



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA DE MASA DE UN
BIORREACTOR EQUIPADO CON IMPULSORES DE FLUJO
MIXTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO QUÍMICO

P R E S E N T A :

CARRILLO TAVERA SAID

DIRECTOR: Dr. GABRIEL ASCANIO GASCA

ASESOR: Dr. EDTSON EMILIO HERRERA
VALENCIA

ASESOR: Dr. LUIS ALBERTO VERDUZCO
MORA



CIUDAD DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Aurelio Ramírez Argáez y al Dr. David Israel Posadas Navarro responsables del proyecto titulado Caracterización Hidrodinámica Y Biológica De Un Agitador De Flujo Mixto En Un Medio De Cultivo, el cual pertenece al periodo 2023-1 del programa de becas posdoctorales en la UNAM.

A la Unidad de Bioprocesos perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por permitirme el uso de sus instalaciones para desarrollar este proyecto.

Al Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología (ICAT) por las facilidades otorgadas para llevar a cabo este proyecto de Tesis.

Al Ingeniero Abel Blancas Cabrera por compartir su tiempo y conocimientos conmigo, lo que me proporciono las aptitudes y habilidades suficientes para poder realizar este trabajo de investigación.

Al Maestro Patricio Zelada pues sin su apoyo la realización de este proyecto de tesis habría resultado en un camino tortuoso, pero con su ayuda este se ha convertido en un gran viaje de aprendizaje.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por brindarme una formación integral y, además de desarrollar mi pasión por la ciencia y proporcionarme los conocimientos necesarios para poder llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Edtso Emilio y al Dr. Verduzco por sus consejos y la disposición que mostraron para ayudarme en todo momento.

A mi asesor el Dr. Gabriel Ascanio Gasca cuya mentoría pudo brindarme la confianza, los conocimientos, los consejos y el apoyo más que suficientes para poder completar mi formación como Ingeniero Químico.

DEDICATORIAS

A mi madre, Guadalupe Tavera quien dedico una vida entera en educarme, con amor y paciencia para formar en mi una persona de principios, por enseñarme el valor de la perseverancia y dedicación, por nunca limitarme, entregarme su apoyo e incluso darme más de lo que tenía a mi y a mis hermanos, que este sea el primero de muchos éxitos para dedicarte.

A mi padre Jesús Carrillo cuyos consejos me han guiado como una mano invisible ayudándome en cada paso que he dado facilitando mi paso por este largo viaje, apoyándome en mi formación como ser humano y como futuro profesionista, e impulsándome a seguir mis sueños y luchar por mis metas, gracias.

A mi novia, Carolina Cortes quien en las noches más oscuras siempre fue un faro de luz para mí, llenando de optimismo la realización de este trabajo, quien siempre creyó en mi incluso cuando yo deje de hacerlo, gracias por ser la mejor compañía y hacer de este logro uno de tantos que quiero conseguir tomado de tu mano.

A mis hermanos Eder y Vianey por estar presentes y apoyarme en todo momento.

A Alejandro González quien, además de familia, ha sido un amigo sincero para mi en todo momento, siempre tendiendo su mano para ayudarme cuando lo necesite.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABLAS.....	6
NOMENCLATURA.....	7
RESUMEN.....	10
ABSTRAC.....	11
1 INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 MEZCLADO	13
1.2 MEZCLA GAS-LÍQUIDO	14
1.3 ANTECEDENTES	15
1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
1.5 OBJETIVOS	19
1.6 HIPÓTESIS	20
2 MARCO TEÓRICO	21
2.1 TASA DE TRANSFERENCIA DE MASA DE OXÍGENO	21
2.2 COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERENCIA DE MASA DE OXÍGENO (K_LA).....	23
2.2.1 Estimación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La})	
24	
2.3 CONSUMO DE POTENCIA	25
2.3.1 Correlaciones de consumo de potencia	25
2.4 REOLOGÍA.....	28
2.4.1 Ley de viscosidad de Newton.....	28
2.4.2 Fluido newtoniano.....	30
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 MONTAJE EXPERIMENTAL.....	31
3.1.1 Biorreactor.....	31
3.1.2 Rociador	32
3.1.3 Instrumentación.....	32

3.1.4	Configuración experimental	33
3.2	CONDICIONES EXPERIMENTALES	34
3.2.1	Determinación experimental de la tasa de consumo de oxígeno, la tasa de transferencia de oxígeno y k_{La}	34
3.2.2	Crecimiento Bacteriano	35
3.2.3	Fluido de Trabajo	38
3.2.4	Preparación del medio de cultivo	40
3.2.5	Cultivo de <i>Azotobacter Vinelandii</i>	41
3.2.6	Condiciones de Operación.....	41
3.3	DETERMINACIONES EXPERIMENTALES	41
3.3.1	Concentración de Biomasa.....	41
3.3.2	Alginato.....	42
3.3.3	Viscosidad	43
3.3.4	Consumo de Sacarosa.....	43
3.3.5	Evaluación del consumo de potencia	45
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
4.1	CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE ALGINATO	47
4.2	EFFECTO DE LA VISCOSIDAD	51
4.3	CONSUMO DE POTENCIA	54
4.4	CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO	55
5	CONCLUSIONES Y TRABAJO FUTURO	58
	BIBLIOGRAFÍA.....	60

Lista de Figuras

<i>Figura 2.1-1 Teoría de doble capa para la transferencia de gases (Molina, et al. (2003)).</i>	23
<i>Figura 2.4-1 Modelo “Ley de viscosidad de Newton”</i>	29
<i>Figura 2.4-2 Fluido newtoniano</i>	30
<i>Figura 3.1-1. Impulsor Radial Axial de flujo Mixto.</i>	32
<i>Figura 3.1-2. Configuración experimental biorreactor aireado equipado con impulsores múltiples híbridos</i>	33
<i>Figura 3.2-1. Descripción esquemática de la medición directa de OTR en bioprocesos por la técnica dinámica clásica. (García-Ochoa & Gomez, 2009).</i>	34
<i>Figura 3.2-2 Curva de crecimiento Bacteriano (Van Alst A. et al. ,2023)</i>	36
<i>Figura 3.2-3. Obtención de la velocidad específica de crecimiento</i>	38
<i>Figura 3.2-4. Efecto de la masa molecular y la concentración del alginato sobre la viscosidad (Peña et al., 2011)</i>	40
<i>Figura 3.3-1. Curva estándar empleada para la cuantificación de la concentración de sacarosa.</i> 45	
<i>Figura 4.1-1. Curvas de la cinética de crecimiento en biomasa (A) y del consumo de fuente de carbono con base en sacarosa (B) del cultivo de A. Vinelandii.</i>	48
<i>Figura 4.1-2. Cinética de producción de alginato.</i>	49
<i>Figura 4.1-3. Curva para la obtención de la velocidad de crecimiento específica del cultivo de A. Vinelandii</i>	50
<i>Figura 4.2-1. Curva de evolución de la viscosidad contra el tiempo del cultivo de A. Vinealndii...</i>	52
<i>Figura 4.2-2. Curva de viscosidad del cultivo de A. Vinelandii</i>	53
<i>Figura 4.2-3. Consumo de potencia del sistema a lo largo del tiempo de cultivo de A. Vinelandii.</i>	54
<i>Figura 4.3-1. Curva del porcentaje de tensión de oxígeno disuelto a lo largo del cultivo de A. Vinelandii</i>	56

Lista de Tablas

<i>Tabla 3.2-1. Composición del medio Burk modificado.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 4.1-1. Comparación de los parámetros cinéticos del cultivo de A. Vinelandii.....</i>	<i>51</i>

Nomenclatura

Símbolos

$a:$	Unidad de volumen del líquido
$C^*:$	Concentración del líquido en la interfase
$C:$	Concentración del líquido
$C1:$	Distancia entre el rociador y el impulsor inferior
$C2:$	Distancia entre el impulsor inferior y el impulsor medio
$C3:$	Distancia entre el impulsor medio y el impulsor superior
$C4:$	Distancia entre el impulsor superior y la superficie libre
$C_x:$	Concentración de biomasa presente
$D_i:$	Diámetro del impulsor
$D_s:$	Diámetro del rociador
$E_{MT}:$	Eficiencia de potencia de transferencia de masa
$Fl_g:$	Número de flujo gaseado
$g:$	Constante de la aceleración de la gravedad
$H:$	Altura del líquido
$h_s:$	Altura del rociador desde el fondo del tanque
$J^0:$	Flujo molar de oxígeno
$K:$	Constante de proporcionalidad
$K':$	Índice de consistencia del flujo de fluidos no newtonianos
$K_G:$	Coefficiente global de transferencia de masa de la fase gaseosa
$K_L:$	Coefficiente global de transferencia de masa de la fase líquida
$k_{La}:$	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa
$k_s:$	Constante de proporcionalidad del impulsor
$M_d:$	Torque con el fluido
$M_e:$	Torque efectivo
$M_f:$	Torque con el tanque vacío
$n:$	Velocidad de rotación
$n':$	Índice de comportamiento de flujo para fluidos no newtonianos

N_{O_2} :	Tasa de transferencia de masa de oxígeno por unidad de volumen del reactor
N_p :	Número de potencia
N_{Pg} :	Número de potencia gaseada
P^* :	Presión parcial del gas en la interfase
p :	Presión parcial del gas
P :	Potencia
P_g :	Potencia gaseada
Q :	Caudal volumétrico del gas
q_{O_2} :	Tasa específica de consumo de oxígeno
T :	Diámetro del tanque
t :	Tiempo
V_s :	Velocidad superficial del gas
$Y_{x/s}$:	Rendimiento celular
$Y_{p/s}$:	Rendimiento de producto
μ_m :	Tasa de crecimiento específica
$\dot{\gamma}$:	Tasa de corte promedio

Letras griegas

μ :	Viscosidad dinámica
μ_a :	Viscosidad aparente del fluido
π :	Número pi
ρ :	Densidad
τ :	Esfuerzo Cortante

Números Adimensionales

Fr :	Número de Froude
Re :	Número de Reynolds

Acrónimos

OTR:	Tasa de transferencia de oxígeno del gas al líquido
OUR:	Tasa de consumo de oxígeno
ARI:	Impulsor de flujo axial-radial
OD:	Oxígeno disuelto
RT:	Turbina Rushton

TOD: Tensión de oxígeno disuelto

Resumen

El presente trabajo muestra un estudio experimental realizado en un tanque mecánicamente agitado equipado con impulsores múltiples que proporcionan un flujo de descarga radial-axial denominados impulsores híbridos con el fin de analizar el rendimiento en cuanto a transferencia de masa que presentan este tipo de impulsores en un medio viscoso. Se ha utilizado una cepa bacteriana de *Azotobacter Vinelandii* para realizar la reacción ya que al ser cultivada produce un polisacárido denominado como alginato de sodio, el cual aumento la viscosidad del medio en que se encontraba disuelto. Se estudió la transferencia de oxígeno proporcionada por los impulsores híbridos mediante lecturas del porcentaje de tensión de oxígeno disuelto (% TOD) en el caldo de cultivo. Además, se examinaron los parámetros cinéticos del cultivo relacionados con la transferencia de oxígeno, como el rendimiento en biomasa y el rendimiento de producto. Asimismo, se analizó el efecto de estos impulsores en el consumo de potencia del sistema.

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionaron una perspectiva más clara del rendimiento de los impulsores híbridos en términos de transferencia de masa en medios viscosos. Los datos recopilados permitieron comprender cómo estos impulsores afectan la transferencia de oxígeno, la producción de biomasa y la eficiencia en la generación del producto deseado, el alginato de sodio.

Abstract

The present document shows an experimental study made on a mechanical stirred tank equipped with multiple impellers that provide a radial-axial discharge flow named like hybrid impellers with the propose to analyze the performance about mass transfer that present this type of impellers in a viscous medium. It was used a bacterial strain of *Azotobacter Vinelandii* for doing the reaction, because when this bacterial strain is cultivated produce a polysaccharide named sodium alginate, wich increased the viscosity of the medium in wich it was dissolved. The oxygen transfer provided for the hybrid impellers was studied through percentage readings of the dissolved oxygen tension (%DOT) in the culture broth. In addition, kinetic parameters of the culture related to oxygen transfer, such as biomass yield and product yield, were examined. Likewise, the effect of these impellers on the power consumption of the system was analyzed.

The results obtained in this study provided a clearer perspective on the performance of hybrid impellers in terms of mass transfer in viscous media. The collected data allowed us to understand how these impellers affect oxygen transfer, biomass production, and the efficiency in generating the desired product, sodium alginate.

CAPÍTULO 1:

1 INTRODUCCIÓN

La operación de mezclado gas-líquido juega un papel importante en la mayoría de los procesos industriales actuales, en específico para aquellos procesos que involucren reacciones biológicas como cultivos bacterianos o fermentaciones. Para poder llevar a cabo de forma óptima este proceso se ha investigado el papel que tiene el mezclado a la hora de obtener una mayor cantidad de producto cuyas propiedades cumplan con los estándares requeridos. Debido a lo anterior, se ha estudiado el efecto que tienen diversos parámetros sobre el sistema, en donde se ha encontrado que la transferencia de oxígeno juega un papel crucial en los procesos que involucren microorganismos aerobios. Para poder tener una mejor transferencia de oxígeno dentro del sistema y obtener un producto homogéneo, se ha relacionado la geometría de los impulsores con este parámetro cuando se trabaja con tanques agitados mecánicamente; además, la geometría del impulsor empleado influye en la hidrodinámica del caldo de fermentación, consumo de energía, cizallamiento y morfología de los microorganismos filamentosos, afectando consecuentemente la biosíntesis del producto de interés (Buffo, Corrêa, Esperança, et al., 2016), por lo tanto, la selección de un impulsor apropiado requiere información precisa sobre las propiedades del fluido, las condiciones de operación y cualquier otro aspecto específico del sistema

1.1 Mezclado

El mezclado juega un papel fundamental en el éxito comercial de los procesos industriales debido a sus aplicaciones en varias áreas; se puede definir al mezclado como una operación

unitaria cuyo fin es la incorporación de dos o más porciones disimiles de un material para lograr un nivel deseado de homogeneidad física o química en el producto final. También se utiliza para incrementar la velocidad de procesos que involucran reacciones químicas o bioquímicas, así como para mejorar la transferencia de masa y de calor.

Una parte importante del conocimiento estudiado sobre mezclado se ha desarrollado a partir de la industria química, sin embargo, muchos otros sectores llevan a cabo operaciones de mezcla a gran escala. Por lo tanto, la mezcla es una característica central de muchos procesos en las industrias alimenticia, farmacéutica, del papel, del plástico, de la cerámica, del caucho, minera, etc.

