partículas por Anemometría de fase Doppler.	

NOMENCLATURA

- PIV Velocimetría de Partículas mediante Imágenes.
- P_u Potencia no gaseada [kW/m³]
- R_n Radio de la partícula “n” [m]
- Re Número de Reynolds [-]
- RPM Revoluciones Por Minuto [min⁻¹]
- s Altura de un giro completo de la hélice de un impulsor helicoidal [m]
- T Diámetro del tanque de agitación [m]
- Tiempo [s]
- V Volumen [m³]
- V_j Volumen de la clase “j”.
- % v/v Concentración en porcentaje de volumen de fase dispersa por volumen de fase continua [%]
- v_{vm} Flujo volumétrico de gas por unidad de volumen de líquido por minuto [m³_{gas}·m⁻³_{liq}·min⁻¹]
- W Ancho de la hélice del impulsor [m]
- Alto de las paletas del impulsor [m]
- X Eje en un sistema de coordenadas
- Ancho del disco del impulsor [m]
- Diámetro de partícula [m]
- $X_{vol,j}$ Fracción de volumen total acumulado hasta la clase “j” [-]
- x Componente en el eje X del centro de una partícula.
- x_j Fracción del volumen total contenida en la clase “j” [-]
- Y Eje en un sistema de coordenadas
- y Componente en el eje Y del centro de una partícula.
- Z Eje en un sistema de coordenadas
- z Componente en el eje Z del centro de una partícula.

Letras griegas

• ε	Velocidad de disipación de energía	[m ² .s ⁻³]
	Umbral de inclusión para estructuras dentro de gotas	[-]
• θ	Ángulo entre los láseres emisores en PDA	[°]
	Ángulo entre las cámaras del sistema de micro-estereoscopia	[°]
• λ	Microescala de Kolmogorov	[m]
• μ	Viscosidad absoluta	[Pa.s]
• ν	Viscosidad cinemática	[m ² .s ⁻¹]
	Velocidad de partícula	[m.s ⁻¹]
• π	Marco de referencia en una de las imágenes 2D componentes del sistema de micro-estereoscopia en 3D.	
• ρ	Densidad	[kg.m ⁻³]
	Resistividad	[Ω.cm]
• σ	Tensión superficial o interfacial	[N.m ⁻¹]
	Desviación estándar.	
• τ	Esfuerzo de corte	[Pa]
• φ	Ángulo entre las sondas emisora y receptora en PDA	[°]
• ϕ	Diámetro de orificio de difusor de aire	[pulg]
• ψ	Ángulo entre los fotodetectores en PDA	[°]
• ω	Velocidad angular	[rad.s ⁻¹]

RESUMEN

Con la finalidad de estudiar los efectos que tienen las tensiones de interfase y la presencia de sólidos complejos en la dispersión de fluidos (gases y líquidos), en sistemas multifásicos, se simuló la fermentación multifásica para producción de γ – decalactona, por el hongo *Trichoderma harzianum*, en un tanque de mezclado. Esta fermentación se caracteriza por tener hasta cuatro fases (medio acuoso, aceite de ricino, aire y sólidos de biomasa micelar). En este sistema se presentan estructuras dispersas complejas, tales como gotas de aceite con burbujas de aire y gotas de agua en su interior (inclusiones), además de burbujas de aire libres. Se usó un sistema de micro – estereoscopía (3D) y de análisis de imágenes, para medir el tamaño de las gotas de aceite y de las burbujas de aire (libres e incluidas en el aceite) cerca a la pared del tanque. Las imágenes en 3D permitieron ubicar y diferenciar las burbujas incluidas.

El suministro de potencia se mantuvo constante modificando la velocidad de agitación en todas las mezclas estudiadas, debido a que tiene gran efecto sobre el tamaño de las gotas de aceite y burbujas de aire dispersas. Se encontró que la adición de proteína soluble generó una caída del 13 % en la tensión superficial de las burbujas de aire, lo que dio lugar a una disminución del diámetro promedio Sauter (d_{32}) del 36 % de las burbujas; el agregar biomasa en una concentración alta (5 g/l) generó una caída 66 % en el d_{32} . Por otra parte, las gotas de aceite no respondieron a los cambios en la tensión interfacial (disminución del 26 %); pero tuvieron un aumento del 20 % en su d_{32} en las mezclas que contenían biomasa sin importar su concentración. Se obtuvieron porcentajes de inclusión de burbujas de aire en gotas de aceite de máximo el 21 %, valor bajo cuando se le compara con el 60 % reportado en otros trabajos donde no se controló la potencia.

Este tipo de comportamiento se describe por primera vez en este trabajo, para un sistema multifásico, en la zona de descarga del impulsor, la cual se caracteriza por ser de alta energía. Se concluye que, a potencia constante, la dispersión de la fase gaseosa depende de la tensión superficial; que la dispersión de líquidos no se ve afectada por los cambios en la tensión interfacial, pero si a los sólidos suspendidos.

ABSTRACT

In order to study the effects of interphase tensions and the presence of complex solids in the dispersion of fluids (gases and liquids), in multiphase systems, the γ – decalactone – production multiphase – fermentation, by the fungus *Trichoderma harzianum*, was simulated in a mixing tank. This fermentation is characterized by up to four mixed phases (aqueous medium, castor oil, air and mycelial biomass solids). In this system complex dispersed structures are presented, such as oil droplets with air bubbles and water droplets inside them (inclusions), also free air bubbles. A micro – stereoscopy (3D) and image analysis system was used to measure the size of oil bubbles and air bubbles (free and included in oil ones), close to tank wall. 3D images allowed to locate and differentiate included bubbles.

The power supply was kept constant by changing the stirring speed in all mixtures studied, because it has large effect on the size of the dispersed oil droplets and air bubbles. It was found that an addition of soluble protein caused a drop of 13 % in the surface tension of the air bubbles, this change made a decrease of 36 % in the air bubbles Sauter mean diameter (d_{32}); biomass addition at a high concentration (5 g / l) generated a 66 % fall in d_{32} . Moreover, the oil droplets did not respond to changes in interfacial tension (26% decrease); but they had an increase of 20% on their d_{32} in mixtures containing biomass regardless of its concentration. 21 % was the maximum percentage of air bubbles included on oil droplets, which is low compared to 60 % reported in other studies where power was not controlled.

This kind of behavior in a multiphase system is described for the first time in this work, in the impeller discharge area, which is characterized because it is a high energy dissipation area. It was concluded that, at constant power, dispersion of the gas phase depends on surface tension; the dispersion of liquids is not affected by changes in the surface tension, but it is affected by the presence suspended solids.

1 INTRODUCCIÓN

En la industria se encuentran procesos en los que se debe poner en contacto dos o más fases con el fin de obtener un producto de interés. Las fermentaciones aeróbicas sumergidas son ejemplos de estos sistemas de múltiples fases, ya que involucran la dispersión de aire y biomasa en un medio acuoso. La disponibilidad de sustratos, vista como la transferencia de masa en fases e interfases, es el factor que controla estos procesos, por lo que se hace necesario estudiar la transferencia de masa y el comportamiento de las fases para diseñar mejores estrategias de operación. Es así como se estudia el cambio en los diámetros de estructura (gotas o burbujas) de las fases involucradas como función de las condiciones de operación, ya que dependiendo de los diámetros de la población de estructuras se tendrá una mayor o menor área de transferencia y como consecuencia una mayor o menor velocidad final de transferencia de masa.

En algunas fermentaciones se adiciona un líquido inmiscible para retirar un metabolito que resulta tóxico para el microorganismo. Tal es el caso de la fermentación en la que se utiliza el hongo *Trichoderma harzianum* para la producción de γ -decalactona (compuesto orgánico con aroma a durazno), en la cual se adiciona aceite de ricino como fuente de carbono y para extraer la γ -decalactona porque es tóxica para el hongo en altas concentraciones (Serrano-Carreón *et al.*, 1997). Este es un proceso complejo de fermentación que involucra cuatro fases: medio acuoso, aceite, aire y biomasa.

Estudios con mezclas que simulan la fermentación de *T. harzianum* para la producción de γ -decalactona (Lucatero *et al.*, 2003; Pulido-Mayoral y Galindo, 2004) han demostrado que las concentraciones de biomasa y proteína (el género *Trichoderma* es un gran productor de proteína extracelular, Mach y Zeilinger, 2003)

son factores que modifican el tamaño de partícula de las fases dispersas (burbujas de aire, gotas de aceite y gotas de agua en aceite). Estos estudios utilizaron técnicas de análisis de imágenes en 2D y no contemplaron la presencia de biomasa y proteína al mismo tiempo.

Galindo *et al.* (2000) utilizaron un sistema de toma y análisis de imágenes en 2D para describir el comportamiento de la dispersión de aceite y aire en el modelo de la fermentación de *T. harzianum*. Midieron gotas de aceite y burbujas de aire con diámetros en un intervalo de 40 a 5,000 μm . Describieron que las burbujas de aire podían encontrarse dispersas en el medio acuoso (denominadas libres) y/o dentro de las gotas de aceite (denominadas incluidas) (Figura 1.1). Pulido-Mayoral y Galindo (2004), estudiaron el efecto que la inclusión de burbujas de aire en gotas de aceite tenía en el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_{\text{L}a}$); encontraron que a mayor porcentaje de inclusión (respecto de las burbujas totales) el valor del $k_{\text{L}a}$ aumentaba.

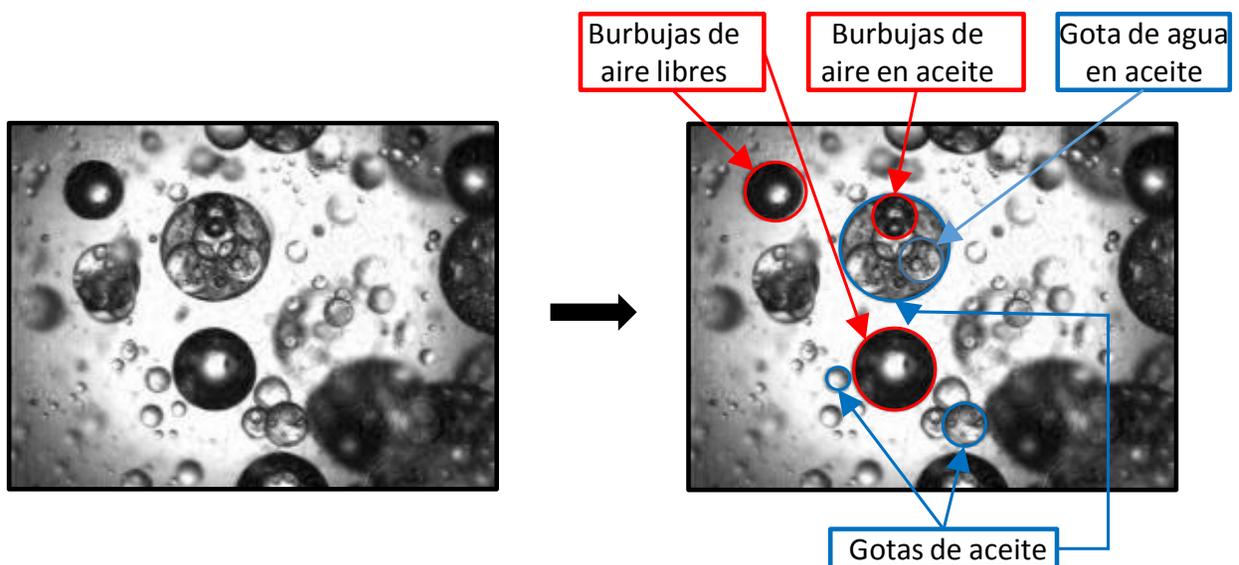


Figura 1.1. Imagen tipo de la dispersión trifásica característica del modelo de estudio de *T. harzianum*. Se muestra la imagen original en 2D y se ejemplifican las diferentes estructuras formadas. Imagen tomada en una mezcla de medio acuoso con aceite de ricino, aireación y sin biomasa.

Por su parte, el micelio disperso (fresco) del hongo modifica las características de la mezcla al producir una mayor dispersión del aceite en la fase continua (acuosa) (Córdova-Aguilar *et al.*, 2001); un aumento en la concentración de la biomasa micelar hace que las gotas de aceite sean más grandes y las burbujas de aire más pequeñas (Lucatero *et al.*, 2003). También modifica, cuando está fresco, las propiedades reológicas del caldo de fermentación, al aumentar el índice de consistencia, K , y disminuyendo el índice de flujo ($n < 1$), lo cual genera un fluido pseudoplástico (Godoy, 1998). A su vez, la proteína modifica la tensión superficial al migrar a las interfases, cambiando la resistencia de las mismas a la deformación (Zhou & Kresta, 1998) y, al aumentar su concentración, hace que tanto gotas de aceite como burbujas disminuyan de tamaño (Pulido-Mayoral y Galindo, 2004).

Adicionalmente al efecto que tienen sobre las estructuras dispersas los cambios en la tensión de las interfases y los sólidos suspendidos (cuando están presentes), el efecto de la energía entregada al sistema, interpretada como el suministro de potencia, es de mayor relevancia. Maaß *et al.* (2011) observaron la disminución del diámetro promedio Sauter (d_{32}) de gotas de tolueno dispersas en agua, acorde con una relación $d_{32} \sim (P/V)^{-0.07}$, cuando se les medía en un punto intermedio entre la punta del impulsor y la pared del tanque de mezclado. Ello indicaba que el aumento de la potencia generaba gotas más pequeñas. Zhou y Kresta (1998) reportaron que, para sistemas en los que la fracción de la fase dispersa se mantiene constante, el aumento en el suministro de energía se traduce en la generación de una mayor área superficial total, concomitante con una disminución de los diámetros de las estructuras de la fase dispersa. La energía aplicada al fluido, considerada en este trabajo como potencia volumétrica gaseada (P_g/V), cambia los diámetros de las estructuras y se transforma en nueva área de transferencia.

La complejidad de las interacciones entre fases (agua, aceite, aire y biomasa), hace de la fermentación de *T. harzianum* un buen modelo de estudio de los sistemas

multifásicos. Con el objetivo de comprender mejor la respuesta de este modelo a los cambios de concentración de sólidos suspendidos y en las tensiones de interfase, en este trabajo se estudió - a potencia constante - la dispersión del aceite y el aire en presencia de micelio del hongo y proteína. Se manipuló la velocidad de agitación para tener la misma potencia en todas las mezclas, de tal forma que se pudiera evaluar independientemente el efecto de otros parámetros (la proteína soluble – como surfactante – y los sólidos que constituyen la biomasa micelar) sobre los tamaños de las gotas de aceite y de las burbujas de aire. Se empleó una técnica de micro-estereoscopía (3D) para la adquisición y análisis de imágenes de la dispersión, que permitió discernir entre las burbujas incluidas y las libres, al ubicarlas en el espacio tridimensional. Ello no es posible de hacer, sin un alto grado de error, con imágenes 2D. El tamaño de las estructuras que se formaban, incluyendo las complejas (burbujas de aire dentro de gotas de aceite), se pudo medir sin dificultad en el medio líquido que se agitaba.

En este trabajo se caracterizaron los tamaños de estructura de las fases dispersas a la disminución de los valores de las tensiones de interfase debidos al aumento en la concentración de proteína; el aumento en la concentración de sólidos suspendidos (biomasa) y los cambios, por primera vez descritos en detalle para este modelo de estudio, en el comportamiento de la potencia gaseada debidos al aumento en las concentraciones de proteína y biomasa. Este trabajo es un aporte encaminado a mejorar el conocimiento del modelo de estudio de *T. harzianum*, para permitir el diseño de mejores estrategias de escalamiento y de operación en sistemas multifásicos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Sistemas multifásicos

En distintas actividades industriales se utilizan procesos que involucran la dispersión de dos o más componentes que son inmiscibles, esto significa que debido a su insolubilidad tienden a separarse en ausencia de un esfuerzo que los mezcle.

Ejemplos de estos procesos se encuentran en la industria alimentaria (estabilización de emulsiones, Romero *et al.*, 2008), la biotecnológica (producción de antibióticos, Choi *et al.*, 2008), producción de aromas (Serrano-Carreón *et al.*, 1997), la química (catálisis heterogénea, Avhad & Marchetti, 2016, Aziz *et al.*, 2015; producción de polímeros en suspensión, Kittiwattanakul *et al.*, 2015), la ambiental (tratamiento de aguas residuales), entre otras. Algunas de las técnicas utilizadas para lograr la homogeneidad de la mezcla, que permiten incrementar la productividad o rendimiento del producto de interés, son (Godoy, 1998): la agitación mecánica (utilizando impulsores como la turbina Rushton), la hidráulica (al hacer pasar un chorro de líquido por una boquilla a alta velocidad, flujo jet) y la neumática (promovida por el ascenso de burbujas de aire, característica de las columnas de burbujeo).

El objetivo de mezclar las fases en un sistema multifásico es promover su contacto (Corkidi *et al.*, 2008). Una mayor área de contacto entre las fases favorece los fenómenos de transferencia de masa o la estabilidad de la suspensión. La agitación produce el rompimiento de las películas interfaciales, lo que da lugar a la formación de burbujas (sistemas gas-líquido) y gotas (sistemas líquido-líquido). El tamaño promedio de estas estructuras (burbujas o gotas), las interacciones entre los componentes del sistema y los parámetros hidrodinámicos, definen la velocidad de transferencia de masa o la estabilidad del sistema según sea el caso. El tamaño de las estructuras se puede disminuir si se agita más rápidamente (Maaß, 2011) o, en el caso de sistemas columnas de burbujeo, se disminuye el tamaño del orificio del

dispersor. Esto genera mayores consumos de potencia en la agitación mecánica y caídas de presión más altas, para el caso de la agitación neumática. El conocimiento de la respuesta de las estructuras (burbujas de aire y gotas de fases líquidas) a las variables fisicoquímicas y de proceso del sistema puede permitir el diseño de mejores estrategias de escalamiento y de operación.

2.1.1 Formación de estructuras

En los sistemas multifásicos, la agitación promueve de distintas formas el rompimiento (dispersión) de las estructuras, reduciendo el diámetro de gotas y burbujas. El alcance de perturbación de la agitación se limita a un tamaño mínimo de estructura determinado por el balance de las fuerzas que se ejercen sobre la estructura. A su vez, la coalescencia genera nuevas estructuras de mayor tamaño.

A continuación, se presenta un ejemplo teórico sobre los mecanismos de la formación de estructuras, que permita al lector familiarizarse con los parámetros que afectan el tamaño de las estructuras a pequeña escala.

La microescala de Kolmogorov (λ) es una medida del diámetro del remolino más pequeño que se forma debido al mezclado (Kresta, S. & Brodkey, R., 2004; Kolmogorov, 1991) y que puede romper las estructuras de la fase dispersa. La microescala relaciona la velocidad de disipación de energía (ε) y la viscosidad cinemática (ν) del fluido estudiado con el tamaño mínimo de perturbación (remolino) que se presenta en un sistema isotrópico:

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad 2-1$$

Las estructuras que tengan un diámetro menor a λ solo se suspenden sin cambio de tamaño; por otra parte, las de mayor diámetro se someten a deformación y dispersión (Figura 2.1).

La fuerza que generan los remolinos de la fase continua, es un esfuerzo de corte (τ_c) y se puede describir utilizando una de las suposiciones de la teoría de la isotropía local de Kolmogorov (Leng y Calabrese, 2004):

$$\tau_c \approx \rho_c \varepsilon^{2/3} d^{2/3} \quad 2-2$$

Siendo τ_c : esfuerzo de corte de la fase continua; ρ_c : densidad de la fase continua; ε : velocidad de disipación de energía y d : diámetro de la estructura sujeta a deformación.

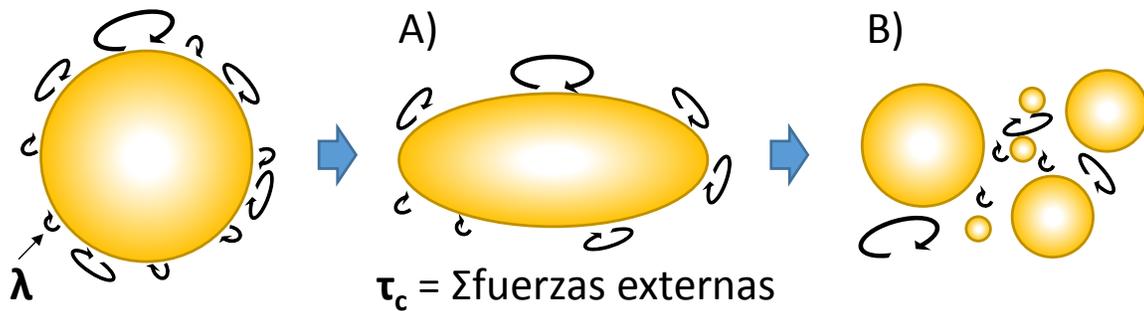


Figura 2.1. Deformación (A) y dispersión (B) de las fases dispersas por acción de los esfuerzos cortantes en la fase continua (τ_c). λ es el tamaño del remolino más pequeño o microescala de Kolmogorov.

Los fluidos de las fases dispersas (gotas o burbujas) a su vez ejercen resistencia a la deformación. Las fuerzas que mantienen la integridad de las estructuras (la tensión superficial en la superficie y la viscosidad en el seno del líquido) deben ser mayores al esfuerzo de la fase continua que promueve la microescala (τ_c), para que no se presente deformación y rompimiento de la estructura.

La fuerza de resistencia debida a la tensión superficial (Figura 2.2.A) está dada por:

$$\tau_s \approx \frac{\sigma}{d} \quad 2-3$$

Siendo τ_s : resistencia debida a la tensión superficial de la fase dispersa y σ : tensión superficial.

Y la debida a la viscosidad del líquido (Figura 2.2.B):

$$\tau_d \approx \mu_d \frac{(\tau_c / \rho_d)^{1/2}}{d} \quad 2-4$$

Siendo τ_d : resistencia debida a la viscosidad de la fase dispersa; μ_d : viscosidad de la fase dispersa; τ_c : esfuerzo de corte de la fase continua y ρ_d : densidad de la fase dispersa.

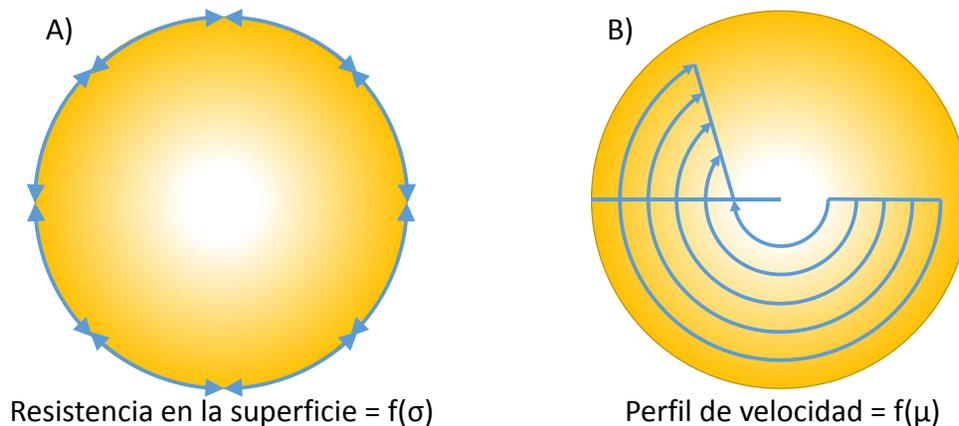


Figura 2.2. Fuerzas de resistencia a la deformación de una estructura de fase dispersa (gota o burbuja). A) Fuerza de resistencia debida a la tensión interfacial (σ). B) Resistencia a la deformación debida a la acción de la viscosidad (μ), expresada como un perfil de velocidades hipotético en el seno del fluido de la estructura.

Un balance de fuerzas permite calcular, teóricamente, el diámetro de estructura máximo para el cual no hay dispersión (rompimiento) ($\Sigma\tau_n=0$). Cualquier estructura con un diámetro mayor a este máximo estará sujeta a deformación, por otro lado, si

su diámetro es menor que el máximo calculado, solo se dispersará sin sufrir cambio de tamaño.

$$\tau_C = \tau_S + \tau_d$$

2-5

Los planteamientos de microescala de Kolmogorov, usados aquí de manera didáctica para ejemplificar la importancia de las propiedades fisicoquímicas sobre tamaño de estructuras dispersas, sólo es aplicable en sistemas isotrópicos, por lo cual las características de no homogeneidad en los tanques de mezclado implican que su aplicación sea limitada o local. Un tanque de mezclado se puede considerar como un conjunto de espacios diferenciales isotrópicos, pero juntos no conservan las condiciones de isotropía; es por esto que las teorías ampliadas en que se consideran parámetros de no homogeneidad, como el tiempo de circulación, correlacionan mejor los datos de tamaño de partícula en todo el tanque de mezclado, aunque describan en promedio un fenómeno que sucede a través de varios segmentos de espacio isotrópicos. El tiempo de circulación funciona como parámetro que engloba los efectos de la anisotropía.

2.1.2 Efecto de la agitación

La influencia del mezclado suele estudiarse en sistemas de dos fases (sólido-líquido, gas-líquido o líquido-líquido). En las mezclas que contienen sólidos, generalmente se busca suspenderlos y que no sedimenten acumulándose en el fondo (Atiemo-Obeng *et al.*, 2004). Generalmente se relacionan los cambios observados con las propiedades de la fase continua por su facilidad de medición; ejemplos de esto pueden ser los cambios en la viscosidad y la tensión superficial. En general se ignoran los cambios en las propiedades de la fase dispersa, los cuales son de igual relevancia cuando se estudia el mezclado. Ejemplos de esto son el cambio en la concentración de un líquido inmiscible durante el proceso, cambio en

la tensión interfacial y superficial de las fases dispersas, cambios de tamaño de estructuras dispersas debidos a efectos de la fisicoquímica.

Las estructuras de las fases dispersas (gotas y burbujas) formadas por efecto de la agitación tienen diversos tamaños. La distribución de estos tamaños es determinada por la dinámica establecida entre los fenómenos de dispersión y coalescencia (Leng y Calabrese, 2004). La dispersión (Figura 2.3.A), que está relacionada con el rompimiento de las estructuras, es determinada por el esfuerzo cortante en la fase continua y los choques con el agitador, las mamparas y las paredes del tanque. La coalescencia (Figura 2.3.B) se da cuando dos o más estructuras, de la misma fase, se unen en una sola y es afectada en gran medida por la presencia de agentes de actividad superficial (surfactantes, Langevin, 2015) y de sólidos en el sistema (Binks *et al.*, 2005). También hay una fracción de las estructuras que no cambia su tamaño y se distribuyen por todo el tanque, debido a la agitación y se considera que solamente están suspendidas (Figura 2.3.C).

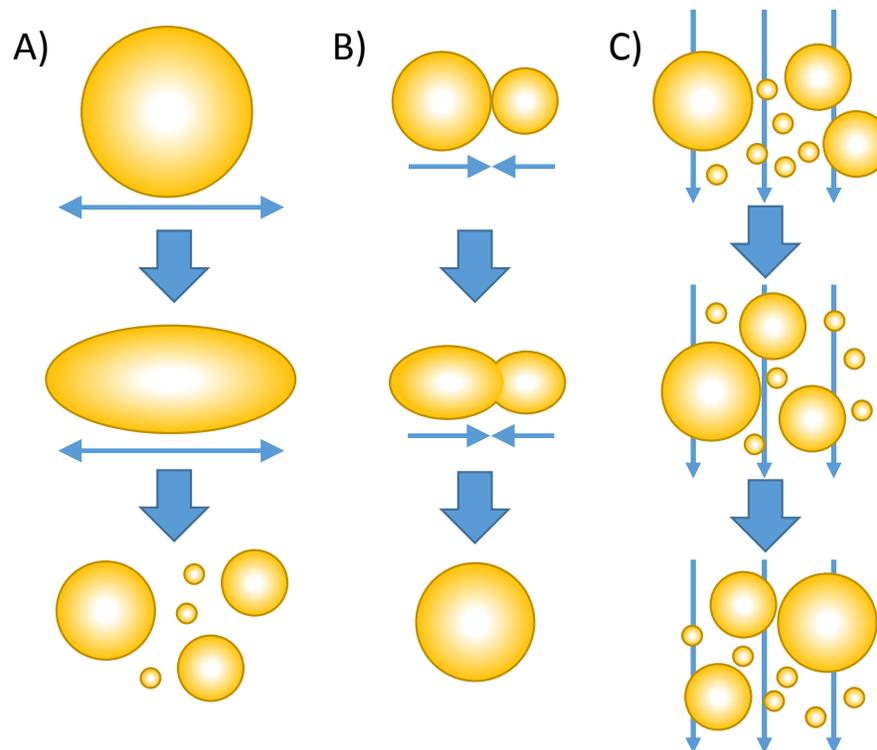


Figura 2.3. Fenómenos de cambio de tamaño de estructuras de fases dispersas. A) Dispersión o rompimiento. B) Coalescencia. C) Suspensión.

2.2 Producción de γ -decalactona por el hongo *Trichoderma harzianum* como modelo de estudio de sistemas multifásicos

Los hongos filamentosos del género *Trichoderma* son utilizados con distintos fines, entre los que se encuentran la producción de hidrolasas (celulasas, hemicelulasas y xilanasas) (Mach y Zeilinger, 2003), la producción de aromas (Serrano-Carreón et al., 1997) y el control biológico.

Entre las moléculas aromáticas secretadas por *T. harzianum* se encuentra la γ -decalactona. Este compuesto se produce cuando se utiliza aceite de ricino como fuente de carbono y tiene olor característico a durazno. La dispersión de fases involucrada en esta fermentación tiene un comportamiento complejo:

- Por el contenido de sales de la fase continua, se modifican los patrones de coalescencia de las fases dispersas.
- La dispersión del aceite implica el tratamiento de una fase viscosa, que desde el punto de vista de la formación de estructuras se comporta de manera compleja al formar gotas con inclusiones de las otras fases.
- La presencia de micelio del hongo modifica las características reológicas del caldo, haciéndolo pseudoplástico y altera con ello los patrones de dispersión (Godoy, 1998) y coalescencia.
- Las proteínas extracelulares cambian los valores de tensión interfacial afectando los tamaños de las estructuras.
- El aire ve modificada su distribución de tamaños y su retención en el sistema (*hold up*) debido a los cambios de tensión superficial y la presencia de sólidos; es interesante estudiar todo el sistema con la finalidad de entender la dinámica de formación de estructuras a la que están sujetas las fases dispersas.

Galindo *et al.*, (2000) describieron que, en el sistema modelo de *T. harzianum*, las gotas de aceite tenían en su interior burbujas de aire y gotas de agua. La existencia de estas gotas multifásicas implica un sistema complejo de transferencia de masa.

Por ejemplo, para el oxígeno consistiría en: paso de la burbuja de aire incluida al aceite, del aceite a la fase acuosa y, finalmente, de la disolución acuosa al micelio.

Utilizando una técnica invasiva (consistente en la toma de una alícuota de la mezcla en un punto de estudio en el tanque de agitación) y caldo agotado de fermentación como fase acuosa, Córdova-Aguilar *et al.* (2001) reportaron que la presencia de biomasa aumenta el porcentaje de aceite suspendido, con respecto al sistema sin hongo, debido al arrastre de aceite por el micelio.

Por su parte, Larralde-Corona *et al.* (2002), utilizando una técnica de adquisición y análisis de imágenes en 2D, observaron que la presencia de micelio influye en la reducción del tamaño de las burbujas de aire y que el volumen de las burbujas incluidas en gotas de aceite puede llegar a ser el 60 % del volumen total de aire en el sistema. Con la misma técnica de análisis de imágenes en dos dimensiones, Lucatero *et al.* (2003) reportaron que, a concentraciones altas del hongo, el tamaño de las gotas de aceite también disminuye y el número de inclusiones (burbujas de aire y gotas de agua dentro de gotas de aceite) aumenta, cuando se les compara con los tamaños medidos para el sistema que no contenía biomasa. Estas observaciones indican que la presencia de biomasa genera mayor área de transferencia, tanto en las gotas de aceite como en las burbujas de aire. La disminución de tamaños y el aumento de las inclusiones coincide con las observaciones hechas para caldos de fermentación conteniendo aceite en los que el coeficiente de transferencia de oxígeno, k_{La} , aumenta cuando se comparan con mezclas sin aceite (Galindo *et al.*, 2000).

El efecto de la proteína en la dispersión de aceite y aire se ha simulado utilizando albúmina bovina como proteína soluble (la albúmina se utiliza como proteína patrón en estudios del comportamiento de interfases, Pezennec *et al.*, 2000), obteniendo como resultado una disminución en el diámetro Sauter (d_{32}) de las gotas de aceite ($d_{32} \sim 1,150 - 550 \mu\text{m}$) y las burbujas de aire ($d_{32} \sim 1100 - 380 \mu\text{m}$) al aumentar la concentración de proteína de cero a 0.5 g/l; además se observó un aumento en el número de inclusiones (del 15 % al 30 % del total de burbujas) con el mismo cambio de concentración en la proteína (Pulido-Mayoral y Galindo, 2004). Los menores

tamaños de las estructuras, se atribuyeron a una disminución de la tensión superficial del sistema e indujeron un aumento en la transferencia de oxígeno (verificado con mediciones de k_{La}).

2.3 Métodos experimentales empleados en la descripción de estructuras dispersas en tanques de mezclado.

Los métodos experimentales para la medición de estructuras pueden ser clasificados como invasivos, los cuales requieren tomar una muestra de la mezcla para luego estudiarla en un entorno externo al sistema de mezclado; o como no invasivos, en los cuales se toman imágenes o se adquieren datos de la dispersión desde el exterior, sin perturbar la libre evolución de las estructuras durante el ensayo. La técnica usada en este trabajo, micro-estereoscopía en 3D, se clasifica como semi-no-invasiva, ya que no toma muestras de la mezcla, pero algunos de sus equipos (sonda de luz) se introducen en el tanque de mezclado, lo que podría perturbar el flujo. Este método es particularmente útil en sistemas complejos de múltiples fases

A continuación, se describen algunas técnicas no invasivas reportadas en la literatura, que ayudan a apreciar la complejidad de medir los tamaños de las estructuras dispersas en el sistema modelo de *T. harzianum*.

2.3.1 Análisis de partículas por Anemometría de fase Doppler (PDA) o de diferencia en la fase Doppler.

Esta técnica utiliza dos haces de láser para medir las velocidades y los tamaños de las partículas que atraviesan un volumen de la dispersión estudiada donde los dos convergen (Papadopoulos y Arik, 2004) (Figura 2.4). Los dos láseres emisores tienen una misma frecuencia, al incidir y reflectarse o refractarse en las estructuras

en movimiento, sufren un cambio de frecuencia, percibido desde los detectores. Este fenómeno se conoce como efecto Doppler.

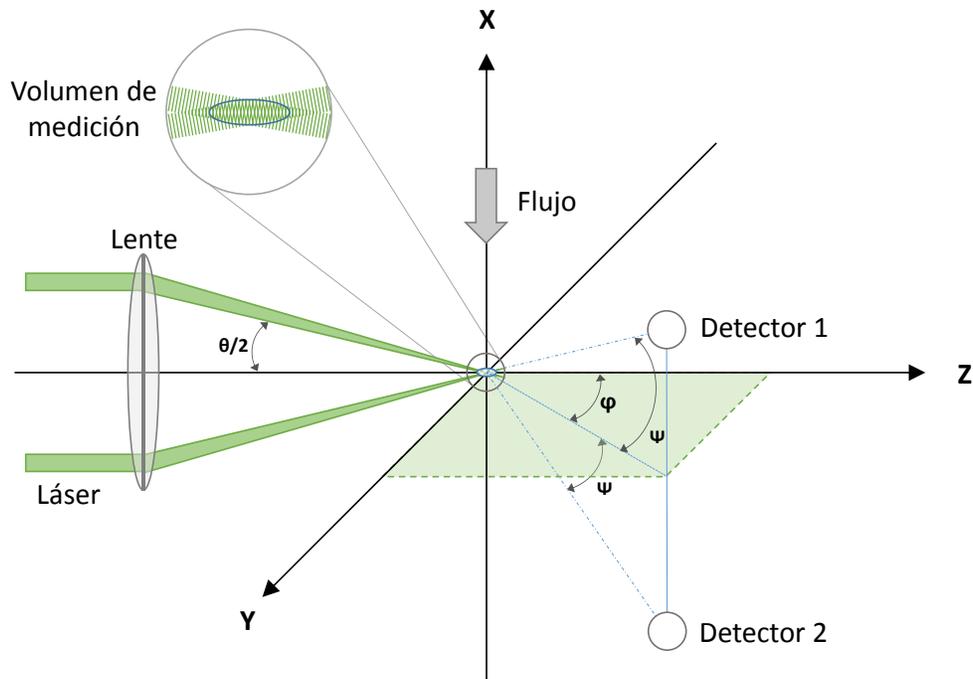


Figura 2.4. Esquema de la ubicación de los detectores, el emisor y el sistema de coordenadas usados en PDA. Adaptado de Papadopoulos y Arik (2004).