Como resultado se obtiene que la inversión financiera, tanto en el capital como en los costos de funcionamiento de los procesos de mezcla, vistos a escala internacional, es considerable (Harnby et al., 1997).

El proceso de mezclado generalmente se divide en seis operaciones básicas o principales.

- Agitación de líquidos miscibles.
- Mezclado solido-líquido.
- Mezclado gas-líquido.
- Mezclado de líquidos inmiscibles.
- Mezclado con reacciones químicas-
- Mezclado sólido-sólido

1.2 Mezcla gas-líquido

Varias operaciones industriales importantes (oxidación, hidrogenación, fermentaciones biológicas, etc.) involucran el contacto de gases y líquidos. El objetivo de tales procesos es agitar la mezcla gas-líquido para generar una dispersión de burbujas de gas en una fase líquida continua, en ese momento tiene lugar la transferencia de masa a través de la interfaz gas-líquido que se crea y, en algunas ocasiones, las reacciones químicas acompañan a la transferencia de masa en la fase líquida. Con lo anterior el término "mezcla" se utiliza para cubrir un proceso de transferencia de masa, además, es importante señalar que todas las mezclas son inestables y se separan si se detiene la agitación (Harnby et al., 1997). La función

principal de la agitación o del mezclado será la de acelerar los procesos de transferencia de calor y de masa, lo cual se consigue mediante la introducción de energía en el volumen del fluido por medio de la rotación del sistema impulsor y la conversión de esta energía en movimiento hidrodinámico.

Estos sistemas tienen altos coeficientes de transferencia de masa y calor, excelentes capacidades de mezcla de líquidos y gases, largos tiempos de residencia del gas en la fase líquida y la capacidad de manejar una amplia gama de velocidades superficiales del gas (Posadas-Navarro et al., 2022). Para estos sistemas son comunes los problemas de transferencia de masa relacionados con la dinámica de fluidos no ideales, algunos ejemplos de esto son las desviaciones de las condiciones de gas totalmente disperso al aumentar la tasa de flujo de gas para incrementar la tasa de transferencia de masa.

Los sistemas gas-líquido son muy comunes en las industrias, bioquímica, química y de bioprocesos en general, donde es fundamental garantizar un contacto de interfase y una dispersión del gas adecuados. Algunas aplicaciones de estas industrias son el cultivo de bacterias, hongos, células animales, además de ser ampliamente estudiados en sistemas fermentativos.

De acuerdo con Maluta et al., (2021) los sistemas gas-líquido presentes en fermentaciones aeróbicas han sido objeto de múltiples estudios debido a que, estos procesos ocurren en presencia de microorganismos aerobios, lo que implica que los requisitos de transferencia de masa con respecto al oxígeno sean una limitación en referencia al crecimiento y mantenimiento celular de dichos microorganismos. Es decir, la tasa de producción en la fermentación aeróbica por lotes alimentados está limitada por la tasa de transferencia de oxígeno, que depende de la hidrodinámica del sistema gas-líquido.

1.3 Antecedentes

Anteriormente se mencionó la importancia del mezclado y que es ampliamente conocido como una operación unitaria clave para diversas industrias entre las cuales encontramos a la alimenticia, metalúrgica, química, farmacéutica, entre otras. Los tanques agitados son una herramienta comúnmente utilizada para homogeneizar productos de uno o múltiples componentes en estas industrias; se ha prestado especial atención a los sistemas gas-líquido en los estudios realizados en los últimos años (Ascanio et al., 2004; Raffo-Durán,

2014; Xie, Xia, Zhou, Zhou, et al., 2014; Xie, Xia, Zhou, Chu, et al., 2014; Labík et al., 2017). A partir de estos estudios se han encontrado diversas ventajas del uso de configuraciones con múltiples agitadores para estos sistemas (Gogate et al., 2000; Moucha et al., 2003; Moilanen et al., 2008; Fujasová et al., 2007; Petříček et al., 2018; Kracík et al., 2019); sin embargo, la mayoría de la información reportada se ha concentrado en el estudio de diferentes arreglos de múltiples impulsores con geometrías convencionales, por ejemplo, las turbinas Rushton, o las turbinas de flujo axial, principalmente (García-Ochoa & Gómez, 1998; Xie et al., 2014; Buffo, Corrêa, Esperanç, et al., 2016; Bernauer et al., 2021).

Tras revisar la literatura disponible nos encontramos con que son pocos los estudios que se han realizado en torno a las turbinas de flujo Axial/Radial (ARI) las cuales son el principal objeto de estudio de este documento. Una de estas investigaciones (Ascanio et al., 2003) mostró que este tipo de turbinas para las regiones segregadas que se generan debajo del impulsor pueden destruirse sin dificultad por la acción de bombeo de esta, mientras que las regiones formadas por encima del impulsor se destruyen por descarga radial, lo que causa que haya tiempos de mezclado más cortos además de que requerirán un menor consumo de potencia en comparación con las turbinas convencionales previamente mencionadas por lo que se consideran ideales para aplicaciones en las que se requiere una buena dispersión con un bajo consumo de energía.

En un estudio realizado por Pakzad et al., (2013a) y Pakzad et al., (2013b), se evaluó el rendimiento hidrodinámico de un impulsor de flujo mixto en comparación con una turbina Rushton y un impulsor A200. Los investigadores llevaron a cabo la evaluación utilizando un ancla coaxial con fluidos de adelgazamiento por cizallamiento y fluidos con tensión de fluencia, y analizaron los resultados utilizando Tomografía de Resistencia Eléctrica (ERT) y Dinámica de Fluidos Computacional (CFD). Los resultados indicaron que el impulsor de flujo mixto tuvo un mejor rendimiento cuando se operó a una relación de velocidad más alta en comparación con el impulsor de anclaje.

Un estudio más reciente realizado por Posadas Navarro et al., (2022) mostró que este tipo de turbinas presentan tasas de corte moderadas, además de una mejor intensidad de agitación dentro del tanque proporcionando una distribución de flujo más uniforme en el mismo, esto en comparación con los dos arreglos de turbinas más utilizados (Turbinas Rushton y de Alabes Inclinados) por lo que se convierten en una alternativa bastante plausible

para una gran variedad de aplicaciones, de entre las cuales destacan los procesos que involucren fermentaciones, en donde los cultivos son sensibles al cizallamiento.

Por otro lado, la producción de Alginato a partir de *A. Vinelandii* ha sido de particular interés como método para sustituir la clásica producción del polisacárido a partir de su extracción de algas marinas, esto debido a que se ha buscado un proceso que pueda controlarse de manera efectiva desde nivel laboratorio para su posterior reproducción a una escala industrial, debido a esto se han desarrollado una multitud de investigaciones que cumplan dicho objetivo (Castillo et al., 2013; Clementi et al., 1995, 1999; Díaz-Barrera et al., 2011; Gacesa, 1998; Ponce et al., 2021), las cuales han estudiado las diferentes condiciones que afectan el cultivo de *A. Vinelandii* para obtener una producción adecuada de alginato, entre las cuales destaca la tasa de transferencia de oxígeno como el parámetro principal para que se lleve de forma adecuada la reacción biológica.

1.4 Planteamiento del Problema

Tras realizar una exhaustiva revisión de la literatura en el campo de la ingeniería química y la ingeniería de biorreacciones, se ha observado que el agitador mecánico más comúnmente utilizado en biorreactores es la turbina Rushton, la cual se caracteriza por generar principalmente un flujo radial. Esta turbina ha demostrado un excelente desempeño en términos de transferencia de *momentum* y masa cuando se trabaja con fluidos de baja viscosidad y altos números de Reynolds. Sin embargo, a medida que la viscosidad del fluido de trabajo aumenta, se generan zonas segregadas cuando se emplean las turbinas Rushton, lo que resulta en la formación de áreas bien mezcladas, también conocidas como cavernas, así como zonas muertas donde el fluido se encuentra prácticamente estático.

En este contexto, es importante destacar que diversos estudios han demostrado que el flujo de descarga está estrechamente relacionado con la geometría del impulsor utilizado en el biorreactor. Es por esto por lo que los agitadores de flujo mixto, también conocidos como agitadores múltiples, han surgido como una alternativa prometedora. Estos agitadores han mostrado una alta eficiencia hidrodinámica cuando se trabaja con fluidos viscosos, como las cepas utilizadas en algunos procesos de fermentación. Sin embargo, hasta el momento, no se ha evaluado el desempeño de los agitadores de flujo mixto en términos de transferencia de masa, lo cual representa una valiosa oportunidad de investigación en el ámbito de los

biorreactores. En resumen, este estudio propone abordar la evaluación de los agitadores de flujo mixto en términos de transferencia de masa en biorreactores. Se espera que los resultados obtenidos aporten nuevos conocimientos en el campo y permitan mejorar la eficiencia de los sistemas de agitación en procesos industriales, particularmente aquellos que involucran fluidos viscosos.

1.5 Objetivos

General

Investigar el desempeño de biorreactores agitados mecánicamente con impulsores coaxiales de flujo mixto (impulsores híbridos) en términos de la reología y de su capacidad de transferencia de masa.

Particulares

- Determinar la capacidad de transferencia de masa en función del tiempo mediante el método dinámico del coeficiente de transferencia de masa, utilizando mediciones de oxígeno disuelto como indicador.
- Caracterizar la evolución de las propiedades físicas y reológicas del producto a lo largo del tiempo, considerando parámetros como la viscosidad, concentración de los componentes, etc.
- Evaluar el efecto de las variables de operación, como la velocidad de agitación y la geometría del impulsor, en la transferencia de masa y en las propiedades físicas y reológicas del producto.

1.6 Hipótesis

El uso de impulsores híbridos múltiples dispuestos de manera coaxial en biorreactores agitados mecánicamente con flujo mixto mejora significativamente el proceso de mezclado y la distribución del producto en comparación con impulsores convencionales. Específicamente, se espera que esta mejora sea notable en procesos de fermentación donde la viscosidad del producto aumenta con el tiempo.

CAPÍTULO 2

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Tasa de Transferencia de masa de oxígeno

La transferencia de masa gas-líquido en recipientes agitados es un proceso de considerable importancia en las industrias química y bioquímica. Se conoce que la mayor parte de los procesos microbianos (fermentaciones, tratamientos de agua, cultivos, etc.) son aerobios, siendo que algunos de ellos se llevan a cabo en medios acuosos que contienen sales y sustancias orgánicas lo que puede resultar en un caldo viscoso como medio. Los microorganismos utilizados en estos procesos trabajan en una fuerte interacción con su entorno durante la fermentación aeróbica, que debe estar adecuadamente formado por el diseño del medio con las condiciones de transferencia de oxígeno y pH ideales. El oxígeno es uno de los nutrientes más importantes para estos microorganismos ya que ayuda en su crecimiento, mantenimiento y producción de metabolitos, por lo que la escasez de este afectará directamente el rendimiento y velocidad del proceso. Es por ello que se considera como el paso limitante de la velocidad a la transferencia de masa del oxígeno debido a la baja solubilidad que puede presentar este en el medio (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009).

Hay varias teorías sobre cómo la transferencia de oxígeno afecta a los microorganismos, estos conceptos se utilizan ampliamente para modelar la cinética del transporte de oxígeno. Aunque existen modelos complejos para explicar esto, los modelos más simples han demostrado ser efectivos en el diseño de sistemas de aireación y proporcionan estimaciones consistentes de la transferencia de oxígeno.

La teoría más utilizada para explicar el transporte de masa gas-líquido es la teoría de la doble película (Whitman, 1923) la cual establece la existencia de dos capas: una de líquido y otra de gas en la interfase gas-líquido. Estas dos fases presentan una resistencia al paso de las moléculas de gas de una fase a otra, lo anterior supone que en la interfase hay equilibrio, y propone la suma de las resistencias en la transferencia de masa de las dos fases para obtener la resistencia total. La resistencia de transferencia proviene de la presencia de dos películas muy delgadas a cada lado de la estructura, una para cada fase. Este proceso se lleva a cabo lentamente, ya que la difusión de películas se produce por difusión molecular. En el resto de la masa hay influencias que producen movimiento lo que provoca dispersión por turbulencia, para producir un mayor o menor flujo de materia. El gradiente de concentración es lineal en cada una de las películas y es igual a cero fuera de ellas. Para el caso de gases poco solubles, la capa líquida es aquella que ofrece una mayor resistencia al paso de las moléculas de la fase gaseosa a la fase líquida, por otra parte, la capa gaseosa se establece con aquellos que son más solubles en agua siendo que opondrá mayor resistencia. La tasa de transferencia de masa gas-líquido se modela conforme esta teoría, describiendo el flujo a través de cada película como el producto de la fuerza motriz por el coeficiente de transferencia de masa. Debido a la imposibilidad de medir directamente las concentraciones interfaciales además de considerar el coeficiente de transferencia de masa general se obtiene la ecuación (1):

$$J^0 = K_G (p - P^*) = K_L (C^* - C) \quad (1)$$

Donde:

J^0 es el flujo molar de oxígeno ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a través de la interfase gas-líquido.

K_G y K_L son los coeficientes globales de transferencia de masa.

P^* es la presión parcial del gas en la interfase, y P es la presión parcial en el resto de la masa de gas.

C^* es la concentración de O_2 en la interfase y C la concentración de O_2 en el resto del líquido ($C^* > C$).

Para la ecuación (1) se considera comúnmente que el oxígeno es poco soluble en agua por lo que la mayor resistencia para la transferencia de masa se encontrará en el lado líquido

de la interfase causando que la resistencia de la fase gas pueda despreciarse con lo que el coeficiente total de transporte de masa será igual al coeficiente local: $K_L = k_L$

En la Figura 2.1-1 se muestra una distribución de las capas mencionadas en esta teoría. Para cada gas, existe un determinado gradiente de presión parcial a lo largo de la película delgada de gas, representado por p y P^* . A lo largo de la película líquida, existe un gradiente de concentraciones de O_2 representado por C y C^* (Molina, et al. 2003).