La diferencia entre la frecuencia original y la medida por los detectores permite calcular la velocidad instantánea de la partícula en el volumen de control. Dados los ángulos entre los láseres emisores (θ), los detectores (ψ), entre la sonda emisora y la sonda receptora (φ) y una partícula de diámetro (d), los detectores reciben cada uno una señal con la misma frecuencia, pero con diferentes fases o un desplazamiento en su función de onda, el cual se correlaciona con el tamaño de la partícula (Figura 2.5).

Esta técnica se caracteriza por su flexibilidad en los intervalos de diámetro a medir (Papadopoulos y Arik, 2004), pues con tan solo cambiar el ángulo de los emisores o de los detectores se pueden medir partículas más pequeñas o más grandes. Ma *et al.* (2004) reportan para esta técnica intervalos de medición de diámetros entre $d = 0.5 \mu\text{m} - 10,000 \mu\text{m}$ y velocidades de partícula hasta de $v = 470 \text{ m/s}$.

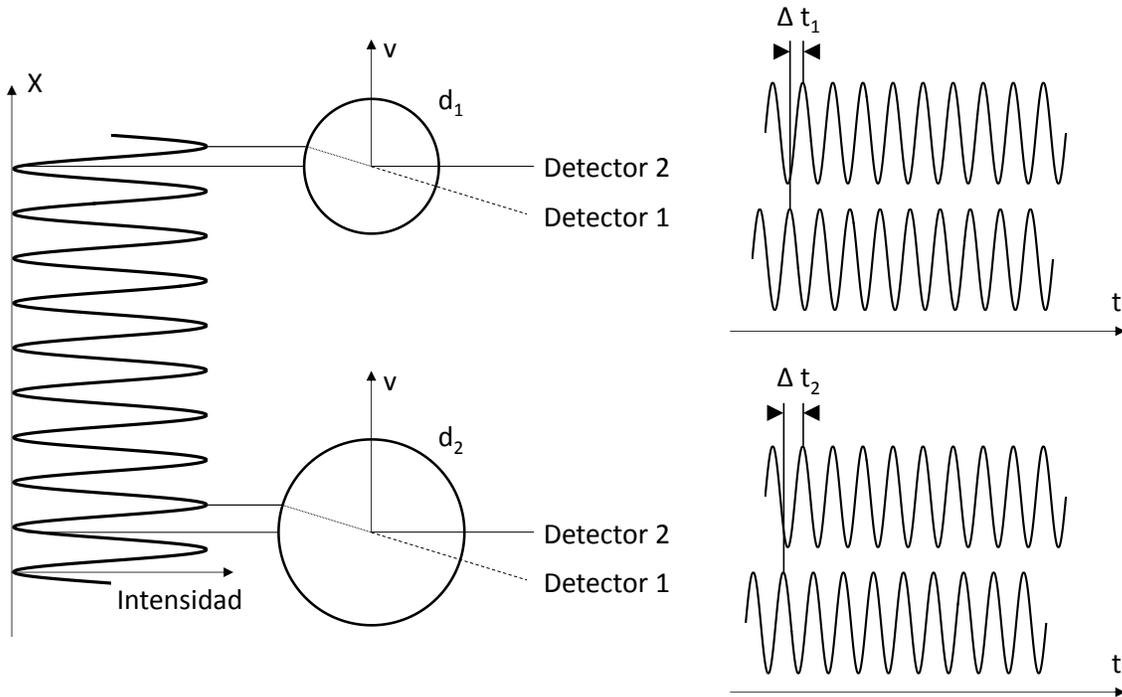


Figura 2.5. Diferencia de fase para dos estructuras de diferente diámetro en un sistema PDA. Adaptado de Papadopoulos y Arik (2004).

Zhou y Kresta (1998) utilizaron esta técnica por ser especialmente robusta para la medición de partículas en sistemas de dos fases, debido a que se pueden generar grandes cantidades de datos (se miden hasta 4,000 partículas por experimento), los cuales son analizados por un software para obtener las distribuciones de tamaño. Esto permite el estudio de diversas condiciones de mezclado en tiempos relativamente cortos. Sin embargo, debido a que se depende de la incidencia perfecta de los haces de láser en las partículas, cualquier interferencia genera lecturas erróneas. Tal es el caso de un cambio en las propiedades de las partículas medidas, cuando en un sistema líquido – líquido hay presencia de burbujas de aire, las burbujas representan un cambio en las propiedades ópticas con respecto a aquellas de las partículas de la fase líquida dispersa, y generan que los detectores no reciban la luz (reflejada o refractada) de la forma como están calibrados. Las partículas sólidas tienen un efecto parecido, porque obstruyen el paso de la luz y afectan la medición. Adicional a esto, el sistema no responde adecuadamente

cuando hay un porcentaje alto de la fase dispersa, debido a que las señales de un gran número de objetos en el volumen de medición harían mucha interferencia entre sí, sobrepasando la capacidad de los detectores.

2.3.2 Velocimetría de partículas mediante imágenes (PIV)

Esta técnica emplea un haz de láser en forma de hoja, el cual se proyecta de manera normal al flujo que se desea estudiar (Figura 2.6). En el caso de los tanques de mezclado esto es de forma longitudinal, perpendicular al eje del impulsor. Este láser permite medir el tamaño y velocidad sólo de las partículas suspendidas que atraviesan la hoja (zona) iluminada, mediante la adquisición de imágenes, con cámaras en el exterior del tanque enfocadas de forma perpendicular al haz de luz. Sólo en casos en que la fase dispersa se encuentra en una concentración alta, se presentan problemas con la medición debidas a la interferencia. Las mezclas en que se emplea deben ser transparentes o con poca turbidez en la escala estudiada, con el fin de permitir la adquisición de imágenes de buena calidad (Brown *et al.*, 2004).

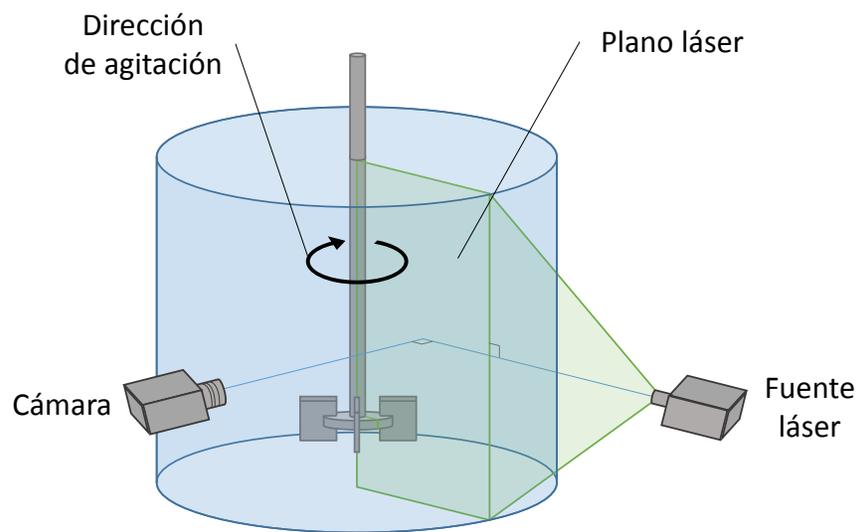


Figura 2.6. Esquema general de un sistema PIV clásico.

Esta técnica es robusta para obtener información local en sistemas de dos fases y utiliza una alta velocidad de adquisición de imágenes para hacer tomas sucesivas de la misma partícula y de esta manera generar un vector de movimiento y, a partir de éste, la velocidad.

Laakkonen y colaboradores (2005) desarrollaron un método que corrige los tamaños de partícula de las imágenes sucesivas, para obtener de manera confiable los tamaños de las burbujas suspendidas en sistemas líquidos. Este sistema es un avance con respecto al PIV clásico porque no solo mide la velocidad, también mide tamaños al hacer correcciones a los objetos que pueden no estar completamente dentro de la zona de influencia del láser. Esta técnica no se puede usar en sistemas de más de dos fases.

2.3.3 Micro-estereoscopia en 3D.

Corkidi y colaboradores (2008) desarrollaron un sistema para la medición de partículas suspendidas e incluidas, en sistemas multifásicos, basado en un modelo tridimensional que permite ubicar espacialmente los objetos medidos (gotas y burbujas). La capacidad para ubicar cada objeto es de suma importancia en el estudio de las mezclas multifásicas, debido a que permite discernir entre las estructuras complejas (gotas de aceite que tienen en su interior burbujas de aire y/o gotas de agua) (Figura 2.7.a) y un solapamiento de partículas (Figura 2.7.b), lo cual no se puede diferenciar en una imagen bidimensional sin incurrir en un alto grado de error.

El sistema utiliza las imágenes capturadas por dos cámaras, cada una con perspectivas diferentes de una misma región tridimensional que se ubica en la vecindad de la pared del de tanque mezclado. Permite determinar la ubicación de un objeto común en las dos imágenes (Figura 2.8.a). Las coordenadas del objeto, adquiridas de las imágenes independientes, sirven para triangular la ubicación en el espacio tridimensional de las partículas estudiadas.

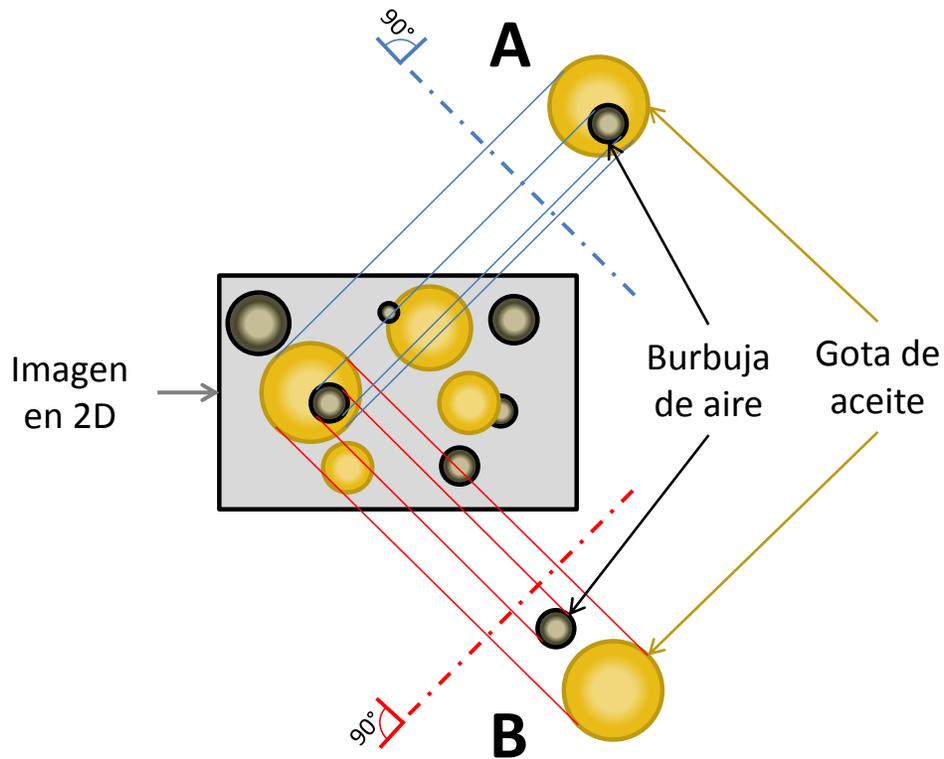


Figura 2.7. Perspectivas de dos posibles escenarios propuestos por la imagen en 2D de una dispersión: A) Inclusión de una burbuja en una gota de aceite; B) Solapamiento de la imagen de una burbuja de aire en frente de la imagen de una gota de aceite.

Para calcular las coordenadas reales (Figura 2.8), (x_p, z_p) de la partícula de estudio (p_i), el sistema utiliza la coordenada (x_1) de la imagen izquierda (marco de referencia π_1 , Figura 2.8.a), para calcular la línea recta que pasa por ese punto y por el origen del eje de la cámara izquierda (lente C_1). Luego hace un cálculo equivalente con los puntos (x_2) y C_2 , en el marco de referencia π_2 (cámara derecha). Con estas dos ecuaciones, hace un cambio de referencia al sistema de coordenadas reales π_{xyz} . Como se muestra en la Figura 2.8.a, la intersección de estas dos rectas tiene coordenadas (x_p, z_p) .

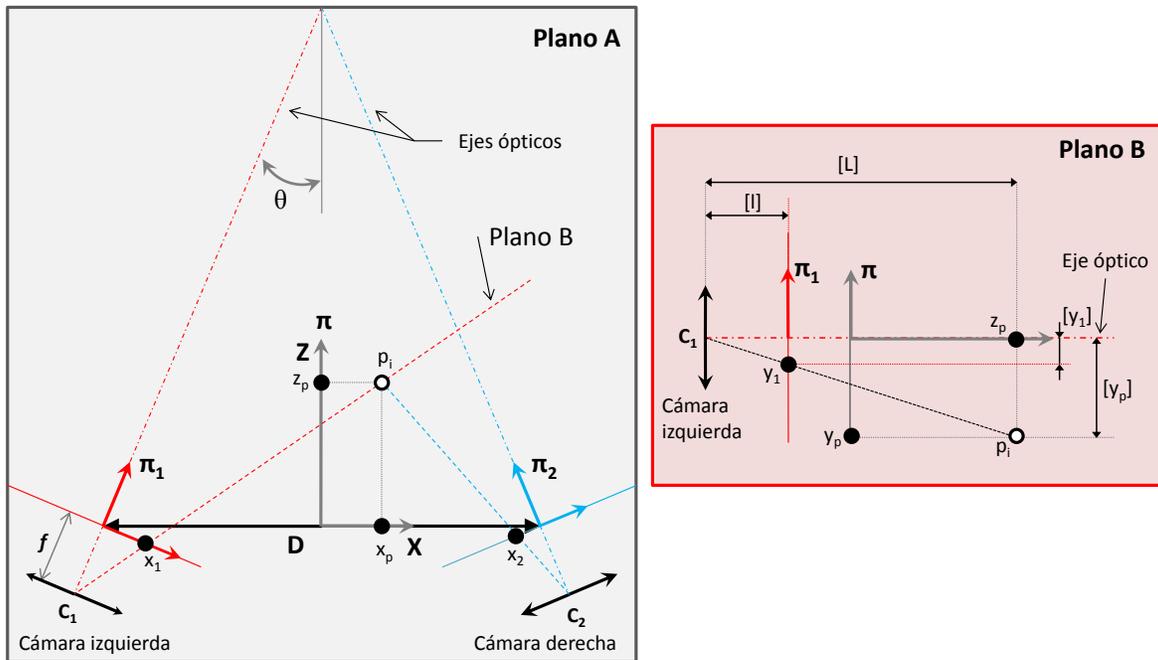


Figura 2.8. Modelo teórico del sistema de micro-estereoscopia. a) Vista superior del sistema; b) Vista lateral del sistema, mostrando un plano B que contiene al origen del sistema de coordenadas de la cámara izquierda y a la partícula en estudio (p_i). Tomado de Curkidi *et al.* (2008).

En un segundo conjunto de cálculos, el sistema utiliza propiedades de los triángulos para calcular la coordenada real (y_p) (Figura 2.8.b). Utilizando las coordenadas (x_p, z_p) ya conocidas, determina la longitud $[L]$ y utilizando los valores de f y x_1 , calcula la longitud $[l]$. Con la relación entre estos valores y con la coordenada (y_1) de la imagen izquierda, por triángulos semejantes, calcula la coordenada (y_p). Esto es, $[l]$ es a $[L]$, como (y_1) es a (y_p).

Las coordenadas reales calculadas (x_p, y_p, z_p) de las partículas en una imagen son sometidas a un proceso de comparación por parejas, de tal forma que se puede determinar si la partícula más pequeña está incluida en la más grande. Este proceso consiste en calcular la distancia Euclidiana entre los centros de las esferas ideales que forman las representaciones hechas con las coordenadas calculadas y el diámetro medido. Si una estuviera incluida en una gota de aceite, la distancia euclídea debe ser menor al diámetro de la gota de aceite. Adicional a esto, las

partículas incluidas deben cumplir un criterio de “inclusión” (Ecuación 2-6), un umbral (ε) que garantiza que una burbuja se considera incluida solo si determinada fracción de su diámetro (0.75) se encuentra dentro de la gota de aceite Figura 2.9.

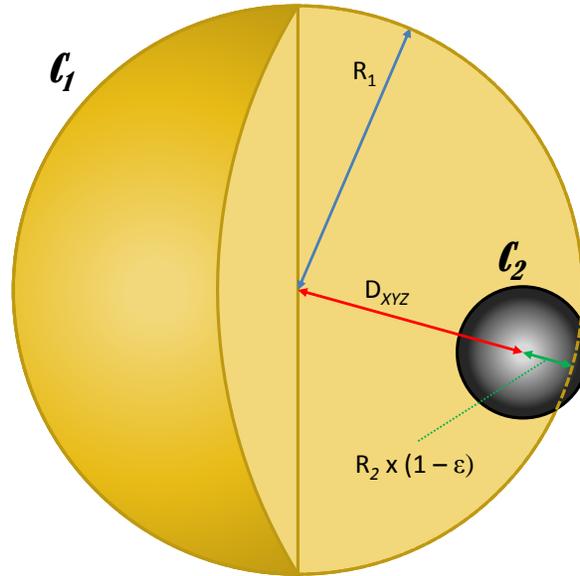


Figura 2.9. Esquema para la determinación de inclusiones de burbujas de aire (C₂) en gotas de aceite (C₁), teniendo en cuenta la tolerancia mínima de inclusión. Tomado de Corkidi *et al.* (2008).

$$D_{xyz} + R_2 \times (1 - \varepsilon) \leq R_1 \quad 2-6$$

Siendo D_{xyz} : distancia euclídea entre los centros de las esferas; R_2 : radio de la partícula incluida; ε : umbral de inclusión y R_1 : radio de la gota de aceite.

El algoritmo de cálculo del sistema de micro-estereoscopía en 3D también incluye correcciones que tienen en cuenta los efectos de difracción, los cuales hacen que las partículas incluidas se vean más grandes (efecto lupa) de lo que en realidad son, permitiendo no solo ubicarlas, sino también conocer su diámetro real.

3 JUSTIFICACIÓN

En investigaciones anteriores se ha descrito la dispersión de tamaños de la fase inmisible (aceite) y la fase gaseosa (aire) en el sistema modelo de fermentación de *Trichoderma harzianum* conteniendo proteína (Pulido-Mayoral & Galindo, 2004) o biomasa (Larralde-Corona *et al.*, 2002) por separado, permitiendo describir sus efectos individuales.

Estos estudios complementaron el trabajo previo en el que se utilizó biomasa de *T. harzianum* y medio agotado de cultivo (Galindo *et al.*, 2000), en el cual se describieron por primera vez burbujas de aire y gotas de agua dentro de gotas de aceite (estructuras multifásicas) en un sistema de mezclado de 4 fases.

La metodología usada anteriormente involucró una velocidad de agitación constante para todos los ensayos y técnicas de adquisición de imágenes en 2 dimensiones (2D). La técnica en 2D tiene una alta precisión para medir los diámetros de gotas de aceite y burbujas libres de aire (Galindo *et al.*, 2005) pero sobreestima el número de burbujas incluidas en aceite (Corkidi *et al.*, 2008). Este error se debe a que en una imagen donde se traslapan una burbuja de aire y una gota de aceite no se puede identificar si la burbuja está dentro o en frente de la gota. Una técnica de estereoscopía en 3D permite calcular la profundidad a la que se encuentran dos estructuras y así determinar con mayor precisión los fenómenos de inclusión.

En todos los estudios previos se usó una única velocidad de agitación, simulando la condición usada en el proceso de fermentación. Sin embargo, el uso de diferentes concentraciones de biomasa y proteína soluble (como se mostrará en la Sección 6.3) ocasiona que la potencia volumétrica cambie ligera pero importantemente cuando la velocidad de agitación es constante. Esto es de especial relevancia debido a que el tamaño promedio de las estructuras (gotas de aceite y burbujas de aire) es una función muy dependiente de la energía entregada al sistema (Calderbank, 1958; Zhou & Kresta, 1998).

En este trabajo se fijó la potencia entregada al sistema (fuente de variación en los tamaños de estructura) para separar su efecto de aquellos presentados por el cambio de concentración de biomasa y de proteína. Se usó una técnica estereoscópica de adquisición y análisis de imágenes en 3D, que permitió clasificar adecuadamente todas las partículas estudiadas de acuerdo con su ubicación, tamaño y complejidad. Todo esto para lograr un mejor entendimiento de los fenómenos de transferencia de masa que ocurren en los procesos de fermentación multifásicos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Describir el efecto que tienen la biomasa y la proteína sobre la dispersión de aire y aceite en un modelo del cultivo del hongo *Trichoderma harzianum* en un tanque agitado a una potencia suministrada constante a partir de un sistema de visión micro-estereoscópico.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar y calcular las condiciones de agitación necesarias para entregar $P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$ a mezclas de estudio con diferentes concentraciones de biomasa y proteína.
- Medir con un sistema de micro-estereoscopía, en el sistema agitado a potencia constante, las distribuciones de tamaño y el diámetro Sauter de las gotas de aceite, las burbujas de aire dispersas e incluidas, en sistemas con diferentes concentraciones de biomasa y proteína.
- Describir, en el sistema agitado a potencia constante, el efecto de la tensión superficial y de la tensión interfacial, según sea el caso, sobre las distribuciones de tamaño y los diámetros Sauter de las gotas de aceite y las burbujas de aire (libres e incluidas).
- Definir para el sistema agitado a potencia constante, el efecto de la concentración de sólidos suspendidos, sobre las distribuciones de tamaño y los diámetros Sauter de las gotas de aceite y las burbujas de aire (libres e incluidas).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

El orden en que se listan a continuación los métodos, se seleccionó para presentar con claridad el trabajo experimental involucrado en el desarrollo del proyecto y sobre la forma en que se abordaron los objetivos del mismo.

1. Producción, conservación y caracterización morfológica de la biomasa de *T. harzianum*.
2. Caracterización fisicoquímica de los fluidos y mezclas de trabajo (concentración de proteína, viscosidad, tensión superficial e interfacial).
3. Descripción y uso de los equipos de medición de potencia (dinamómetro) y adquisición de imágenes (sistema de micro-estereoscopía).
4. Análisis de imágenes y tratamiento estadístico de los datos.

En la Figura 5.1 se incluye un esquema del flujo de información involucrado.

5.1 Producción y conservación de material de trabajo (biomasa) y su caracterización morfológica

Se utilizó el hongo *Trichoderma harzianum*, cepa IMI 206040 de la colección del *International Mycological Institute* (IMI, UK). Se activó el contenido liofilizado de un tubo, cultivándolo en 50 ml de un medio compuesto por dextrosa (10 g/l, J.T. Baker) y extracto de malta (20 g/l, Bioxon) en un matraz de 250 ml por 72 horas (Flores, 2002). El cultivo se realizó en una incubadora con agitación orbital y control de temperatura (New Brunswick Scientific Co. Inc., modelo G25); las condiciones de cultivo fueron 200 RPM, pH inicial 5.6 y temperatura 29 °C

La cepa activada se utilizó con dos fines: A) cultivo en tubos inclinados para conservación y posterior uso y B) cultivo en cajas Petri para producir esporas. En ambos casos se utilizó un medio compuesto por extracto de malta (20 g/l, Bioxon) y agar bacteriológico (15 g/l, J.T. Baker).

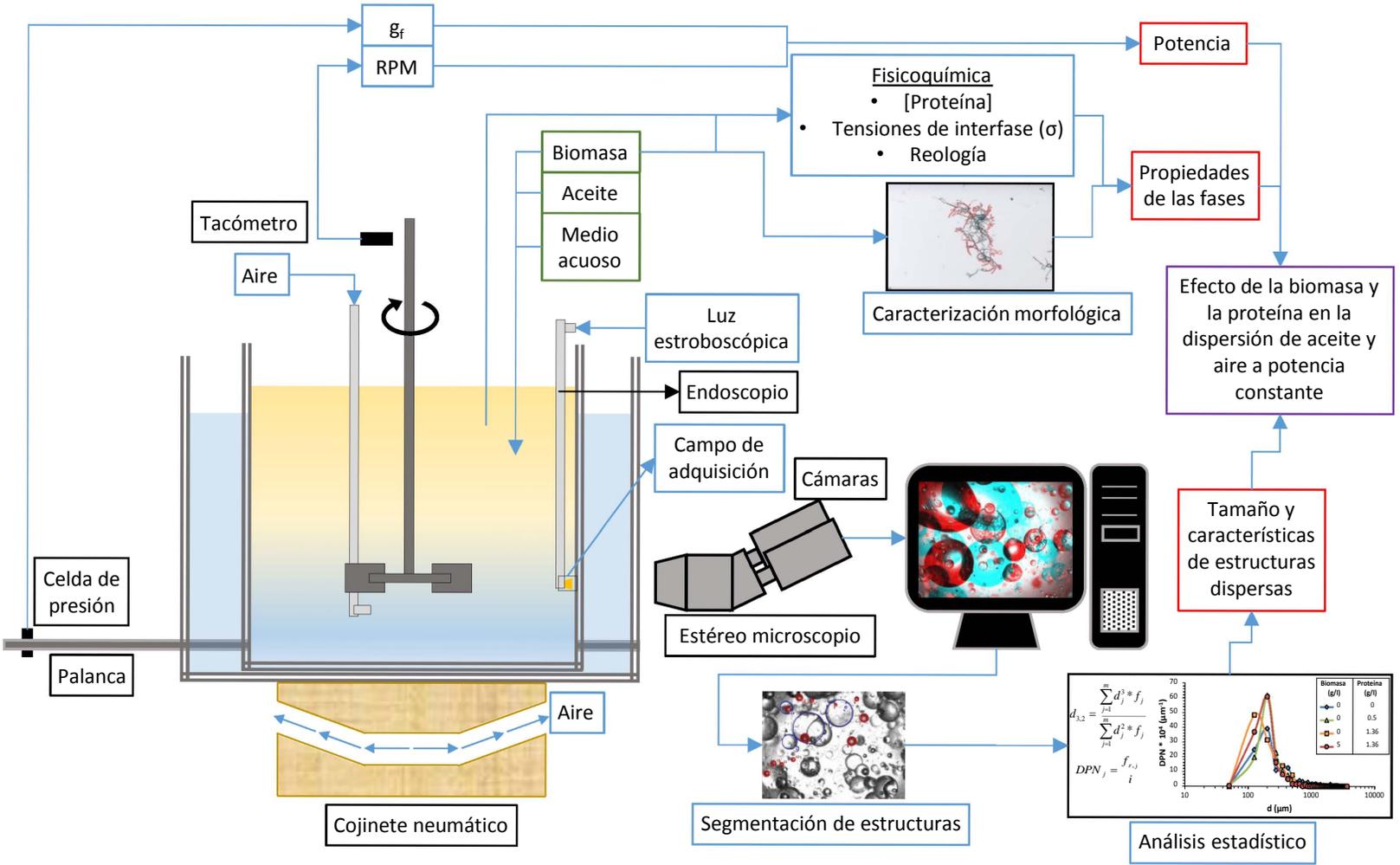


Figura 5.1. Diagrama del flujo de información usado en este trabajo.

5.1.1 Siembra en tubos inclinados

Los tubos inclinados (Figura 5.2) se inocularon por primera vez con micelio tomado del matraz donde se activó la cepa y se incubaron a 29 °C (incubadora Riossa, modelo ECME) por cuatro días. Una vez terminado el cultivo se almacenaron los tubos a 4 °C. El mantenimiento de la cepa se hizo con resiembras mensuales en el mismo medio.



Figura 5.2. Cultivo de *Trichoderma harzianum* en tubos inclinados.

5.1.2 Siembra en cajas y preparación del inoculo

El cultivo en cajas tuvo la finalidad de producir esporas para inocular los fermentadores de producción de biomasa. Las cajas se inocularon con un segmento de agar de aproximadamente 1 cm² proveniente de un tubo inclinado que contenía al hongo. Se incubó por 6 días a 29° C (incubadora Riossa, modelo ECME). Las cajas se expusieron a la luz solar por 15 minutos cada día para inducir la esporulación del hongo (Figura 5.3).

Al término del cultivo se lavó cada caja con 8 ml de solución salina estéril (NaCl, 9 g/l, J.T. Baker y Tween 40, 0.05 % p/v, Sigma). La suspensión de esporas se recuperó en un matraz estéril y se llevó a 100 ml con agua destilada estéril. La concentración de esporas en la solución se determinó por conteo en cámara de Neubauer (Optik Labor, Friedrichdorf, Alemania, modelo Neubauer Improved).

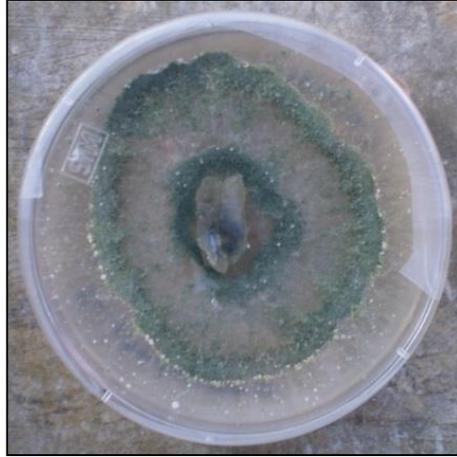


Figura 5.3. Esporulaci3n de *Trichoderma harzianum* en cultivo en caja.

Una vez conocida la concentraci3n de esporas en la soluci3n del matraz, se calcul3 el volumen necesario de suspensi3n para que la concentraci3n de esporas en el fermentador fuera de 10^5 esporas/ml. El n3mero aproximado de cajas necesarias en este procedimiento se calcul3 teniendo en cuenta que cada caja tena aproximadamente 3×10^8 esporas (Flores, 2002).

5.1.3 Cultivo en fermentador

El cultivo en fermentador se realiz3 para obtener micelio de *T. harzianum* (biomasa) suficiente para los ensayos de mezclado y toma de im3genes. El fermentador usado est3 ubicado en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del Instituto de Biotecnologa en la UNAM.

Las caracteristicas del reactor fueron:

- Di3metro interno T = 40 cm
- 2 impulsores tipo Rushton D/T = 1/3
- 4 mamparas B/T = 1/10
- Difusor tipo dona, di3metro de orificio $\phi = 1/8''$
- Volumen de trabajo $V_T = 100$ l
- Control de pH y temperatura
- Medici3n de Tensi3n de Oxigeno Disuelto

En el desarrollo del proyecto se utilizó biomasa proveniente de dos lotes de fermentación, los cuales tuvieron diferencias en la composición del medio y las condiciones de cultivo. En el presente documento se les llamó lote 1 y lote 2.

El medio líquido de ambos lotes fue el mismo (Tabla 5.1) exceptuando las concentraciones de sulfato de amonio y extracto de levadura (Tabla 5.2). La diferencia se debe a que el primer lote se hizo para obtención de esporas para otro proyecto y el segundo lote se llevó a cabo exclusivamente para la obtención de biomasa. En particular, no se observó ningún efecto del origen de la biomasa sobre la dispersión de aceite y aire, debido a las características del micelio obtenido que en ambos casos fue micelio disperso (Secciones 5.1.6.3 y 6.2). Esto se discute en la Sección 6.6.1.

Tabla 5.1. Composición del medio mineral utilizado para la producción de *Trichoderma harzianum*.

Compuesto	Concentración (g/l)
Dextrosa	30
KH₂PO₄	7
Na₂HPO₄	2
MgSO₄.7H₂O	1.5
CaCl₂.2H₂O	0.0671
FeCl₃.6 H₂O	0.008
ZnSO₄.7 H₂O	0.0001

Las sales minerales y el extracto de levadura se disolvieron en el fermentador usando 90 l de agua común, se ajustó el pH a 5.6 con ácido fosfórico (H₂PO₄ al 85 % p/v) y se esterilizaron mediante el paso de vapor directo. El (NH₄)SO₄ se esterilizó por separado en 2 l de agua. La dextrosa se disolvió a una concentración de 50 % p/v y se esterilizó por separado. El volumen de trabajo en el reactor se llevó a 100 l, adicionando agua destilada estéril.

Tabla 5.2. Fuentes de nitrógeno de los cultivos de *T. harzianum* para la producción de esporas (lote 1) y biomasa (lote 2).

Compuesto	Concentración (g/l) lote 1	Concentración (g/l) lote 2
(NH ₄)SO ₄	5.6	0.94
Extracto de levadura	0.5	1.5

El fermentador se inoculó con esporas frescas de *T. harzianum*. Durante la fermentación se controló la temperatura a 29° C y se equilibró el pH en 5.6 mediante el uso de NaOH (50 % p/v) y H₂PO₄ (85 % p/v). El aire introducido al reactor se esterilizó por filtración, primero a través de un filtro de fibra de vidrio y luego por uno de tamaño de poro 0.22 µm (Sartorius, E.U.A.); el flujo inicial del aire se fijó en 0.5 vvm y se aumentó en 0.25 vvm cada vez que la tensión de oxígeno disuelto (TOD) estuvo por debajo de 10 % de la saturación, hasta un máximo de 1 vvm. La agitación y el compuesto usado para el control de espuma fueron diferentes en los dos lotes. En la Tabla 5.3 se detallan éstas condiciones.

Tabla 5.3. Diferencias en las condiciones de operación de los lotes de fermentación.

Condición	Lote 1	Lote 2
Agitación (RPM)	320	200
Potencia (kW/ m ³) (calculada)	2.55	0.19
Control de espuma	Aceite de canola (Alimentos Capullo)	Octametilciclotetrasiloxano (Dow Corning)

La potencia en el reactor de 100 litros se calculó con la siguiente fórmula empírica, desarrollada en la Unidad de Escalamiento y Planta Piloto del Instituto de Biotecnología en la UNAM (datos no publicados):

$$P_g = 0.0312 * Re^{0.064} * Fr^{-0.156} * Na^{-0.38} * \left(\frac{T}{D}\right)^{0.8} * P_o \quad 5-1$$

Siendo P_g : potencia gaseada (kW/m^3); Re : número de Reynolds (-); Fr : número de Froude (-); Na : número de aireación (-); T : diámetro del tanque (m); D : diámetro del impulsor (m) y P_o : potencia no gaseada en el reactor (kW/m^3).

5.1.4 Recuperación de biomasa

El micelio se tamizó utilizando mallas N° 50 y 80. Posteriormente se hicieron 2 lavados con agua destilada para eliminar los residuos del caldo agotado de fermentación (medio de cultivo). Luego del lavado, la biomasa se resuspendió en una solución de azida de sodio (NaN_3 , concentración final 0.1 %) (Spectrum Chemical Mfg. Corp., Gardena, USA). La azida de sodio se usó para conservar la biomasa por su efecto bacteriostático. A la mezcla de biomasa resuspendida se le denominó “pasta concentrada” debido a que el volumen, luego del proceso, se redujo notablemente. La pasta concentrada se refrigeró a (4°C) para su conservación.

5.1.5 Concentración de biomasa

La concentración de biomasa en todos los casos se determinó gravimétricamente (peso seco), para lo cual se tomaron 10 ml de muestra y se filtraron al vacío utilizando papel filtro Whatman (N° 1) previamente tarado (llevado a peso constante en un horno a 85°C , durante 24 horas). El filtro con la muestra de biomasa se secó en un horno (Hoffman – Pinther & Bosworth, México; modelo HA223) a 85°C , por 24 horas, hasta lograr peso constante; luego de lo cual se depositó en un desecador al vacío (conteniendo sílica gel como agente desecante) por un periodo de una hora y media para que la temperatura se igualara a la ambiente (aproximadamente 26°C) y evitar errores en la posterior medición de peso. El cálculo de biomasa se realizó por diferencia de pesos y se expresó como gramos de biomasa por litro de caldo de cultivo o pasta concentrada.