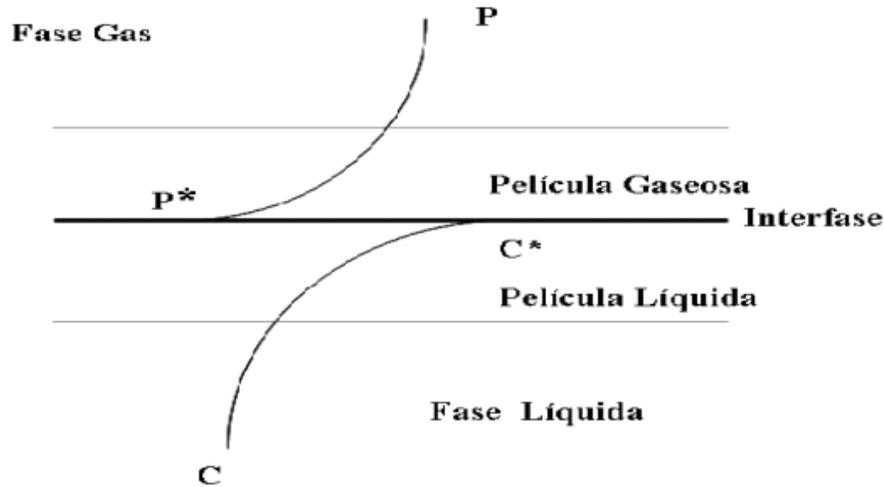


Figura 2.1-1 Teoría de doble capa para la transferencia de gases (Molina, et al. (2003)).

Finalmente, para obtener la tasa de transferencia de masa de oxígeno por unidad de volumen del reactor, N_{O_2} o OTR, se multiplica el flujo total por el área interfacial gas-líquido por unidad de volumen de líquido “ a ” quedando la ecuación (1) de la siguiente forma:

$$N_{O_2} = a (J^0) = k_L a (C^* - C) \quad (2)$$

2.2 Coeficiente Volumétrico de transferencia de masa de oxígeno ($k_L a$)

El coeficiente volumétrico de transferencia de masa de oxígeno ($k_L a$) es aquel parámetro que caracteriza el transporte de gas a líquido para el oxígeno, surge del producto de dos términos: el primero de ellos k_L , es el coeficiente de transferencia de oxígeno en la interfaz líquido-gas; por su parte el término “ a ” corresponde a la razón de área superficial de burbujas con respecto al volumen total de líquido. Sin embargo, debido a que resulta difícil medir estos parámetros por separado generalmente se opta por medir el producto $k_L a$.

El valor del k_{LA} depende principalmente de las condiciones del medio de cultivo (flujo de aire, volumen del líquido, régimen de agitación, etc.) además del diseño del reactor; los factores que afectan al coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno son la viscosidad del medio y el volumen del líquido; por su parte los factores que propician mejores valores para este coeficiente son una buena agitación, además de una amplia área de transferencia de masa, lo anterior resulta en la importancia de utilizar dispositivos que aumenten uno o ambos factores, tal es el caso de los diversos tipos de impulsores utilizados para la agitación de este tipo de reactores.

2.2.1 Estimación experimental del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{LA})

La determinación de k_{LA} en biorreactores es importante para asegurar la eficiencia de la aireación y calcular el efecto de las condiciones de operación sobre el suministro de oxígeno disuelto. Por ello existen diferentes técnicas para su obtención experimental las cuales toman en cuenta factores tales como los sistemas de aireación y homogeneización utilizados, el tipo de biorreactor y su diseño mecánico, la composición del medio de fermentación y el posible efecto de la presencia del microorganismo. (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009)

Para obtener el valor del oxígeno disuelto (OD) en la fase líquida se establece el siguiente balance:

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR \quad (3)$$

En esta ecuación dC/dt es la razón de cambio de OD con respecto al tiempo, OTR es la tasa de transferencia de oxígeno del gas al líquido mientras que OUR es la tasa de consumo de oxígeno por los microorganismos. OUR puede expresarse como el producto de la tasa específica de consumo de oxígeno del microorganismo empleado q_{O_2} por la concentración de biomasa presente C_x lo que representa la cantidad de oxígeno consumido por los microorganismos por unidad de tiempo y se expresa en $mg\ O_2/(l \cdot h)$. Por lo tanto, la ecuación (3) puede expresarse de la siguiente forma:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a(C^* - C) - (q_{O_2})(C_x) \quad (4)$$

Donde el primer término del lado izquierdo de la ecuación representa la OTR mientras que el segundo termino se refiere al OUR.

2.3 Consumo de Potencia

El consumo de energía es un parámetro clave en el diseño y escalado de tanques agitados, por lo que la potencia consumida por un impulsor giratorio ocupará un papel importante en el diseño de estos sistemas. Este parámetro indica cómo se transfiere la energía de los impulsores al fluido, es decir, determina la cantidad de energía requerida en un período de tiempo, para generar el movimiento del fluido dentro del recipiente mediante agitación mecánica o neumática (Ascanio et al., 2004). Es por ello por lo que las mejores opciones para los impulsores de un tanque agitado serán aquellos con el menor consumo de energía.

El consumo de energía influye en los procesos de transferencia de calor y masa, así como en los tiempos de mezcla y circulación, es por lo anterior que ha sido ampliamente utilizado para el escalado y diseño de biorreactores, donde es comúnmente conocido como consumo de energía volumétrica (P/V).

2.3.1 Correlaciones de consumo de potencia

Para estimar la potencia requerida para hacer girar un impulsor a una velocidad dada, es preciso disponer de correlaciones empíricas de la potencia (o del número de potencia) en función de otras variables del sistema. La forma de estas correlaciones se encuentra por análisis dimensional, en función de las medidas importantes del tanque y del impulsor, la distancia del impulsor desde el fondo del tanque, la profundidad del líquido, así como las dimensiones de las placas deflectoras cuando se utilizan. El número y disposición de los deflectores y el número de los alabes del impulsor deben ser fijados.

Las variables relevantes para el análisis son las medidas importantes del tanque y del impulsor, la viscosidad (μ) y la densidad (ρ) del fluido y la velocidad (n). Por otra parte, salvo que se tomen precauciones para evitarlo, se formará un vórtice en la superficie del líquido. Algo de líquido se elevará por encima del nivel medio o nivel sin agitación de la superficie del líquido, y esta elevación tiene que vencer la fuerza de gravedad. Por lo tanto, la aceleración debida a la gravedad (g) se toma en cuenta como un factor en el análisis (McCabe et al., 2007).

2.3.1.1 Consumo de potencia (energía) con líquido newtonianos.

Es posible convertir todas las distintas medidas lineales en relaciones adimensionales, llamadas factores de forma, dividiendo cada uno de los términos por uno de ellos que se toma arbitrariamente como base. El diámetro del impulsor D_i y el del tanque T son elecciones adecuadas para esta medida base, y los factores de forma se calculan dividiendo cada una de las mediciones restantes entre el valor de D_i o T . Por otra parte, el consumo de potencia de un impulsor en un tanque agitado con un fluido newtoniano se puede predecir con bastante precisión a partir de un parámetro adimensional llamado número de potencia.

Este número adimensional es parte de las correlaciones que describen la hidrodinámica de un sistema agitado, el cual, en general, está representado por la siguiente correlación:

$$N_p = f(Fr, Re, \text{"Factores de forma"}) \quad (5)$$

Donde:

$$N_p = \frac{P}{n^3 D_i^5 \rho} \quad (6)$$

$$Fr = \frac{n^2 D_i}{g} \quad (7)$$

$$Re = \frac{n(D_i)^2 \rho}{\mu} \quad (8)$$

En este caso, el efecto de la gravedad sobre la hidrodinámica del sistema puede despreciarse si hay suficientes deflectores en el sistema por lo cual no se tomará en cuenta el número de Froude (Fr). Cabe señalar que los elementos de diseño incluidos en la ecuación se pueden dividir en dos grupos: el primero, que está representado por una relación geométrica simple que describe el cambio en la geometría del impulsor, y el segundo, integrado por los que caracterizan los cambios en la geometría del resto del sistema de agitación. Los factores de forma que componen el segundo grupo afectan indirectamente el cambio en el consumo de energía y su influencia se muestra principalmente por la caída en la presión del agua circulante. (García-Cortés & Jáuregui-Haza, 2006).

2.3.1.2 Consumo de potencia (energía) con líquidos no newtonianos

En las correlaciones de datos de potencia (energía) para líquidos no newtonianos, el número de potencia N_p se define de la misma forma que para fluidos newtonianos. Sin embargo, el número de Reynolds no se define fácilmente, ya que la viscosidad aparente del fluido varía con la velocidad de corte (gradiente de velocidad), y ésta varía considerablemente de un punto a otro en el tanque. A pesar de esto, se han obtenido correlaciones útiles, con un número de Reynolds definido de acuerdo con la ecuación (8), utilizando una viscosidad media aparente (μ_a) calculada a partir del gradiente promedio de la velocidad de corte (du/dy) promedio ($\dot{\gamma}$) (McCabe et al., 2007). El número de Reynolds es entonces:

$$Re = \frac{n(D_i)^2 \rho}{\mu_a} \quad (9)$$

Para un fluido newtoniano que sigue la ley de potencia la viscosidad media aparente está relacionada con el gradiente promedio de velocidad de corte, por la ecuación:

$$\mu_a = K'(\dot{\gamma})^{n'-1} \quad (10)$$

Al sustituir en la ecuación (9) se obtiene la ecuación(11) :

$$Re = \frac{n(D_i)^2 \rho}{K'(\dot{\gamma})^{n'-1}} \quad (11)$$

Para fluidos pseudoplásticos, se ha probado que la deformación efectiva promedio en el interior de un tanque se relaciona de forma directa con la velocidad del impulsor. Para muchos fluidos pseudoplásticos, la relación que satisface la siguiente ecuación es:

$$(\dot{\gamma}) = k_s n \quad (12)$$

Donde:

k_s : constante para el tipo específico de impulsor.

2.3.1.3 Correlación con coeficiente volumétrico de transferencia de masa $k_L a$

De acuerdo con Ascanio et al., (2004) gran variedad de valores reportados de $k_L a$ en la literatura se describen mediante la correlación estándar basada en la teoría de la turbulencia isotrópica:

$$k_L a = K \left(\frac{P}{V} \right)^\alpha (V_s)^\beta \quad (13)$$

En donde $k_L a$ corresponde al coeficiente volumétrico de transferencia de masa (h^{-1}), V_s es la velocidad superficial del gas ($m h^{-1}$) y K es la constante de proporcionalidad. El

rendimiento y escalado del biorreactor requiere la determinación precisa de los parámetros involucrados en la ecuación (13). Con respecto al consumo de energía volumétrica, solo el consumo de energía del fluido es relevante en términos de resultados del proceso. Esto significa que la energía consumida por el motor y la caja de engranajes, así como la pérdida de energía debido a la fricción, aunque son importantes para la economía del proceso, no necesitan tenerse en cuenta para el diseño o la operación. progreso (Ascanio et al., 2004); sin embargo, la intensidad de disipación de energía P/V no es el único parámetro relevante, entonces la predicción de $k_L a$ debe calcularse por separado, por ejemplo, para fluidos coalescentes y no coalescentes.

Otro parámetro importante para tener en cuenta es la eficiencia de potencia de transferencia de masa (E_{MT}), definida de acuerdo con la ecuación (14), siendo que E_{MT} se expresa como el coeficiente de transferencia de oxígeno según el consumo de energía y se da en unidades de Joule^{-1} (Buffo, Corrêa, Esperança, et al., 2016). Representa la mayor transferencia de oxígeno utilizando 1 J de energía.

$$E_{MT} = \frac{k_L a}{P} \quad (14)$$

2.4 Reología

La reología es la rama de la ciencia que estudia la deformación y el flujo de los materiales; el campo de la reología se extiende desde la mecánica de fluidos newtoniana, hasta el estudio de la elasticidad de Hooke. En esta sección solo se revisará la primera parte, es decir, la mecánica de fluidos newtonianos (Peña et al., 2011).

2.4.1 Ley de viscosidad de Newton

Cuando se aplica una fuerza de corte o tensión al fluido, el fluido exhibe resistencia al movimiento, ya que la tensión antes mencionada continúa, el fluido tiende a deformarse. Luego se hunde y su velocidad aumenta a medida que aumenta la fuerza. La resistencia al movimiento relativo entre capas adyacentes en un fluido es una de sus propiedades conocida en el campo de la mecánica de fluidos como viscosidad.

Para explicar la ley de viscosidad de newton se parte del siguiente modelo: Las capas de un fluido cercanas a una placa sólida fija tienen menores velocidades que las capas más alejadas debido a los procesos disipativos que se producen, por lo que parte de la energía cinética que poseen las capas se convertirá en calor. Representando el comportamiento de un

fluido, contenido entre dos placas grandes y paralelos de área A , separadas por una pequeña distancia " y " y si es muy pequeña " dy " tal como se muestra en la Figura 2.4-1

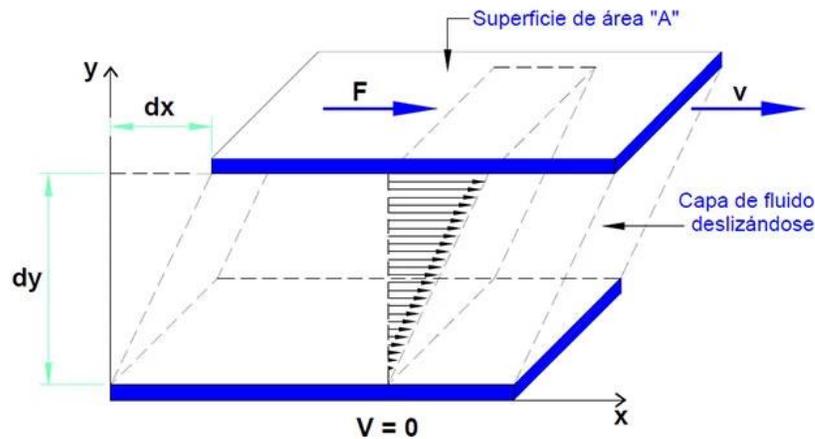


Figura 2.4-1 Modelo "Ley de viscosidad de Newton"

La fuerza " F " requerida para mover la placa superior está relacionada con el área en contacto con el fluido; para obtener una medida específica es necesario dividir la fuerza total requerida para mover por el área en contacto con la sustancia. Esta relación es conocida como esfuerzo cortante " τ ". Por otro lado, la fuerza cortante que actúa sobre el material, también conocida como cizallamiento, está relacionada con la velocidad de desplazamiento relativa y la distancia entre las placas. A cierta velocidad " v " se requiere más esfuerzo por unidad de material cuanto más cerca están las placas entre sí. La medida específica de este trabajo por unidad de material se denomina velocidad, tasa de deformación o corte, y se define como la velocidad relativa dividida por la distancia entre las placas

Suponiendo que el sistema está inicialmente en reposo, $t = 0$, pero luego la placa superior comienza a moverse en la dirección del eje X , con una velocidad constante v . A medida que transcurre el tiempo el fluido gana cantidad de movimiento, y para finalmente establecer el perfil de velocidad en régimen estacionario. Una vez alcanzado dicho estado estacionario de movimiento es preciso aplicar una fuerza constante F para conservar el movimiento de la lámina inferior. Dadas estas condiciones el esfuerzo cortante se puede expresar como:

$$\tau = \frac{F}{A} = -\mu \frac{dv_x}{dy} \quad (15)$$

2.4.2 Fluido newtoniano

Si la viscosidad del fluido se mantiene constante, entonces se considera que el fluido es Newtoniano, también conocido como fluido viscoso lineal, independientemente del valor de τ . Visto en una gráfica de esfuerzo cortante (τ) vs. velocidad corte promedio ($\dot{\gamma}$) para un fluido Newtoniano será una recta que pasa por el origen (Figura 2.4-2).