5.1.6 Caracterización morfológica del hongo

Para caracterizar los dos lotes de biomasa utilizados en los ensayos de mezclado, se reportaron la circularidad y el diámetro promedio de los agregados de micelio. A continuación, se indica el procedimiento realizado para ello.

5.1.6.1 Preparación de la muestra

Una muestra de 10 ml de la pasta concentrada del hongo se diluyó en 10 ml de solución fijadora de formalina (13 ml de formaldehído 40 % p/v, 5 ml de ácido acético glacial y 200 ml de etanol al 50 %). Utilizando puntas de micropipeta cortadas se tomaron 100 μ l de esta suspensión y se resuspendieron en una proporción de 1:20 con agua destilada. Se adicionaron 5 μ l de una solución de azul de metileno al 0.1 % por cada 100 μ l de muestra para teñir el micelio y mejorar el contraste de las imágenes. Con las puntas cortadas se dispusieron 100 μ l de micelio teñido en un portaobjetos.

5.1.6.2 Toma de imágenes y segmentación

Utilizando una videocámara CCD (Hitachi-Denshi, Ltd., modelo KP-D50 digital) acoplada a un microscopio compuesto (Nikon Optiphot-2, Japón) se visualizó el micelio (Figura 5.4) en una computadora PC (Hewlett-Packard, Vectra VL). La interfaz de la computadora estaba dada por el programa *Image Pro Plus 4.1* (IPP) (Media Cybernetics, MD, E.U.A.) el cual permitió la toma y procesamiento de las imágenes de diferentes agregados de micelio.

Se midieron 200 agregados de micelio (Figura 5.4 y Figura 5.5), los cuales se consideraron una muestra representativa al usar el criterio de que la variación del diámetro promedio debía ser menor a 10 % por cada agregado adicional en la muestra. Las imágenes se tomaron utilizando la lente de magnificación 4X del microscopio y con el programa se determinó el diámetro promedio de cada uno de los agregados. Para esto, en el programa IPP se delimitó manualmente el perímetro del agregado a medir (Figura 5.5), luego el *software* utilizó el área proyectada para calcular el centro de gravedad, finalmente calculó la longitud de una serie de 180

líneas (ángulo de 2° entre líneas adyacentes) que pasaban por el centro de gravedad de la imagen de micelio y reportó su valor promedio. La segmentación manual debía abarcar el mayor porcentaje del área proyectada por el agregado, sin embargo, no se incluían algunos filamentos debido a que el programa no los detectaba.



Figura 5.4. Micelio de *T. harzianum* visto con una magnificación de 4x.

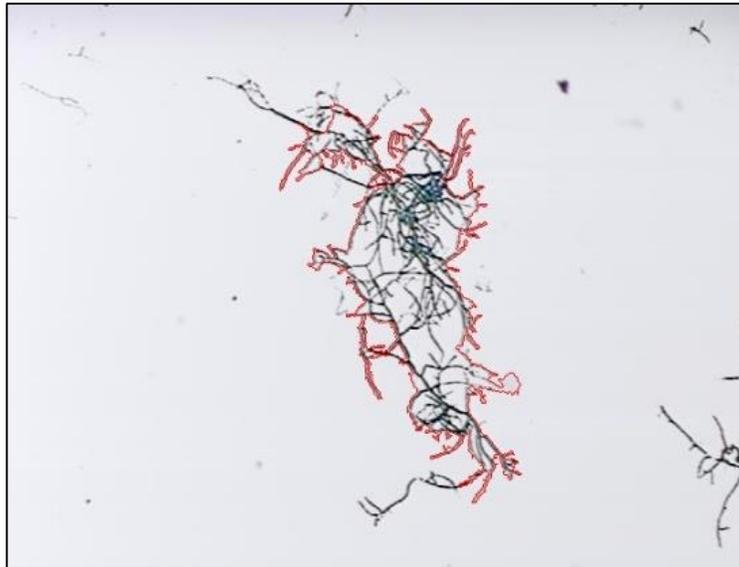


Figura 5.5. Agregado de micelio de *T. harzianum* seleccionado durante el análisis morfológico usando el software IPP.

5.1.6.3 Morfología de los agregados micelares presentes en las pastas concentradas de biomasa.

La caracterización morfológica del micelio de cada uno de los dos lotes de fermentación usados en el desarrollo del proyecto (Sección 5.1.3) se presenta en esta sección. Las distribuciones de diámetro promedio (Figura 5.6.) y de circularidad (Figura 5.7) de los agregados mostraron que ambos lotes presentaban morfología de agregados laxos. A pesar que tuvieron la misma clase de morfología, las poblaciones de cada lote se diferenciaron en sus medidas básicas, a saber, diámetro promedio del agregado y circularidad del mismo.

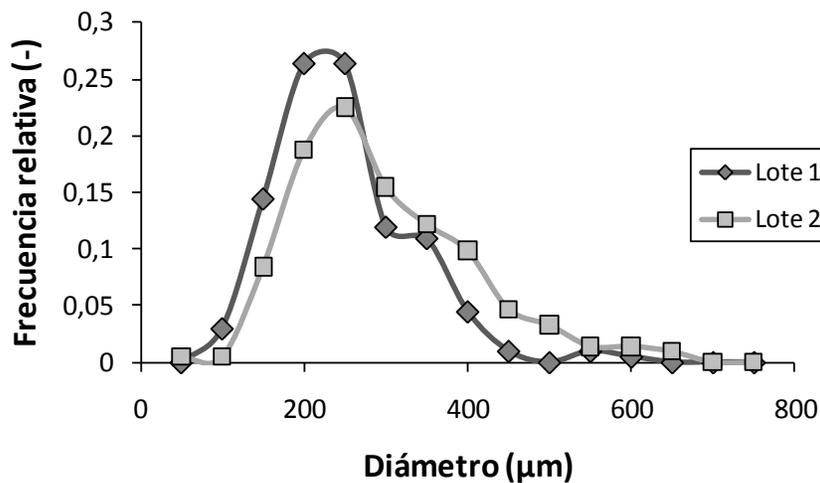


Figura 5.6. Distribución de diámetros promedio de agregados de micelio de *T. harzianum* cultivados a diferentes potencias iniciales.

Las tendencias de las gráficas, aunque poco perceptibles a simple vista, fueron congruentes con las diferencias en la potencia entregada al sistema en cada lote de fermentación (Tabla 5.3). El lote 1 ($Pg/V = 2.55 \text{ kW/m}^3$) presentó con mayor frecuencia agregados con un menor diámetro (promedio $223 \mu\text{m}$), lo que se observó en la Figura 5.6, donde la curva del lote 1 ocupó una ubicación más a la izquierda donde se encuentran los menores diámetros.

Los agregados del lote 2, cuya potencia fue mucho menor ($Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$), tuvieron un diámetro promedio mayor ($272 \mu\text{m}$), congruente con los mayores tamaños observados en la Figura 5.6, cuando se les compara con los del lote 1.

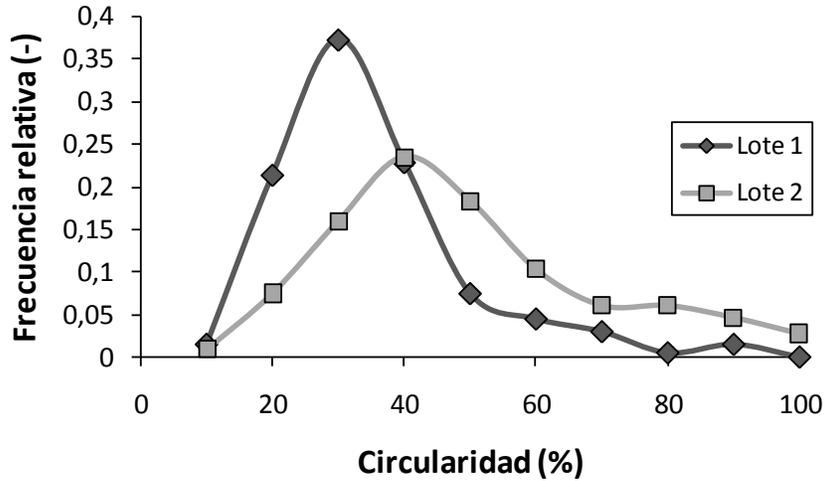


Figura 5.7. Distribución del porcentaje de circularidad de agregados de micelio de *T. harzianum* cultivados a diferentes potencias iniciales.

Para confirmar que las dos distribuciones de diámetros eran diferentes y que sus diámetros promedio se podían comparar dentro de un margen aceptable de error, se realizó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA), cuyos resultados se presentan en la Tabla 5.4. Los valores $F > F_{\text{crit}}$ permitieron desechar la hipótesis nula y asegurar con un 95 % de probabilidad que las distribuciones eran diferentes y que la diferencia en sus medias era significativa, sugiriendo que la potencia entregada al sistema tuvo un efecto sobre la morfología del hongo.

Tabla 5.4. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de los diámetros promedio de los agregados de micelio de *T. harzianum* de los lotes 1 y 2.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	F_{crit}
Entre grupos	240649,405	1	240649,405	25,8173415	5,7019E-07	3,8641279
Dentro de los grupos	3840347,19	412	9321,23104			
Total	4080996,59	413				

La forma de los agregados medida como su circularidad (Figura 5.7), también mostró ser afectada por la potencia. Los agregados del lote 1 tuvieron una circularidad promedio de 30 %, lo cual significó que describían formas alargadas consistentes con morfología de micelio disperso propia de fermentaciones llevadas a cabo a altas potencias. Por otra parte, los agregados del lote 2 tuvieron una circularidad promedio de 47 %, esto es, una forma más circular, mostrando morfologías más compactas, propias de fermentaciones hechas a potencias menores. El ANOVA realizado a las distribuciones de circularidad (Tabla 5.5), apoyó la hipótesis de que la morfología (medida como circularidad) de la biomasa obtenida en los dos lotes de fermentación era diferente ($F = 67.77$; $F_{\text{Crit.}} = 3.86$; $F > F_{\text{Crit.}}$).

Tabla 5.5. Resultados del análisis de varianza (ANOVA) de las circularidades de los agregados de micelio de *T. harzianum* de los lotes 1 y 2.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F_{Crit.}</i>
Entre grupos	30180,3881	1	30180,3881	67,7699801	2,4495E-15	3,8641279
Dentro de los grupos	183478,287	412	445,335649			
Total	213658,676	413				

Estos resultados coincidieron con lo encontrado por Rocha-Valadez y colaboradores (2007), quienes estudiaron el efecto que tenía la dispersión de energía en el tanque de fermentación sobre la morfología de *T. harzianum*, demostrando que el tamaño de los agregados dependía principalmente de la potencia y de otras variables (geometría, tiempo de circulación, etc.).

El estudio del efecto de la potencia sobre la morfología de *T. harzianum* no fue un objetivo de este trabajo, por lo que no se discutió a profundidad al respecto.

5.2 Caracterización fisicoquímica de los fluidos y mezclas de trabajo (concentración de proteína, tensión superficial y viscosidad).

5.2.1 Determinación de proteína por el método de Lowry

La metodología usada es una modificación de la propuesta por Lowry *et al.* (1951). El “método de Lowry” es una determinación colorimétrica de valoración cuantitativa de las proteínas. Involucra un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas.

Se tomó una alícuota de la pasta de biomasa (1 ml) y se centrifugó a 12,000 RPM por 10 minutos (centrífuga Mini Spin Plus, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania), se separó el sobrenadante y se descartó la biomasa. Se hizo una dilución de 100 μ l del sobrenadante con 900 μ l de agua destilada. Se tomaron 500 μ l de esta mezcla y se llevaron a 1000 μ l con agua destilada. Se adicionó 5 ml de solución reactiva (Na_2CO_3 (2 % en NaOH (0.1 N), Tartrato de sodio y potasio (2 %) y CuSO_4 (1 %)) y se dejó reposar por 10 minutos. Posteriormente, se agregó 0.5 ml de reactivo de Folin (diluido con 1 volumen de agua) y se reposó por 30 minutos. La absorbancia fue leída a 625 nm. Al mismo tiempo se realizó una curva de calibración usando una solución *stock* de concentración conocida (2 mg/ml) de albúmina bovina (Figura 5.8).

5.2.2 Medición de tensión superficial e interfacial

En la medición de las propiedades de superficie se utilizó un equipo tensiómetro semiautomático (ST-PLUS, TANTEC INC., Schaumburg, IL, EUA) (Figura 5.9). La temperatura de todas las mediciones fue de 26 +/- 1 °C. La técnica utilizada para la medición se denomina de “placa Wilhelmy” y consiste en medir la fuerza que requiere una lámina de área transversal conocida para romper la interfase. Esta fuerza es proporcional a la tensión superficial o interfacial en dicha separación de fluidos.

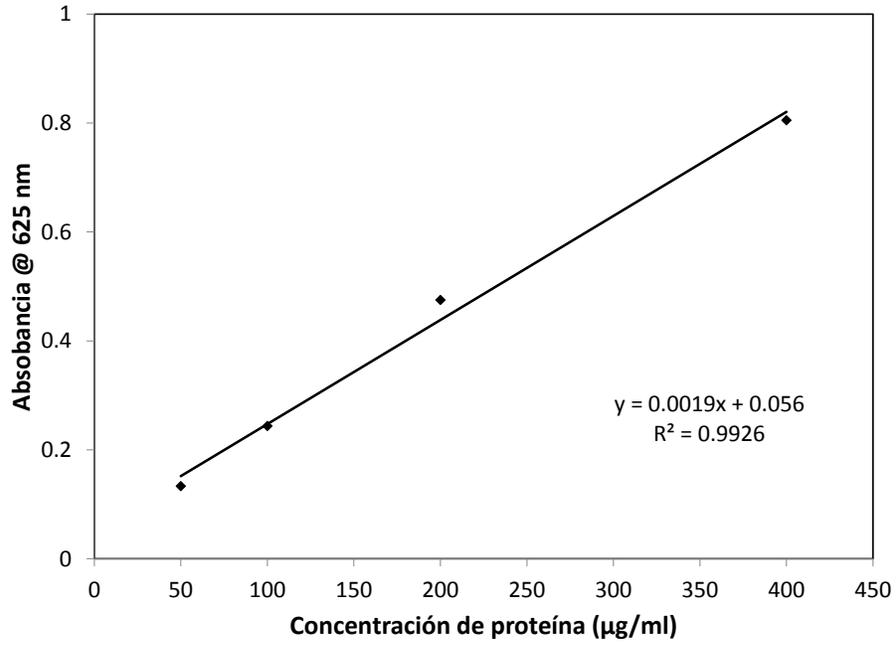


Figura 5.8. Curva patrón para determinar proteína por el método de Lowry.

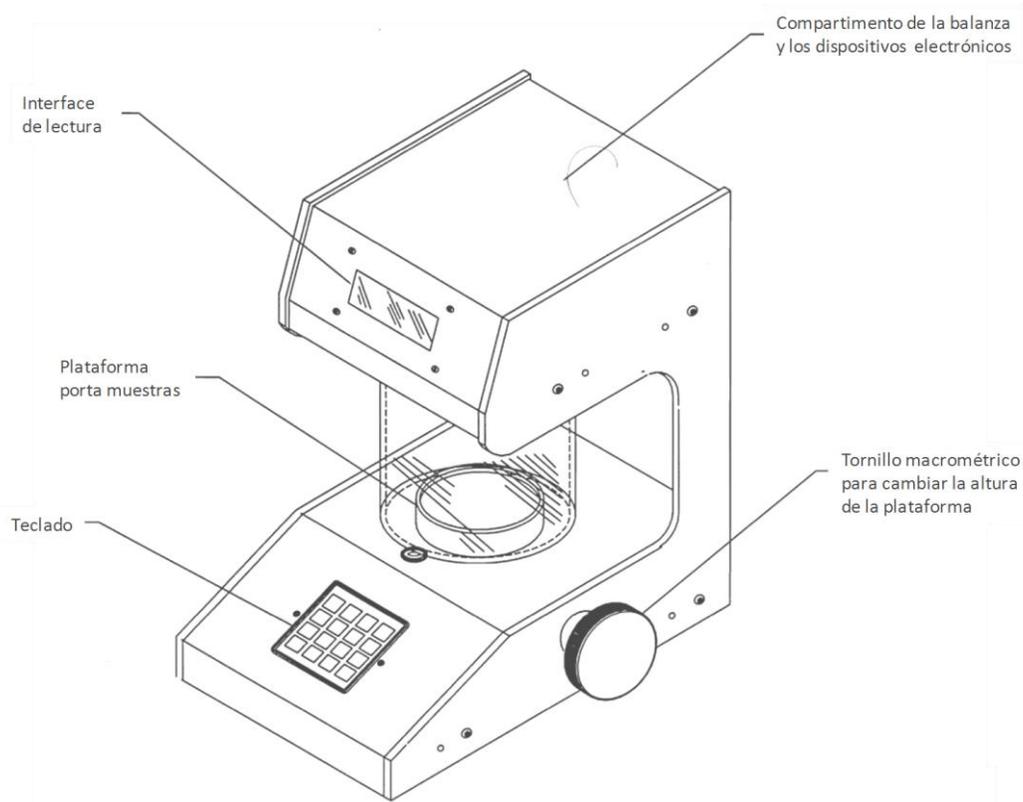


Figura 5.9. Esquema del tensiómetro Tantec ST-PLUS utilizado para la medición de propiedades de superficie. Tomado y adaptado del manual original suministrado con el equipo.

5.2.2.1 Limpieza del material para la medición de propiedades de superficie

Todo el material de vidrio y las piezas metálicas utilizados en las mediciones de tensión superficial e interfacial fue sometido a un proceso riguroso de limpieza. Esto se realizó para evitar la presencia de contaminantes que interfirieran con las mediciones. Las propiedades de superficie son muy sensibles a la presencia de sustancias orgánicas, las cuales disminuyen la tensión superficial. Cualquier suciedad en el material generaría lecturas erróneas en el tensiómetro.

La limpieza del material consistió en un primer lavado con desengrasante industrial (CESCO), para retirar los residuos de grasas, y triple enjuague con agua desionizada (Milli-Q, resistividad $\rho = 7 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$); se agregó un paso de enjuague con xileno (la literatura reportaba el uso de benceno, pero por cuestiones de seguridad se sustituyó por xileno). Se dejó escurrir el agua para luego hacer un segundo enjuague con alcohol etílico (96 % v/v) y un tercer enjuague con acetona para retirar cualquier compuesto orgánico remanente y se dejó secar.

La placa de platino-iridio usada en la medición se lavó de la misma manera que el material de vidrio y adicionalmente se flameó a “rojo vivo” (Figura 5.10), para retirar cualquier depósito orgánico remanente en el metal, utilizando un mechero de alcohol etílico (96 % v/v). El uso de este alcohol fue fundamental para evitar el depósito de hollín en la superficie de la placa durante el proceso de flameado.



Figura 5.10. Flameado de una placa de iridio - platino para su limpieza total antes de la medición de propiedades de superficie.

5.2.2.2 Tensión superficial

Las mediciones de tensión superficial correspondieron a los sistemas de dos fases: aceite-aire y medio acuoso-aire. Para esto se procedió a preparar 45 ml de mezcla conteniendo medio acuoso con proteínas y aceite, de acuerdo con las concentraciones de la mezcla a estudiar, en las cuales todas las interfases están “contaminadas” con aceite, lo cual significa que todas las interfases tenían moléculas de triglicéridos y ácidos grasos que componen el aceite, viéndose afectadas sus tensiones características. Esto se hizo para identificar las características de las mezclas tal cual se iban a trabajar en los ensayos de adquisición de imágenes, incluyendo a todos los componentes a estudiar. Para garantizar que las concentraciones de proteína y aceite en las interfases llegaran al equilibrio, se agitó utilizando un vortex (FineVortex, Daigger) a máxima velocidad. La emulsión obtenida se sometió a centrifugación (5,000 RPM por 10 minutos) (Centrifuga Eppendorf 5804, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y se separó cuidadosamente la fase que se deseaba estudiar con la ayuda de una micropipeta de 10 ml.

Para caracterizar las mezclas que contenían biomasa, se preparó una suspensión con la concentración específica de biomasa en medio acuoso (sin aceite). Luego de mezclar usando un vortex, se procedió a filtrar para retirar el micelio. De esta forma se aseguró que las proteínas contenidas en el sobrenadante de las pastas concentradas de biomasa, que eran responsables de modificar las propiedades de superficie, estuvieran presentes en la mezcla a caracterizar.

Para calibrar el equipo, primero se niveló. Una vez hecho esto se procedió a encenderlo y se calibró usando una pesa de 5 g, incluida en el equipo. Cada vez que se empezaba una secuencia de mediciones, se realizaba una lectura de tensión superficial con agua desionizada ($\sigma = 72 \text{ mN/m}$) para corroborar que el equipo funcionara de manera correcta.

Para medir la tensión superficial se utilizaron platos Petri de vidrio, limpios, de 60x15 mm. Con una micropipeta de 10 ml se separó la fase a estudiar (fase superior aceite o fase inferior medio acuoso) del resto de la mezcla en el tubo de centrifugación y se sirvió hasta una altura de líquido de 10 mm.

El plato Petri, con el líquido a analizar, se ubicó en una plataforma dentro del equipo (Figura 5.9). Siguiendo las instrucciones desplegadas en la interfase de lectura del tensiómetro, se colgó la placa de iridio-platino al gancho de la balanza y se taró a cero. Luego, subiendo la plataforma con el plato, se mojó la placa de platino – iridio en el líquido hasta una profundidad de 2 a 4 mm (Figura 5.11). Paso seguido se hizo descender la plataforma manualmente, lo más lento posible, con el fin de que la inercia del movimiento no interfiriera con la lectura de la balanza.

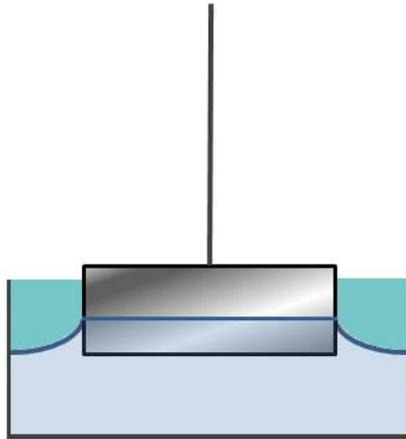


Figura 5.11. Esquema de la placa de iridio-platino arrastrando la interfase durante una medición de tensión superficial. La figura fue hecha exagerando la curvatura de la interfase para enfatizar el fenómeno.

Se utilizó la opción de medición “*Wilhelmy plate Detach*” del tensiómetro, la cual permitía guardar la máxima lectura realizada durante la prueba. Esta lectura correspondía al momento exacto en que se rompía la interfase. Los resultados se reportan en la Sección 6.4.

5.2.2.3 Tensión interfacial

Las mediciones de tensión interfacial se realizaron al sistema de dos fases líquidas, medio acuoso - aceite de ricino. La preparación de las mezclas a estudiar siguió el mismo tratamiento que las muestras de tensión superficial (Sección 5.2.2.2).

Antes de iniciar la cuantificación, primero se mojó la placa con el líquido que presentaba la mayor mojabilidad con la placa. Si el líquido con la mayor mojabilidad era el de mayor densidad (fase inferior), la tara se realizaba colocando la placa totalmente sumergida en el líquido de menor densidad (arriba) (Figura 5.12). La medición en este caso se iniciaba subiendo la plataforma, hasta que la placa entrara 2 mm en el líquido inferior, y se realizaba bajando la plataforma hasta que se rompía el contacto entre la placa y el líquido inferior.



Figura 5.12. Determinación de tensión interfacial por el método de placa Wilhelmy (para estas fotografías se usó un fluido coloreado de baja densidad con fines demostrativos).

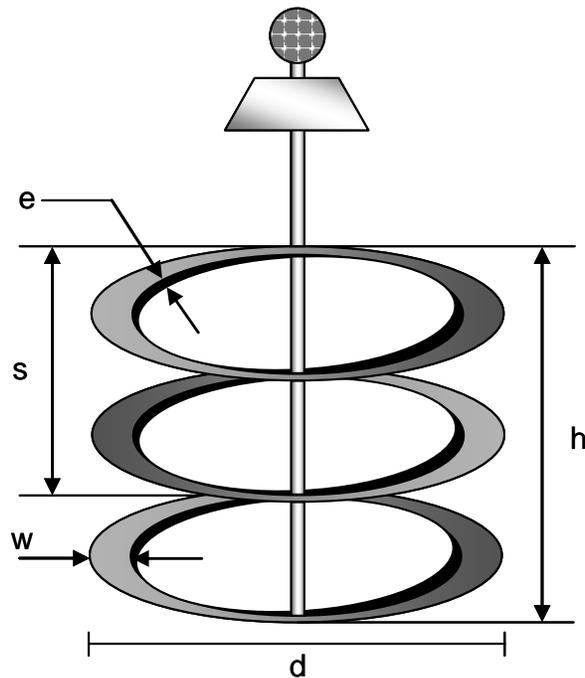
Sí el líquido con la mayor mojabilidad era el de menor densidad (fase superior), la tara se realizaba con la placa sumergida en el líquido inferior. Se bajaba la plataforma hasta que la placa entrara 2 mm en el líquido superior, y se realizaba la medición subiendo la plataforma, hasta que el contacto entre el líquido superior y la placa, se rompía.

5.2.3 Ensayos reológicos

Las mediciones reológicas se realizaron usando un reómetro “Advanced Rheometer AR1000” (TA Instruments, New Castle, DE, USA) y un impulsor helicoidal IH2 (Figura 5.13). Este tipo de impulsor impide la separación de fases o sedimentación del micelio durante la medición (Godoy, 1998).

La temperatura de la muestra se controló a 26°C utilizando la plancha de calentamiento del viscosímetro y un baño recirculador de agua que alimentaba la chaqueta del vaso de mezcla.

Se consignaron las mediciones de Par ($\mu\text{N}\cdot\text{m}$) para velocidades de agitación entre 0.1 y 90 rad/s ($0.16 - 14.32 \text{ s}^{-1}$), para lo cual se empleó el programa de computadora “Rheology Advantage Instrument Control AR” (V5.0.34, TA Instruments, 2003). Las mediciones hechas se almacenaron y analizaron en una computadora PC, utilizando el programa “Rheology Advantage Data Análisis” (V5.0.38, TA Instruments, 2003).



d	w	s	h	e
47.0 mm	8.5 mm	30.3 mm	45.4 mm	1.2 mm

Figura 5.13. Esquema y dimensiones del impulsor helicoidal IH2 usado en la caracterización reológica.

Para caracterizar el comportamiento del impulsor IH2, se realizaron ensayos con líquidos newtonianos de diferentes viscosidades (Tabla 5.6). Las diferencias en las curvas de Par al caracterizar cada fluido (Figura 5.14), permitieron determinar que el

equipo usado era adecuado para medir las variaciones en las medidas hechas con el impulsor IH2, en vista de que brindaba sensibilidad en los intervalos de viscosidad medidos y reportados por Godoy (1998) y Rocha-Valadez y colaboradores (2007) en caldos de fermentación de *T. harzianum*.

Tabla 5.6. Características de los fluidos utilizados en la caracterización del impulsor IH2

Fluido	Naturaleza	Densidad (kg/m ³)	Viscosidad (Pa.s)
Agua	Newtoniano	996	0.001
Brookfield 50	Newtoniano	955.8	0.052
Brookfield 100	Newtoniano	962.5	0.104
Brookfield 500	Newtoniano	965.1	0.536

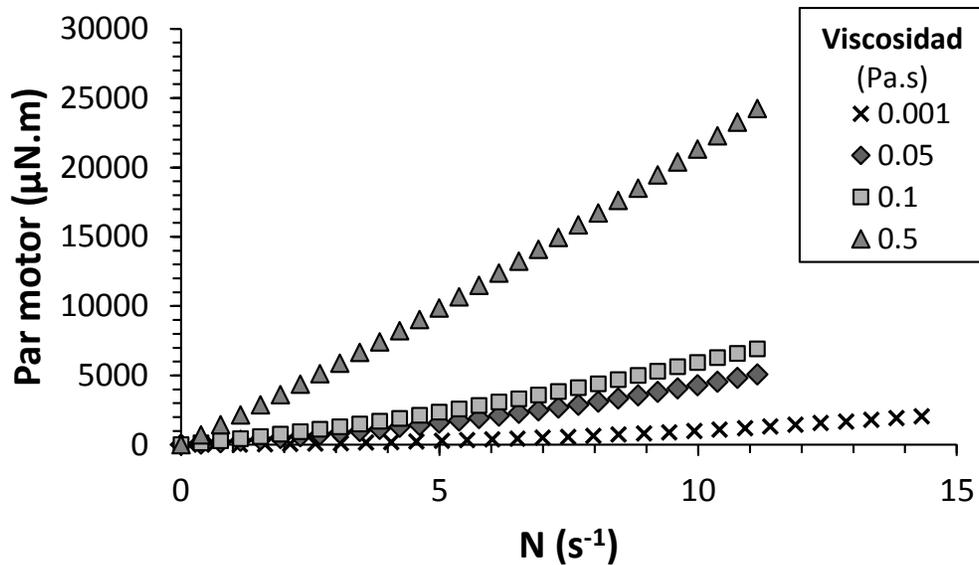


Figura 5.14. Par motor medido con el impulsor IH2 al agitar fluidos newtonianos con diferentes viscosidades.

Adicionalmente, para determinar el comportamiento del impulsor IH2 bajo diferentes regímenes hidrodinámicos, se hicieron cálculos de número de potencia (Figura

5.15). El valor de $P_o = 0.5 @ Re > 10,000$, es indicativo de que el agitador IH2 transmite menos potencia si se le compara con la turbina Rushton ($P_o = 3.5 @ Re > 10,000$); sin embargo, es adecuado para evitar la sedimentación del micelio (Godoy, 1998). Los resultados de las mediciones reológicas de las mezclas estudiadas en este documento se reportan en la Sección 6.2.

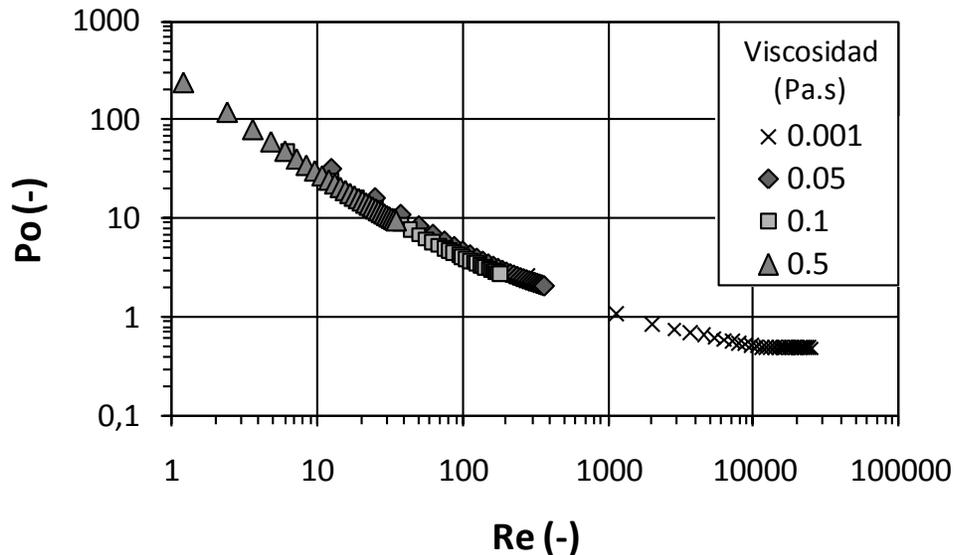


Figura 5.15. Número de potencia (P_o) en función del número de Reynolds (Re); curva característica del sistema de impulsor helicoidal IH2 y vaso usados en este trabajo.

5.3 Mediciones de potencia en la dispersión

Con la finalidad de que todos los experimentos de mezclado se desarrollaran a la misma potencia volumétrica gaseada ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$), se procedió a medir la potencia de las mezclas a estudiar en un intervalo de velocidades de agitación (100 – 400 RPM). Las curvas obtenidas se utilizaron para interpolar la velocidad de agitación necesaria para cumplir con el parámetro de potencia deseado (Sección 6.3).

La potencia entregada al sistema se determinó utilizando un dinamómetro de cojinete neumático (Reséndiz *et al.*, 1991) (Figura 5.16). El dinamómetro también se usó para soportar la chaqueta, el tanque y el sistema de agitación usados en la adquisición de imágenes (Sección 5.4).



Figura 5.16. Sistema de motor y cojinete neumático usados en la medición de potencia.

La teoría involucrada en el cálculo de la potencia se presenta a continuación:

En el caso de sistemas agitados, la potencia (P) que se entrega efectivamente al líquido, se puede medir a través del efecto de rotación que ejerce la fuerza aplicada por el impulsor sobre el líquido. De esta manera:

$$P = M \cdot \omega$$

5-2

El Par motor (M) o torsión se puede definir como el producto de la fuerza perpendicular a un brazo de palanca, que pasa por el eje de rotación, y la longitud (B) de éste:

$$M = F \cdot B \quad 5-3$$

La velocidad angular está determinada por la velocidad de agitación:

$$\omega = 2\pi N \quad 5-4$$

Finalmente, la potencia se puede calcular en función de parámetros fácilmente medibles:

$$P = 2\pi \cdot F \cdot B \cdot N \quad 5-5$$

En esta clase de montaje, el agitador imparte una fuerza mecánica rotacional. Esta fuerza induce un Par motor, que se transmite del líquido al tanque y de éste a la chaqueta. Todo el sistema gira sobre su eje y mediante un brazo de palanca activa un sensor de presión (Figura 5.17), el cual brinda lecturas de fuerza (g_{fuerza}).

Para asegurar que el sistema girara libremente, este equipo contaba con un cojinete neumático, en el cual se inyecta aire entre dos placas metálicas especialmente diseñadas; de esta forma, la pérdida máxima de par motor en el sistema fue de $4 \cdot 10^{-4}$ N.m (Reséndiz *et al.*, 1991) (Figura 5.18). Permitiendo que el par motor en sistema se pudiese transferir al sensor de presión sin pérdidas significativas. Si el peso del tanque usado impedía que la placa base girara libremente, se aumentaba el flujo de aire entre las placas, de tal forma que se restableciera el cojinete neumático. Las placas servían de soporte a la chaqueta, elevándola, permitiendo medir la potencia entregada al sistema con pérdidas despreciables comparadas con las medidas ($1.9 \cdot 10^{-2} - 2.4 \cdot 10^{-1}$ Nm).

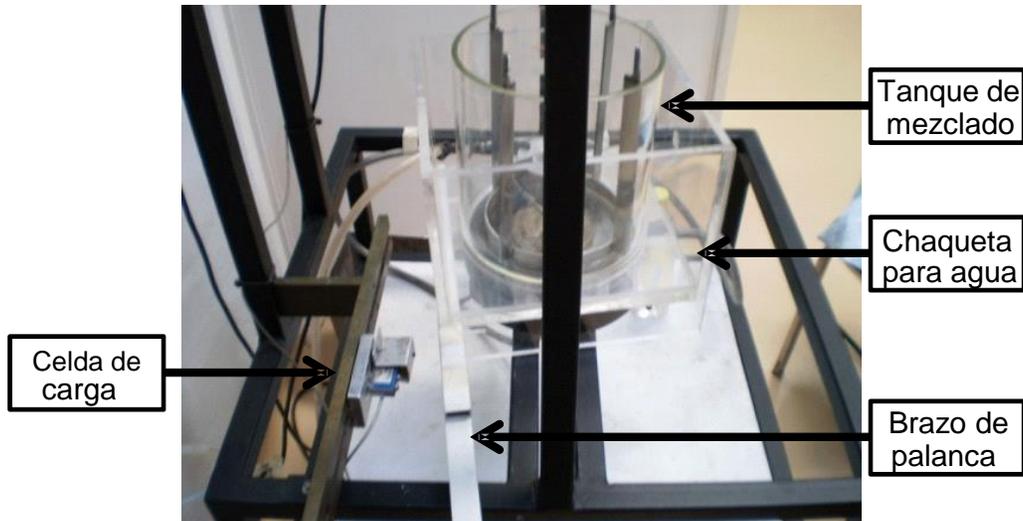
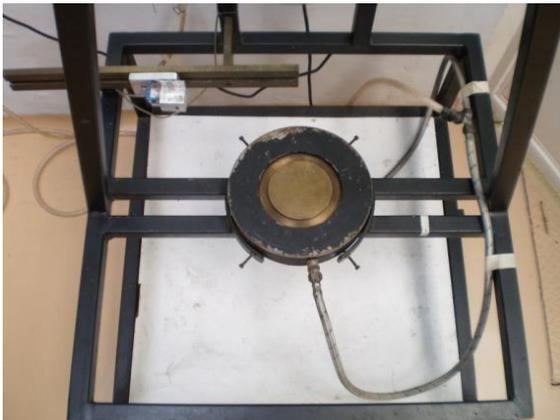


Figura 5.17. Componentes del sistema de medición de potencia.