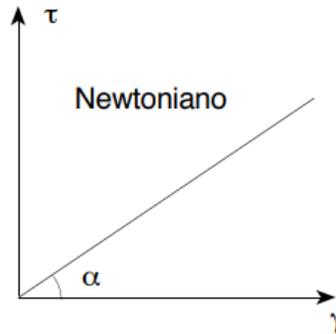


Figura 2.4-2 Fluido newtoniano

CAPÍTULO 3:

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Montaje Experimental

3.1.1 Biorreactor

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un biorreactor de tanque agitado de 15 L de volumen total; este equipo consiste en un recipiente cilíndrico vertical de fondo plano fabricado en vidrio con un diámetro interior (D_i) de 70 mm y una altura total (H_T) de 28 cm. Para este trabajo el volumen de operación (V_o) fue de 10 L.

3.1.2 Impulsores

En el presente trabajo se utilizaron tres impulsores axiales/radiales “ARI” por sus siglas en inglés (Axial Radial Impeller) también llamados impulsores híbridos debido a que producen patrones de flujo mixto (Ascanio et al., 2003), la geometría de este tipo de impulsor consiste en la combinación de un alabe inclinado y un alabe recto como se muestra en la Figura 3.1-1; los tres impulsores se montaron de forma coaxial a lo largo del eje para el biorreactor.

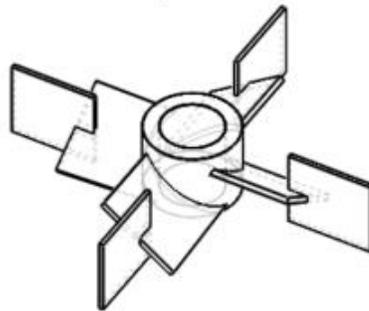


Figura 3.1-1. Impulsor Radial Axial de flujo Mixto

3.1.3 Rociador

En los sistemas gas-líquido, se utiliza un rociador cuando se suministra un gas al líquido para lograr un contacto gas-líquido eficiente para la transferencia de masa y la reacción. Hoy en día, muchas configuraciones de rociadores están disponibles. Sin embargo, estudios numéricos han demostrado que el rociador de anillo muestra una dispersión más homogénea y bajas zonas muertas (Amer et al., 2019). Esta configuración tiene pequeños orificios que, cuando se conectan al aire a presión, se distribuyen como burbujas finas en el tanque agitado para permitir una aireación eficaz. Aunque no existen estándares de procedimientos para su diseño y fabricación, se recomienda que las áreas de entrada y salida de un rociador de anillo sean iguales, lo que ayuda a minimizar la caída de presión del aire mientras proporciona una distribución uniforme del mismo (Kulkarni et al., 2007).

En el presente trabajo, se colocó un rociador de anillo debajo del impulsor a una distancia h_s de 31 mm medida desde el fondo del tanque. El diámetro del rociador fue de aproximadamente 0,8 veces el diámetro del impulsor ($D_s = 57$ mm) el cual posee 8 orificios de 2 mm distribuidos equitativamente alrededor del anillo. El rociador fue diseñado con las dimensiones estándar reportadas por Paul et al. (2003).

3.1.4 Instrumentación

Con el fin de tener un control más certero de la fermentación, se instrumentó el biorreactor utilizado en este trabajo tomando en cuenta las variables más importantes que influyen en el proceso de fermentación como lo son el pH, la temperatura, además de poder medir el % de oxígeno disuelto a lo largo de la reacción.

3.1.4.1 Medición de pH

El pH dentro de una fermentación es uno de los parámetros más comúnmente medidos, ya que las células durante la fermentación producen ácidos como producto de su propio metabolismo. Por lo cual para generar el mayor crecimiento celular depende altamente del pH.

Para el presente trabajo se utilizó como sensor de medición del pH un electrodo de vidrio. Los electrodos de vidrio son considerados como instrumentos de lectura directa, leyéndose el pH de la disolución donde se introduce el electrodo de vidrio en una escala con

unidades de pH, la cual se gradúa con valores de pH de referencia, suministrados por disoluciones tampón estándar.

3.1.4.2 Temperatura

Para medir la temperatura se colocó el biorreactor dentro de un baño maría cuya temperatura se mantuvo a 29 °C

3.1.5 Configuración experimental

En la Figura 3.1-2 se muestra la configuración utilizada en este trabajo. El impulsor inferior se montó en el eje a una distancia de 31 mm (C1) medida desde el rociador. El impulsor medio se colocó a una distancia de 70 mm (C2) medida desde el impulsor inferior y el superior se colocó a una distancia de 70 mm (C3) desde el impulsor medio. Con el objetivo de minimizar la entrada de aire al líquido de trabajo, se fijó la distancia entre el impulsor superior y la superficie libre en 31 mm (C4).

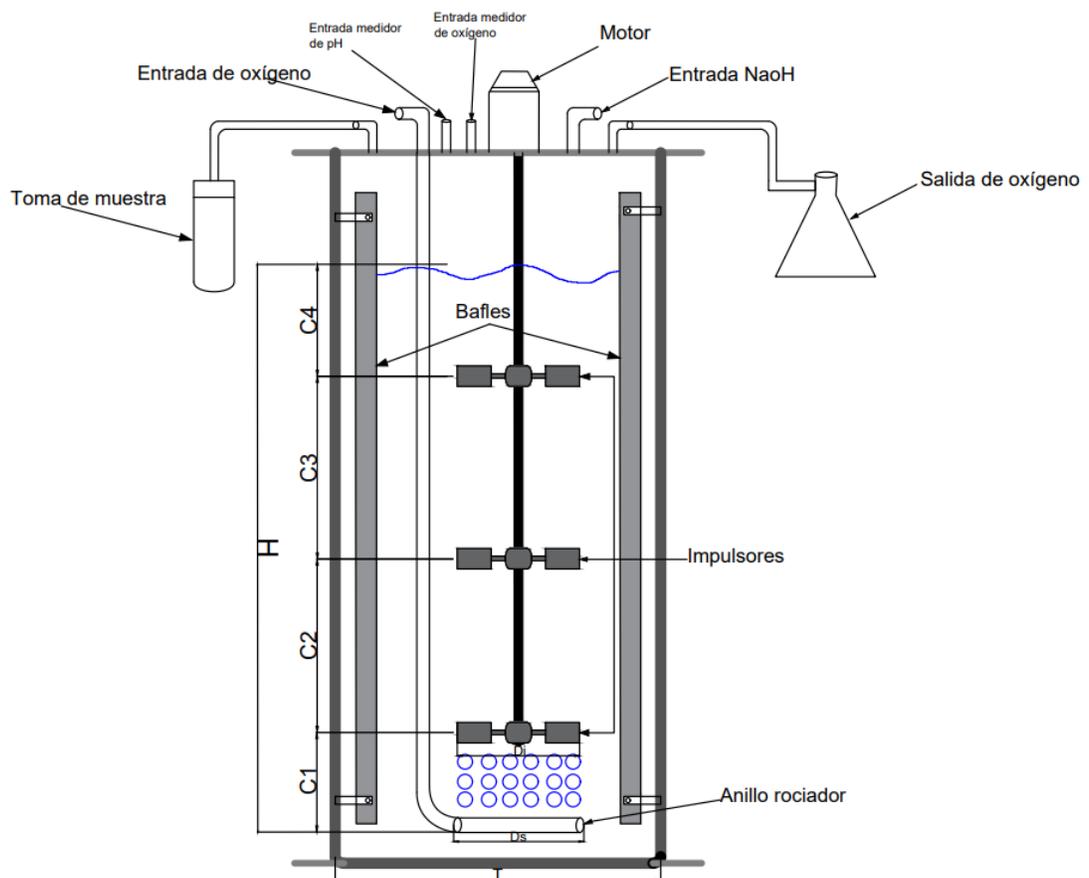


Figura 3.1-2. Configuración experimental biorreactor aireado equipado con impulsores múltiples híbridos

3.2 Condiciones Experimentales

3.2.1 Determinación experimental de la tasa de consumo de oxígeno, la tasa de transferencia de oxígeno y k_La

Se utilizo el método dinámico reportado por Garcia-Ochoa & Gomez (2009) que considera el consumo biológico de oxígeno realizado por los microorganismos (Figura 3.2-1).

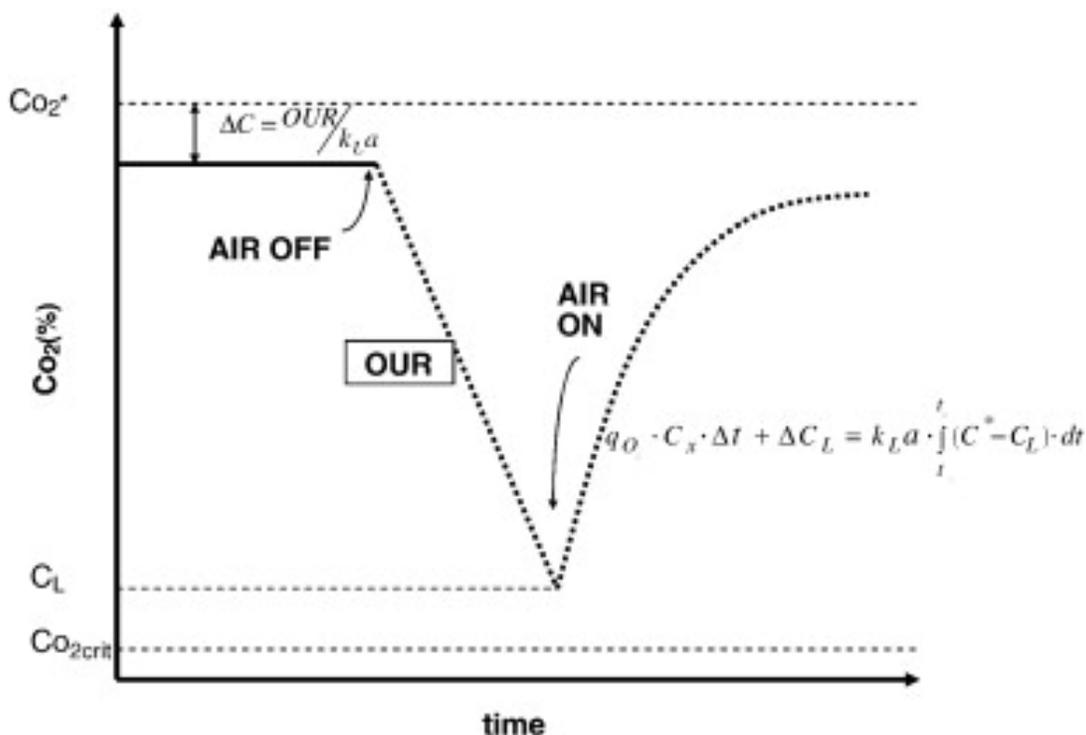


Figura 3.2-1. Descripción esquemática de la medición directa de OTR en bioprocesos por la técnica dinámica clásica. (Garcia-Ochoa & Gomez, 2009)

El método es utilizado debido a la existencia de condiciones dinámicas dentro del sistema, por lo que debe introducirse una perturbación dentro de este, lo anterior se realiza interrumpiendo el suministro de aire al caldo de fermentación, lo que provocará una disminución de la concentración de oxígeno disuelto a un ritmo igual al consumo de oxígeno por la respiración del microorganismo lo cual se registra con una sonda polarográfica de oxígeno, bajo estas condiciones es posible obtener el OUR volumétrico el cual viene dado por el cambio en la concentración de oxígeno disuelto después de detener el suministro de aire, entonces la ecuación (4) toma la siguiente forma:

$$\frac{dC}{dt} = -(q_{O_2})(C_x) \quad (16)$$

La OUR volumétrica se obtiene a partir de la pendiente del gráfico de concentración de oxígeno disuelto (después de detener el flujo de aire) frente al tiempo (Figura 3.2-1) cabe señalar que la concentración de biomasa debe medirse o conocerse en ese momento, además debe tenerse cuidado de no disminuir por debajo del 10% del valor de saturación a la tasa de OD, con el fin de evitar algún daño sobre el microorganismo utilizado. Esta primera parte del proceso se utiliza para conocer el valor de la tasa volumétrica específica de consumo de oxígeno del microorganismo (q_{O_2}) para lo cual se debe dividir la OUR volumétrica por la concentración de biomasa presente.

La segunda parte consiste en reanudar la aireación al medio de cultivo dentro del biorreactor fijando valores predeterminados para la velocidad de agitación y el caudal de aire suministrado, bajo estas condiciones la concentración de oxígeno disuelto aumentará hasta alcanzar una concentración constante. Bajo estas condiciones, una vez conocido el valor de q_{O_2} y, para una concentración de biomasa dada C_x se puede integrar la ecuación (4) tomando en cuenta el tiempo en que se restableció el flujo de aire ($t = t_1 \therefore C = C_1$) obteniendo la siguiente expresión:

$$(q_{O_2})(C_x)(\Delta t) + \Delta C = k_L a \left(\int_{t_1}^{t_2} (C^* - C) dt \right) \quad (17)$$

La ecuación anterior se utiliza para determinar la transferencia volumétrica de masa de oxígeno varias veces durante el todo el proceso, resolviendo esta ecuación para cada conjunto de datos de valores experimentales de C contra al tiempo.

3.2.2 Crecimiento Bacteriano

El crecimiento bacteriano se puede definir como un aumento en el número de componentes y estructuras celulares. Si el crecimiento ocurre en ausencia de división celular, esto conduce a un aumento en el tamaño y peso de las células. En cambio, si al crecimiento le sigue la división celular, el número de células aumenta.

Es importante distinguir entre el crecimiento de células individuales y el crecimiento de poblaciones. En el caso de los microorganismos, debido a su pequeño tamaño, se realizan estudios de crecimiento poblacional en lugar de estudios de crecimiento individual. El

crecimiento de una población se refiere a un aumento en el número de células debido al crecimiento individual y la subsiguiente división.