El sensor utilizado, proveniente de una balanza digital, reporta gramos-fuerza. Esto hizo necesario realizar la conversión a kilogramos-fuerza y multiplicar el valor obtenido por la aceleración de la gravedad ($g = 9.82 \text{ ms}^{-2}$) para obtener fuerza (N), tal y como se requería para calcular la potencia usando la Ecuación 5-5.

Vista superior



Vista inferior



Figura 5.18. Cojinete neumático.

El tanque de medición de potencia (Figura 5.19 A), estaba completamente hecho de acrílico. En los sistemas que contenían una concentración alta de BSA (0.5 g/l), se utilizó un dispositivo rompedor de espuma hecho *ad hoc*. Este aditamento consistió en una lámina de aluminio ubicada 0.03 m por encima del nivel inicial del líquido. En la Tabla 5.7 se reportan las medidas del tanque y accesorios utilizados en la medición de potencia (tanque A).

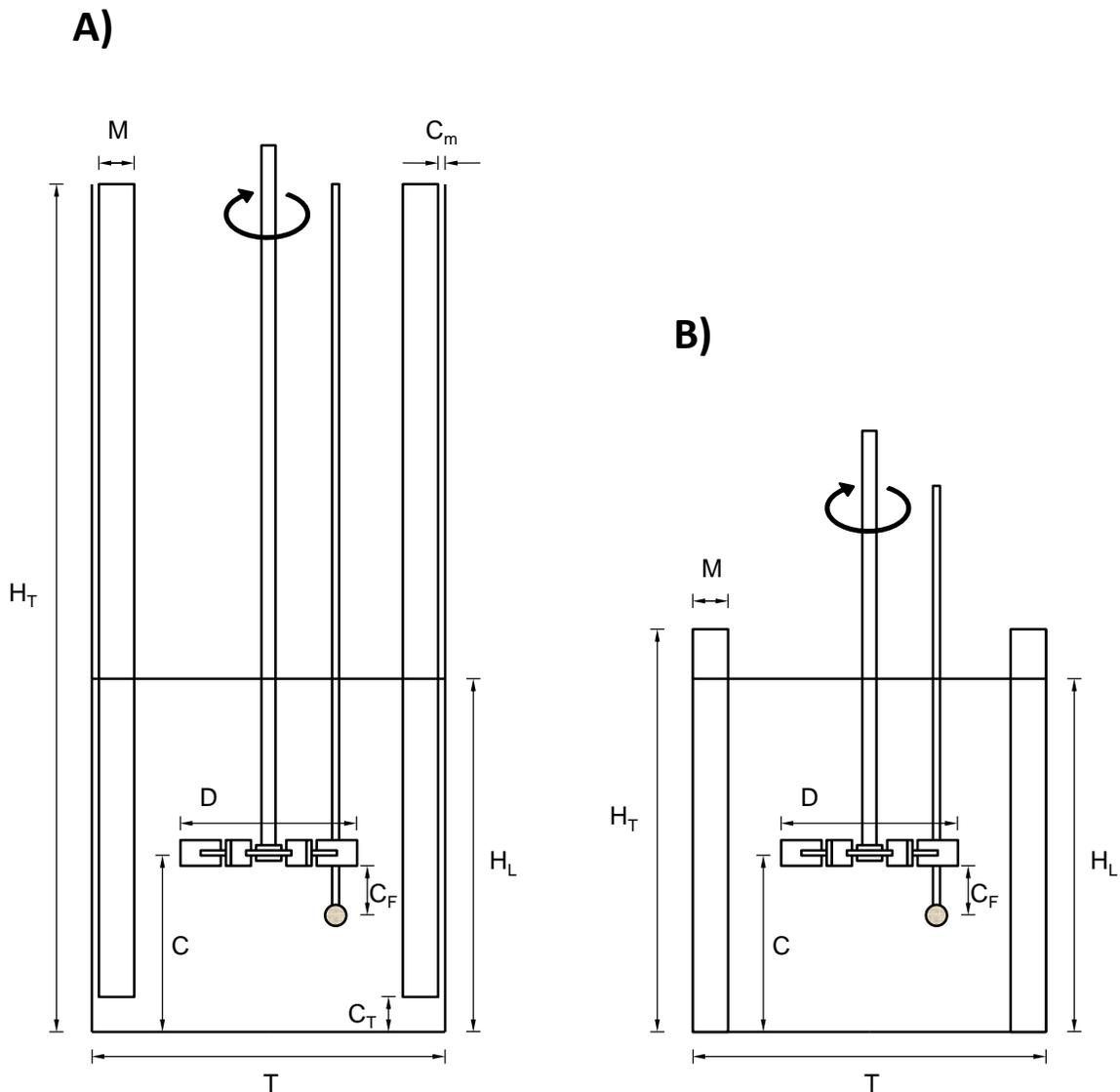


Figura 5.19. Esquema de dimensiones de los tanques utilizados para medir potencia volumétrica (A) y del sistema de micro-estereoscopia (B).

Tabla 5.7. Longitudes características del sistema tanque - agitador utilizado en la medición de potencia volumétrica (tanque A) y en el sistema de micro-estereoscopia (tanque B).

Dimensión	Descripción	Sistema de agitación usando el tanque A (m)	Relación geométrica	Sistema de agitación usando el tanque B (m)	Relación geométrica
T	Diámetro del tanque	0.21	1 T	0.21	1 T
H _T	Altura del tanque	0.51	2.4 T	0.24	1.1 T
D	Diámetro del impulsor	0.105	0.5 T	0.105	0.5 T
C	Separación entre el impulsor y el fondo del tanque	0.105	1 D	0.105	1 D
C _F	Separación entre el difusor de aire y el impulsor	0.05	-	0.05	-
M	Ancho de las mamparas	0.019	0.09 T	0.019	0.09 T
C _m	Separación entre las mamparas y la pared del tanque	0.0025	-	0.0000	-
C _T	Separación entre las mamparas y el fondo del tanque	0.017	-	0.000	-
H _L	Altura del líquido	0.21	1 T	0.21	1 T
D _D	Diámetro del disco del impulsor	0.0780	-	0.0780	-
L	Largo de las paletas del impulsor	0.0260	-	0.0260	-
C _L	Longitud de las paletas del impulsor que está por fuera del disco.	0.0133	-	0.0133	-
X	Ancho del disco del impulsor	0.0031	-	0.0031	-
W	Alto de las paletas del impulsor	0.0205	-	0.0205	-

5.4 Sistema de micro-estereoscopía para la adquisición de imágenes de la dispersión.

El desarrollo y los fundamentos teóricos de la técnica de micro-estereoscopía para el análisis de imágenes, son descritos en detalle por Corkidi *et al.* (2008). El procedimiento básico y las características de los equipos utilizados en la técnica se describen a continuación.

5.4.1 Tanque y condiciones de mezclado

La dispersión de las fases se realizó en un tanque de vidrio (Figura 5.19.B) de 7 l (T = 0.21 m de diámetro, 0.24 m de altura y volumen de trabajo 6.7 l). La agitación fue suministrada por una turbina Rushton con relación de diámetro (D/T) = 0.5, separada del fondo del tanque 1D y 4 mamparas. Para el burbujeo se utilizó un difusor sinterizado con tamaño de poro 20 μm (Waters Chromatography). Las características del tanque de adquisición de imágenes fueron similares a las del tanque de medición de potencia (Figura 5.19 B y Tabla 5.7 – tanque B). A diferencia de las mamparas del tanque A, las mamparas del tanque B no estaban separadas del fondo o de la pared del tanque. Los datos obtenidos en los dos tanques son comparables a las velocidades de estudio y sus efectos se discuten en la Sección 6.3.1.

El tanque se ubicó dentro de una chaqueta cuadrada de acrílico llena con agua, esto tuvo la finalidad de compensar el efecto geométrico de refracción que ofrecía la curvatura del tanque en las imágenes (Taboada *et al.*, 2003) (Figura 5.20).

Las fases a dispersar fueron las siguientes:

- La fase continua constaba de una fase acuosa con concentración de sales igual a la usada en la fermentación original, ver Tabla 5.1, y concentraciones de proteína hasta de 1.36 g/l (Tabla 6.2)
- Aceite de ricino, 5 % v/v, como la fase líquida dispersa.
- La fase sólida fue micelio disperso en concentraciones de 0.5 o 5 g/l.
- Aire como fase gaseosa.

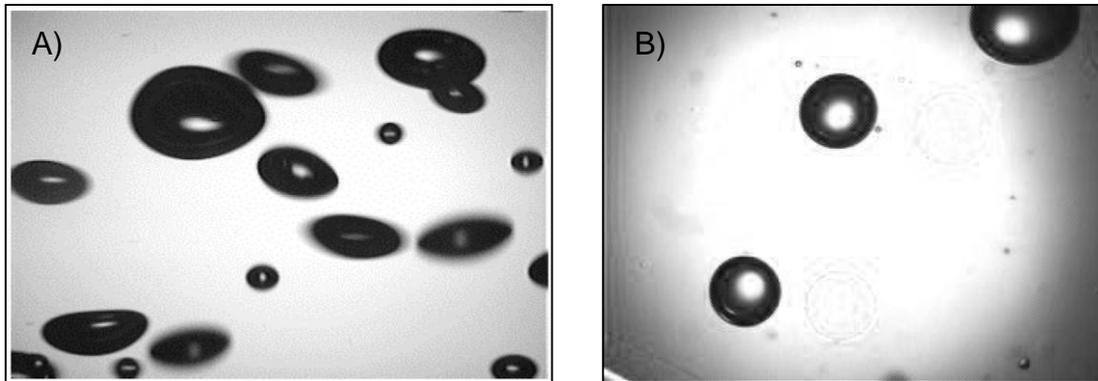


Figura 5.20. A) Burbujas de aire distorsionadas, vistas a través de un tanque cilíndrico. Tomado de Taboada *et al.* (2003). B) Burbujas vistas a través de una chaqueta con agua para corregir el efecto de la curvatura del tanque.

La aireación fue de 0.5 vvm y la velocidad de agitación dependió de la mezcla estudiada, ajustándola siempre de tal manera que se entregaba una potencia volumétrica gaseada de $P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$. Las velocidades de agitación se reportan en la Sección 6.3.2. Previo a la adquisición de imágenes se agitó la mezcla por un lapso de 10 a 13 minutos, tiempo suficiente para alcanzar la estabilidad en los tamaños de las estructuras y para evitar la pérdida de visibilidad al interior del tanque debido a la emulsificación de la mezcla.

5.4.2 Equipo de adquisición de imágenes

La iluminación del campo visual para la captura de las imágenes se llevó a cabo mediante el uso de una fuente de luz estroboscópica MVS-2601 (EG&G Optoelectronics, USA) que emitía destellos a una velocidad de 60 Hz. La luz viajaba por una guía de fibra óptica hasta un endoscopio sumergido en el tanque. La salida de luz del endoscopio, una ventana de 0.004 m de diámetro, se ubicaba a la altura de descarga del impulsor y 0.005 m de la pared del tanque.

Se usaron dos video cámaras CCD (Hitachi-Denshi, Ltd. Modelo KP-D50 digital) acopladas a los oculares de un estereomicroscopio (Olympus America Inc., USA., modelo Olympus SZ4045), para capturar las imágenes del interior del tanque, en la

zona cercana a la pared. Las lentes del estereomicroscopio se ubicaron fuera del tanque, justo en frente de la guía de luz, con un espaciamiento de 0.11 m.

La combinación cámara-estereomicroscopio permitía una magnificación de 3.35X a 20X (Corkidi *et al.*, 2008) y obtenía dos imágenes, separadas por un ángulo de 6°, del mismo plano en el interior del tanque.

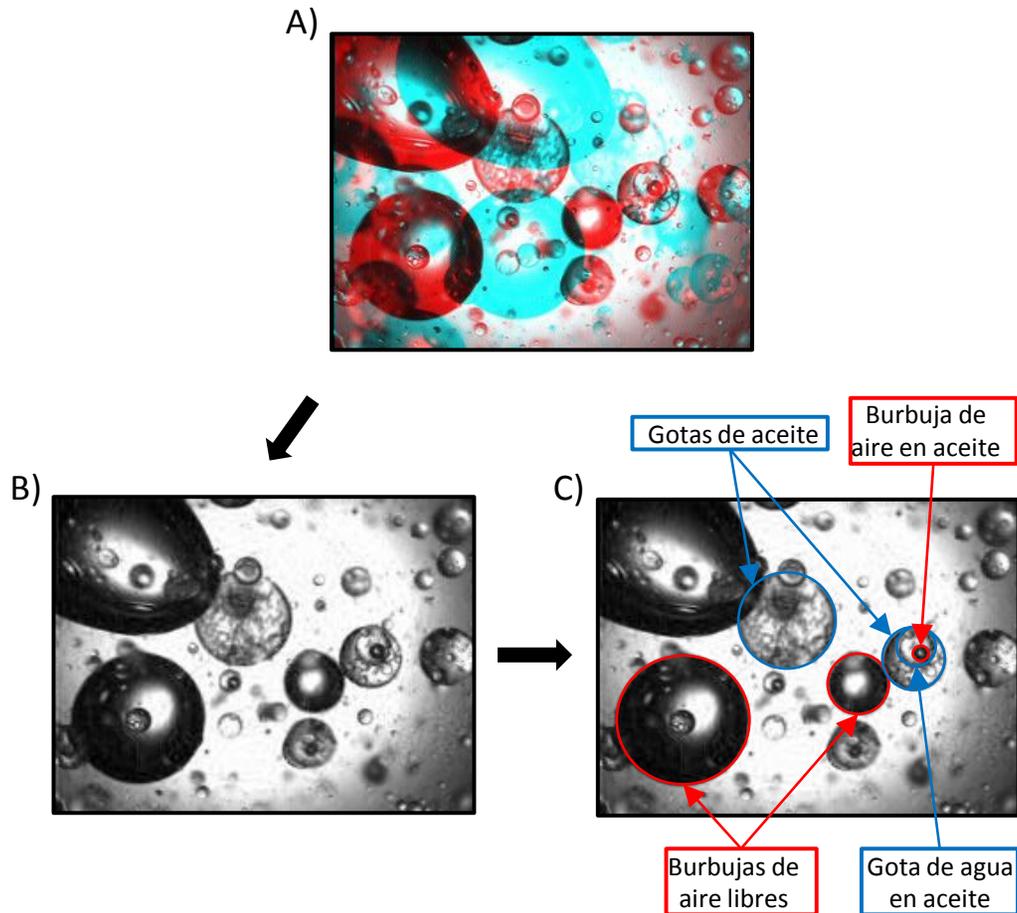


Figura 5.21. A) Ejemplo de imagen estereoscópica, B) canal cian y C) estructuras presentes.

El destello del estroboscopio fue controlado por un programa de computadora. Una señal viajaba de la computadora a un dispositivo, diseñado *ad hoc*, que controlaba el encendido de la lámpara. El dispositivo también controlaba la captura de imágenes, por parte de las cámaras, al sincronizar ésta acción con el destello del estroboscopio. La imagen tomada por cada cámara, una en rojo y la otra en cian,

se transmitía a la computadora utilizando una tarjeta de video (FlashBus™ MV Pro, Integral Technologies, Inc.). De esta forma se pudo construir una sola imagen dual, en rojo y cian (Figura 5.21).

En la puesta a punto de la técnica de micro-estereoscopia se dificultó la obtención de imágenes que coincidieran horizontalmente debido a que los ejes de las cámaras no estaban alineados (Figura 5.22)

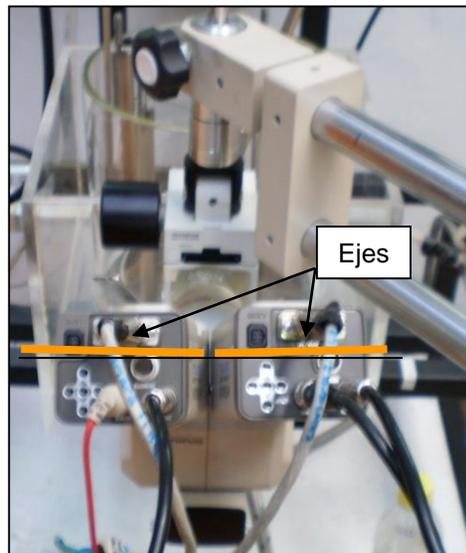


Figura 5.22. Sistema de micro-estereoscopia con cámaras no alineadas.

Para esto se implementó un sencillo patrón externo (Figura 5.23) que consistió en una cruz de cinta adhesiva, alineada horizontal y verticalmente, pegada en un vidrio portaobjetos.

La forma del patrón vista por las cámaras (Figura 5.24) permitió alinear la imagen cian con la roja (derecha e izquierda) y de esta manera los ejes horizontales de las cámaras. En todos los experimentos se calibraron las cámaras antes de empezar la agitación.



Figura 5.23. Guía para la calibración de los ejes horizontal y vertical de las cámaras.

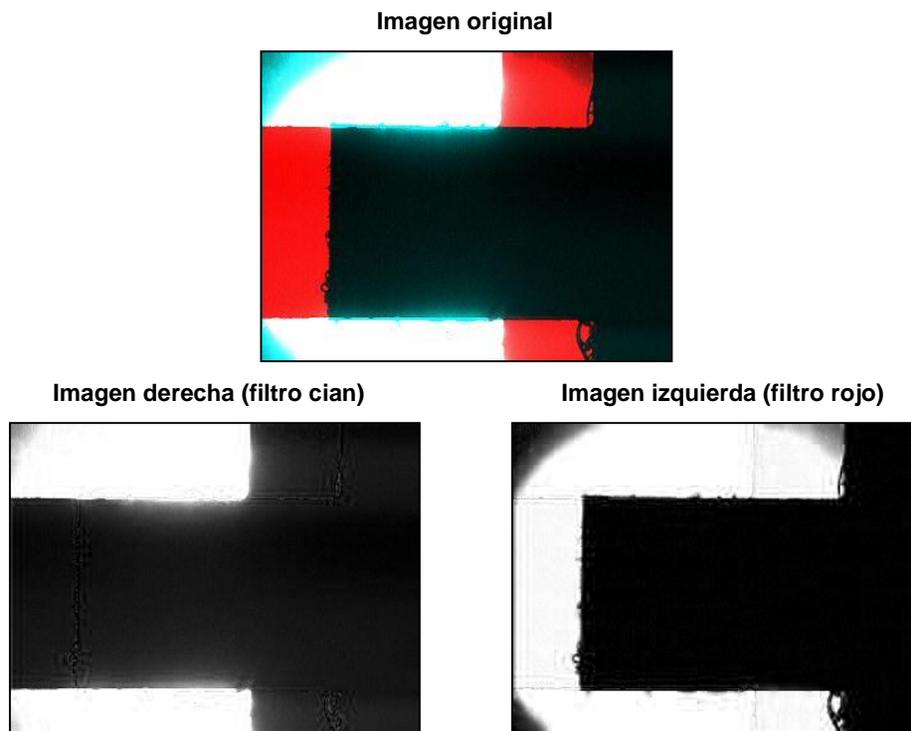


Figura 5.24. Patrón de alineación de cámaras. Se giraron las cámaras para que sus ejes horizontales estuvieran alineados.

5.5 Análisis de imágenes estereoscópicas y tratamiento estadístico de los datos.

5.5.1 Procesamiento de imágenes estereoscópicas

Utilizando la aplicación de computadora “*Stereo v.4.0.*”, de desarrollo *ad hoc* (Corkidi *et al.*, 2008), se aplicaron dos filtros a las imágenes estereoscópicas. Un filtro cian permitía ver la imagen izquierda y el filtro rojo la derecha (Figura 5.25).

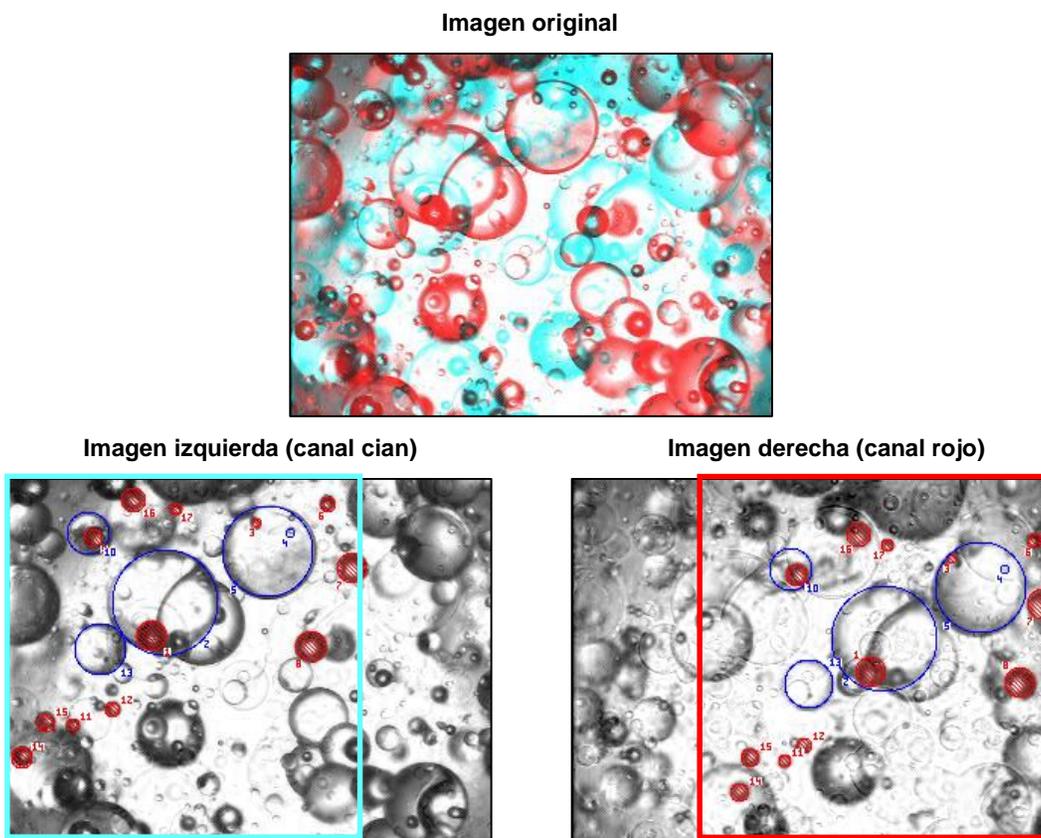


Figura 5.25. Separación de imágenes estereoscópicas, detallando la zona de visión en 3D. En este ejemplo se observa cómo la aplicación “*Stereo v 4.0.*” permite hacer corrección de altura para objetos segmentados en imágenes que no están alineadas verticalmente.

Una vez separadas las imágenes, se procedió a segmentar las estructuras presentes. La segmentación consistía en ubicar, con la ayuda del cursor del ratón, tres puntos que pertenecían al perímetro de la circunferencia en tratamiento. El

programa trazaba una circunferencia que pasaba por los tres puntos de tal manera que coincidía con la gota o burbuja en segmentación. Este primer paso se realizaba en la imagen derecha (cian). Luego el programa permitía trasladar horizontalmente una copia de la circunferencia y ubicarla sobre su contraparte en la imagen izquierda (rojo). Se utilizó un código de colores para identificar las estructuras, en círculos azules para las estructuras claras (gotas de aceite o gotas de agua incluidas en aceite) y círculos rojos para las estructuras oscuras (burbujas de aire libres e incluidas en aceite). Para los casos como el de la Figura 5.25, en que los dos componentes de la imagen no estaban alineados a la misma altura, el programa permitía hacer una corrección de altura. De esta forma todos los objetos segmentados en la imagen izquierda se sobreponen exactamente con sus equivalentes en la imagen derecha.

La lectura del diámetro y la ubicación relativa en las dos imágenes le permitían al programa calcular el centro de masa de las estructuras, la posición tridimensional y determinar si algunas de ellas estaban incluidas (gotas de agua en aceite, burbujas de aire en aceite).

Para cada ensayo de adquisición de imágenes, se segmentaron un total de 300 burbujas y 500 gotas para garantizar que se tenía una muestra significativa, siguiendo un criterio de que la variación el diámetro Sauter (d_{32}) debía ser menor al 5 % por cada estructura adicional que se medía (Lucatero *et al.*, 2003). Generalmente se alcanzó primero el número de gotas de aceite; sin embargo, se siguieron contando en todas las imágenes analizadas hasta que se completó el número mínimo de burbujas. El número mínimo de gotas a segmentar fue mayor que el de burbujas debido a que las gotas presentaban mayor variabilidad en su diámetro y por ende obtener un promedio confiable requirió una muestra mayor. Finalmente, los datos almacenados se exportaron a una hoja de cálculo y se procedió a realizar su análisis estadístico.

Las imágenes en blanco y negro de los componentes cian y rojo presentaron ruido, cada una del otro componente. Así el componente cian presentaba sombras de las

estructuras de la imagen del componente rojo y viceversa. Siendo la imagen derecha (componente rojo) la que presentaba mayor ruido (Figura 5.25).

El uso de la técnica de micro-estereoscopía 3D permitió diferenciar las burbujas libres de las incluidas, de tal forma que no se generaran errores al confundir las dos poblaciones, lo cual fue de suma importancia en este trabajo. Se tuvo en cuenta que, aunque los datos fueron precisos, la técnica presentó una limitante experimental consistente en que solo se pudieron segmentar las burbujas incluidas cercanas a la superficie proximal de gota de aceite o más cercana a la pared del tanque al momento de tomar la imagen (Figura 5.26). En los casos de gotas de aceite con varias capas de burbujas incluidas, solo aquellas en la primera capa pueden ser medidas con seguridad. Como consecuencia de esta limitante, la muestra reportada de burbujas incluidas solo incluyó una fracción de todas aquellas burbujas contenidas en las gotas de aceite reportadas.

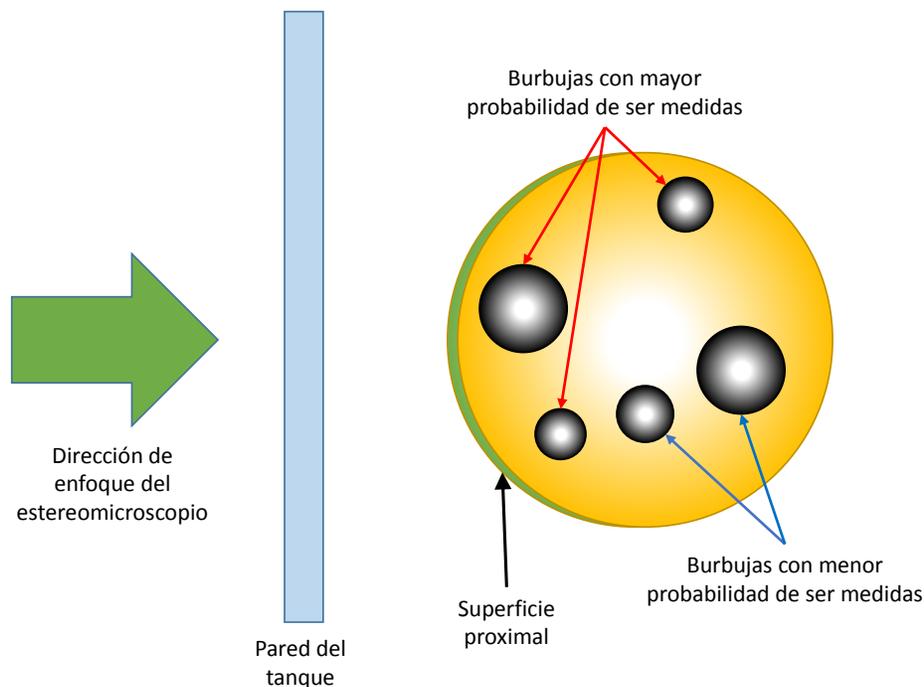


Figura 5.26 Limitante experimental de la técnica de micro-estereoscopía 3D. Solo las burbujas incluidas cercanas a la superficie proximal de la gota de aceite o aquellas en un primer plano pueden ser segmentadas sin interferencia.

5.5.2 Tratamiento estadístico de tamaños de estructura (gotas y burbujas)

Se utilizaron técnicas de estadística descriptiva (histograma de densidad de probabilidad de número e histograma de frecuencia acumulada) para presentar los datos obtenidos en cada experimento de manera que fuesen comparables entre sí y que los efectos de las variables estudiadas fuesen fácilmente descritos.

Los datos de diámetro de cada experimento se separaron en diferentes muestras según fueran burbujas libres, burbujas incluidas, gotas de aceite o gotas de agua. Cada una de estas muestras se analizó por separado.

Para cada muestra se procedió a organizar los datos en orden ascendente, lo cual facilitó la tabulación de los datos en un histograma. Los límites y los intervalos utilizados en las clases del histograma, respondieron a técnicas recomendadas en la literatura de estadística (Holguín, 1970) y a la experiencia derivada del manejo de los datos concretos del proyecto. Así, el límite inferior de la primera clase consistió en 50 μm , el diámetro mínimo que la técnica de micro-estereoscopia podía reportar de manera significativa, sin errores mayores al 15 % (Corkidi *et al.*, 2008); este valor fue determinado por Corkidi y colaboradores (2008) utilizando una reglilla micrométrica graduada de vidrio (longitud graduada: 1 mm; divisiones: 10 μm) al momento de calibrar la técnica y del programa “Stereo v.4.0.”.

Fijado el límite inferior del histograma, se utilizó un intervalo (diferencia entre el límite superior y el inferior de una clase) de 75 μm para las clases de las estructuras libres (burbujas y gotas de aceite) y un intervalo de 50 μm para las clases de estructuras incluidas en las gotas de aceite (burbujas y gotas de agua). Estos valores, fijados *a priori*, fueron adoptados de la heurística generada al observar el comportamiento de los histogramas al utilizar diferentes intervalos. Valores de intervalo menores a los sugeridos, hacían que varias de las clases presentaran una frecuencia de cero, y valores de intervalo mayores provocaban aglomeramiento de los datos, lo que podía llevar a errores de interpretación (Holguín, 1970).

Determinadas las clases se procedió a hacer los histogramas de Densidad de Probabilidad de Número (DPN) (Ecuación 5-6). Esta medida se utiliza para

normalizar distribuciones hechas a partir de frecuencias relativas obtenidas con intervalos de clase diferentes, como cuando se utiliza una fracción de la desviación estándar (σ/n) de los datos para definir las clases.

$$DPN_j = \frac{f_{r,j}}{i} \quad 5-6$$

$$f_{r,j} = \frac{f_j}{n} \quad 5-7$$

Siendo DPN_j : densidad de probabilidad de número de la j -ésima clase; $f_{r,j}$: frecuencia relativa de la j -ésima clase; i : intervalo de clase; f_j : frecuencia en la j -ésima clase; n : tamaño de la muestra.

En el caso específico de este trabajo, las distribuciones de DPN y de frecuencia relativa son equivalentes por cuanto se usaron las mismas clases para representar todos los ensayos. La distribución de DPN se usó para que los datos de este trabajo fuesen comparables con aquellos reportados en la literatura.

Adicional al histograma de DPN, se utilizó el histograma de fracción de volumen acumulado. Este histograma se realizó calculando la fracción del volumen total de las estructuras medidas contenido en una clase específica. De esta manera:

$$X_{vol,j} = X_{vol,j-1} + x_j \quad 5-8$$

$$x_j = \frac{V_j}{\sum_{j=1}^m V_j} \quad 5-9$$

5-10

$$V_j = f_j * \left(\pi \frac{d_j^3}{6} \right)$$

Siendo $X_{vol,j}$: fracción de volumen acumulado de la j-ésima clase; $X_{vol,j-1}$: fracción de volumen acumulado de la (j-1)-ésima clase; x_j : fracción del volumen total contenido en la clase j; V_j : volumen de la clase j-ésima clase; m : número de total de clases; f_j : frecuencia en la j-ésima clase y d_j : diámetro de la j-ésima clase.

Para caracterizar las distribuciones, se utilizó también, el diámetro Sauter ($d_{3,2}$ o d_{32}). Este diámetro es considerado un estadístico de momento, pues relaciona el centro de gravedad de dos características de la misma muestra, como son d^3 (tercer momento del diámetro o d_3) y d^2 (segundo momento del diámetro o d_2), que representan el volumen de las estructuras en la dispersión con el área proyectada por las mismas, además de ser un promedio geométrico. Suponiendo que las burbujas y las gotas medidas fueron una muestra significativa de la población de estructuras en la zona de captura de imágenes, su diámetro Sauter se calculó:

$$d_{3,2} = \frac{\sum_{j=1}^m d_j^3 * f_j}{\sum_{j=1}^m d_j^2 * f_j} \quad 5-11$$

Siendo d_{32} : diámetro Sauter (μm); m : número de clases; d_j : diámetro de la j-ésima clase y f_j : frecuencia de la j-ésima clase.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Contenido de proteína en las mezclas multifásicas.

La posibilidad de que la pasta concentrada de biomasa lavada (Sección 5.1.4), debido a su naturaleza biológica, pudiera contener proteína soluble, hizo necesarias mediciones de proteína total a su sobrenadante (medio líquido separado de los sólidos). Esto sirvió para determinar si la única fuente de proteína era la albúmina de suero bovino (BSA) que se disolvía en el medio líquido, tal como se había propuesto en anteriores trabajos (Larralde-Corona *et al.*, 2002; Pulido-Mayoral y Galindo, 2004).

Las mediciones de proteína realizadas a los sobrenadantes de los dos lotes de pasta descritos en las Secciones 5.1.3 y 5.1.4 (Tabla 6.1.), permitieron observar que al adicionar biomasa lavada a la mezcla de estudio, también se agregaba proteína soluble. La proteína presente en el sobrenadante de la pasta concentrada probablemente se generó por lisis del micelio durante su recuperación (tamizado) o durante el periodo de almacenamiento

Con cada gramo de biomasa lavada, se agregaba también un excedente de hasta 0.17 g de proteína. En una mezcla conteniendo 5 g/l de biomasa se tendrían también 0.86 g/l de proteína soluble concomitante a la presencia del hongo.

Tabla 6.1. Resultados de la determinación de proteína soluble en las pastas concentradas de biomasa usadas en este trabajo

Propiedad	Lote 1	Lote 2
Proteína soluble ($\mu\text{g/ml}$)	3666	1991
Concentración de biomasa (g/l)	21.33	14.9
Proteína soluble (g/g biomasa)	0.1719	0.1336

Considerando que las concentraciones de BSA usadas estuvieron en el intervalo de 0.02 g/l a 0.5 g/l, la proteína proveniente de la pasta de biomasa es relevante para interpretar los resultados encontrados. En los subsiguientes resultados y discusión se consideró a la concentración de proteína total como la suma de la proteína adicionada con el sobrenadante de la pasta de biomasa y la BSA (Tabla 6.2).

Tabla 6.2. Composición de las mezclas analizadas en este trabajo. Todas con aceite de ricino (5 % v/v) y 0.5 vvm de aireación.

Biomasa (g/l)	BSA (g/l)	Proteína total (g/l)
0 (mezcla base)	0	0
0	0.02	0.02
0	0.5	0.5
0.5	0	0.086
0.5	0.02	0.106
0.5	0.5	0.586
5 (lote 2)	0.5	1.16
5 (lote 1)	0.5	1.36
0 (con proteína lote 1)	0.5	1.36

6.2 Caracterización reológica de las mezclas estudiadas.

Dado que la potencia entregada a sistemas agitados depende de las propiedades reológicas de los fluidos mezclados (Sánchez, *et al.*, 1992, Rushton, *et al.*, 1950) y que los caldos de hongos filamentosos, como *T. harzianum*, se caracterizan por su comportamiento reológico complejo (Godoy, 1998), se hicieron pruebas de viscosidad a las mezclas estudiadas. Utilizando el reómetro y el impulsor helicoidal descritos en la Sección 5.2.3, se determinaron los perfiles reológicos de las mezclas caracterizadas en este trabajo (Figura 6.1).