Bajo condiciones controladas en el laboratorio, es posible seguir la evolución del número de células a lo largo del tiempo de un cultivo microbiano en un sistema cerrado. Al representar estos resultados, se obtiene la curva de crecimiento (Figura 3.2-2), que se compone de cuatro fases: la fase de latencia o de adaptación, la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte (Brock Biology of Microorganisms, 2012)

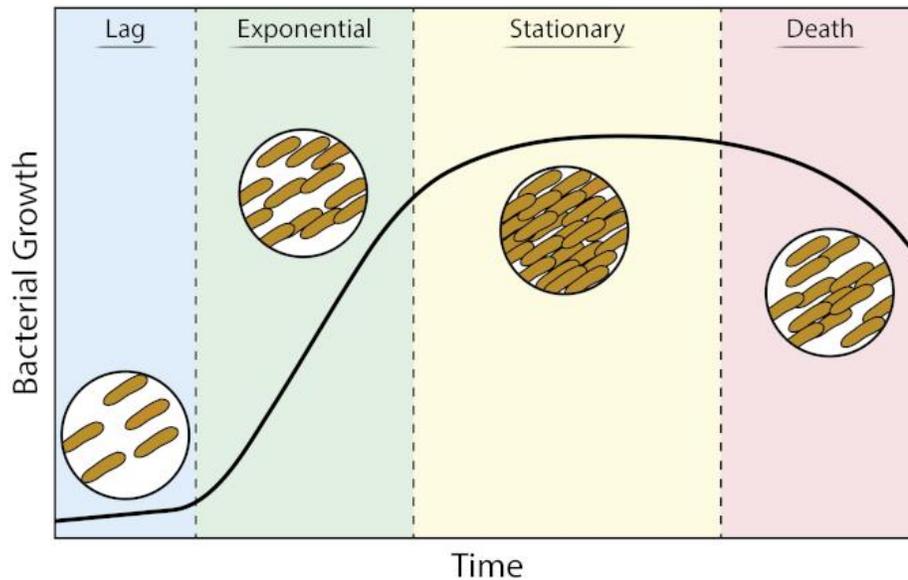


Figura 3.2-2 Curva de crecimiento Bacteriano (Van Alst A. et al. ,2023)

Fase de latencia: La fase de latencia se refiere a un período de transición en el cual, cuando una población bacteriana es inoculada en un medio fresco, el crecimiento no comienza inmediatamente, sino después de un tiempo que puede ser corto o largo, dependiendo de las condiciones. Durante esta fase, los microorganismos se adaptan a las nuevas condiciones del medio ambiente y producen las enzimas necesarias para su crecimiento. Esta fase es fundamental para que los microorganismos puedan establecerse en el nuevo medio ambiente y prepararse para la siguiente fase de crecimiento.

Fase exponencial: La fase exponencial, también conocida como fase logarítmica, es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo experimenta un crecimiento exponencial. Bajo condiciones óptimas, la velocidad de crecimiento es máxima durante esta fase. Las condiciones ambientales, como la temperatura y la composición del

medio de cultivo, afectan significativamente la velocidad de crecimiento exponencial del microorganismo. Es en esta fase donde se produce la mayor cantidad de células y se observa el mayor cambio en la densidad del cultivo.

Fase estacionaria: es el periodo en la cual no varía el número de microorganismos.

Fase de muerte: Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabolizando, pero comenzará una disminución progresiva en el número de células viables. Cuando esto ocurre, se dice que la población ha entrado en la fase de muerte. Durante la fase de muerte, el número de células viables disminuye debido a una combinación de factores, como la falta de nutrientes, el acúmulo de productos metabólicos tóxicos y el agotamiento de los recursos del medio ambiente. Es importante tener en cuenta que, aunque la fase de muerte se llama así, no significa necesariamente que todas las células de la población mueran. Algunas células pueden permanecer viables incluso después de que la mayoría de la población haya muerto.

3.2.2.1 Velocidad de crecimiento bacteriano

La velocidad de crecimiento es una medida del aumento en el número de células o en la masa celular por unidad de tiempo. La velocidad específica de crecimiento se refiere a la tasa de crecimiento específica (μ_m) de un tipo particular de microorganismo en un medio de cultivo determinado, también conocido como sustrato. La velocidad específica de crecimiento es influenciada por diversos factores, como la temperatura, el pH, la concentración de nutrientes, el oxígeno disponible, entre otros. Cada tipo de microorganismo y sustrato tienen una velocidad específica de crecimiento óptima, que es la tasa de crecimiento máxima que pueden alcanzar en las condiciones adecuadas.

Medir la velocidad específica de crecimiento es importante para entender cómo los microorganismos se desarrollan en diferentes condiciones y para optimizar el crecimiento de microorganismos en cultivos industriales y en la producción de biomasa y productos derivados de microorganismos.

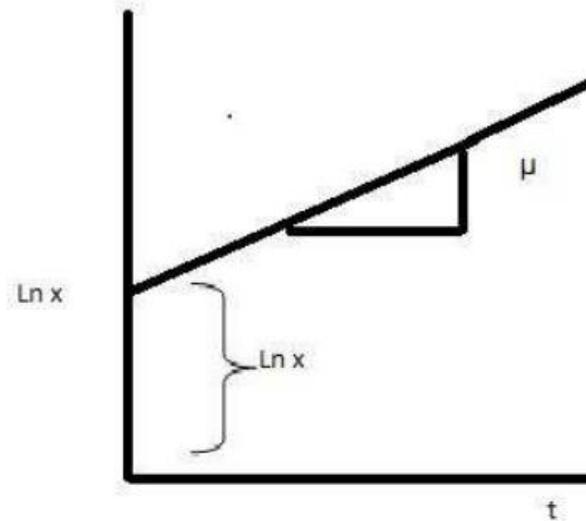


Figura 3.2-3. Obtención de la velocidad específica de crecimiento

3.2.3 Fluido de Trabajo

Para el presente trabajo se utilizó una cepa bacteriana de *A. Vinelandii*, la cual es una bacteria poliploide, es decir, posee varias copias de su cromosoma, además es una bacteria de tipo gran negativa que suele vivir en suelos y agua, por otra parte, son células ovoides de gran tamaño el cual varía entre 1.5 a 2 μm , lo que es de 5 a 10 veces el volumen de *E. Coli* Son bacterias pleomórficas, cuya morfología se observa desde bacilos hasta células en forma de cocos (Punita et al., 1989).

Las capacidades metabólicas y genéticas de *A. Vinelandii* que han sido y continúan siendo estudiadas son las siguientes:

- Fija nitrógeno de manera biológica en condiciones aerobias, ya que posee el complejo enzimático de la nitrogenasa y una alta capacidad respiratoria.
- Sufre procesos de diferenciación morfológica para formar quistes resistentes a la desecación.
- Produce dos polímeros de uso industrial: el polisacárido extracelular alginato y el poliéster intracelular polihidroxibutirato.
- Posee una alta capacidad respiratoria con respecto a otras bacterias.

3.2.3.1 Alginato

El interés particular de este trabajo con respecto a *A. Vinelandii* corresponde a la producción del polisacárido extracelular conocido como alginato. Los alginatos son

utilizados principalmente como aditivos para gelificar, emulsionar, estabilizar o viscosificar soluciones acuosas, también en el recubrimiento y protección de heridas (curitas) y en la inmovilización de células y enzimas por lo cual se utilizan principalmente en industrias como la farmacéutica y la alimenticia.

La principal fuente de donde son extraídos la mayoría de los alginatos utilizados en la industria viene de algas marinas cafés de los géneros *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*, por ello la composición estos alginatos se verá sujeta a las variaciones del medio ambiente y a la edad de los tejidos de donde son extraídos por lo cual la calidad de estos alginatos es también muy variable. Debido a lo anterior es que la producción de alginatos de origen bacteriano con calidad uniforme representa una interesante alternativa, siendo *A. Vinelandii* un buen candidato para la producción de alginato ya que contiene una distribución de los bloques de residuos de M (ácido manurónico) y G (ácido gulurónico) muy similar a la producida por las algas (Gacesa, 1998).

Cuando el alginato se disuelve en una solución, es capaz de aumentar la viscosidad de dicha solución en función de su concentración y peso molecular. Tanto el aumento de la concentración del alginato como el aumento de su peso molecular conducen a un incremento en la viscosidad de la solución. No obstante, se ha observado que el peso molecular tiene un mayor impacto en la viscosidad, ya que el alginato con un peso molecular más alto (2000 kDa) puede generar soluciones más viscosas con menor concentración en comparación con el alginato de menor peso molecular (200 kDa) y mayor concentración (Peña et al., 2011), lo anterior queda ilustrado en la

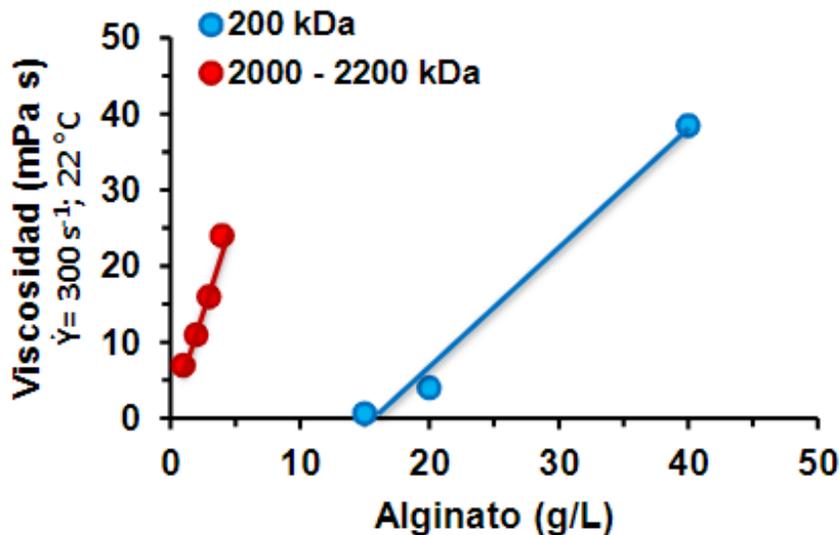


Figura 3.2-4. Efecto de la masa molecular y la concentración del alginato sobre la viscosidad (Peña et al., 2011)

3.2.4 Preparación del medio de cultivo

Se cultivó la cepa de *A. Vinelandii* en un medio de cultivo Burk modificado (Peña et al., 1997) cuya composición en g/L fue la indicada en la Tabla 3.2-1.

Para la preparación del medio se elaboraron tres soluciones: Solución A ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Solución B ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y Solución C (K_2HPO_4 , KH_4PO_4 , MOPS, extracto de levadura, NaCl , CaSO_4 y sacarosa). Las tres soluciones se esterilizaron a 121°C por 35 minutos y posteriormente se mezclaron en condiciones estériles.

Tabla 3.2-1. Composición del medio Burk modificado

Componente	Concentración [g/L]
Sacarosa	20.0
Extracto de Levadura	3.0
K_2HPO_4	0.66
KH_2PO_4	0.16
MOPS	1.42
CaSO_4	0.05
NaCl	0.2

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0029
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.027

Todos los materiales fueron previamente esterilizados en una autoclave a 121 °C durante 35 minutos.

3.2.5 Cultivo de *Azotobacter Vinelandii*

Para el cultivo de *A. Vinelandii* se siguió la siguiente metodología:

1. Se aforaron 100 mL del medio de cultivo Burk modificado.
2. Se inocularon 0.5 ml de la cepa bacteriana *A. Vinelandii* en un matraz Erlenmeyer que contenía los 100 mL del medio de cultivo.
3. La cepa inoculada se incubo durante 24 horas en el matraz Erlenmeyer a las siguientes condiciones: 29 °C y 200 rpm.
4. Se tomaron 10 ml de la cepa inoculada y se agregaron a 290 ml del medio de cultivo previamente preparados y aforados.
5. Se incubo esta nueva solución a 29 °C y 200 rpm por 24 horas.
6. Los 300 ml incubados se tomaron y agregaron a 9.7 litros del medio de cultivo Burk previamente preparado y contenidos dentro del biorreactor previamente esterilizado.

3.2.6 Condiciones de Operación

El cultivo de *A. Vinelandii* se llevó a cabo durante 66 horas.

El pH del medio de cultivo se ajustó a 7.2 con una solución de NaOH 2 N. Se mantuvo la temperatura del medio a 29 °C y la presión dentro del biorreactor fue la atmosférica. Se gaseo al sistema un flujo de aire de $10 \frac{L}{min}$ correspondiente a una tasa de aireación de 1 vvm.

Y se mantuvo una agitación constante al sistema de 300 rpm.

3.3 Determinaciones Experimentales

3.3.1 Concentración de Biomasa

Se determinó la cinética del crecimiento bacteriano a través de la concentración de biomasa producida tras el cultivo de *A. Vinelandii* por el método de peso seco descrito a continuación:

1. Se tomaron muestras de 10 mL del cultivo cada 6 horas y se colocaron en tubos de ensaye.
2. Cada muestra se centrifugo a 1000 rpm durante una hora.
3. Se separo el sobrenadante del precipitado colocando el primero en un nuevo tubo de ensaye.
4. Se disolvió el precipitado con 5 ml de una solución que contenía EDTA 0.1 M con NaCl 1.0 M.
5. Se pasa la disolución por el vortex para homogenizar la solución.
6. Se centrifugó la disolución a 1000 rpm durante una hora.
7. Se separa el nuevo sobrenadante y se coloca en el tubo de ensaye que contenía el primer sobrenadante.
8. El precipitado se disuelve con 10 ml de agua destilada y se pasa por el vortex para homogenizar la disolución.
9. Se vierte la suspensión sobre un recipiente de aluminio y se deja secando a temperatura constante durante 12 horas.
10. Se pesa la suspensión sobre el recipiente de aluminio hasta llegar a peso constante para obtener la concentración de biomasa.

A partir de la gráfica de la concentración de la biomasa obtenida contra el tiempo de cultivo se puede obtener la tasa de crecimiento específico para dicho cultivo, ya que la tasa de crecimiento específica (μ_m) es la pendiente de la línea recta que se obtiene calculado el logaritmo natural de la fase de crecimiento exponencial en función del tiempo de cultivo.

3.3.2 Alginato

La técnica utilizada para la extracción y cuantificación del alginato consistió en la precipitación del polisacárido y su determinación gravimétrica, para lo cual se prosiguió de la siguiente forma:

1. Se tomaron los sobrenadantes a los cuales se les añadieron 45 ml de alcohol isopropílico a baja temperatura (aprox. 10 °C) para mezclarlos vigorosamente, manteniendo la baja temperatura.
2. Se dejó precipitando la solución durante 24 horas.
3. El producto obtenido se filtró al vacío a través de filtros de papel Whatman no. 42, previamente secado durante 24 h a 80 °C en una estufa y posteriormente pesados
4. El papel con el producto filtrado se secó en una estufa a 80°C durante 24 horas.
5. Se pesó el precipitado secado y filtrado hasta llegar a peso constante.

3.3.3 Viscosidad

Para medir la viscosidad del caldo de cultivo además de obtener información sobre las propiedades reológicas de la muestra, se llevaron a cabo determinaciones utilizando un reómetro de esfuerzo controlado, específicamente un Anton Paar Physica Austria MCR101, a una temperatura constante de 25°C. La configuración de cono plato CP-50 se utilizó para medir las propiedades reológicas de la muestra. Los datos obtenidos se analizaron mediante el software Rheoplus 3.5. Para evaluar la variación en el comportamiento reológico de la muestra, se midieron las curvas de flujo utilizando un rango de velocidades de deformación que va desde 0.1 a 500 s⁻¹, siendo que todas las mediciones se realizaron por duplicado.

3.3.4 Consumo de Sacarosa

Para medir la concentración de sacarosa se utilizó el método analítico de hidrólisis ácida-DNS. Este método se basa en la hidrólisis de la sacarosa usando ácido clorhídrico concentrado y la posterior medición de los azúcares reductores libres por la reducción con el ácido dinitrosalicílico (DNS), formando un complejo nitro amino coloreado (amarillo), cuya densidad óptica es proporcional a la concentración de grupos reductores (Miller, 1959).

La metodología utilizada se describe a continuación:

1. Preparación reactivo DNS

La solución de DNS se prepara pesando 1,6 [g] de hidróxido de sodio, 30 [g] de tartrato de sodio y 1 [g] de reactivo DNS de la siguiente manera:

- En un vaso precipitado de 200 [ml] se adicionan 50 [ml] de agua destilada en donde se disuelve el hidróxido de sodio y el tartrato de sodio.

- La solución se calienta con agitación en una manta calefactora y se le agrega lentamente el reactivo DNS, una vez disuelto se pone a temperatura ambiente y se deja enfriar.
- La solución se afora a 100 [ml] y con agua destilada.
- Se almacena el reactivo DNS protegido en una botella ámbar envuelto en papel aluminio a temperatura ambiente.

2. Determinación de la concentración de sacarosa

- Se toma una alícuota de 1 [ml] de sobrenadante de caldo de cultivo.
- Se diluye convenientemente y 1 [ml] de cada dilución se mezcla con 0.1 [ml] de ácido clorhídrico concentrado y se disponen los tubos en un baño a 60 °C por 10 [min].
- Se retiraron los tubos del baño y se les agrega 0,9 [ml] de hidróxido de sodio 1,7 N para neutralizar la reacción.
- De lo anterior se toma 1 [ml] y se le agrega 1 [ml] de DNS, posteriormente se tapan los tubos y se disponen en un baño a ebullición por 5 [min].
- Se retiran los tubos del baño a ebullición y colocan en un baño de hielo en donde se les agrega 10 [ml] de agua destilada a cada tubo.
- Se mide absorbancia de cada tubo a 540 [nm] usando como blanco la solución con sólo agua destilada.
- Los valores obtenidos de absorbancia se extrapolan en la curva de calibrado de sacarosa.

3. Curva de calibrado de sacarosa

- Se preparan 100 [ml] de solución aforada estándar de sacarosa de 1 [g/L] con agua destilada.
- De la solución estándar se prepara una batería de tubos con concentraciones que varían entre 0,1 y 1 [g/L].
- Se toma 1 [ml] de cada dilución anterior y se mezcla con 0,1 [ml] de ácido clorhídrico concentrado y se disponen los tubos en un baño a 60 °C por 10 [min].
- Se realiza un blanco en el cual se reemplaza la solución estándar por agua destilada.

- Se retiran los tubos del baño y se les agrega 0,9 [ml] de hidróxido de sodio 1,7 N para neutralizar la reacción.
- De lo anterior se toma 1 [ml] y se le agrega 1 [ml] de DNS, posteriormente se tapan los tubos y disponen en un baño a ebullición por 5 [min].
- Se retiran los tubos del baño a ebullición y se colocan en un baño de hielo en donde se les agregan 10 [ml] de agua destilada a cada tubo.
- Se mide absorbancia de cada tubo a 540 [nm] usando como blanco la solución con agua destilada.

Se realizó una curva de calibración utilizando sacarosa en concentraciones de 0.1 a 1.0 g/L (Figura 3.3-1)

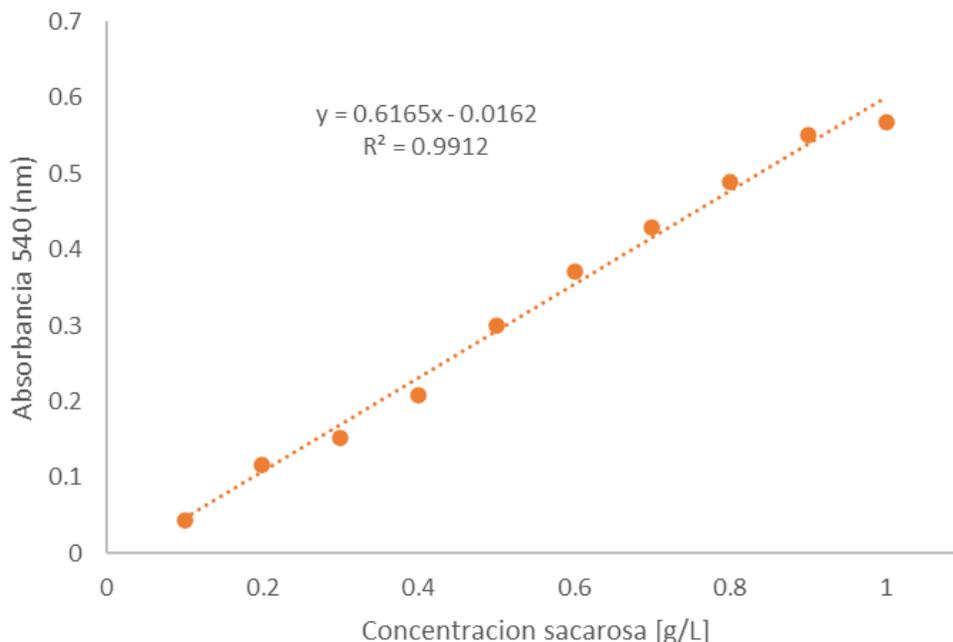


Figura 3.3-1. Curva estándar empleada para la cuantificación de la concentración de sacarosa

El cálculo de la concentración de sacarosa se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Sacarosa} \left(\frac{g}{l} \right) = \left(\frac{\text{Absorbancia} - 0.11045}{.6092} \right) * \text{Dilución} \quad (18)$$

3.3.5 Evaluación del consumo de potencia

La potencia consumida por los impulsores se determinó midiendo el par fuerza de acuerdo a la metodología descrita por Ascanio et al., (2004). Para ello se acopló un sensor de torque rotatorio (Futek TRS300) entre el motor y el eje. Este torquímetro disponía de dos

acoplamientos KTR ROTEX (GS28), que permiten reducir las vibraciones del eje, generando una medición continua del par en función de la velocidad de rotación. Para medir el par efectivo (M_e), inicialmente, el par de fricción residual (M_f) se midió cuando el recipiente estaba vacío. Luego, se midió el torque con el fluido de trabajo (M_d) contenido en el tanque. El torque efectivo se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$M_e = M_d - M_f \quad (19)$$

y la potencia consumida por los impulsores bajo condiciones de gaseado se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$P_g = 2\pi M_e \quad (20)$$

Como se mencionó en el capítulo 2, el sistema de mezcla debe caracterizarse en términos de números adimensionales. En el presente trabajo, las características de potencia se reportan con el número de potencia gaseado (N_{Pg}), es decir:

$$N_p = N_{Pg} \quad (21)$$

Con lo cual la ecuación (6) tomará la siguiente forma:

$$N_{Pg} = \frac{P_g}{n^3 D_i^5 \rho} \quad (22)$$

Dejando el número de potencia gaseado en función del número de flujo Fl_g en condiciones gaseadas de la siguiente manera:

$$Fl_g = \frac{\dot{Q}}{n D_i^3} \quad (23)$$

Donde \dot{Q} es el caudal volumétrico de gas, el cual se midió con un rotámetro.

CAPÍTULO 4:

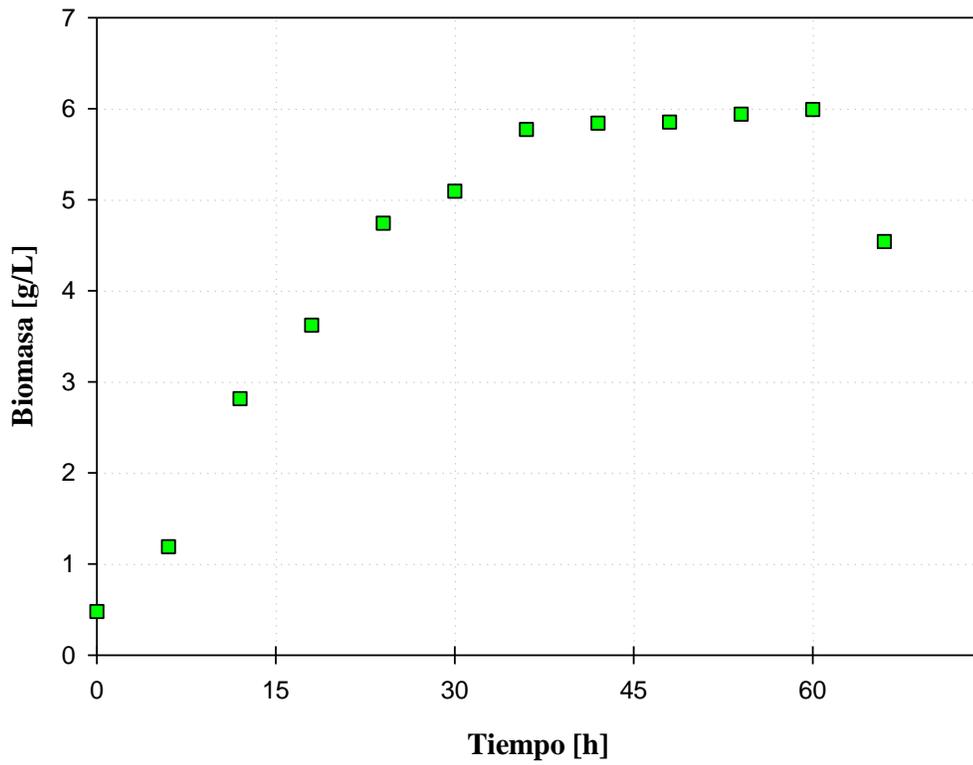
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos una vez realizado los experimentos. La primera parte de los resultados mostrados corresponde a los datos resultantes del cultivo de *A. Vinelandii* como lo son la cantidad de biomasa producida, el alginato obtenido, el consumo de sacarosa a través del tiempo de cultivo y el cambio en la viscosidad del cultivo. Por otro lado, también se presentan los parámetros locales registrados a partir del cultivo, que para este caso corresponden al consumo de potencia y el análisis de transferencia de masa del oxígeno.

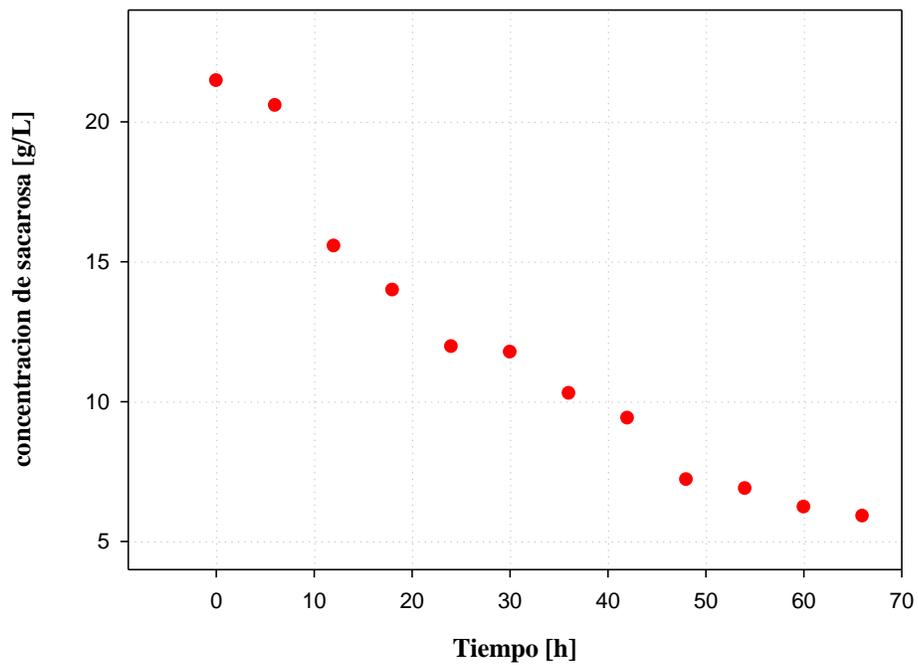
4.1 Cinética de crecimiento y producción de alginato

La producción de biomasa de *A. Vinelandii* en el medio de Burk modificado tras realizar el proceso de fermentación en las condiciones de operación previamente determinadas se muestra en la Figura 4.1-1(A). Bajo estas condiciones la máxima concentración de biomasa obtenida fue de $5.991 \frac{g}{l}$ tras 60 horas de cultivo, posterior a ello se observó una disminución en la concentración de biomasa producida, indicando que se había alcanzado la fase de muerte del crecimiento bacteriano del cultivo de *A. Vinelandii*.

En la Figura 4.1-1 (B) se presenta el consumo de la fuente de carbono, que en este caso corresponde a la sacarosa, para el medio cultivado, partiendo de una concentración de poco más de los 20 g/l, los cuales corresponde a lo estimado para elaborar el medio de cultivo Burk modificado; se puede observar que tras 66 horas de cultivo disminuye hasta 5.9 g/l indicando que se consumió la mayor parte de la sacarosa suministrada al sistema.