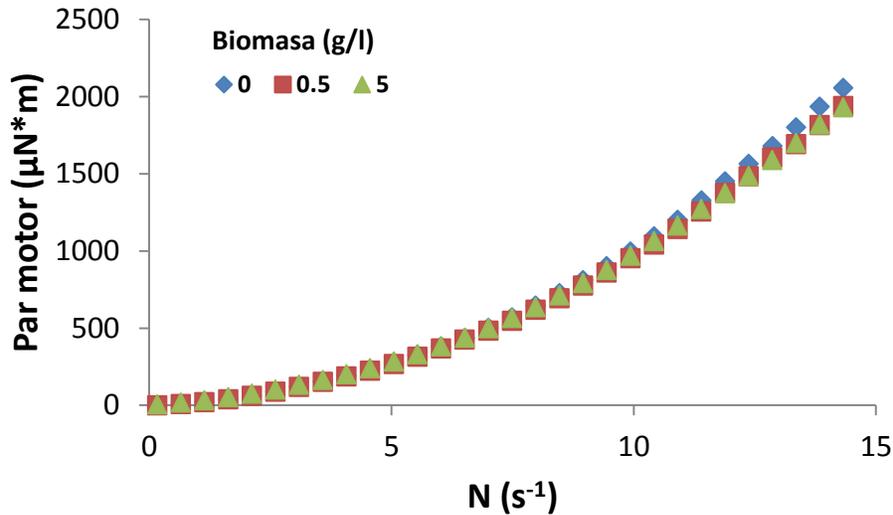


Figura 6.1. Comportamiento reológico de mezclas conteniendo medio acuoso, micelio de *Trichoderma harzianum* (con proteína soluble asociada) y aceite de ricino 5 % v/v.

En la Figura 6.1 se observa que las mezclas que contenían biomasa tuvieron el mismo comportamiento reológico que la mezcla sin biomasa. Lo cual significa que la biomasa, debido al proceso de lavado y conservación, perdió sus propiedades pseudoplásticas.

La pérdida de las características pseudoplásticas de las suspensiones de biomasa ha sido reportada con anterioridad para otros cultivos de hongos filamentosos (Velazco, 1994). Para los caldos de fermentación de los hongos *S. eritreus* y *S. aureofaciens*, se reportó que incluso un tiempo de 2 horas entre la cosecha (toma de muestra) y la medición de las propiedades reológicas, afectaba los valores medidos.

En conclusión, la reología de las mezclas fue una constante en este trabajo, permitiendo observar el efecto de la biomasa, únicamente, como el efecto de la concentración de sólidos suspendidos y no como un agente que brinda comportamiento pseudoplástico al medio.

6.3 Velocidades de agitación usadas para asegurar una potencia gaseada volumétrica (P_g/V) de 0.19 kW/m^3

6.3.1 Caracterización del equipo utilizado en la medición de potencia.

En la determinación de la velocidad de agitación requerida para entregar una potencia gaseada de 0.19 kW/m^3 en cada mezcla (ver Tabla 6.2), se utilizó, en primera instancia, el tanque B (Sección 5.4.1), en un intervalo de velocidades de 100 a 400 RPM. Sin embargo, las mezclas con concentraciones altas de BSA (0.5 g/l) se caracterizaron por producir mucha espuma a velocidades de agitación mayores a 275 RPM. La altura del tanque B ($H_{TB} = 0.24 \text{ m}$, Sección 5.4.1) fue insuficiente para contener la formación de espuma, produciéndose el desbordamiento y pérdida del material de trabajo, inclusive cuando se usó un dispositivo rompedor de espuma (Sección 0). Por esta razón, para las mediciones de potencia, se utilizó otro tanque (A) con características geométricas similares (Tabla 5.7). Las principales diferencias entre ambos tanques radicaron en la altura, el material de construcción y la separación entre las mamparas y la pared del tanque. El tanque usado para medición de potencia (tanque A) tenía una altura de $H_{TA} = 0.51 \text{ m}$ (Tabla 5.7).

Para verificar si la información recolectada en el tanque más alto se podía utilizar para calcular la velocidad de agitación que se buscaba, se hizo una prueba comparativa en los dos tanques. En la prueba se agitó a diferentes velocidades y se midió la potencia entregada al medio acuoso con sales, sin aceite ni aireación.

En las curvas de potencia del medio acuoso sin aireación, que se obtuvieron para cada tanque (Figura 6.2), se observó que la potencia volumétrica a velocidades de agitación de 275 RPM y menores no se ve afectada al cambiar el tanque en que se realiza el ensayo. Las alturas de las barras de error en cada punto indicaron que las diferencias no fueron significativas y soportaron esta explicación (la Figura 6.2 incluye las barras de error para los datos de potencia en las ordenadas).

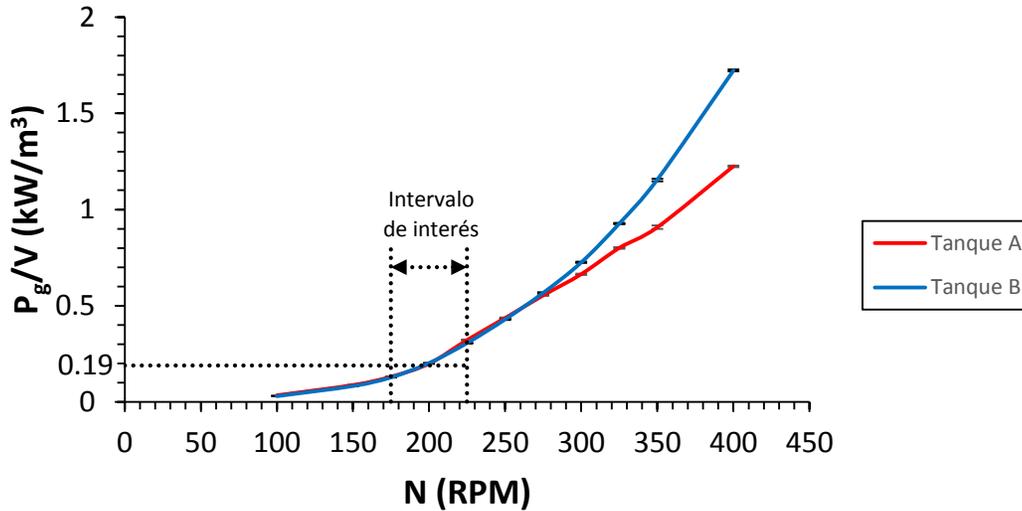


Figura 6.2. Curvas de potencia gaseada de la solución acuosa, usando dos tanques de igual diámetro, diferente altura y diferente separación entre las mamparas y la pared del tanque. Suministro de aire: 0.5 vvm.

La diferencia en las curvas a velocidades de agitación mayores a 275 RPM se atribuyó a una diferencia en la geometría y en los patrones de aireación superficial en los dos tanques. Chapman *et al.* (1980) reportaron diferencias en ensayos de medición de aireación superficial, en los que cambiaban la velocidad de aireación por el difusor y la velocidad de agitación, dado que en este trabajo esos valores se mantuvieron constantes, las diferencias encontradas se atribuyeron a la geometría. La curva de potencia del tanque A, cuyos valores fueron menores que los respectivos del tanque B a partir de las 275 RPM, permitió inferir que en esta configuración se presentaba mayor aireación superficial.

Las diferencias geométricas estuvieron dadas por las características de las mamparas. En el tanque B las mamparas tocaban el fondo y la pared del tanque (Figura 5.19). En el tanque de medición de potencia las mamparas colgaban desde la boca del tanque, ubicándolas $C_T = 1.8$ cm del fondo del tanque y $C_m = 0.3$ cm de la pared del tanque. La diferencia en la geometría de las mamparas pudo ser la causa de que la potencia no gaseada en los tanques fuera diferente a velocidades de agitación mayores de 275 RPM.

La aireación superficial se confirmó visualmente en ambos sistemas, no gaseados, a partir de las 200 RPM y afectó la potencia a velocidades de agitación mayores a 250 RPM. Esta inferencia, que la potencia disminuía debido a un aumento de la aireación superficial, se hizo al observar el comportamiento del número de potencia (Po) para los datos de agua destilada sin aireación en el tanque B (Figura 6.3). Para este sistema de tanque y turbina Rushton, el número de potencia promedio fue de 3.31 (Figura 6.3.A), valores para estos impulsores suelen ser cercanos a 3.5 (valores entre 3 y 5, dependiendo de la configuración de las paletas y el disco, Hemrajani & Tatterson, 2004). Sin embargo, si se hace un acercamiento a los datos (Figura 6.3.B), se observa una caída en el número de potencia a partir de las 275 RPM, que en el sistema sin aireación se debió a que el volumen de aire arrastrado desde la superficie aumentó a valores suficientes para afectar el comportamiento del impulsor y provocar una caída de potencia. En consecuencia, a partir de las 275 RPM, la potencia medida en el sistema cambió de “no gaseada” a “gaseada”. Las velocidades de agitación mayores a 325 RPM presentaron un aumento en el número de potencia, indicando que el impulsor era menos afectado por el flujo de aire tomado desde la superficie.

Con base en los resultados anteriores, se concluyó que las velocidades de agitación que se calcularan usando los datos del tanque A (Sección 6.3.2) para tener una potencia de 0.19 kW/m^3 en los ensayos de adquisición de imágenes en el tanque B, eran confiables en el intervalo de 100 RPM a 250 RPM. En adelante se discutirán los datos obtenidos de potencia obtenidos en el tanque A.

6.3.2 Potencia gaseada en sistemas con biomasa y proteína.

Los ensayos de potencia volumétrica gaseada se realizaron para determinar la velocidad de agitación requerida para lograr la potencia objetivo (0.19 kW/m^3) en todas las mezclas de estudio. Inicialmente se trabajó bajo la hipótesis de que la proteína no cambiaba la potencia entregada al sistema como función de la velocidad de agitación; contrario a lo que sucedería en las mezclas que incluyeran biomasa, cuya presencia podría afectar la hidrodinámica en el tanque de mezclado. Sin

embargo, se hicieron pruebas en todos los sistemas con proteína y/o biomasa para tener controles de todas las mezclas y evaluar dicha hipótesis.

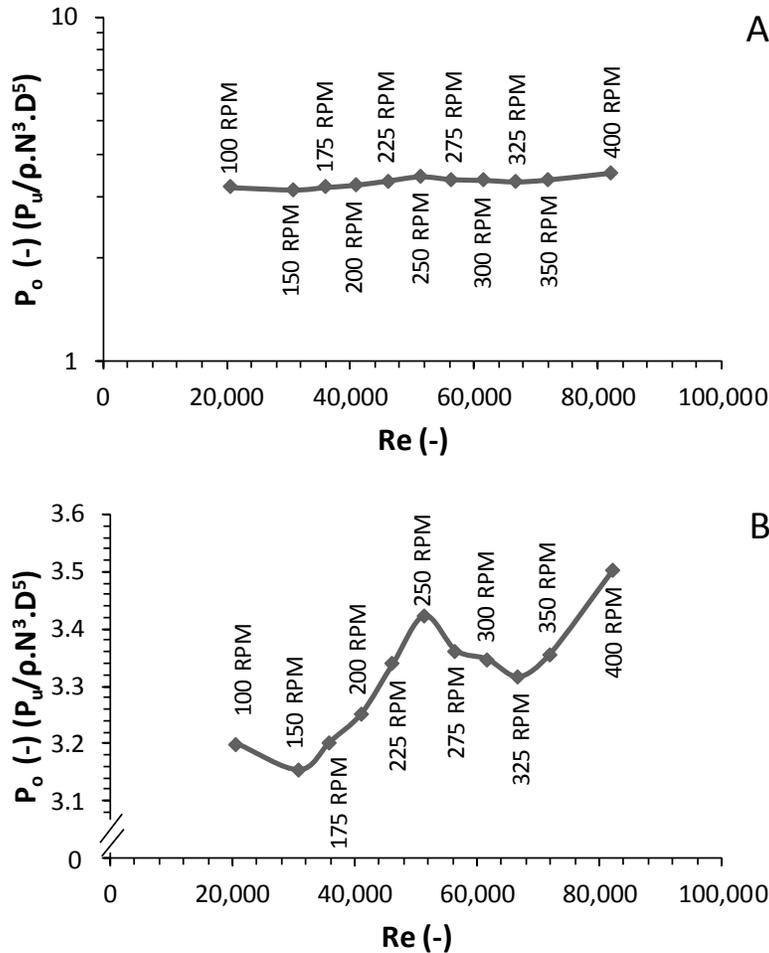


Figura 6.3. Evolución del número de potencia sin aireación por el difusor con respecto a distintas velocidades de agitación, para una turbina Rushton con relación $W/D = 4/21$, en el tanque B. A) Comportamiento típico para una turbina Rushton; B) Acercamiento para determinar el efecto de la aireación superficial sobre el suministro de potencia.

Como se observa en la Figura 6.4, utilizando el medio acuoso (Tabla 5.1), aceite de ricino (5 % v/v), albúmina bovina y aireación, se encontró que un aumento en la concentración de proteína generaba una caída en la potencia gaseada de hasta el 26 %, cuando se comparan el sistema sin proteína y aquel con 0.5 g/l; esta observación fue novedosa, por cuanto este comportamiento no había sido reportado con anterioridad en la literatura.

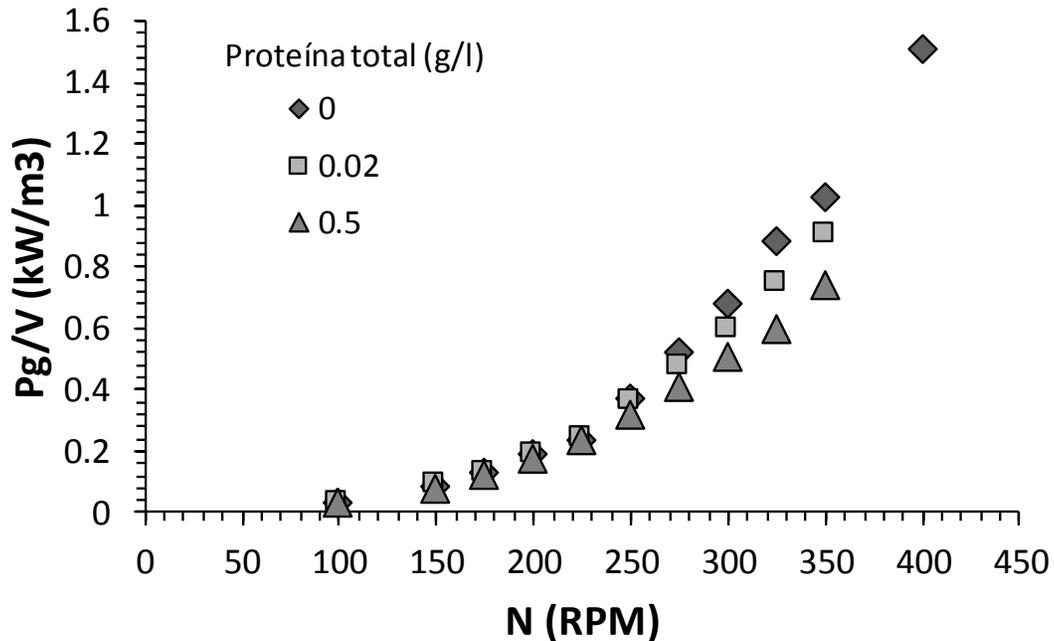


Figura 6.4. Evolución de la potencia gaseada (0.5 vvm) del medio acuoso con aceite de ricino (5 % v/v) a distintas concentraciones de proteína total y sin biomasa. Ensayo realizado en el tanque A.

El efecto de la proteína sobre la potencia gaseada implicó que la hidrodinámica en el tanque fuera perturbada con respecto a lo que se podría encontrar en el sistema sin proteína. Como se mencionó en otras secciones, el aumento en la concentración de proteína se vio acompañado de formación de espuma. A mayor cantidad de proteína, mayor cantidad de espuma se formaba y, derivado de esto, mayor retención de aire en el sistema, lo cual se pudo reflejar en la caída de potencia observada. En la Figura 6.4 no se reportan los datos de potencia gaseada a 400 RPM de las mezclas con 0.02 g/l y 0.5 g/l de proteína, ya que a estas velocidades la presencia de espuma produjo vibraciones en el impulsor y en el tanque, así como inestabilidad en las lecturas obtenidas del sensor de presión del dinamómetro.

En la Figura 6.5 se presentan los datos de potencia gaseada de mezclas que contenían 0.5 g/l de biomasa, con su concomitante proteína soluble. En estas se observó el mismo comportamiento que en aquellas que no tenían sólidos ni su proteína concomitante, esto es, que el aumento de la concentración de proteína generaba una caída en la potencia gaseada.

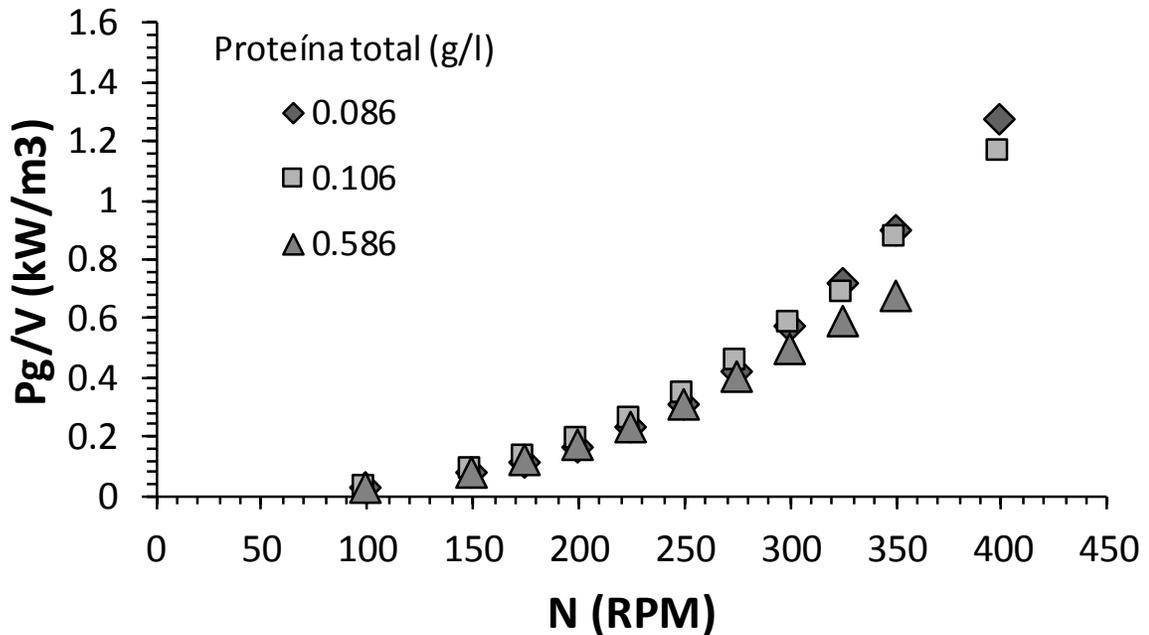


Figura 6.5. Evolución de la potencia gaseada (0.5 vvm) del medio acuoso con aceite de ricino (5 % v/v) y 0.5 g/l de biomasa, a distintas concentraciones de proteína total. Ensayo realizado en el tanque A.

No se determinó directamente el efecto de adicionar la biomasa, para ello se habría necesitado comparar grupos de dos de mezclas con la misma concentración de proteína pero una de ellas sin biomasa y la otra con biomasa, como se discutió en la Sección 6.1; sin embargo, se pudo observar que en las mezclas con 0.086 g/l y 0.106 g/l de proteína total sí se pudieron hacer las lecturas de potencia cuando la velocidad era de 400 RPM (Figura 6.5) a diferencia de lo observado en el sistema sin biomasa y 0.02 g/l de proteína (menor concentración, Figura 6.4). Esto sugirió que los sólidos suspendidos estabilizaron el suministro de potencia al sistema. Al respecto, Córdova-Aguilar y colaboradores (2001) reportaron que en sistemas como el descrito en este trabajo, la presencia de biomasa mejoraba la dispersión del aceite y propusieron que se debía a un efecto de arrastre del aceite por la biomasa; se sugiere la hipótesis de que estos agregados biomasa – aceite pudieron mejorar la transferencia de potencia en el agitador al impedir que las burbujas de aire coalescieran hasta el punto de formar cavidades (Davoody *et al.*, 2016), que a su vez generaran cavitación en el impulsor.

El aumento en la concentración de biomasa a 5 g/l más su concomitante proteína soluble (figura 6.6), permitió observar potencias gaseadas mayores (1.58 kW/m^3 @ 400 RPM) que aquellas descritas por el resto de mezclas (Figura 6.4 y Figura 6.5); incluso sobrepasaron al sistema sin biomasa y sin proteína (1.51 kW/m^3 @ 400 RPM), confirmando que los sólidos suspendidos mejoraban el suministro de potencia. También a estas concentraciones de biomasa se confirmó el efecto de la proteína sobre la potencia gaseada, la cual, comparando a 400 RPM, disminuyó de 1.58 kW/m^3 con 0.86 g/l de proteína a 1.51 kW/m^3 con 0.88 g/l de proteína. Un aumento de 0.02 g/l en la concentración de proteína se tradujo en una disminución del 4.4 % en la potencia gaseada.

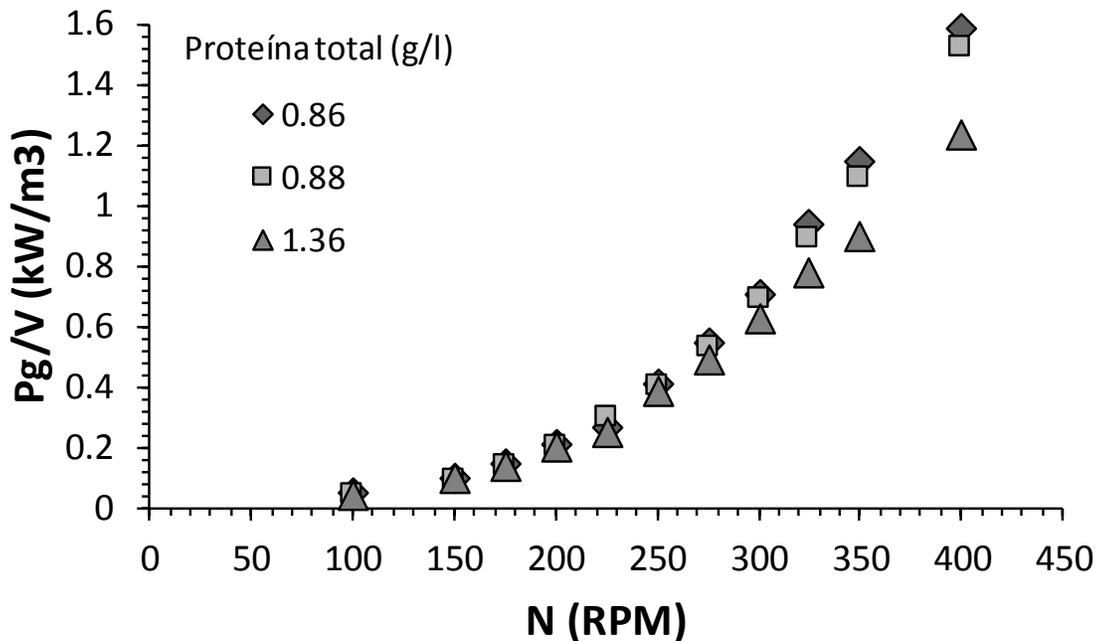


Figura 6.6. Evolución de la potencia gaseada (0.5 vvm) del medio acuoso con aceite de ricino (5 % v/v) y 5 g/l de biomasa, a distintas concentraciones de proteína total. Ensayo realizado en el tanque A.

El efecto de la biomasa y la proteína sobre la potencia gaseada a la velocidad de agitación usada en la fermentación (200 RPM) se muestra en la Figura 6.7. Se puede observar que la estrategia de agitar a la misma velocidad, mezclas de diferente composición, genera potencias gaseadas diferentes y que, para estudiar la dispersión a potencia constante, la velocidad de agitación debe ser corregida.

En la Figura 6.7 también se puede observar que, si se comparan los resultados del mezclado de sistemas con diferente composición de biomasa o proteína, agitados a la misma velocidad del impulsor, también se estará evaluando el efecto que estas pequeñas pero importantes diferencias de potencia tienen sobre los tamaños de las estructuras medidas (gotas de aceite y burbujas de aire). Ejemplos de esto se encuentran en la Figura 6.7; el primero consiste en que la adición de proteína tiene un efecto negativo sobre la potencia gaseada (0.17 kW/m^3 con 0.5 g/l de proteína @ 200 RPM) cuando se le compara con el sistema sin proteína (0.19 kW/m^3 @ 200 RPM o 10% mayor); y, por otro lado, la concentración de 5 g/l de biomasa aumentó el suministro de potencia (0.205 kW/m^3 @ 200 RPM) cuando se le compara con el sistema sin biomasa y proteína (0.19 kW/m^3 @ 200 RPM u 8% menor).

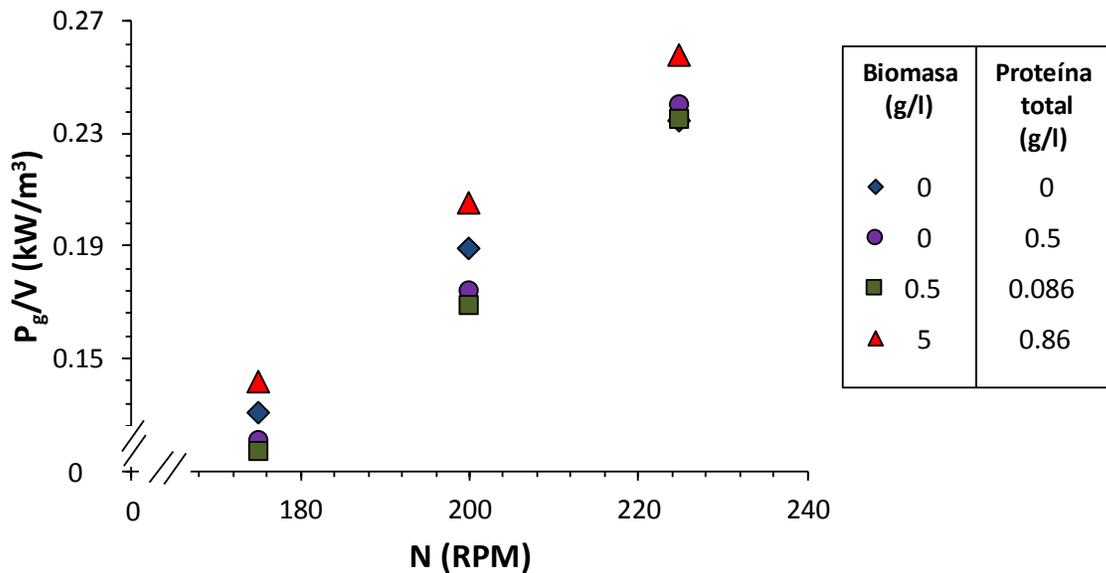


Figura 6.7. Potencia gaseada volumétrica a 200 RPM y 0.5 vvm , de sistemas conteniendo biomasa y proteína a distintas concentraciones. Ensayo realizado en el tanque A con 5% v/v de aceite de ricino.

Teniendo en cuenta que la potencia entregada al sistema es una de las variables que mayor efecto tiene en el mezclado y que en este trabajo se estudian los efectos que los sólidos suspendidos y la concentración de proteína tienen en el tamaño de las estructuras dispersas (gotas de aceite y burbujas), se ajustó la velocidad de agitación para que la potencia gaseada siempre fuese la misma en todas las mezclas.

Para determinar las velocidades de agitación necesarias para entregar una potencia volumétrica de 0.19 kW/m³ en los ensayos de mezclado, se hizo una regresión potencial, del tipo de la Ecuación 6-1, con los datos de cada una de las curvas de potencia según fuera la mezcla a estudiar (Figura 6.4, Figura 6.5 y Figura 6.6). Las variables de ajuste se presentan en la Tabla 6.4.

$$Pg / V = a * N^b \tag{6-1}$$

Siendo Pg/V: potencia gaseada [kW.m⁻³]; N: velocidad de agitación [RPM]; a: constante de ajuste [(kW.min.m⁻³)^b] y b: constante de ajuste [-].

Una vez hecha la regresión se procedió a calcular las velocidades de agitación (N) según fue el caso. Las velocidades de agitación usadas en los ensayos se presentan en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3. Velocidades de agitación (RPM) necesarias para suministrar una potencia de 0.19 kW/m³ a un volumen de 6.7 l con diferentes concentraciones de proteína total y biomasa.

		Proteína total (g/l)							
		0	0.02	0.086	0.106	0.5	0.586	1.16	1.36
Biomasa (g/l)	0	194	197			206			202
	0.5			204	199		206		
	5							191	194

En la Figura 6.8 se muestra el intervalo de velocidades que se usó para algunas de las mezclas, tomadas de la Tabla 6.3. Se puede observar que se usaron velocidades de agitación hasta con 15 RPM de diferencia (Tabla 6.3). En estudios previos se agitaba todas las mezclas a 200 RPM, bajo la suposición de que la potencia no se veía afectada y era igual a la reportada para las condiciones iniciales de una

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.4. Constantes para el cálculo de potencia en sistemas conteniendo biomasa y proteína en diferentes concentraciones. Siguiendo el modelo de la Ecuación 6-1: $Pg/V = a * N^b$. Siendo Pg/V : Potencia gaseada [$kW.m^{-3}$]; N : Velocidad de agitación [RPM]; a : constante de ajuste [$(kW.min.m^{-3})^b$] y b : constante de ajuste [-].

Biomasa (g/l)		Proteína total (g/l)																									
		0			0.02			0.086			0.106			0.5			0.586			1.16			1.36				
		a	b	r ²	a	b	r ²	a	b	r ²	a	b	r ²	a	b	r ²	a	b	r ²	a	b	r ²	a	b	r ²		
0		$6.60 * 10^{-8}$	2.82	0.9931	$1.41 * 10^{-7}$	2.67	0.9979																				
0.5							$7.74 * 10^{-8}$	2.77	0.9966	$1.70 * 10^{-7}$	2.63	0.9991				$3.15 * 10^{-7}$	2.50	0.9989									
5																			$8.46 * 10^{-8}$	2.78	0.9943	$2.11 * 10^{-7}$	2.60	0.9960			

fermentación. Los datos de la Figura 6.7 y de la Figura 6.8 muestran que a velocidad de agitación constante se generan diferencias importantes en la potencia gaseada y que dichos estudios son válidos solo si se toma en cuenta la potencia como un factor adicional sobre el comportamiento de la dispersión, esto es, que la potencia no se puede asumir como constante ya que es afectada por la presencia de biomasa y proteína.

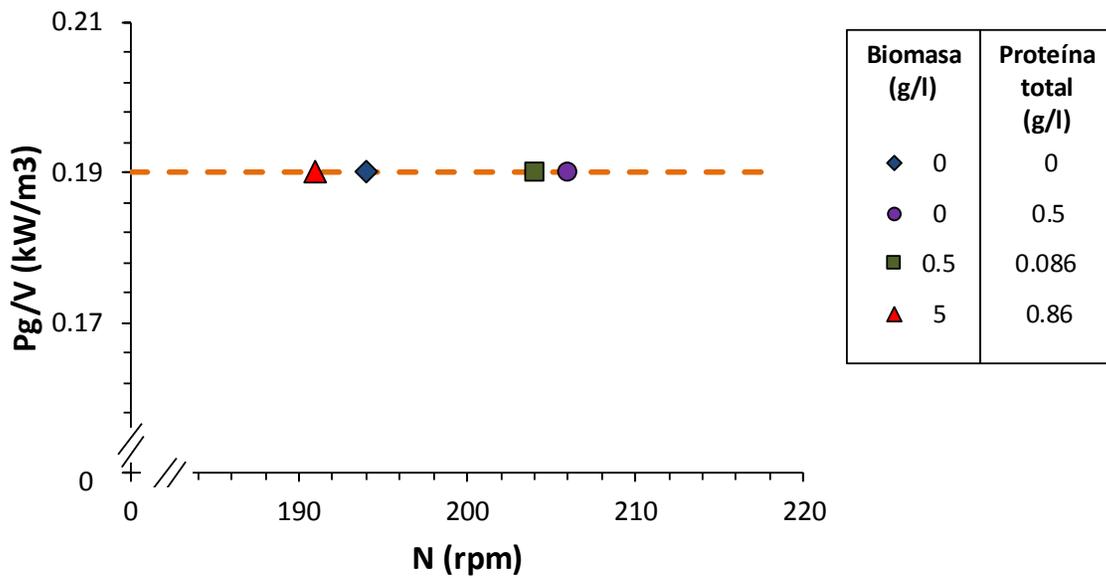


Figura 6.8. Velocidad calculada de agitación necesaria para entregar una potencia gaseada volumétrica de 0.19 kW/m³ a sistemas con una aireación de 0.5 vvm conteniendo biomasa y proteína total en distintas concentraciones. Datos de la Tabla 6.3, calculados con la Ecuación 6-1 con constantes de la Tabla 6.4

El control de la potencia gaseada, fue el fundamento principal de este trabajo. Se buscaba reducir las variables a estudiar, limitándose sólo a la tensión en las interfases (modificada por la proteína) y a la presencia de sólidos (biomasa) para observar su efecto en la dispersión de las fases (medida como el tamaño de las gotas de aceite y las burbujas de aire, Sección 6.6). Controlar una variable tan importante como la potencia gaseada al modificar la velocidad de agitación, seguramente generó cambios en otros parámetros hidrodinámicos en el tanque, por ejemplo, el tiempo de circulación, el número de Froude, el número de flujo de aire, entre otros. Sin embargo, como se discutirá más adelante (Sección 6.6), los cambios

en la hidrodinámica debidos al cambio de velocidad de agitación, no tuvieron efecto observable en el tamaño promedio de las estructuras medidas, evidenciando que la potencia es el factor de mayor importancia, al menos en la sección del tanque estudiada (descarga del impulsor cercana a la pared).

La decisión de medir la potencia en todos los sistemas se apoyó en consiguado desde 1958 por Calderbank (1958), quien indicó que la comparación de tamaños de gotas y burbujas entre sistemas en los que no se había medido la potencia, no era correcto, aun cuando el intervalo de tamaños de las estructuras fuera el mismo, porque la potencia era un factor determinante del tamaño de las mismas.

6.4 Comportamiento de las tensiones de interfase

En esta sección se discute el comportamiento de las tensiones de interfase características de cada clase de estructura encontrada en la dispersión, a saber:

- Tensión superficial agua – aire (σ_{W-A}) Burbujas de aire libres
- Tensión interfacial agua – aceite (σ_{W-O}) Gotas de aceite
- Tensión superficial aceite – aire (σ_{O-A}) Burbujas incluidas

Como se explicó en la Sección 5.2.2.2, para la medición de tensión en las interfases para los sistemas con biomasa, las mezclas no contenían sólidos *per se*, sino que se midieron a concentraciones de proteína total que incluían BSA y la proteína contenida en el sobrenadante de pasta concentrada de micelio, equivalentes a la concentración de biomasa reportada. Los resultados de esta sección se contrastan con los observados de tamaños de estructura en la Sección 6.6, explicando por qué el diámetro Sauter (d_{32}) de las burbujas de aire libres describe el mismo patrón que el descrito por la tensión de su respectiva interfase y por qué las gotas de aceite no son susceptibles al cambio de tensión interfacial.

6.4.1 Tensión superficial agua – aire (σ_{W-A})

Las mediciones de tensión superficial e interfacial resultaron relevantes para entender cuáles de estas superficies se veían afectadas por la presencia de proteína y permitieron observar dos fenómenos de importancia, que sucedían en el sistema modelo y no habían sido reportados con anterioridad:

1) Los fenómenos de superficie fueron afectados por la presencia de aceite de ricino. A saber, la tensión superficial del medio acuoso (W-A) respondió a un efecto combinado de la proteína soluble total y el aceite de ricino (Figura 6.9 y Figura 6.10).

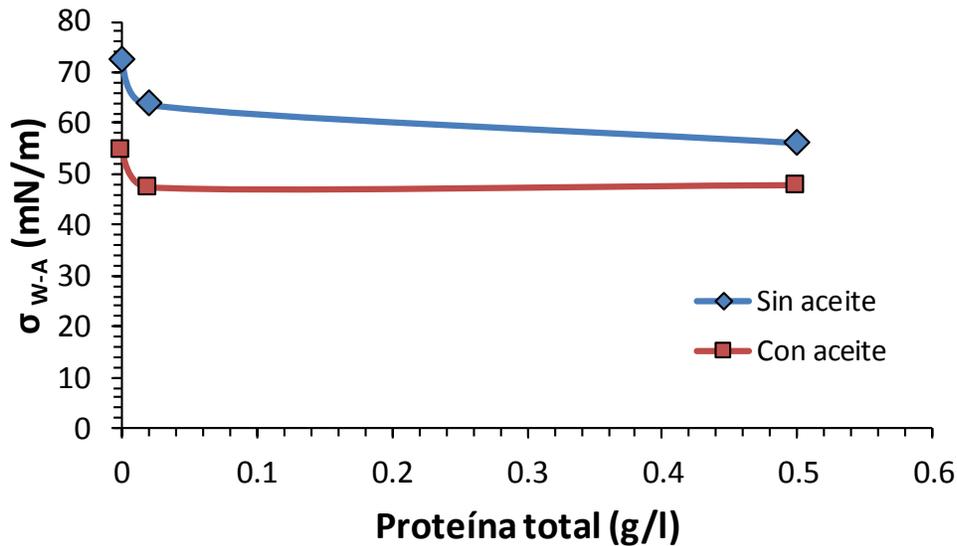


Figura 6.9. Influencia del aceite de ricino (5 % v/v) en la tensión superficial del medio acuoso a diferentes concentraciones de BSA.

2) La tensión de la interfase agua-aire (W-A) no es suficiente para explicar el cambio en el tamaño de todas las estructuras que no fueran burbujas libres (ver más adelante); las tensiones de las interfases agua-aceite (W-O) y aceite-aire (O-A), en cambio, se usaron para entender la dispersión de aceite y los tamaños de las burbujas incluidas, respectivamente. Esto se debe a que el cambio en la concentración de proteína no afectó de la misma manera las tres interfases.

Estos dos fenómenos se explican a detalle a continuación.

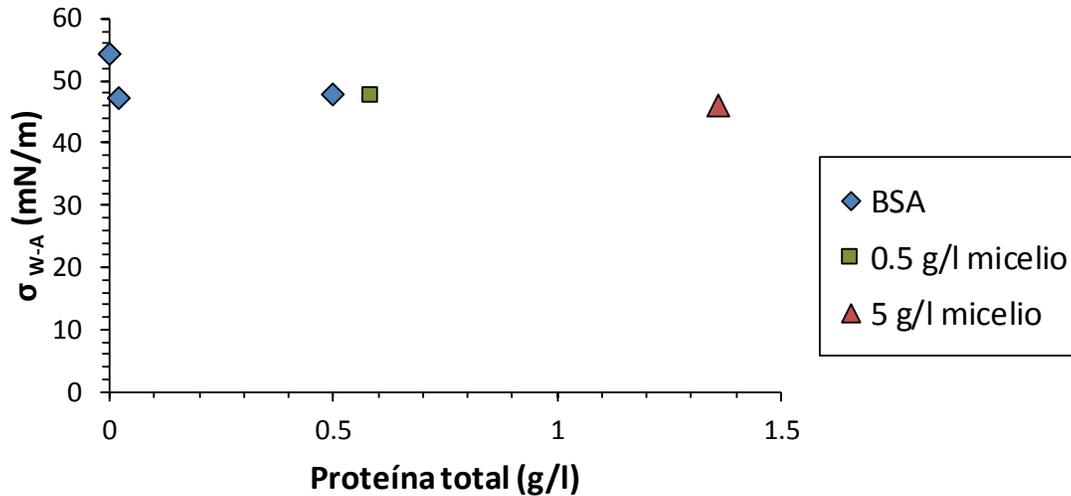


Figura 6.10. Tensión superficial del medio acuoso “contaminado” con aceite a distintas concentraciones de proteína total y biomasa (para las concentraciones específicas de proteína ver la Tabla 6.2).

El aceite de ricino, debido a su actividad surfactante, provocó una disminución en la tensión superficial del medio acuoso. Como se observa en la Figura 6.9, en presencia de aceite, la tensión superficial del medio acuoso sin proteínas cayó de 72 mN/m a 54 mN/m. La adición de proteína a la mezcla con aceite describió una curva de saturación (Figura 6.10), con una meseta a una tensión de 47 mN/m. La disminución observada de 7 mN/m de la tensión superficial (W-A) en los ensayos que contenían 0.02 g/l de proteína total (Figura 6.10), respecto al medio acuoso solo con aceite, fue un indicativo de que una fracción de la proteína migraba a la interfase, aun cuando ésta última estaba “contaminada” con aceite, esto es, que la interfase agua – aire tenía aceite (o los ácidos grasos contenidos en él) adsorbidos. Este comportamiento se observó incluso cuando la proteína total incluía la proteína soluble de las pastas de biomasa a concentraciones de proteína total de hasta 1.36 g/l (Figura 6.10). El que no se haya observado una disminución posterior de la tensión superficial fue un indicativo de que la interfase estaba saturada con las proteínas presentes y el aceite.

En la Figura 6.11 se presenta el panorama general de lo que sucede cuando se hace la medición de tensión superficial con y sin aceite. Reportar como representativas las mediciones hechas en sistemas sin aceite podría generar un

error en la interpretación de los resultados de los tamaños de estructuras en el sistema de cuatro fases.

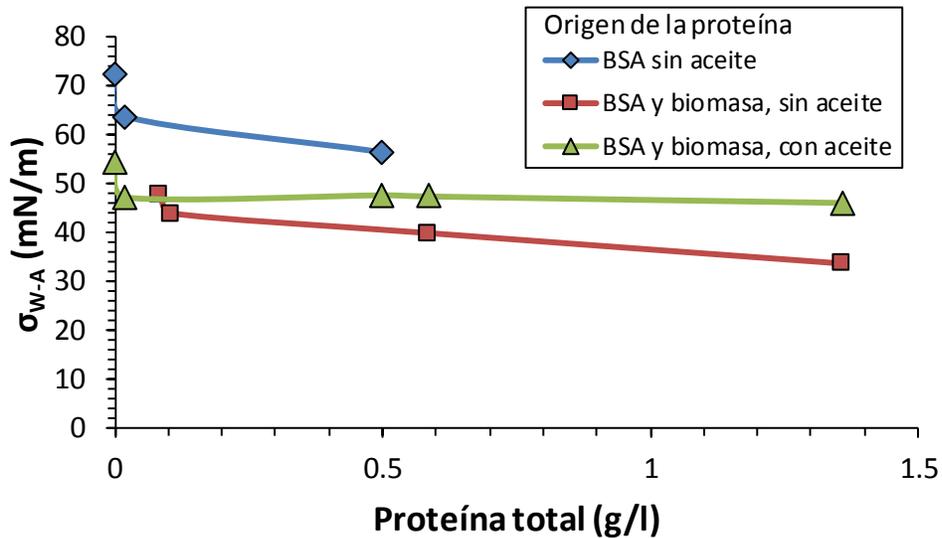


Figura 6.11. Comportamiento de la tensión superficial del medio acuoso (σ_{w-A}) con proteínas en mezclas con y sin aceite.

Como se observa en la Figura 6.11, sin aceite, la tensión interfacial sigue disminuyendo cuando se agrega proteína proveniente de la biomasa al sistema en concentraciones mayores de 0.02 g/l; por otro lado, en presencia de aceite, como se discute en el párrafo anterior, la tensión superficial si disminuye, pero alcanza su nivel de saturación desde concentraciones de proteína de 0.02 g/l. En la Sección 6.6.2 se discute cómo el valor constante de la tensión superficial coincide con los valores también constantes del tamaño promedio de las burbujas de aire, medidos como diámetro Sauter (d_{32}).

Relkin, *et al.*, (1999) y Pezennec, *et al.*, (2000) sugieren que las proteínas se desnaturalizan en las interfases, reorganizando sus dominios hidrofóbicos e hidrofílicos hasta adquirir mayor estabilidad que cuando están en solución. Es probable que la presencia de triglicéridos en la interfase, compitiendo por el área disponible, evite que las proteínas se desplieguen completamente, que la concentración de las mismas en la interfase no alcance su máximo o simplemente que tengan un efecto repelente que evite que las proteínas migren a la interfase.

6.4.2 Tensión interfacial agua – aceite (σ_{w-o})

La tensión interfacial agua – aceite (W-O) (Figura 6.12), también disminuyó en respuesta a un aumento en la concentración de proteína total. Al comparar los resultados para las concentraciones de 0 g/l y 1.36 g/l de proteína total, esta tensión, característica de la superficie de las gotas de aceite, presentó cambios en el mismo orden de magnitud (5 mN/m) que la tensión superficial del medio acuoso (σ_{w-A}). Este resultado fue importante, por cuanto indicaba que una fracción de la proteína también migraba a esta interfase (agua - aceite) y que el tamaño de las gotas de aceite podría verse afectado de la misma manera que las burbujas de aire por la presencia de proteína en la mezcla. Esto se discute en la Sección 6.6.3.

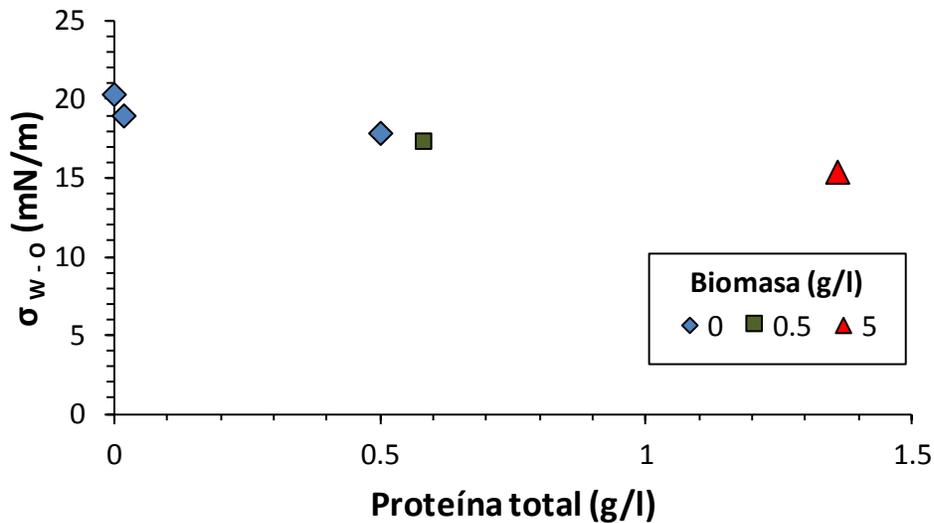


Figura 6.12. Tensión interfacial agua - aceite (W-O) a distintas concentraciones de proteína total en la fase acuosa y diferentes concentraciones de biomasa.

6.4.3 Tensión superficial aceite – aire (σ_{o-A})

Finalmente, la tensión superficial aceite – aire (O-A) (Figura 6.13) no presentó cambios (38.6 +/- 0.8 mN/m), indicando que la proteína no migraba de forma importante a esta interfase. Esto indicó que los cambios observados en el tamaño de las burbujas incluidas serían respuesta a la presencia de biomasa como sólido suspendido.

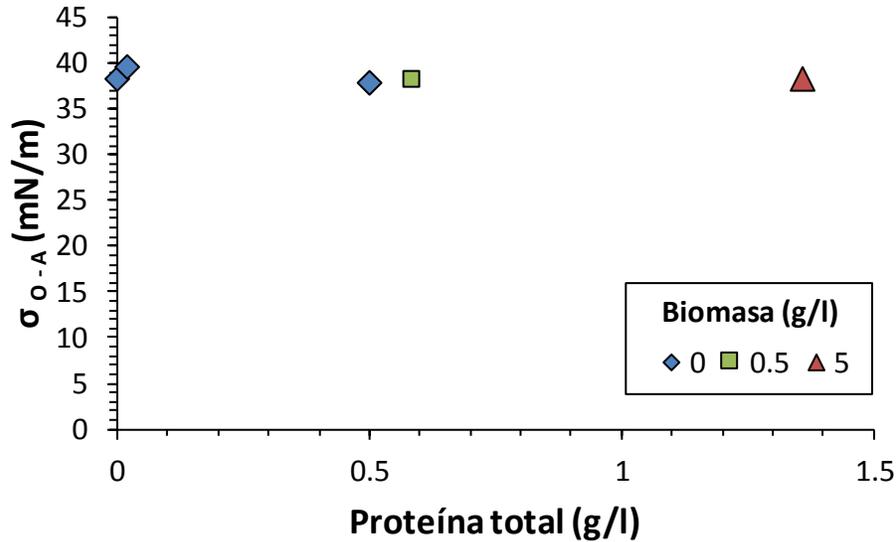


Figura 6.13. Tensión superficial del aceite de ricino luego de estar en contacto con soluciones acuosas conteniendo diferentes concentraciones de proteína total y diferentes concentraciones de biomasa.

6.5 Análisis de las imágenes adquiridas

Las imágenes adquiridas con el sistema de micro-estereoscopía, presentaron diferencias por su nitidez, número de objetos (gotas, burbujas) y complejidad de los mismos. En su mayoría los cambios de nitidez se dieron por la presencia de la biomasa; sin embargo, también se encontraron cambios en el número de objetos por imagen, cuando se cambió la concentración de proteína.

En la Figura 6.14 se muestra un ejemplo representativo de imágenes de una mezcla sin biomasa. Las fotografías en color rojo y cian corresponden a la imagen original, adquirida con el sistema de micro-estereoscopía 3D descrito en la Sección 5.4, y, justo debajo, la imagen del componente izquierdo (cian), para su apreciación, como se indica en la Sección 5.5.1. Se seleccionó el componente cian debido a que presentaba menos ruido cuando se separaban los dos componentes. Las estructuras negras son burbujas de aire y las estructuras circulares transparentes pueden ser, dependiendo de su tamaño y ubicación, gotas de aceite o gotas de agua incluidas en las gotas de aceite.

La mezcla base (Figura 6.14), medio acuoso – aceite – aire, se caracterizó por ser un medio cristalino que permitía una buena iluminación, estructuras (gotas y burbujas) brillantes, definidas y de fácil segmentación, caracterizada también por un mayor número de gotas de agua incluidas en aceite por imagen, cuando se le compara con otras mezclas con proteína y biomasa. En este sistema se requirieron 90 imágenes para obtener la información suficiente para el análisis (Sección 5.5.1).

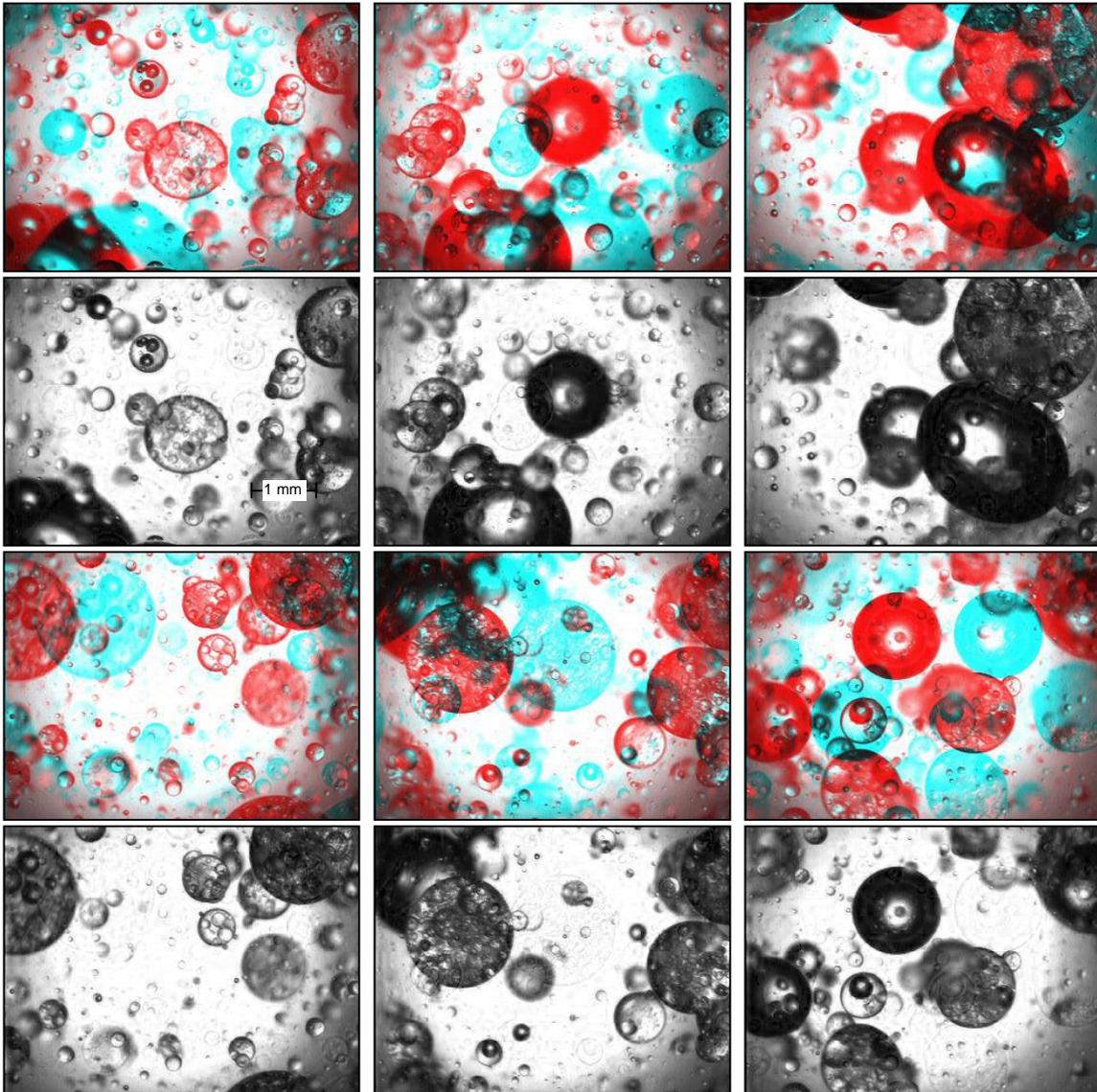


Figura 6.14. Imágenes de micro-estereoscopia de una mezcla de medio acuoso y aceite (5 % v/v) con aireación (0.5 vvm). Magnificación 6 X. Cada imagen estereoscópica tiene debajo, en blanco y negro, su componente cian que permite observar a detalle las estructuras.

Los sistemas conteniendo la mezcla base y BSA, conservaron las características ópticas de nitidez y las condiciones de buena iluminación (Figura 6.15). La presencia de proteína generó un aumento en el número de estructuras observadas, llegando necesitarse sólo 36 imágenes para obtener información suficiente para el análisis.

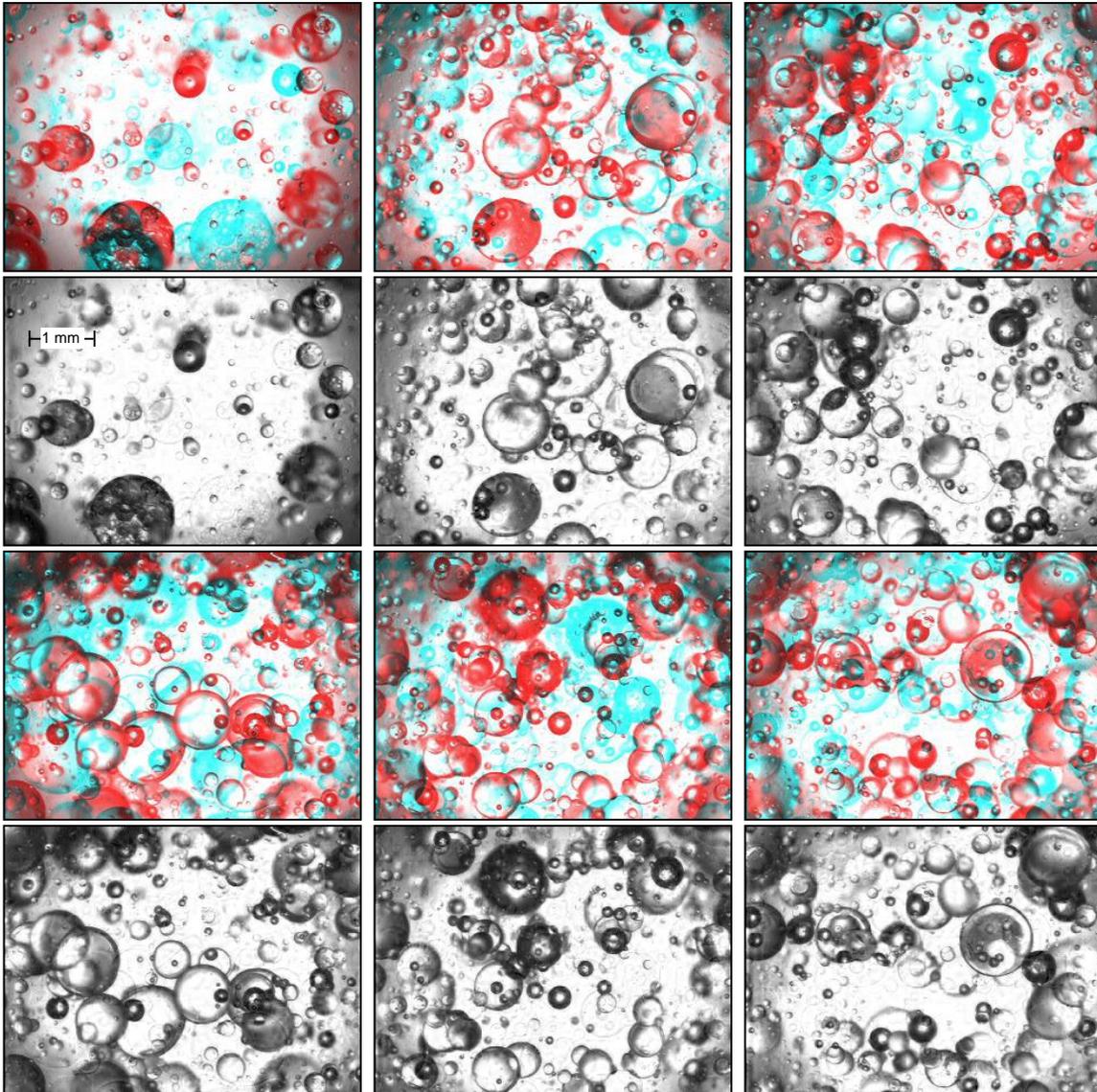


Figura 6.15. Imágenes de micro-estereoscopia de una mezcla de medio acuoso y aceite (5 % v/v) con aireación (0.5 vvm) y BSA. Magnificación 6 X. Cada imagen estereoscópica tiene debajo, en blanco y negro, su componente cian que permite observar a detalle las estructuras.

Los sistemas de la mezcla base con BSA y 0.5 g/l de biomasa (con su concomitante proteína) (Figura 6.16), requirieron un aumento en la potencia de la fuente de luz

para obtener imágenes claras, ya que la biomasa generó un oscurecimiento de las imágenes posiblemente debido a efectos de difusión de la luz, comparadas con aquellas sin biomasa.

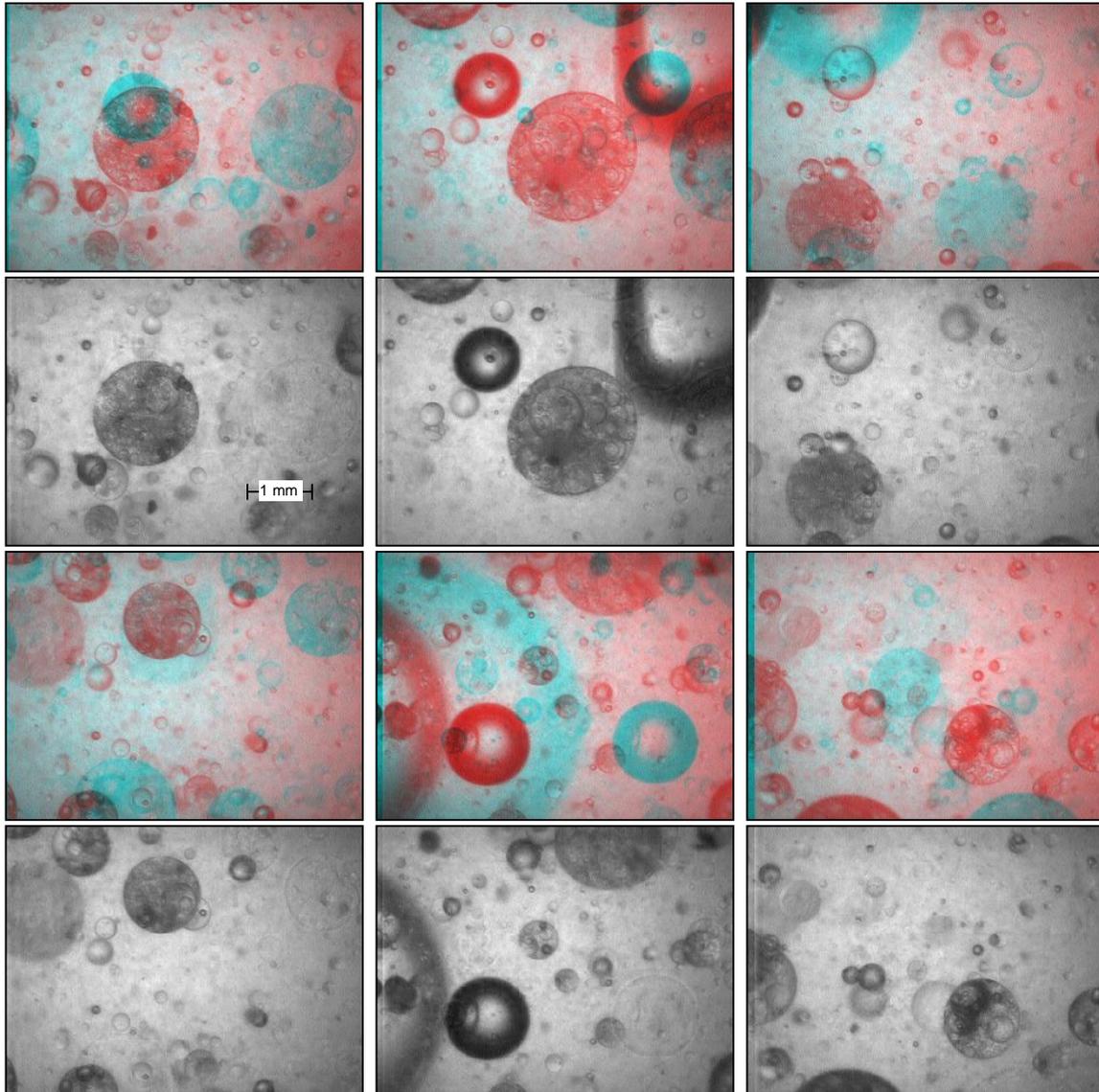


Figura 6.16. Imágenes de micro-estereoscopia de una mezcla de medio acuoso y aceite (5 % v/v) con aireación (0.5 vvm), proteína soluble y biomasa (0.5 g/l). Magnificación 6 X. Cada imagen estereoscópica tiene debajo, en blanco y negro, su componente cian que permite observar a detalle las estructuras.

Se observó que, en presencia de biomasa, el número de estructuras por imagen disminuyó, incluso algunas no se podían medir debido a que la interferencia de la

biomasa disminuía su nitidez, impidiendo determinar si estaban en foco. Como consecuencia de esto fueron necesarias un máximo de 210 imágenes para tener información suficiente para analizar.

Por último, para los sistemas de la mezcla base con BSA y 5 g/l de biomasa (con su concomitante proteína) (Figura 6.17), se caracterizaron porque en las fotografías se pudieron observar detalladamente los cúmulos de micelio. Debido a ello se requirió aumentar la potencia de la fuente de luz para obtener imágenes adecuadas.

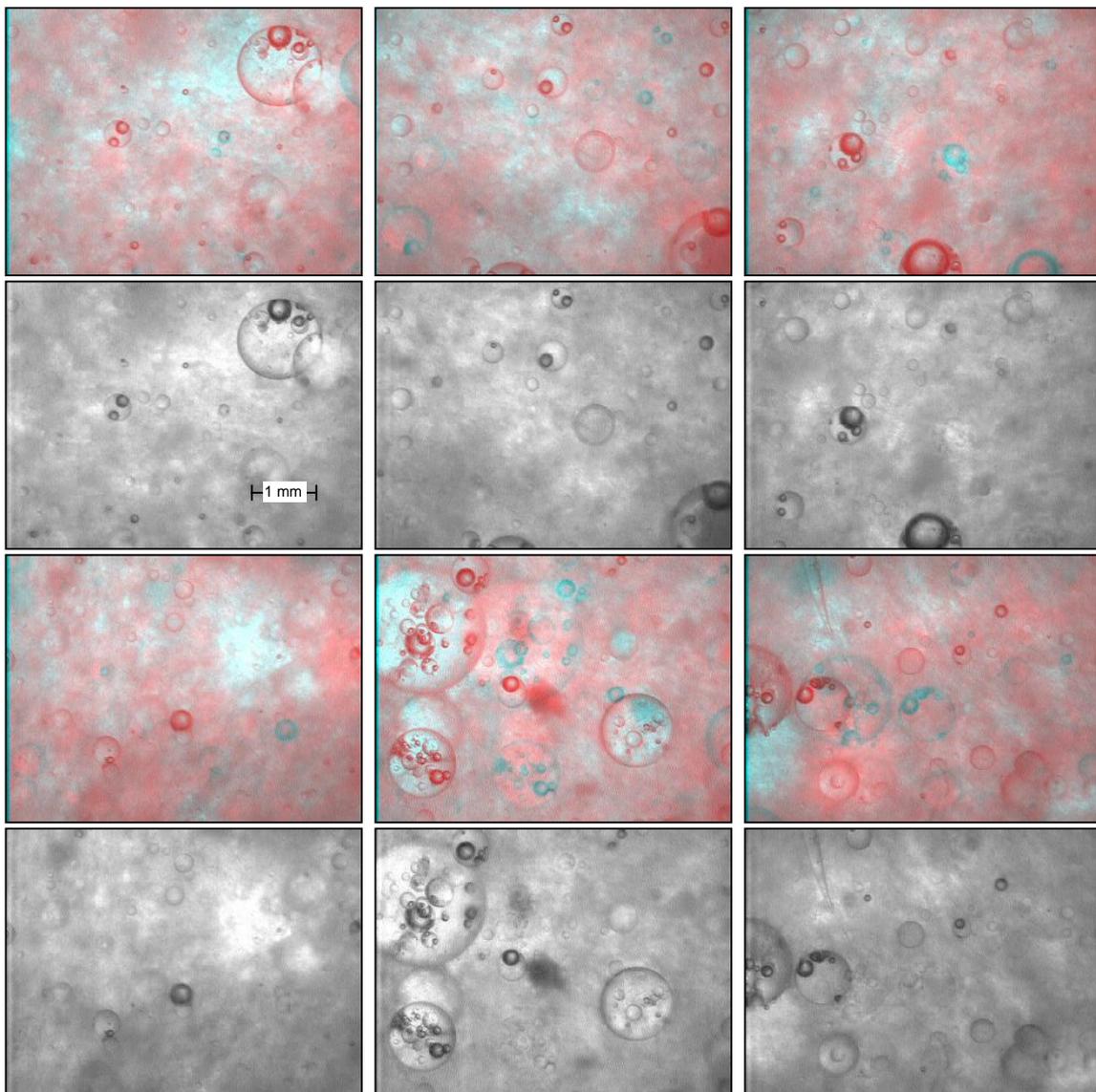


Figura 6.17. Imágenes de micro-estereoscopia de una mezcla de medio acuoso y aceite (5 % v/v) con aireación (0.5 vvm), proteína soluble y biomasa (5 g/l). Magnificación 6 X. Cada imagen estereoscópica tiene debajo, en blanco y negro, su componente cian que permite observar a detalle las estructuras.

En estos sistemas se requirieron hasta 155 imágenes para reunir información suficiente para analizar. Fueron menos que en el sistema con 0.5 g/l de biomasa (210 imágenes) debido a que la biomasa a 5 g/l, generaba burbujas libres más pequeñas, las cuales a su vez quedaban atrapadas entre los cúmulos de micelio. En comparación, se tuvieron en promedio 1.43 burbujas libres por imagen con un diámetro Sauter de $d_{32} = 909 \mu\text{m}$ en el sistema con 0.5 g/l de biomasa y 1.93 burbujas libres por imagen con un diámetro Sauter de $d_{32} = 436 \mu\text{m}$ en el sistema con 0.5 g/l de biomasa. Esto se discute en la siguiente sección (6.6).

6.6 Efecto de la biomasa y la proteína en la dispersión

En esta sección se presenta cómo los efectos observados de la proteína y la biomasa sobre los fenómenos de superficie (tensión superficial e interfacial, Sección 6.4) y sobre la hidrodinámica del sistema (Sección 6.3) se manifestaron sobre los tamaños de las burbujas de aire libre, de las gotas de aceite y de las burbujas incluidas. Para esto se presentan los datos de diámetro promedio Sauter (d_{32}) para hacer comparación entre mezclas diferentes y se complementa en cada caso esta información con las distribuciones de diámetro y de volumen acumulado, las cuales brindan información importante para entender los cambios en el diámetro promedio.

6.6.1 Efecto del tamaño de los agregados del hongo en la dispersión.

Como se presentó en la Sección 5.1.6.3, se usaron dos lotes de biomasa en los ensayos de mezclado y toma de imágenes. Las poblaciones de micelio de estos lotes se caracterizaron por tener tamaños diferentes. Para identificar cualquier efecto del tamaño de la biomasa en las gotas y las burbujas, se hizo una comparación de las estructuras descritas por mezclas conteniendo biomasa de cada lote.

En la Sección 6.6.2, más adelante, se describe que la biomasa sólo tuvo efecto sobre el tamaño de las burbujas de aire libres en la concentración de 5 g/l. En la Figura 6.18, se muestra que las burbujas de aire, de las mezcla con 5 g/l de biomasa de ambos lotes, tienen un diámetros Sauter muy cercanos ($d_{32\text{-aire}}$ lote 1 = 436 μm , $d_{32\text{-aire}}$ lote 2 = 482 μm); cuando se compararon esos diámetros con el obtenido de una mezcla que contenía la misma concentración de proteína que el lote 1, pero sin los sólidos ($d_{32\text{-aire}}$ lote 1 = 841 μm).

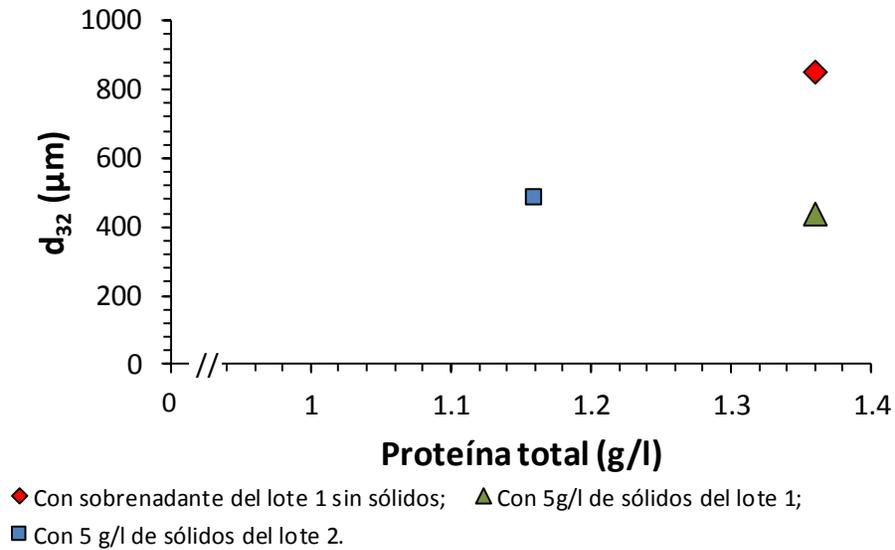


Figura 6.18. Diámetro Sauter (d_{32}) de burbujas de aire libres en sistemas conteniendo biomasa de diferentes lotes en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

El encontrar que los diámetros Sauter de las burbujas en las mezclas que contenían biomasa eran cercanos, dentro del margen de error de la técnica y de la magnitud de los cambios observados, se consideró como una evidencia de que las diferencias en la morfología de los agregados de micelio de los dos lotes usados (Sección 5.1.6.3) no tenían efecto sobre el tamaño de las estructuras.