A)



B)

Figura 4.1-1. Curvas de la cinética de crecimiento en biomasa (A) y del consumo de fuente de carbono con base en sacarosa (B) del cultivo de *A. Vinelandii*

Comparando los datos en ambas graficas se obtuvo el rendimiento celular $Y_{x/s}$ el cual relaciona el producto obtenido con el sustrato consumido mediante la siguiente ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{\text{Biomasa producida}}{\text{Sustrato consumido}} \quad (24)$$

Obteniéndose un rendimiento $Y_{x/s}$ de 0.261 para el cultivo de *A. Vinelandii*. Esto quiere decir que el 26.1 % del sustrato consumido se utilizó para la producción de biomasa.

Por otro lado, se obtuvo la curva de producción de alginato a lo largo de las 66 horas que duró el cultivo, como aparece en la Figura 4.1-2. Se partió de una concentración inicial de alginato de $4.895 \frac{g}{l}$ llegando a una concentración máxima de $13.842 \frac{g}{l}$ tras 66 horas de cultivo.

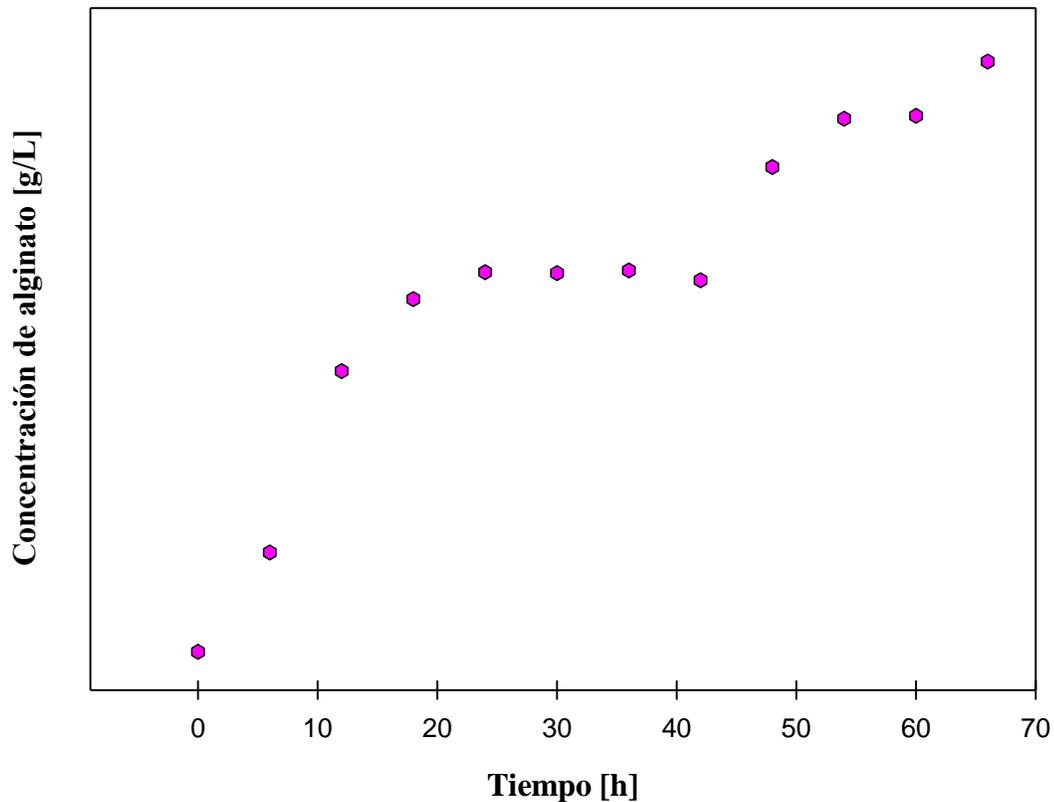


Figura 4.1-2. Cinética de producción de alginato

A partir de los datos obtenidos se obtuvo el rendimiento de producto $Y_{p/s}$ tomando para el cálculo la ecuación (25).

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta s} = \frac{\text{Producto formado}}{\text{Sustrato consumido}} \quad (25)$$

Obteniéndose un rendimiento $Y_{p/s}$ de 0.56, lo que indica que el 56% del sustrato consumido se utilizó para la producción de alginato. A partir de lo anterior se calcularon diversos parámetros cinéticos y estequiométricos referentes al cultivo, comenzando por la velocidad específica de crecimiento o tasa de crecimiento específico μ_m , cuyo valor relaciona la velocidad de crecimiento de la biomasa en función del tiempo y se mide en $[h^{-1}]$ la cual se obtiene a partir de la pendiente de la gráfica del logaritmo natural de la biomasa ($\ln x$) contra el tiempo (t) como se muestra en la Figura 3.2-3.

Para este caso en particular se graficó el logaritmo natural de la biomasa durante la fase de crecimiento exponencial contra el tiempo durante ese periodo, el cual transcurrió desde la primera hora de cultivo hasta las 12 horas aproximadamente, obteniéndose la gráfica mostrada en la Figura 4.1-3 cuya pendiente sirvió para la obtención de μ_m dando un valor de 0.148.

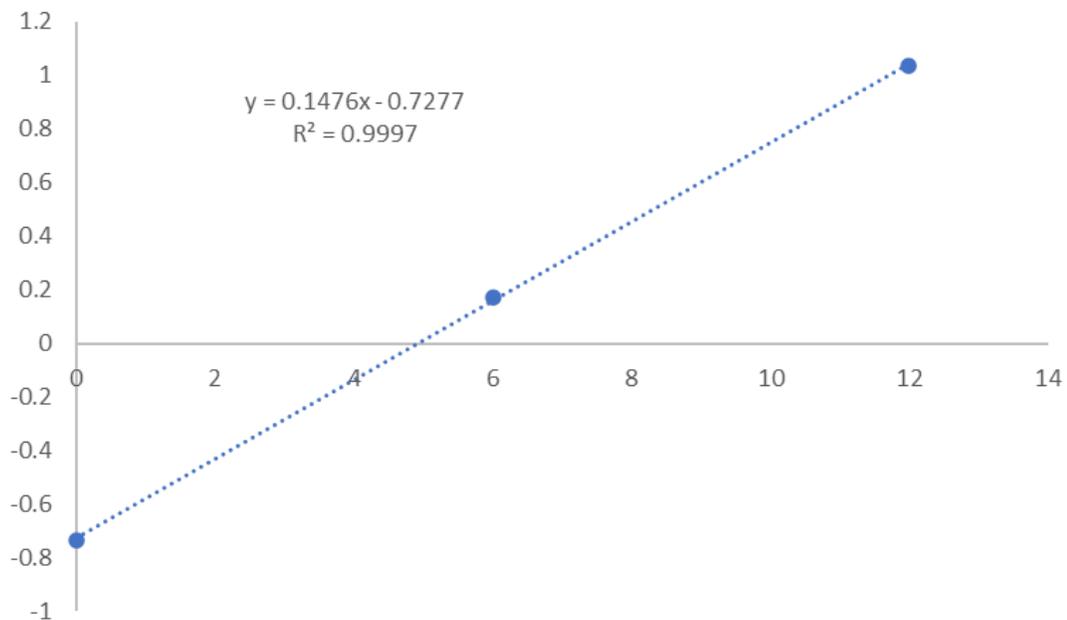


Figura 4.1-3. Curva para la obtención de la velocidad de crecimiento específica del cultivo de *A. Vinelandii*

La Tabla 4.1-1 recopila los parámetros cinéticos y estequiométricos del cultivo de *A. Vinelandii*. Los datos obtenidos se compararon con otros recopilados de la literatura, sin embargo, debido a que no se encontraron otros estudios que utilicen la turbina híbrida como medio de agitación en un cultivo de *A. Vinelandii* se utilizaron datos obtenidos de investigaciones que utilizaron turbinas Rushton debido a que son las más utilizadas.

Tabla 4.1-1. Comparación de los parámetros cinéticos del cultivo de *A. Vinelandii*

Parámetro	Turbina Híbrida	(Díaz-Barrera et al., 2012)	(Clementi et al., 1999)	(Díaz-Barrera et al., 2011)	(Castillo et al., 2013)	(Martínez, et al., 2014)
C. sacarosa (g/l)	20	20	20	20	20	20
rpm	4	300	300	500		400
μ	0.148	0.10	0.149	.08	.08	0.11
$Y_{x/s}$	0.261	0.35	0.3		0.37	0.32
$Y_{p/s}$	0.56	0.10	0.14	0.19	0.12	0.15

Como se puede observar, al analizar los rendimientos de la turbina híbrida con respecto a la turbina Rushton, el rendimiento en biomasa tiene valores similares para cada dato comparado, mientras que el rendimiento de producto tiene un valor superior para la turbina híbrida lo que significa que existió una mayor conversión en producto tras el cultivo, obteniéndose una mayor cantidad de alginato producido con el uso este tipo de impulsor. Mientras que la velocidad específica de crecimiento tuvo un valor aproximado al reportado por otros autores (Clementi et al., 1999; Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014). Lo anterior supone que existió una alta transferencia de masa para el sistema, pues como se mencionó en la parte teórica de este documento, el metabolismo celular es influenciado directamente por la transferencia de oxígeno dando como resultado una mayor producción cuando se trata de un proceso aerobio, como se presentó aquí.

4.2 Efecto de la viscosidad

A partir de las mediciones realizadas al sistema se obtuvo la curva de viscosidad del cultivo con respecto al tiempo de este. Como se puede apreciar en la Figura 4.2-1 la viscosidad del caldo de cultivo aumentó con respecto al tiempo; inicialmente se obtuvo un valor de viscosidad de 1.2 mPa·s, lo cual es muy cercano al valor del agua; posteriormente, se puede apreciar un ligero crecimiento en este valor, claramente influenciado por la presencia de alginato, ya que el aumento gradual de la viscosidad corresponde al incremento en la

presencia de alginato en el caldo, pues el valor más alto de viscosidad se obtuvo tras 66 horas al igual que el valor más elevado en la cantidad de alginato por litro en el sistema. Finalmente se obtuvo una viscosidad de 2.85 mPa·s.

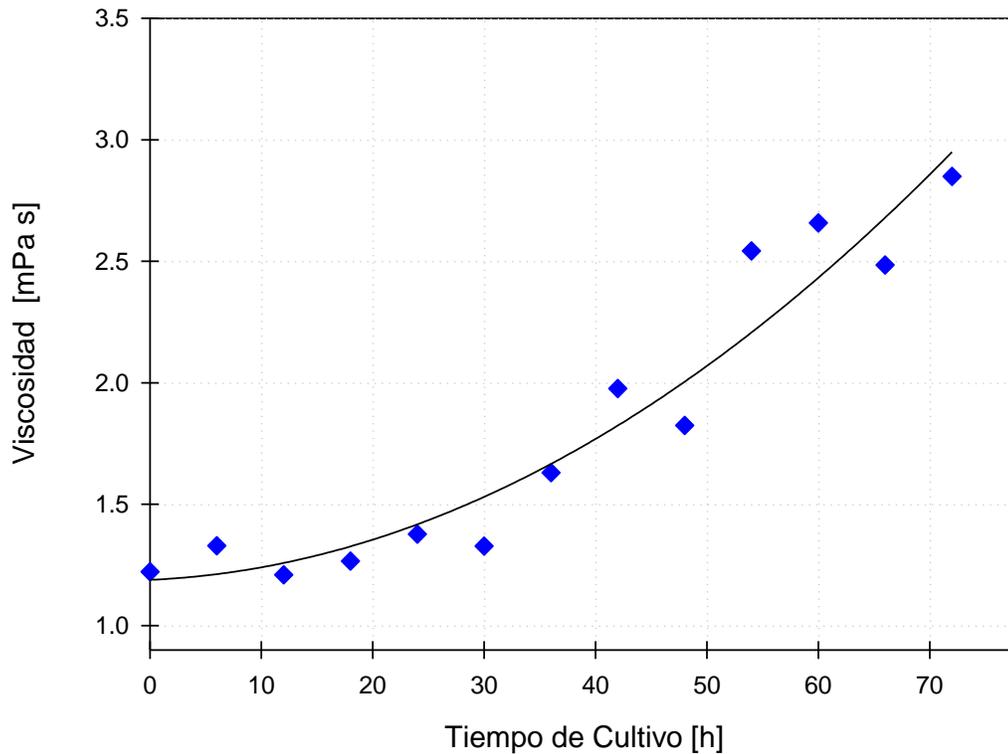


Figura 4.2-1. Curva de evolución de la viscosidad contra el tiempo del cultivo de *A. Vinealndii*

Por otra parte, para caracterizar qué tipo de comportamiento reológico tuvo el sistema se realizó una gráfica de la viscosidad aparente del caldo contra diversos valores de tasa de corte, desde 1 hasta 500 [s^{-1}], aplicados para las diferentes muestras tomadas con respecto al tiempo que duró el cultivo como se muestra en la Figura 4.2-2.

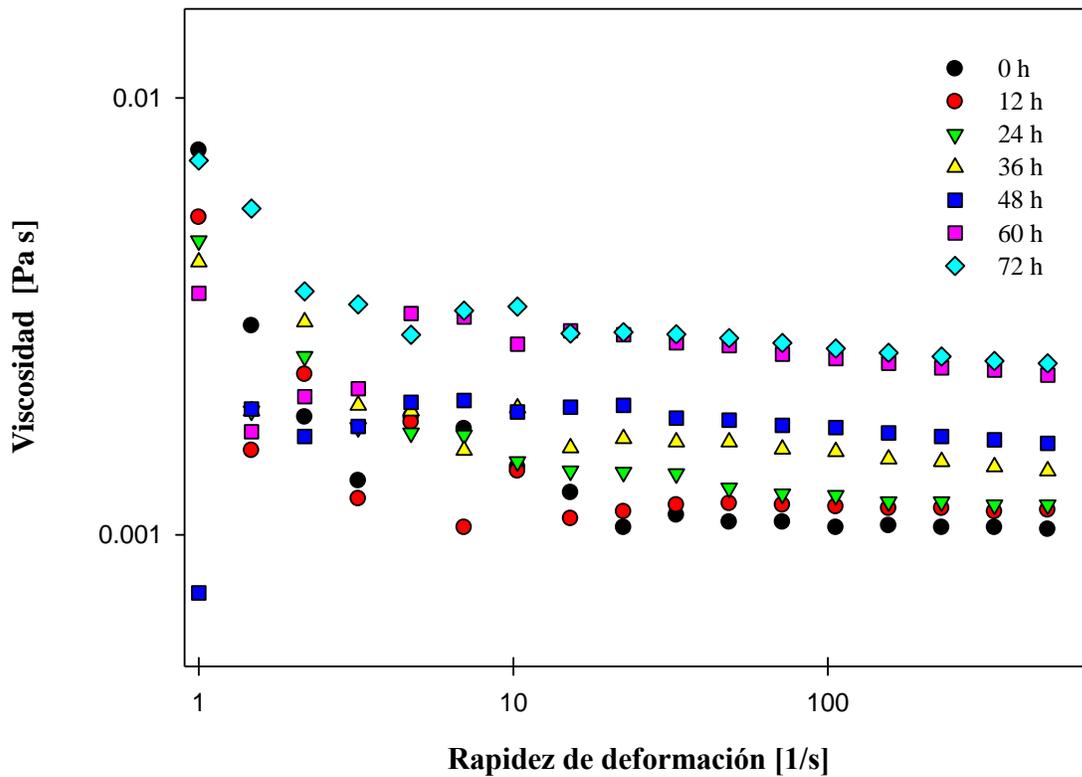


Figura 4.2-2. Curva de viscosidad del cultivo de *A. Vinelandii*

Como se puede observar, la viscosidad mantiene un valor casi constante para todas las velocidades de deformación aplicadas, lo cual se repite para todas las muestras comparadas en las 72 horas de cultivo, por lo cual se puede decir que es un fluido newtoniano. Se sabe que un incremento considerable en la viscosidad puede afectar la transferencia de oxígeno, ya que al aumentar el espesor de la película el gradiente de concentración de conducción de la difusión de oxígeno en la película líquida se eleva; para este caso en particular la viscosidad aumento con el transcurso del tiempo, sin embargo, no se observó que esto tuviera un efecto adverso, caso contrario al utilizar turbinas Rushton. Debido a la geometría de los impulsores híbridos se favoreció el mezclado aún con el aumento de la viscosidad lo cual se vio reflejado en la cantidad de producto obtenido, aunque esto podrá apreciarse mejor con fluidos más viscosos, ya que el aumento de la viscosidad reportada en este trabajo podría considerarse minúsculo.

4.3 Consumo de potencia

Por otro lado, el consumo de potencia por unidad de volumen (P/V) es uno de los parámetros más importantes para determinar las condiciones de cultivo microbiano en agitadores y biorreactores. Se define como la energía total que se introduce en el biorreactor para hacer que las fases en el sistema se mezclen, y se disipa como calor por la fricción del flujo del fluido con el reactor. A partir de la metodología propuesta en el capítulo 3 de este documento, se obtuvo la curva de la potencia volumétrica contra el tiempo de cultivo, como se muestra en la Figura 4.3-1

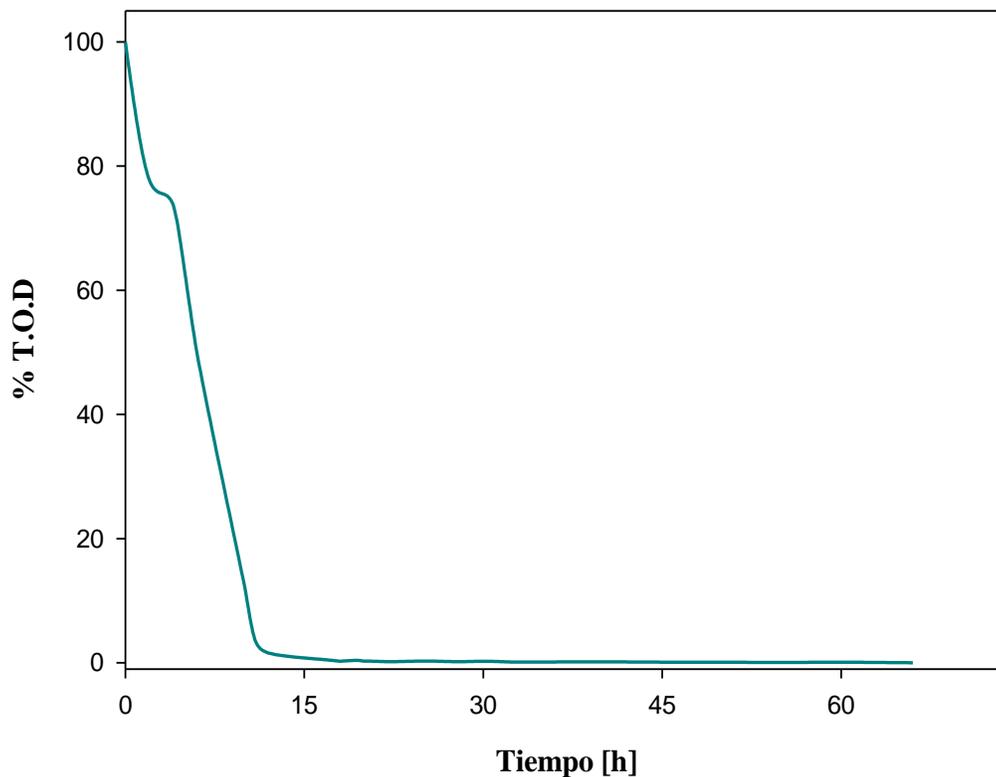


Figura 4.3-1. Consumo de potencia del sistema a lo largo del tiempo de cultivo de *A. Vinelandii*

Como se puede observar, la potencia volumétrica aumento con la cinética del cultivo de *A. Vinelandii*, esto se debe a que, al aumentar la viscosidad del sistema por la producción de alginato, los impulsores requirieron un mayor gasto energético para poder mover el fluido. Analizando el grafico, se puede ver que el aumento en el consumo de potencia esta íntimamente ligado con el aumento de alginato en el caldo, pues al igual que la mayor

producción de alginato se llevó a cabo durante las primeras 30 horas de cultivo, la potencia aumento de manera rápida en este periodo, pues se partió de una potencia inicial de 10.47 W/m³ y a las 30 horas ya se tenía un consumo de 56.6 W/m³. Esto quiere decir que las turbinas híbridas requieren de un alto consumo de potencia para poder mover el caldo con el microorganismo, siendo que este valor aumentará conforme aumente la viscosidad del sistema.

4.4 Capacidad de transferencia de oxígeno

Como se mencionó anteriormente, la capacidad de transferencia de masa se evalúa a partir de la transferencia de oxígeno en el sistema la cual se determina por medio del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno k_{La} . Para la determinación del k_{La} se tomaron los porcentajes de la tensión de oxígeno disuelto (% TOD) en el sistema a lo largo del cultivo (Figura 4.4-1). Se sabe que la concentración de oxígeno disuelto tiene un importante efecto en la síntesis de alginato y en el crecimiento de *A. Vinelandii*. A un bajo porcentaje en la tensión de oxígeno disuelto (%TOD), se favorece la producción del poli-β-hidroxibutirato (P3HB) y a un alto %TOD, *A. vinelandii* usará el sustrato de carbono principalmente para la producción de biomasa (Gómez-Pazarín et al., 2015).

Para *A. Vinelandii*, el nivel crítico de oxígeno, definido como la concentración de oxígeno disuelto en la cual la velocidad específica de crecimiento alcanza el 95% de su tasa máxima de crecimiento, es del 4%. Por tanto, si la tensión de oxígeno disuelto está por debajo de este valor, se denominan condiciones de limitación oxígeno. (Flores et al., 2013). En una condición de limitación de oxígeno, la máxima velocidad de transferencia de oxígeno no satisface el consumo de oxígeno del cultivo (García-Ochoa & Gomez, 2009).

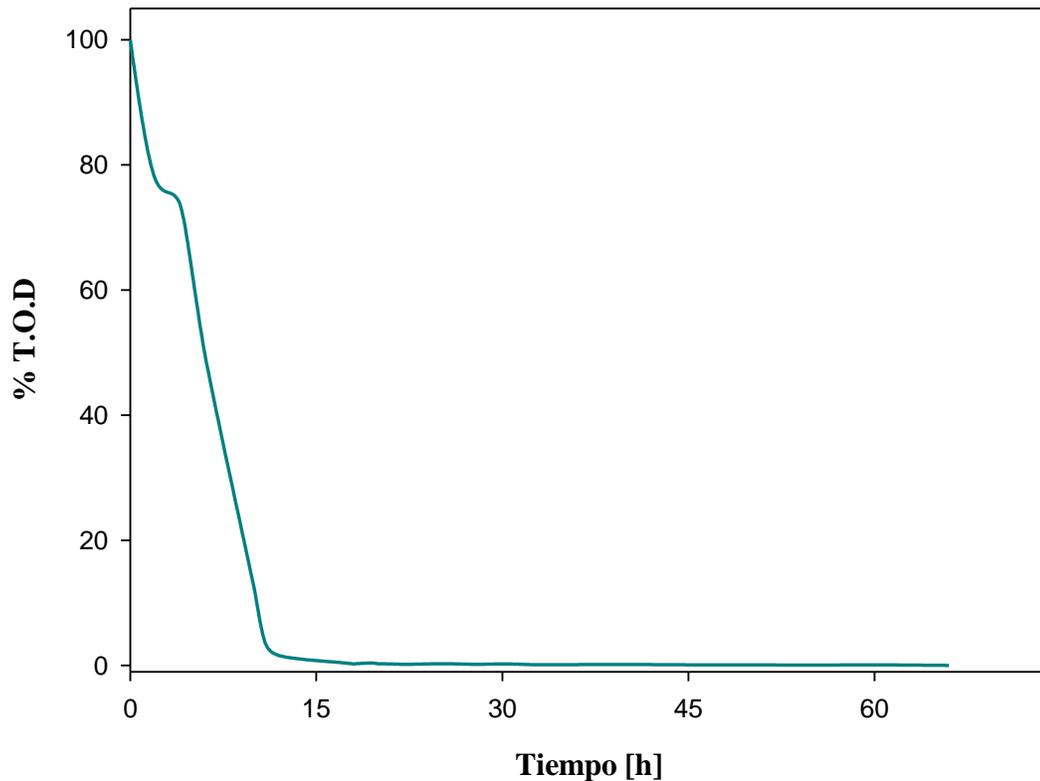


Figura 4.4-1. Curva del porcentaje de tensión de oxígeno disuelto a lo largo del cultivo de *A. Vinelandii*

De acuerdo con lo anterior y observando la Figura 4.4-1 se puede apreciar que a partir de las 12 horas de cultivo el % TOD disminuyó por debajo del 4% lo que significa que una vez transcurrido ese tiempo el cultivo comenzó a desarrollarse bajo condiciones de limitación de oxígeno. A la hora 12 se presentó un % de 1.57 de TOD y desde ese entonces hasta el final del tiempo del cultivo el % de TOD se mantuvo en valores entre 0.6 y 0.2 %.

Se sabe que los cambios en la concentración de oxígeno disuelto en un cultivo dependen de la velocidad de transferencia de oxígeno desde las burbujas de aire hasta el líquido, además de la velocidad de consumo de oxígeno por parte del microorganismo y las necesidades de mantenimiento por parte de este, esto corresponde con que la rápida disminución del % de TOD se llevará a cabo durante la fase de crecimiento exponencial del cultivo siendo uno de los motivos de la rápida caída del % de TOD la alta velocidad de consumo de oxígeno por parte de *A. Vinelandii*. Lo anterior también indica que no existió acumulación de oxígeno en el sistema por lo que a partir de esa etapa la velocidad de

transferencia de oxígeno sería igual a la velocidad de consumo de oxígeno por parte de *A. Vinelandii*.

Otra causa por la cual el % de TOD disminuyó hasta condiciones de limitación fue debido a que no se utilizó ningún tipo de control para la concentración de oxígeno disuelto en el medio. A pesar de que el cultivo se llevó bajo estas condiciones, la producción de alginato no pareció afectada debido a que se obtuvo un alto porcentaje del producto al final del cultivo; sin embargo, pese a obtener una cantidad elevada de alginato puede decirse que la calidad de este no será buena recordando que el alginato con mayor calidad es aquel cuyo peso molecular es más elevado y que este difícilmente se producirá bajo condiciones de limitación de oxígeno (Díaz-Barrera, Gutierrez, et al., 2014).

Un indicativo de que el alginato obtenido no fue de alto peso molecular es la viscosidad, pues como se mencionó anteriormente altas concentraciones de alginato en solución, producen un aumento en la viscosidad; este aumento será aun más significativo si el alginato disuelto tiene un alto peso molecular. Como se observó en la Figura 4.2-1 el incremento en la viscosidad no pareció significativo por lo que el alginato obtenido puede tener un bajo peso molecular. Debido a que la viscosidad no aumento en gran medida, esta no afectó el proceso de transferencia de oxígeno por lo que con el transcurso del tiempo se mantuvo una buena transferencia de oxígeno en el sistema causando que se obtuviera una gran cantidad de alginato al final del cultivo.

En base a que el cultivo se llevó a cabo en condiciones de limitación de oxígeno, se generó la imposibilidad de realizar del método dinámico descrito en la sección tres de este documento, lo que conllevó a que no pudiera obtenerse un valor numérico para el coeficiente de transferencia de masa del oxígeno k_{La} . A pesar de no obtener una cuantificación del k_{La} se puede observar de forma cualitativa que el proceso tuvo una buena transferencia de masa generando la obtención de un porcentaje superior de alginato con respecto al reportado en otras investigaciones que utilizaron turbinas convencionales como medio de agitación para sus sistemas.

Capítulo 5:

5 Conclusiones y Trabajo Futuro

A través de la metodología experimental propuesta en el presente trabajo, se obtuvo el rendimiento de transferencia de oxígeno para turbinas de flujo axial/radial en un medio viscoso proporcionado por el cultivo de *A. Vinelandii* mediante la obtención de los parámetros cinéticos que están íntimamente relacionados con la transferencia de masa en el sistema, tales como el rendimiento en biomasa de la reacción, el rendimiento de producto, el consumo del sustrato de carbono, además de analizar el efecto de la reología del sistema en contra de la transferencia de oxígeno y el consumo energético.

Debido a que el cultivo se llevó a cabo en condiciones de limitación de oxígeno (% de T.O.D menor al 4%) no fue posible obtener de forma cuantitativa el coeficiente de transferencia de oxígeno k_{La} ya que no existió una recuperación del oxígeno disuelto en el sistema imposibilitando el cálculo de la tasa de transferencia de oxígeno. Sin embargo, se obtuvieron los rendimientos para la biomasa y el producto producidos por el cultivo; sabiendo que estos parámetros dependen principalmente de la transferencia de oxígeno, se pudo determinar que el sistema tenía un alto coeficiente de transferencia de oxígeno ya que los rendimientos obtenidos, en especial el del producto, fueron mayores a los presentados en otros estudios.

Lo anterior se vio reflejado en un aumento en la viscosidad en el caldo con respecto al tiempo ya que es conocido que el aumento en la concentración de alginato en un medio líquido aumenta su viscosidad; también se pudo observar un aumento