6.6.2 Dispersión de aire libre

El diámetro promedio, d_{32} , de las burbujas libres tuvo tres respuestas fácilmente identificables (Figura 6.19). A saber:

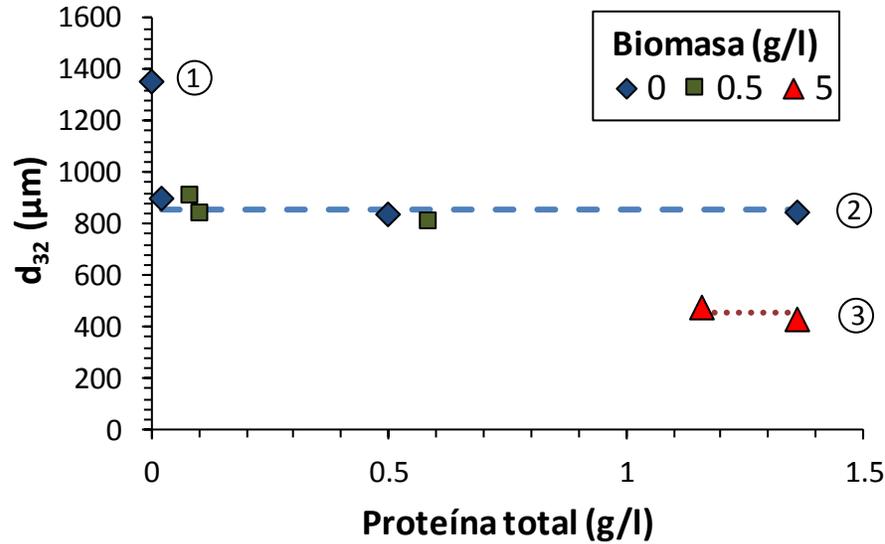


Figura 6.19. Diámetro Sauter (d_{32}) de burbujas de aire libres a distintas concentraciones de biomasa y proteína en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$)

1) Primer nivel: Mezcla sin proteína ni biomasa. La presencia de aceite de ricino establece la tensión superficial (W-A). Diámetro promedio $d_{32} = 1350 \text{ } \mu\text{m}$. Esta respuesta al efecto surfactante del aceite es equivalente a lo que se encuentra justo cuando se empieza la fermentación. El valor del diámetro Sauter evidencia que se encuentran burbujas de tamaño grande.

2) Segundo nivel: Mezclas con proteína sin biomasa o con 0.5 g/l de micelio. Diámetro promedio $d_{32} = 800 - 900 \text{ } \mu\text{m}$ (segmentos de línea azul en la Figura 6.19). El segundo nivel de respuesta presentó un diámetro d_{32} inferior al valor del sistema sin biomasa y sin proteína ($d_{32} = 1350 \text{ } \mu\text{m}$). Esta respuesta se debió al efecto de la proteína y fue congruente con la disminución de la tensión superficial (W-O) medida al adicionar proteína a la mezcla de medio acuoso con aceite de ricino, discutida en la Sección 6.4.1 y expuesta en la Figura 6.10. Este comportamiento fue semejante al reportado por Calderbank (1958), quien sugirió que el tamaño de burbujas de gas en dispersiones gas-líquido, era determinado por un balance entre las fuerzas debidas a la tensión superficial y las fuerzas debidas a las fluctuaciones propias de

la turbulencia. Teniendo en cuenta que la tensión superficial (Figura 6.10) y la potencia suministrada en todos los ensayos en el segundo nivel de respuesta fueron constantes, el comportamiento similar de los d_{32} se entendió como un efecto directo del cambio en la tensión superficial (W-A). De esta manera se concluyó que *el parámetro importante en determinar el tamaño de las burbujas libres, cuando se agita a potencia constante, fue la tensión superficial.*

Las distribuciones de tamaño (Figura 6.20) y de volumen (Figura 6.21) de las burbujas de aire en el sistema sin biomasa mostraron la complejidad en la respuesta a la adición de proteína. Pese a tener el mismo diámetro promedio (Figura 6.19), las distribuciones presentaron diferencias que seguían un patrón.

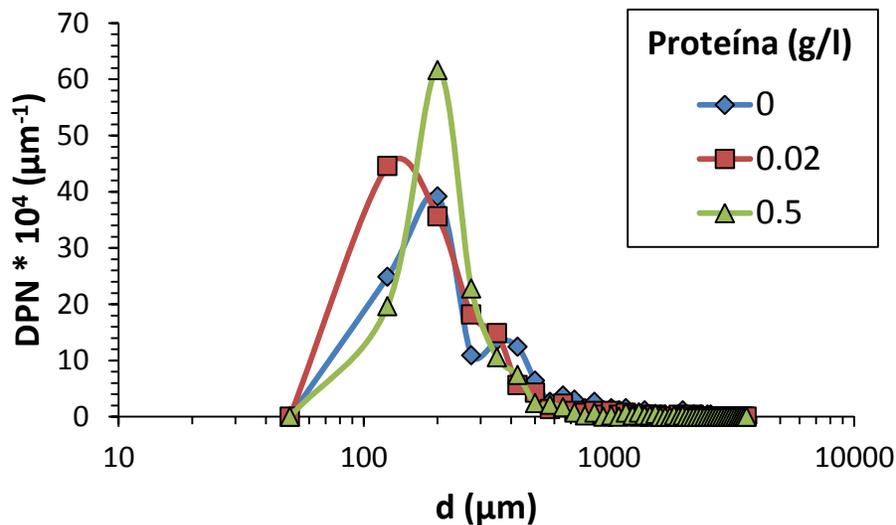


Figura 6.20. Distribución de probabilidad de número (DPN) de diámetros de burbujas libres en sistemas sin biomasa, con BSA y con potencia constante ($Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

El aumento en la concentración de proteína produjo un crecimiento en la población de burbujas de diámetro pequeño ($d < 300 \mu\text{m}$) (Figura 6.20) y una disminución en el diámetro máximo (Figura 6.21) de $2575 \mu\text{m}$ (en el sistema sin proteína), a $1963 \mu\text{m}$ (en el sistema con 0.5 g de proteína), ambos sin biomasa.

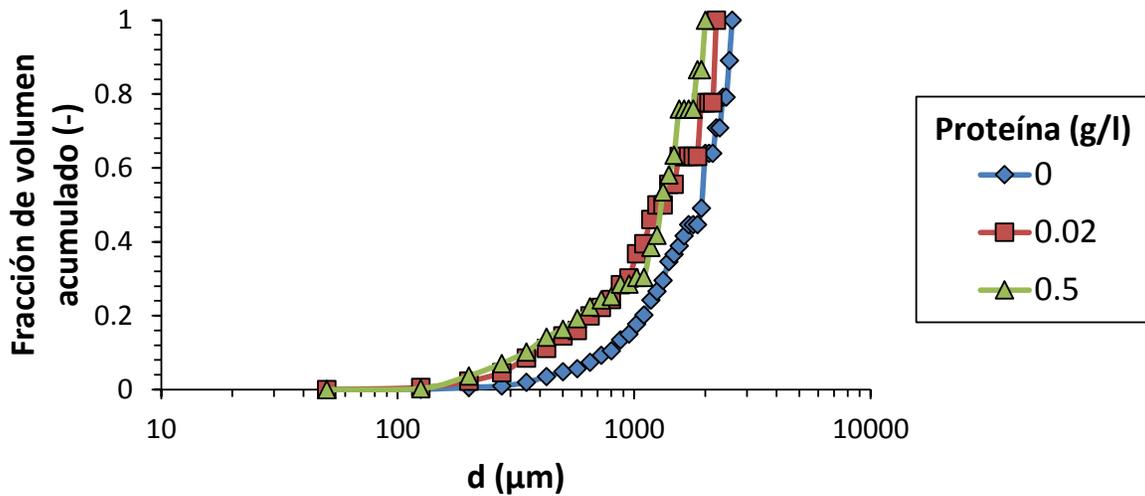


Figura 6.21. Distribución de volumen acumulado de burbujas de aire libres en sistemas sin biomasa, con BSA y con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

Teniendo en cuenta que:

- 1) La potencia suministrada fue la misma en todos los sistemas.
- 2) Los diámetros Sauter fueron relativamente iguales.
- 3) Las distribuciones de tamaño fueron diferentes.

Se propone la hipótesis que la población de burbujas libres respondió a la cantidad constante de energía suministrada (potencia), de tal forma que el área superficial generada en todos los casos se mantuvo constante (valor que está ligado directamente al diámetro Sauter y al *hold up*), aunque hubiese cambios en las distribuciones de tamaño debidas a la variación de la velocidad de agitación. Esta hipótesis no pudo ser comprobada directamente porque no se midió el *hold up* en el sistema; sin embargo, evidencia indirecta se encontró en los diámetros de las gotas de aceite (Sección 6.6.3), las cuales también presentaron diámetros Sauter cercanos con distribuciones diferentes. Como la fracción de aceite en todos los experimentos fue siempre la misma, se puede confiar en la validez de dicha hipótesis hasta obtener más datos que puedan comprobarla.

Un ejemplo de la respuesta del tamaño de partículas a la cantidad energía suministrada en procesos de disminución de diámetro, se describe en Perry (2008), donde se discute el proceso de molienda de sólidos. El tamaño de las partículas de sólidos después de una operación de molienda depende de la cantidad de energía que se suministra y de la forma en que las fuerzas se ejercen. La ecuación diferencial 6-2, es una representación general de esta relación energía - tamaño.

$$dE = -C \frac{dX}{X^n} \quad 6-2$$

Siendo E: trabajo realizado; X: tamaño de partícula; C y n: constantes.

Una solución de esta ecuación, la ley de Rittinger (Ecuación 6-3), relaciona la energía usada y el tamaño final de los sólidos, a través del área superficial generada por la molienda, lo que implica que la energía suministrada se usa para formar nueva área superficial.

$$E = C \left(\frac{1}{X_P^2 - 1} - \frac{1}{X_A^2 - 1} \right) \quad 6-3$$

En sólidos, el alcance de dichas suposiciones es limitado, debido a las formas irregulares que adquieren las partículas formadas y a la pérdida de energía en forma de calor y sonido. Sin embargo, en este trabajo se propone utilizar dicha interpretación para entender el comportamiento de las estructuras de fluidos suspendidos en los tanques de mezclado, debido a que dichas estructuras pueden alcanzar conformaciones regulares de mínima energía (forma esférica) dentro del reactor.

Continuando con las mezclas que contenían 0.5 g/l de biomasa, estas no presentaron mayores diferencias en su diámetro Sauter, al ser comparadas con las mezclas que sólo contenían proteína (Figura 6.19). En las distribuciones de tamaño (Figura 6.22) y de volumen acumulado (Figura 6.23) se observó que los tamaños de las burbujas en las mezclas con 0.5 g/l de biomasa fueron prácticamente iguales a los tamaños de las burbujas del sistema que tenía la concentración de proteína más cercana, 0.586 g/l y 0.5 g/l, respectivamente. Esto evidenció que la biomasa en bajas concentraciones (0.5 g/l) no tuvo un efecto sobre las burbujas de aire; o bien el efecto indirecto de la proteína total sobre la tensión superficial (W-A) y sobre el tamaño de las burbujas libres fue mayor que cualquier efecto individual que pudo ejercer la biomasa en la concentración de 0.5 g/l.

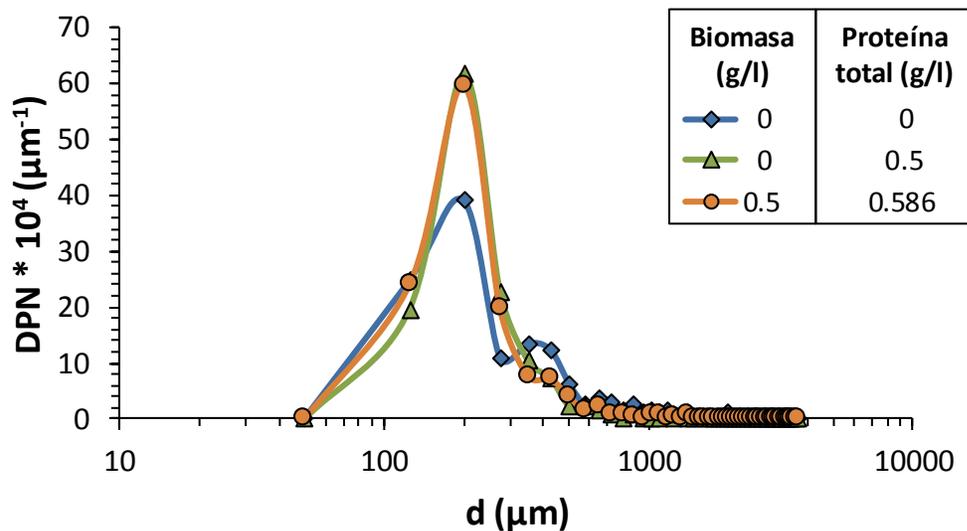


Figura 6.22. Efecto de la presencia de biomasa en una concentración de 0.5 g/l en el tamaño de las burbujas de aire libre en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

Cualquier efecto individual de la biomasa, como sólido suspendido, en este nivel no se pudo medir por cuanto no fue posible tener micelio sin proteína en el sobrenadante de las pastas concentradas utilizadas para preparar las mezclas (Sección 6.1).

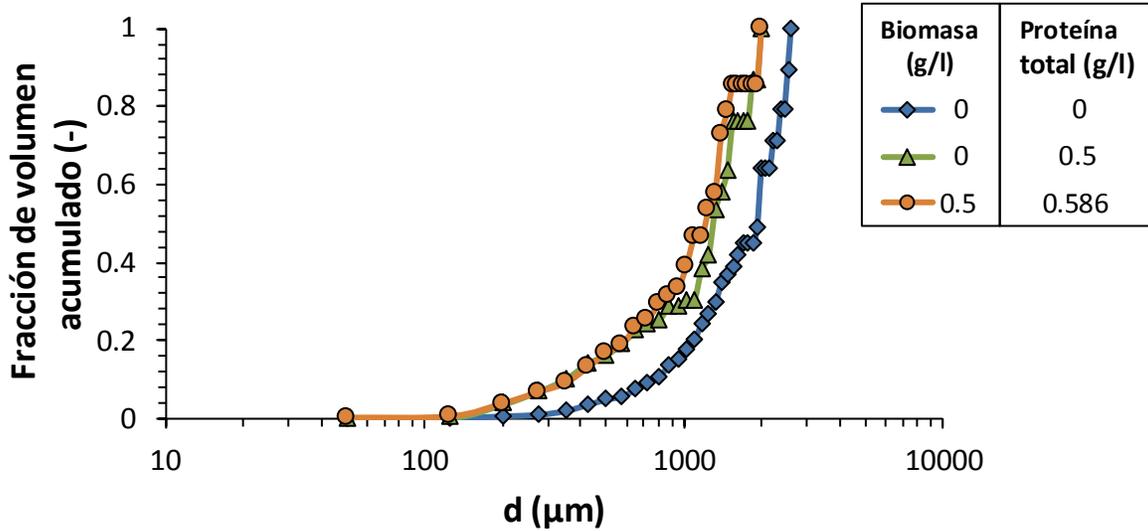


Figura 6.23. Comparación de las distribuciones de volumen acumulado de burbujas de aire libres en mezclas con proteína y 0.5 g/l de biomasa, en sistemas con potencia constante ($Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

Concluyendo acerca del segundo nivel de respuesta, no se observó un efecto de la biomasa cuando la concentración fue de 0.5 g/l. Sólo se observó un efecto de la proteína.

3) Tercer nivel: Mezclas conteniendo proteína y 5 g/l de micelio. Diámetro promedio $d_{32} = 430 - 480 \mu\text{m}$ (línea punteada roja en la Figura 6.19).

Las burbujas de aire presentaron diámetros Sauter 50 % menores a los observados en el segundo nivel de respuesta (Figura 6.19). Esta disminución de tamaño se atribuyó principalmente al aumento en la concentración de sólidos, los cuales ocupaban un mayor volumen en el tanque, pudiendo interferir en los procesos de coalescencia entre las burbujas. Las imágenes tomadas de los sistemas con 5 g/l de micelio (Figura 6.17) permitieron observar los grandes cúmulos de biomasa en medio de las burbujas y las gotas.

Para confirmar que el efecto adicional se debía a la biomasa, se tomaron imágenes de una mezcla con la misma concentración de proteína total (1.36 g/l), pero sin los sólidos, los cuales se retiraron de la pasta de biomasa, por filtración, antes del

experimento. Como resultado, las burbujas libres tuvieron un $d_{32} = 848 \mu\text{m}$ (Figura 6.24).

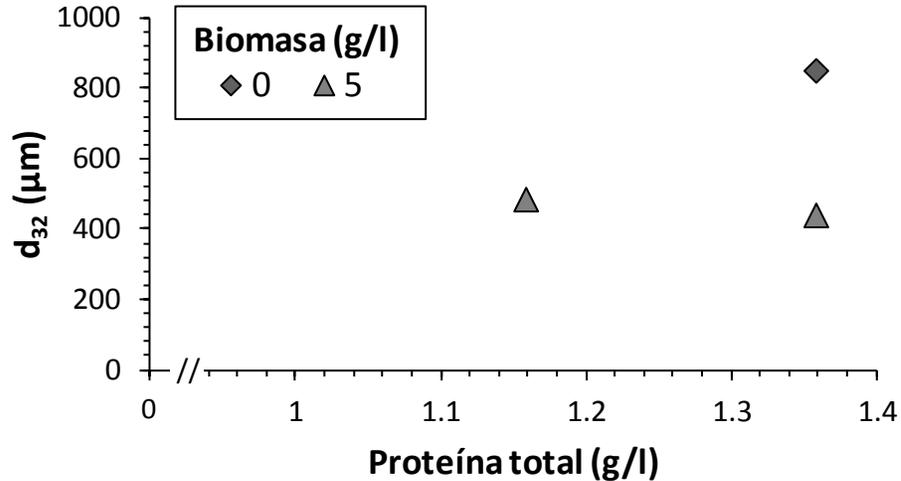


Figura 6.24. Cambio en el diámetro Sauter de sistemas conteniendo 5 g/l de micelio y un duplicado (1.36 g/l de proteína) en el que se retiraron los sólidos. Con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

Debido a que las burbujas presentaron un diámetro cercano al descrito en los sistemas del segundo nivel de respuesta ($d_{32} = 800 - 900 \mu\text{m}$), se concluyó que la disminución en el d_{32} fue un efecto del aumento en la concentración de los sólidos. Sin embargo, en este nivel no se pudo descartar algún efecto sinérgico entre la biomasa y la proteína, para lo cual se tendría que haber realizado un ensayo con los sólidos, pero sin proteína y, como se explicó en la Sección 6.1, el micelio siempre tuvo proteína consigo, por lo cual no se pudo descartar completamente dicha interacción.

En la Figura 6.25 se presenta como la respuesta del tamaño de las burbujas de aire libre, en las mezclas que contenían concentraciones altas de biomasa y proteína, resultó ser compleja. En todos los casos se observó un aumento en la población de burbujas pequeñas respecto del sistema sin biomasa y sin proteína, lo cual se identificó como un efecto de la disminución de la tensión superficial producido por la proteína; las burbujas fueron más pequeñas porque su resistencia a la

deformación en la superficie fue menor. Este efecto incluyó a las mezclas con 5 g/l de biomasa.

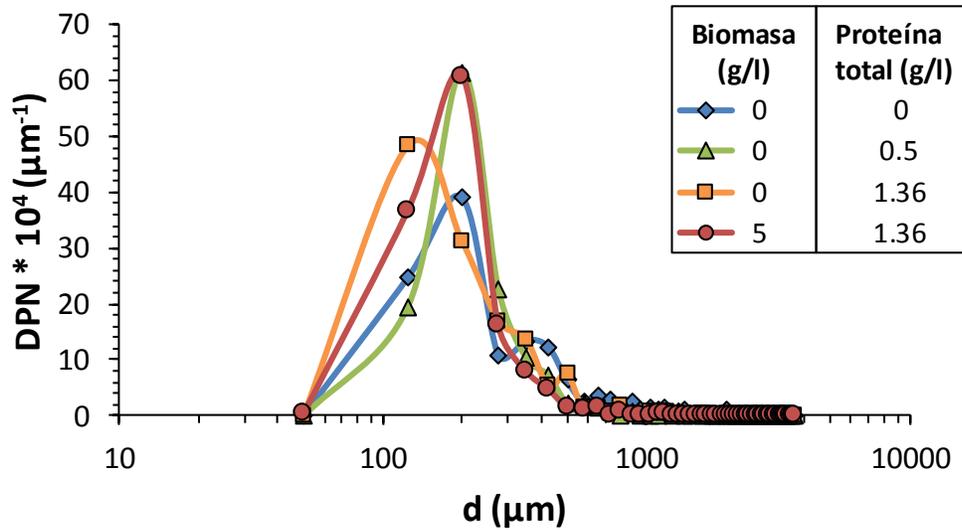


Figura 6.25. Distribuciones de Densidad de Probabilidad de Número (DPN) de burbujas de aire libres a diferentes concentraciones de proteína y biomasa. Comparación para sistemas con concentraciones altas de biomasa y con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

Con los datos de volumen acumulado (Figura 6.26), se pudo apreciar de una manera más gráfica la naturaleza de los cambios en el d_{32} de las burbujas libres. En presencia de concentraciones altas de biomasa, el diámetro máximo (d_{max}) de las burbujas libres en sistemas con 5 g/l de biomasa fue de 1180 μm , lo cual fue el 59 % del valor del diámetro máximo de las burbujas libres en los sistemas sin biomasa ($d_{max} = 2000 \mu\text{m}$) y el 45 % del valor alcanzado por las burbujas en sistemas sin biomasa ni proteína ($d_{max} = 2600 \mu\text{m}$). Estas disminuciones en los valores del diámetro máximo respecto a otros sistemas, indicó que una fracción de las burbujas grandes dejó de formarse como respuesta a la presencia de biomasa, la cual podría interferir en los procesos de coalescencia de las burbujas.

En perspectiva, las tres respuestas del tamaño de las burbujas a los cambios en las concentraciones de biomasa y proteína, a su vez fueron resultado y se observaron por el hecho, muy importante, de fijar la potencia en todos los experimentos. De no haber fijado la potencia, en el caso de las mezclas con proteína y 0.5 g/l de biomasa,

el aumentar la concentración de proteína a velocidad de agitación constante, se habría generado una disminución en la potencia (Figura 6.5) y por consiguiente el tamaño de las burbujas libres habría aumentado. En el caso de las mezclas con 5 g/l de biomasa, las burbujas, también habrían sido más grandes de lo reportado, al aumentar la concentración de proteína debido a la caída de potencia, mostrando un efecto indirecto adicional de la proteína sobre el tamaño de las burbujas. Esta disminución adicional del diámetro podría haber sido mal interpretada, al considerarse que la proteína seguía migrando a la interfase, aun cuando en las mediciones de tensión interfacial ($W - A$) se observaba lo contrario; esto es, que se hubiera podido confundir un efecto de la hidrodinámica (potencia) con uno de la fisicoquímica de la interfase (tensión interfacial).

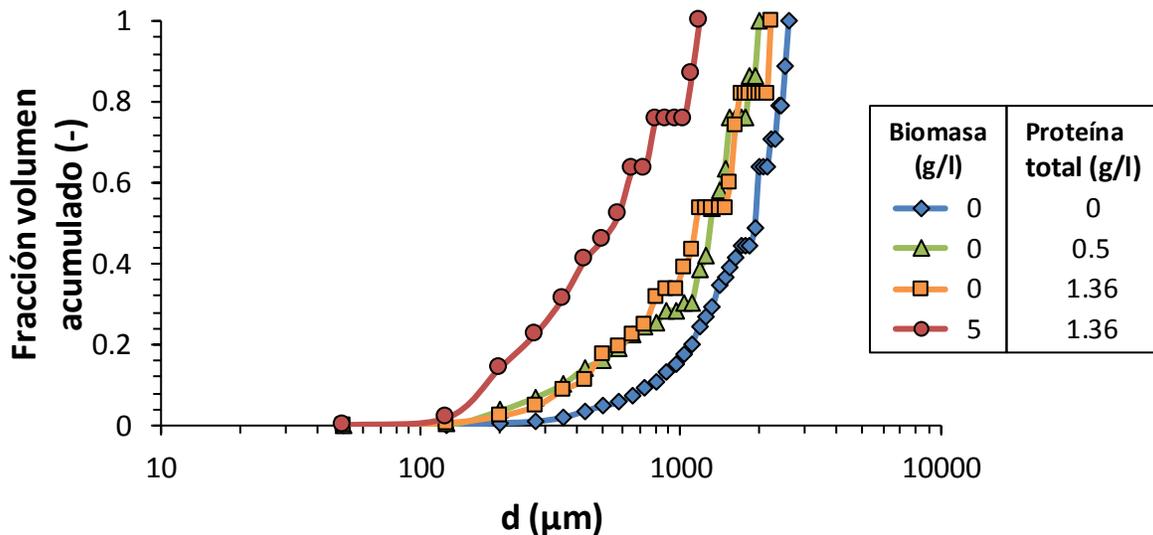


Figura 6.26. Distribución de volumen acumulado de burbujas de aire libres en sistemas conteniendo proteína y biomasa. Efecto de las concentraciones altas de biomasa. Sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

6.6.3 Dispersión de aceite

Los diámetros Sauter (d_{32}) de las gotas de aceite (Figura 6.27) presentaron dos niveles, en respuesta a la presencia o no de biomasa. En los sistemas que no contenían biomasa, el d_{32} estuvo en el intervalo de $725 \mu\text{m}$ a $788 \mu\text{m}$, mientras que

en los sistemas que contenían biomasa, sin importar si la concentración de la misma fue de 0.5 g/l o de 5 g/l, el d_{32} estuvo en el intervalo de 896 μm a 931 μm .

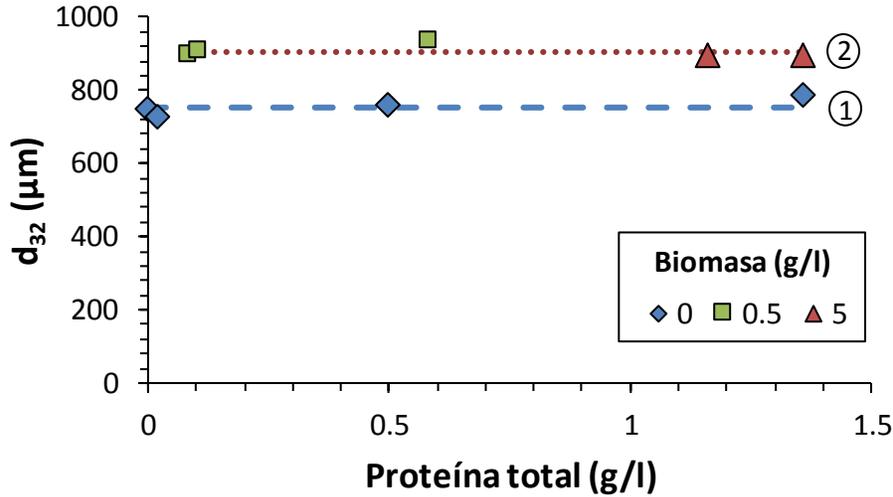


Figura 6.27. Diámetro Sauter (d_{32}) de gotas de aceite a distintas concentraciones de biomasa y proteína en sistemas con potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

Como se puede observar en la Figura 6.27, la proteína total no afectó significativamente el d_{32} de las gotas de aceite. Este resultado fue contrario a lo esperado al tener en cuenta el cambio descrito por la tensión interfacial agua – aceite (W-O) (Figura 6.12). Una disminución de 5 mN/m en la tensión interfacial W-O debió tener efecto en el tamaño de las gotas de aceite, de la misma forma que el cambio de 9 mN/m en la tensión superficial del medio acuoso (W-A) (Figura 6.10) disminuyó el d_{32} de las burbujas de aire libres. Sin embargo, al tener en cuenta la diferencia de viscosidades de los fluidos involucrados (Tabla 6.5), se pudo explicar este resultado. Las diferencias en las propiedades físicas de los dos fluidos (aire y aceite) fueron tan diferentes que afectaron el comportamiento de sus respectivas dispersiones.

La viscosidad del aire fue calculada utilizando la correlación para viscosidades de gases y vapores disponible en Perry (2008), Sección 2: “Physical and Chemical

Data” y la densidad se calculó con la ley de los gases ideales (1 atm, 26°C y peso molecular promedio del aire: 28.96 g/gmol).

Tabla 6.5. Propiedades físicas de los fluidos utilizados en las dispersiones.

Fluido	Viscosidad (μ) (Pa.s)	Densidad (kg/m ³)
Aceite de ricino	5.60*10 ⁻¹	956
Medio acuoso	1.0*10 ⁻³	996
Aire	1.844*10 ⁻⁵	1.18

Zhou y Kresta (1998) reportaron que hay fuerzas de cohesión en el seno de las estructuras (burbujas o gotas) de fluidos dispersos debidas a su viscosidad y que se oponen a las deformaciones externas. Hinze (1955) propuso que dichas fuerzas son proporcionales a:

$$\left(\frac{\mu_d}{d}\right)\sqrt{\frac{\tau_c}{\rho_d}} \tag{6-4}$$

Para hacer una inferencia rápida de la diferencia en las magnitudes de las fuerzas de cohesión viscosa del aceite y del aire se remplazaron en la Ecuación 6-4 las características de gotas y burbujas (Figura 6.19, Figura 6.27 y Tabla 6.5). Se hicieron las suposiciones de que el d_{32} es el diámetro representativo y que tanto gotas como burbujas estuvieron sujetas a las mismas tensiones por parte del medio líquido que las rodea (τ_c):

$$\frac{\left(\frac{\mu_{aceite}}{d_{aceite}}\right)\sqrt{\frac{\tau_c}{\rho_{aceite}}}}{\left(\frac{\mu_{aire}}{d_{aire}}\right)\sqrt{\frac{\tau_c}{\rho_{aire}}}} = \frac{\left(\frac{5.60*10^{-1} Pa.s}{7.5*10^{-4} m}\right)*\frac{\tau_c^{1/2}}{(956kg / m^3)^{1/2}}}{\left(\frac{1.844*10^{-5} Pa.s}{8.5*10^{-4} m}\right)*\frac{\tau_c^{1/2}}{(1.18kg / m^3)^{1/2}}} = 1.2*10^3 \tag{6-5}$$

La viscosidad del aceite de ricino le confirió una resistencia a la deformación tres órdenes de magnitud mayor que la del aire ($1.2 \cdot 10^3$) (Ecuación 6-5), y fue esa resistencia adicional la que ocasionó que las gotas de aceite tuvieran el mismo diámetro promedio pese a la caída en la tensión interfacial W-O. *La viscosidad propia del aceite controló el tamaño de las gotas de aceite en el sistema agitado a potencia constante.* Lo anterior estuvo en concordancia con lo reportado por Calderbank (1958), quien utilizando sistemas gas – líquido y líquido – líquido, llegó a la conclusión de que las fuerzas viscosas debían ser ignoradas en dispersiones de gases en líquidos y que el tamaño de las burbujas es determinado por un balance entre las fuerzas de tensión superficial y las debidas a las fluctuaciones de la turbulencia; y que para los líquidos dispersos, las fuerzas viscosas determinan el tamaño de las estructuras aún sobre las fuerzas de superficie.

Una vez explicado el por qué las gotas de aceite no respondieron de la misma forma que las burbujas de aire a los cambios en la fisicoquímica, se procedió a interpretar los cambios que dentro de las mezclas dieron lugar a los dos niveles de respuesta en el tamaño promedio de las gotas de aceite (Figura 6.27).

Como ya se comentó anteriormente, los dos niveles de respuesta obedecieron a la presencia o no de biomasa. El micelio funciona como un acarreador de aceite (Córdova-Aguilar, *et al.*, 2001), lo cual habría ocasionado las gotas de aceite con diámetros mayores.

En la Figura 6.28 se comparó el efecto que tiene quitar los sólidos de una mezcla conteniendo 5 g/l de biomasa. Los dos ensayos se hicieron por separado con mezclas nuevas, pero en una de ellas se retiraron los sólidos mediante filtración de la pasta concentrada de biomasa. Se observó que la presencia de biomasa produjo una disminución en el número de gotas pequeñas con diámetros de 100 a 150 μm y un aumento del diámetro máximo (Figura 6.29) de 1475 μm (en la mezcla sin biomasa), hasta 1775 μm en la mezcla que contenía los sólidos. Este efecto también se observó en las mezclas con concentraciones bajas de biomasa (0.5 g/l) (Figura 6.30), en las cuales el efecto fue un poco más pronunciado ya que el diámetro máximo aumentó de 1175 μm hasta 2300 μm . La caída en la población de gotas

pequeñas fue un indicio de que la presencia de biomasa favorecía la formación de gotas de mayor tamaño a partir de esa fracción de aceite que las conformaba. Lo que se confirmó con el aumento en el diámetro máximo.

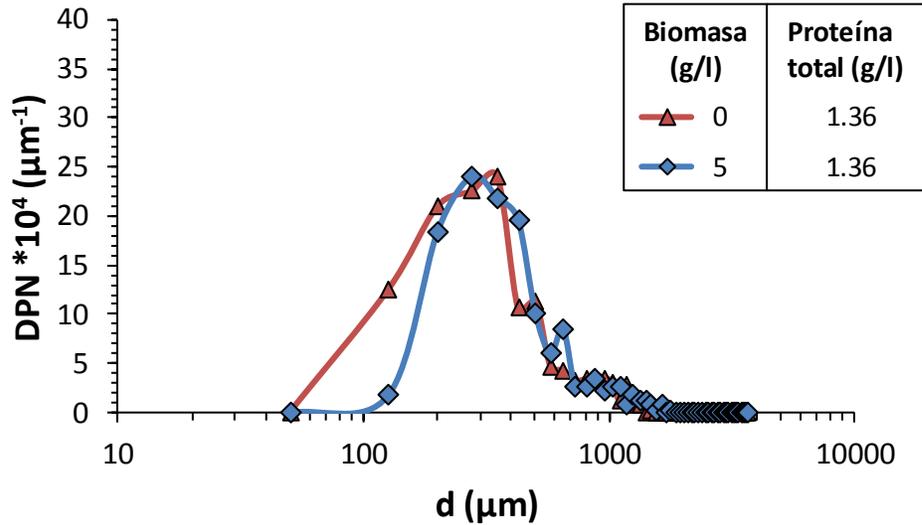


Figura 6.28. Distribución de Densidad de Probabilidad de Número (DPN) de gotas de aceite en sistemas con biomasa y proteína. Efecto de la adición de biomasa en una concentración alta. Sistemas con potencia constante ($Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

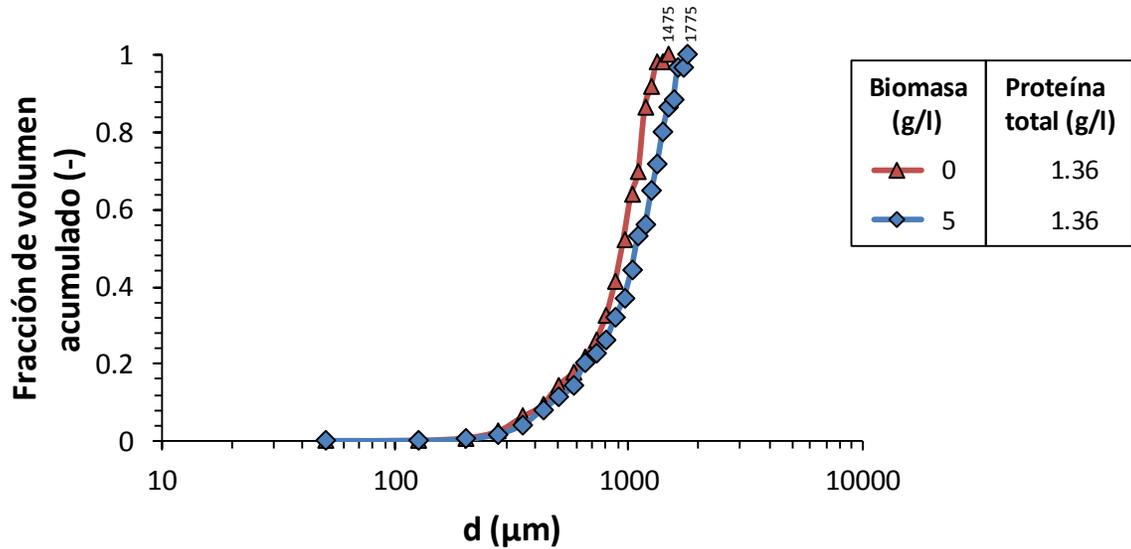


Figura 6.29. Distribución de volumen acumulado de gotas de aceite en sistemas con biomasa y proteína. Efecto de la adición de biomasa en una concentración alta (5 g/l). Sistemas con potencia constante ($Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

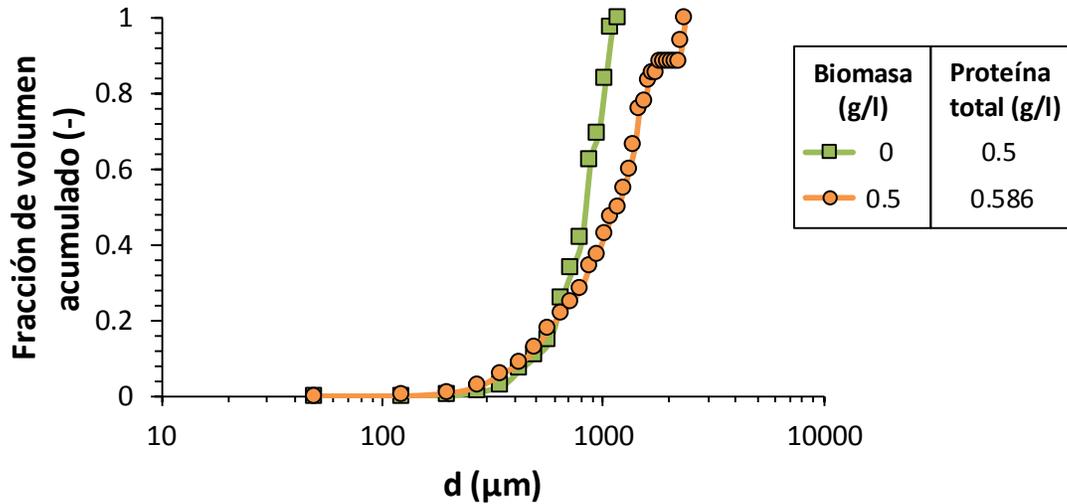


Figura 6.30. Distribución de volumen acumulado de gotas de aceite en sistemas con biomasa y proteína. Efecto de la adición de biomasa en una concentración baja (0.5 g/l). Sistemas con potencia constante ($Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

Es importante resaltar que, en todos los casos, las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite tuvieron un comportamiento similar al de las burbujas libres, a la condición de potencia constante suministrada al sistema. De tal forma que, aunque las distribuciones de tamaño fueron diferentes (cuando se tenía biomasa o cuando no se encontraba en la mezcla), se midieron los diámetros Sauter constantes (Figura 6.27). En otras palabras, *el tamaño de las gotas de aceite fue ante todo una respuesta a la potencia suministrada (constante), en la sección del tanque estudiada.*

6.6.4 Características de las burbujas de aire incluidas en aceite

Como se explicó en la Sección 5.5.1, la muestra de burbujas incluidas reportada, es solo una fracción las burbujas que estaban dentro de las gotas de aceite medidas. La técnica de micro-estereoscopía 3D permitió identificar con certeza las inclusiones, sin embargo, solo se pudieron medir aquellas burbujas incluidas que estaban en un primer plano en las imágenes estereoscópicas. Por lo que la información reportada tiene una interpretación limitada.

Se observó que los cambios en la concentración de proteína podrían no afectar el diámetro Sauter de las burbujas de aire incluidas en aceite (Figura 6.31). Se obtuvieron diámetros en el intervalo de 340 μm y 282 μm con un promedio de 316 \pm 26 μm . Esto sería congruente con el hecho de que la proteína no migraba a la interfase aceite-aire, derivado del valor constante de la tensión superficial del aceite a diferentes concentraciones de proteína (Sección 6.4.3, Figura 6.13).

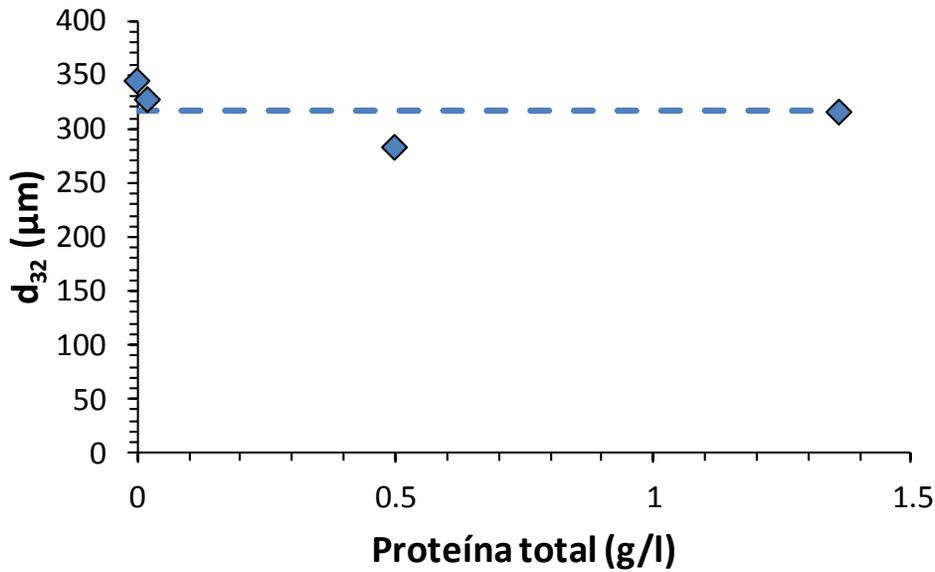


Figura 6.31. Diámetro Sauter (d_{32}) de burbujas de aire incluidas en gotas de aceite a diferentes concentraciones de proteína en sistemas agitados a potencia constante ($Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

Por otro lado, la biomasa podría disminuir el d_{32} de las burbujas de aire incluidas (Figura 6.32). Se observó una disminución desde un valor de 426 μm (0.5 g/l de biomasa) a 243 μm (5 g/l de biomasa). Esta caída, de casi el 45 % en el tamaño promedio de las burbujas incluidas, fue congruente con una caída igual en el tamaño de las burbujas libres debido a la adición de biomasa a una concentración de 5 g/l.

Una mayor población de burbujas libres pequeñas, generaría que las burbujas incluidas en aceite sean también pequeñas, ligando directamente el fenómeno de inclusión con el tamaño de las burbujas libres. Esto no se había reportado en trabajos anteriores y se pudo observar gracias a la condición de igualdad de

potencia suministrada en todas las mezclas. Si el suministro de potencia no se hubiese fijado, las diferencias de potencia habrían generado diferentes tamaños de burbujas libres y diferentes porcentajes de inclusión de las burbujas en todas las mezclas. Lo cual no habría permitido observar el efecto de la biomasa en el tamaño de las burbujas libres que se tradujo en menores tamaños de burbujas incluidas.

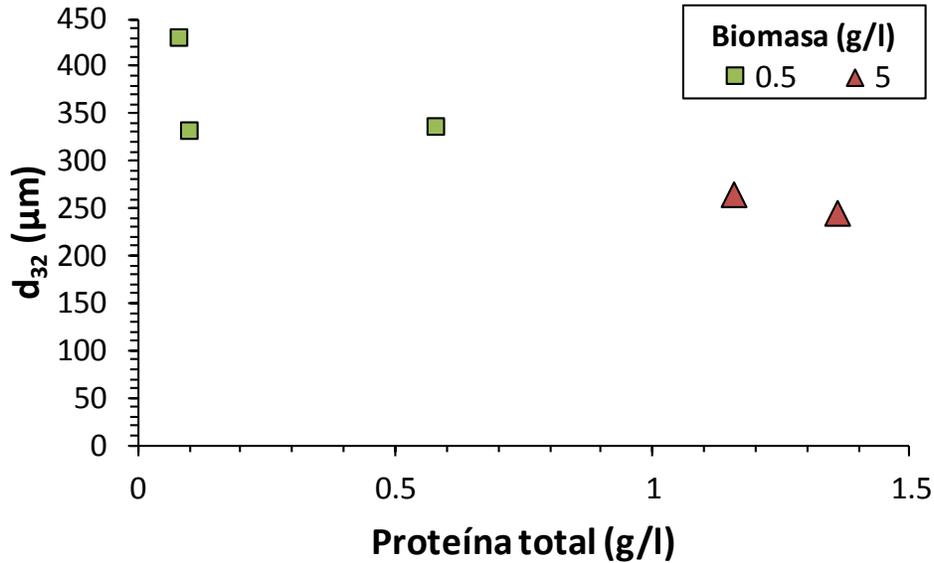


Figura 6.32. Diámetro Sauter (d_{32}) de burbujas de aire incluidas en gotas de aceite a diferentes concentraciones de biomasa y proteína total en sistemas agitados a potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$).

El porcentaje de burbujas incluidas (respecto del total de burbujas) en las gotas de aceite (Figura 6.33) mostró gran diferencia cuando se le compara con los resultados obtenidos en otros trabajos, en los cuales se reportaron porcentajes de inclusión de hasta el 80 % (Lucatero *et al.*, 2003; Corkidi *et al.*, 2008). En el presente trabajo, se observó que la mayoría de los experimentos presentó porcentajes de inclusión cercanos al 15 %, lo cual demostró que la inclusión de burbujas de aire en el aceite es un proceso determinado principalmente por la potencia suministrada.

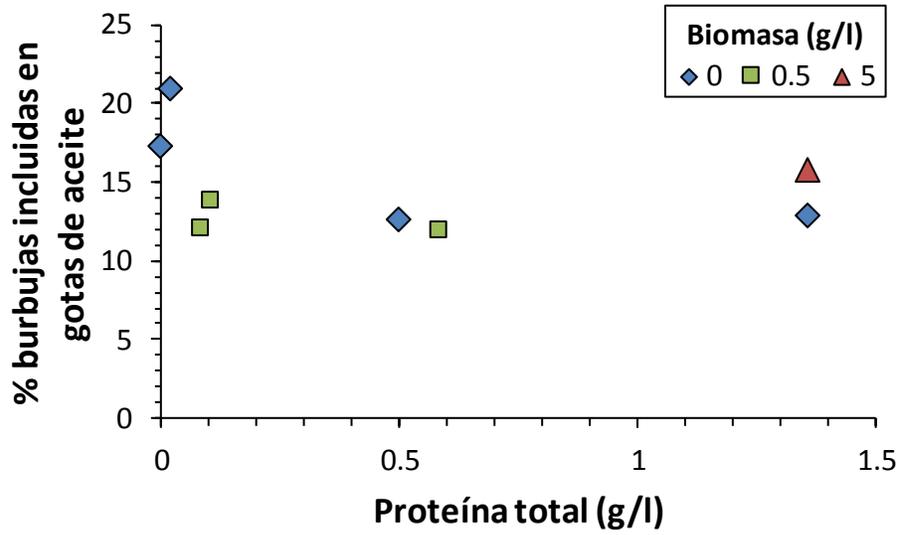


Figura 6.33. Porcentaje de burbujas incluidas en gotas de aceite a diferentes concentraciones de biomasa y proteína en sistemas agitados a potencia constante ($P_g/V = 0.19 \text{ W/m}^3$)

7 CONCLUSIONES

- La medición experimental de la potencia suministrada a mezclas de medio acuoso, aceite, proteína y biomasa micelar, permitió observar que la biomasa y la proteína tienen efecto sobre el suministro de potencia. Si se hubiese agitado las mezclas a velocidad constante (200 RPM) la potencia habría variado hasta en un 28 %. Para fijar el suministro de potencia constante en todas las mezclas (0.19 kW/m^3), fue necesario variar la velocidad de agitación de los ensayos entre 191 RPM y 206 RPM.
- En los sistemas agitados a 0.19 kW/m^3 sin biomasa, el diámetro Sauter (d_{32}) de las gotas de aceite (incluso las complejas) se comportó constante ($755 \pm 26 \text{ }\mu\text{m}$), sin importar la concentración de proteína. En los sistemas que contenían biomasa, sin importar su concentración, el valor del diámetro Sauter, también fue constante ($904 \pm 15 \text{ }\mu\text{m}$). Esto mostró que, al controlar la potencia, no se observan en los tamaños de las estructuras y que es la potencia el factor que controla la dispersión.
- El diámetro Sauter de las burbujas de aire libres (esto es, no localizadas dentro de gotas de aceite) fue constante ($858 \pm 40 \text{ }\mu\text{m}$), cuando se cambió la concentración de proteína. Este valor constante, aunque fue debido a la tensión superficial, solo se pudo observar al controlar el suministro de potencia en las mezclas.
- El diámetro Sauter de las burbujas de aire libres se vio afectado por la biomasa, aunque solo en una concentración de 5 g/l ($d_{32} = 436 \text{ }\mu\text{m}$), el cual fue menor que el medido para la misma mezcla con proteína (1.36 g/l ; $d_{32} = 896 \text{ }\mu\text{m}$), pero sin biomasa.

- Con la técnica de micro-estereoscopía en 3D, fue posible medir una pequeña muestra de las burbujas de aire incluidas en las gotas de aceite de forma precisa, lo que permitió observar que, a potencia constante, el porcentaje de burbujas incluidas (respecto al total de burbujas medidas) tiene poca variación (12 % - 22 %), y con valores más bajos que los reportados (hasta 60 %) para sistemas en los que no se controló el suministro de potencia. Ello sugirió que la inclusión de burbujas de aire en gotas de aceite es un proceso controlado fundamentalmente por el suministro de potencia.
- De forma global, se puede concluir que el suministro de potencia (como medida de la energía entregada al sistema) es determinante, en el establecimiento de la dispersión multifásica. En los procesos de mezclado siempre se debería tener en cuenta la variación de la potencia como factor fundamental, ya que puede estar enmascarando un efecto directo de las variables fisicoquímicas (principalmente la tensión superficial e interfacial) con un efecto indirecto a través del cambio (pequeño pero importante) de la potencia debido al cambio en la fisicoquímica. Esto solo se pudo determinar haciendo experimentos de mezclado a potencia constante.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Atiemo-Obeng, V., Penney, W. & Armenante, P. (2004), "Solid-Liquid Mixing", en: Paul, E., Atiemo-Obeng, V. & Kresta, S., eds., "Handbook of Industrial Mixing, Science and Practice", EUA, John Wiley & Sons, p. 543 – 584.
- Avhad, M. & Marchetti J. (2016), "Innovation in solid heterogeneous catalysis for the generation of economically viable and ecofriendly biodiesel: a review", *Catalysis Reviews*, en línea: <http://dx.doi.org/10.1080/01614940.2015.1103594>
- Aziz, H., Aroua, M., Yusoff, R., Abas, N., Idris, Z. & Hassan, H. (2015), "Production of palm-based esteramine through heterogeneous catalysis", *Journal of Surfactants and Detergents*, 19 (1), p. 11 – 18.
- Binks, B., Clint, J. & Whitby, C. (2005), "Rheological behavior of water-in-oil emulsions stabilized by hydrophobic bentonite particles", *Langmuir*, 21 (12), p. 5307 – 5316.
- Brown, D., Jones, P. & Middleton, J. (2004), "Measuring tools and techniques for mixing and flow visualization studies", en: Paul, E., Atiemo-Obeng, V. & Kresta, S., eds., "Handbook of Industrial Mixing, Science and Practice", EUA, John Wiley & Sons, p. 145 – 201
- Calderbank, P. (1958), "Physical rate processes in industrial fermentation -Part I: The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation", *Chemical Engineering Research and Design*, 36 (a), p. 443 – 463.
- Chapman, C., Nienow, A. & Middleton, J. (1980), "Surface aeration in a small, agitated, and sparged vessel", *Biotechnology and Bioengineering*, 22 (5), p. 981 – 993.
- Choi, D., Park, S., Ahn, B., Lim, D., Lee, Y., Moon, J. & Shin, D. (2008), "Studies on production of gentamicin from *Micromonospora purpurea* using crude vegetable oils", *Process Biochemistry*, 43 (8), p. 835 – 841.
- Córdova-Aguilar, M., Sánchez, A., Serrano-Carreón, L. & Galindo, E. (2001), "Oil and fungal biomass dispersion in a stirred tank containing a simulated fermentation broth", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76 (11), p. 1101 – 1106.
- Corkidi, G, Voinson, T., Taboada, B., Córdova, M. & Galindo, E. (2008), "Accurate determination of embedded particles within dispersed elements in multiphase dispersions, using a 3D micro-stereoscopic vision system", *Chemical Engineering Science*, 63 (2), p. 317 – 329.

- Davoody, M., Raman, R. & Parthasarathy, R. (2016), "Maximizing gas-liquid interfacial area in a three-phase stirred vessel operating at high solids concentrations", *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 104, p. 133 – 147.
- Flores, C. (2002), "Estudio de factores nutricionales y de proceso que determinan la producción de biomasa micelial de *Trichoderma harzianum* y su viabilidad", Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Galindo, E., Larralde-Corona, C., Brito, T., Córdova-Aguilar, M., Taboada, B., Vega-Alvarado, L. & Corkidi, G. (2005), "Development of advanced image analysis techniques for the *in situ* characterization of multiphase dispersions occurring in bioreactors", *Journal of Biotechnology*, 116 (3), p. 261 – 270.
- Galindo, E., Pacek, A. & Nienow, A. (2000), "Study of drop and bubble sizes in a simulated mycelial fermentation broth of up to four phases", *Biotechnology and Bioengineering*, 69 (2), p. 213 – 221.
- Godoy, R. (1998), "Efecto de la geometría del impulsor sobre el crecimiento, reología y producción de aromas por *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido", Tesis de Maestría en Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hemrajani, R. & Tatterson, G. (2004), "Mechanically stirred vessels", en: Paul, E., Atiemo-Obeng, V. & Kresta, S., eds., "Handbook of Industrial Mixing, Science and Practice". EUA: John Wiley & Sons, p. 344 – 390.
- Hinze, J. (1955), "Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion processes" *AIChE Journal*, 1 (3), p. 289 – 295.
- Holguín, F. (1970), "Estadística descriptiva", *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Kittiwattanakul, T., Prasassarakich, P. & Hinchiranan, N. (2015), "Preparation of green high impact polystyrene beads via suspension polymerization", *Macromolecular Symposia*, 354 (1), p. 69 – 75.
- Kolmogorov, A. (1991), "The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers", *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering*, 434 (1890), p. 9 – 13.
- Kresta, S. & Brodkey, R. (2004), "Turbulence in mixing applications", en: Paul, E., Atiemo-Obeng, V. & Kresta, S., eds., "Handbook of Industrial Mixing, Science and Practice". EUA: John Wiley & Sons, p. 19 – 87.

- Laakkonen, M., Honkanen, M., Saarenrinne, P. & Aittamaa, J. (2005), "Local bubble size distributions, gas – liquid interfacial areas and gas holdups in a stirred vessel with particle image velocimetry", *Chemical Engineering Journal*, 109, p. 37 – 47
- Langevin, D. (2015), "Bubble coalescence in pure liquids and in surfactant solutions", *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 20 (2), p. 92 – 97.
- Larralde-Corona, C., Córdova-Aguilar, M. & Galindo, E. (2002), "Distribution of the free and oil-trapped air bubbles in simulated broths containing fungal biomass", *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 80 (3), p. 491 – 494.
- Leng, D. & Calabrese, R. (2004), "Immiscible liquid-liquid systems", en: Paul, E., Atiemo-Obeng, V. & Kresta, S., eds., "Handbook of Industrial Mixing, Science and Practice", EUA: John Wiley & Sons, p. 639 – 753.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951), "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), p. 265 – 275.
- Lucatero, S., Larralde-Corona, C., Corkidi, G. & Galindo, E. (2003), "Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology", *Biotechnology Progress*, 19 (2), p. 285 – 292.
- Ma, J., Yu, S. C. M., Ng, H. W. & Lam, Y. C. (2004), "Some observations on particle size and velocity measurements using Phase Doppler Anemometry in plasma spray", *Plasma Chemistry and Plasma Processing*, 24 (1), p. 85 – 115.
- Maaß, S., Wollny, S., Voigt, A. & Kraume, M. (2011), "Experimental comparison of measurement techniques for drop size distributions in liquid/liquid dispersions", *Experiments in Fluids*, 50 (2), p. 259 – 269.
- Mach, R. & Zeilinger, S. (2003), "Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60 (5), p. 515 – 522.
- Papadopoulos, G. & Arik, E. (2004), "Fundamental Flow Measurement", en: Paul, E., Atiemo-Obeng, V. & Kresta, S., eds., "Handbook of Industrial Mixing, Science and Practice". EUA: John Wiley & Sons, p. 202 – 256.
- Perry, R. (2008), "Perry's Chemical Engineers' Handbook", D. W. Green, ed., 8a edición, McGraw-Hill, New York.
- Pezennec, S., Gauthier, F., Alonso, C., Graner, F., Croguennec, T., Brulé, G. & Renault, A. (2000), "The net electric charge determines the surface rheological properties of ovalbumin adsorbed at the air – water interface", *Food Hydrocolloids*, 14 (5), p. 463 – 472.

- Pulido-Mayoral, N. & Galindo, E. (2004), "Phases dispersion and oxygen transfer in a simulated fermentation broth containing castor oil and proteins", *Biotechnology Progress*, 20 (5), p. 1608 – 1613.
- Relkin, P., Hagolle, N., Dalgleish, D. G. & Launay, B. (1999), "Foam formation and stabilisation by pre-denatured ovalbumin", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 12 (3 – 6), p. 409 – 416.
- Reséndiz, R., Martínez, A., Ascanio, G. & Galindo, E (1991), "A new pneumatic bearing dynamometer for power input measurement in stirred tanks", *Chemical Engineering & Technology*, 14 (2), p. 105 – 108.
- Rocha-Valadez, J., Galindo, E. & Serrano-Carreón, L. (2007), "The influence of circulation frequency on fungal morphology: a case study considering Kolmogorov microscale in constant specific energy dissipation rate cultures of *Trichoderma harzianum*", *Journal of Biotechnology*, 130 (4), p. 394 – 401.
- Rushton, J., Costich, E. & Everett, H. (1950), "Power characteristics of mixing impellers. 1.", *Chemical Engineering Progress*, 46 (8), p. 395 – 404.
- Romero, A., Cordobes, F., Puppo, M., Guerrero, A. & Bengoechea, C. (2008), "Rheology and droplet size distribution of emulsions stabilized by crayfish flour", *Food Hydrocolloids*, 22 (6), p. 1033 – 1043.
- Sánchez, A., Martínez, A., Torres, L. & Galindo, E. (1992), "Power consumption of three impeller combinations in mixing xanthan fermentation broths", *Process Biochemistry*, 27 (6), p. 351 – 365.
- Serrano-Carreón, L, Flores, C. & Galindo, E. (1997), " γ -Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in stirred bioreactors", *Biotechnology Progress*, 13 (2), p. 205 – 208.
- Sher, F., Malik, H. & Liu, H. (2013), "Industrial polymer effluent treatment by chemical coagulation and flocculation", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1 (4), p. 684 – 689.
- Taboada, B., Larralde, P., Brito, T., Vega-Alvarado, L., Díaz, R., Galindo, E. & Corkidi, G. (2003), "Images acquisition of multiphase dispersions in fermentation processes", *Journal of Applied Research and Technology*, 1 (1), p. 78 – 84.
- Velazco, D., (1994), Reología y mezclado de caldos de fermentación miceliares de interés industrial, Tesis de Maestría en Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Zhou, G. & Kresta, S. (1998), "Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank", *Chemical Engineering Science*, 53 (11), p. 2063 – 2079.

ANEXO I: RESUMEN PRESENTADO EN EL XIV CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ESTUDIO, A POTENCIA CONSTANTE, DE LA DISPERSIÓN DE ACEITE Y AIRE EN UN SISTEMA MODELO DE FERMENTACIÓN MULTIFÁSICA: EFECTO SIMULTÁNEO DE LA PROTEÍNA Y LA BIOMASA

Diego Humberto Cuervo Amaya, María Soledad Córdova-Aguilar, Enrique Galindo, Instituto de Biotecnología / Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, C.P. 62210. cuervoam@gmail.com

Palabras clave: Mezclado, sólidos suspendidos, análisis de imágenes.

Introducción. La transferencia de masa en fermentaciones miceliales se comporta de manera compleja debido a la presencia de hasta cuatro fases a mezclar (medio acuso, sustrato líquido inmisible, biomasa y aire). Es el caso de la producción de γ -decalactona por *Trichoderma harzianum*. En este estudio se fijó la potencia para estudiar la respuesta en el diámetro de las gotas de aceite y de las burbujas de aire al cambio en la concentración de proteína y de biomasa.

Metodología. Se tomaron imágenes de la dispersión de aceite y aire del sistema líquido con biomasa y usando las técnicas previamente descritas [1]. Antes de cada toma de imágenes se determinó la velocidad de agitación para entregar una potencia gaseada volumétrica de $P_g/V=0.19\text{kW/m}^3$, determinada en un dinamómetro de cojinete neumático [2]. Los ensayos se complementaron con lecturas de tensión superficial (método de plato Wilhelmy) y ensayos reológicos, para determinar los cambios fisicoquímicos derivados de la adición de proteína y biomasa.

Resultados. Las mediciones de tensión superficial (interfases agua-aire, W-A y aceite-aire, O-A) e interfacial (interfase agua-aceite, W-O) indicaron que los fenómenos de superficie fueron controlados por el aceite de ricino y afectados en menor medida por la proteína. Los ensayos reológicos revelaron que las concentraciones de biomasa usadas no afectaron importante la reología del medio de cultivo. El diámetro promedio Sauter (d_{32}) de las gotas de aceite (figura 1-A) en ausencia de biomasa no cambió significativamente ($725\text{-}780\ \mu\text{m}$) en función de la proteína presente en el sistema, en concordancia con una tensión interfacial (W-O) constante. En presencia de biomasa, el d_{32} se incrementó ($890\text{-}930\ \mu\text{m}$), aún cuando se encontró que la biomasa llevaba consigo proteína soluble, esto fue en respuesta a interacciones del aceite de ricino con el micelio, fenómeno que ha sido descrito anteriormente con otra metodología [3]. En el caso del aire (figura 1-B) la proteína produjo una disminución de d_{32} (de $1300\ \mu\text{m}$ a $850\ \mu\text{m}$) correspondiente un cambio en la tensión superficial (W-A) (de 54 a 47mN/m) cuando se compara con el sistema sin proteína. Por otra parte, la biomasa no tuvo influencia sobre el tamaño de las burbujas a concentraciones bajas ($0.5\ \text{g/l}$); el efecto en estos sistemas se debió a la proteína. En concentraciones mayores ($5\ \text{g/l}$), la biomasa provocó que el d_{32} disminuyera a valores de $430\ \mu\text{m}$ en respuesta a una

posible menor coalescencia de las burbujas, lo que se manifestó en la menor aparición de burbujas grandes en distribuciones de tamaño, de los sistemas con $5\ \text{g/l}$ de biomasa al compararlos con aquellos sin biomasa.

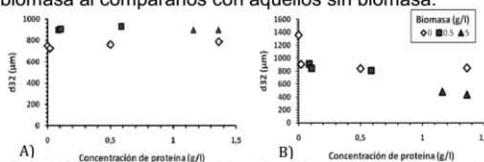


Fig. 1. Diámetro Sauter (d_{32}) de la dispersión a potencia constante de aceite de ricino a diferentes concentraciones de proteína y biomasa. Las distribuciones de tamaño de las gotas de aceite (figura 2) fueron diferentes, aunque con d_{32} cercanos entre sí ($725\text{-}788\ \mu\text{m}$) (figura 1-A). Esto se debió a que las gotas pequeñas fueron un menor porcentaje del total y a que el diámetro de gota máximo disminuyó al adicionar proteína o biomasa. Las distribuciones de tamaño de las burbujas de aire, en cambio, tuvieron d_{32} cada vez menores (figura 1-B) por presentar mayores porcentajes de estructuras pequeñas en presencia de proteína y biomasa, siendo mayor el efecto de la biomasa en concentraciones altas; el diámetro máximo de las burbujas de aire también disminuyó al aumentar concentración de proteína o biomasa.

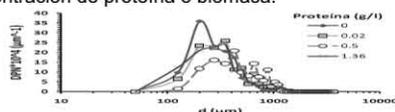


Fig. 2. Distribución de tamaños de gotas de aceite de ricino dispersos a diferentes concentraciones de proteína y sin biomasa.

Conclusiones. La biomasa aumenta el d_{32} de las gotas de aceite. La proteína no tiene efecto porque no modifica la tensión interfacial W-O. A concentraciones altas de biomasa, es ésta la que controla el d_{32} de las burbujas de aire, mientras que a concentraciones bajas lo hace la proteína. El uso de P_g/V constante permitió observar d_{32} aproximadamente constantes a pesar de de las concentraciones de biomasa y proteína usadas.

Agradecimiento. Este proyecto se financió con el apoyo del CONACyT (proyecto 129676).

Bibliografía.

- Corkidi, G., Voison, T., Taboada, B., Córdova, M., Galindo, E. (2008). *Chem. Eng. Sci.* 63:317-329.
- Reséndiz, R., Martínez, A., Ascanio, G., Galindo, E. (1991). *Chem. Eng. Technol.* 14(2):105-108.
- Córdova, M., Sánchez, A., Serrano, L., Galindo, E. (2001). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76(11): 1101-1106.

ANEXO II: CARTEL PRESENTADO EN LA XXIII CONFERENCIA DEL FORO NORTEAMERICANO DE MEZCLADO (NAMF).



Air and oil dispersion in a mixing tank under constant power input and varying concentrations of surfactants (protein) and solids (mycelial biomass)



Diego Cuervo-Amaya*, M^o Soledad Cordova-Aguilar, Gabriel Corkidi, Enrique Galindo
 *Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62250, México
 cuervoam@gmail.com

Abstract:

The production process of γ -decalactone by *Trichoderma harzianum* is a complex mycelial fermentation due to the presence of up of four-phases to be mixed (aqueous media, immiscible liquid substrate castor oil, mycelial biomass and air). In this study the power input was fixed constant ($Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$), in order to rule out effects of small power drawn variations, over the oil drops and air bubbles sizes, (due to possible changes in surface tension and solid presence) that occur when experiments are conducted under equal agitation speed. To achieve these goals a model system that simulates the actual fermentation was used.

Concluding remarks:

At constant power input:

- The surface tension only affects significantly the Sauter diameter of the free bubbles.
- The solids (biomass) at 5 g/l decrease the free bubbles Sauter diameter, while at low concentrations it has no effect.
- The solids (biomass) presence at any concentration increase the oil drops Sauter diameter.
- The inclusion-on-oil of air bubbles is a function of the power input instead of the protein and biomass concentrations.

Materials and methods:

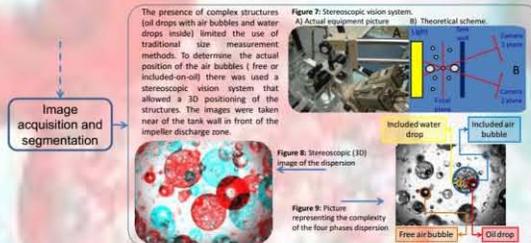
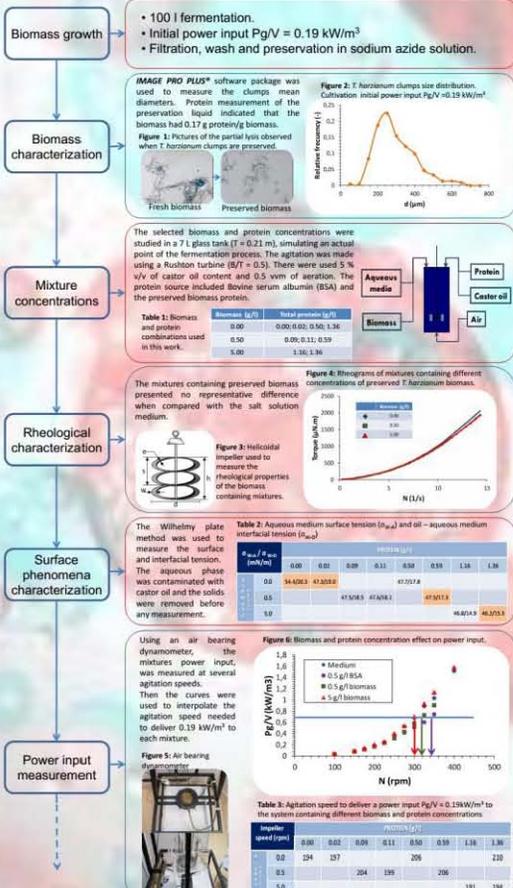


Table 4: Graphic color key

Biomass (g/l)	Total protein (g/l)
0.00	0.00
0.00	0.50
0.50	0.59
5.00	1.36

Figure 10: Sauter mean diameter of free bubbles in systems with different concentrations of biomass and protein. All the experiments were made at the same power input conditions $Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$

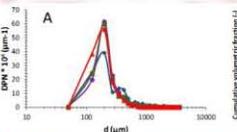
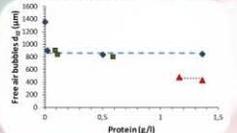


Figure 12: Sauter mean diameter of oil drops in systems with different concentrations of biomass and protein. All the experiments were made at the same power input conditions $Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$

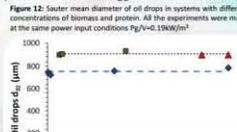


Figure 13: Percentage of included-on-oil air bubbles in systems with different concentrations of biomass and protein. All the experiments were made at the same power input conditions $Pg/V = 0.19 \text{ kW/m}^3$



Results:

The control of the power input allowed to selectively observe the simultaneous effect of the biomass and the protein on the dispersed structures. The free air bubbles Sauter mean diameter (d_{32}) (figure 10) had a decrease in the presence of protein (1350 – 890 μm), compared with the system without protein. The plateau described by the sizes of the mixtures with no biomass suggested that this was due to a decrease on the surface tension (σ_{w-a}) (table 2). The specific effect of the protein was due to an increase in the small size air bubbles (figure 11 A) and a slightly decrease (2600 – 2000 μm) on the maximum diameter (d_{max}) (figure 11 B). The biomass at low concentrations (0.5 g/l) had no further effect than that observed only with the protein. At high concentrations the biomass produced an additional decrease in the air bubbles d_{32} (890 – 410 μm), the decrease of d_{max} on these systems (2600 – 1100 μm) (figure 11 B) suggested that high solids concentrations interfered with the coalescence process.

The oil drops d_{32} (figure 12) presented no changes in the systems containing only protein, even when a decrease on interfacial tension (σ_{w-o}) (table 2) was observed. Hinze (1955) proposed a recuperation force due to the viscosity on the dispersed liquids; the high viscosity of the castor oil (650 cP) enabled the drops to maintain their size. This observation was possible due to the equal power input condition between experiments. When present, the biomass at any concentration, increased the d_{32} of the oil drops, this was due to the oil being adsorbed in the biomass reported by Cordova-Aguilar et al. (2001), promoting the oil drops higher coalesce. The included-on-oil air bubbles counting (figure 13) presented no significant variation due to the biomass and protein concentrations changes. A maximum air bubbles inclusion of 60 % were reported by Laralde-Corona et al. (2002) on systems containing protein and under equal agitation speed, the values reported in this work suggested that the inclusion process is only controlled by the power input.

References:

- Hince, J. (1955), "Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of air-liquid dispersion processes", *AIChE J.*, 1, 289-295
- Cervino-Aguilar, M. S., Sandoval, A., Serrano-Carrasco, L., Galindo, E. (2003), "Oil and fungal biomass dispersion in stirred tank containing a simulated fermentation broth", *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 78:1103-1106
- Laralde-Corona, C. P., Cordova-Aguilar, M. S., Galindo, E. (2002), "Distribution of the free and oil-trapped air bubbles in simulated broths containing fungal biomass", *Can. J. Chem. Eng.*, 80:491-494
- Mexican National Science and Technology Council (CONACYT), Master scholarship and grants of 59807/129676.
- To the Bioprocess Engineering and Pilot Plant groups of the Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM) for the collaboration in the development of this work.

Acknowledgement: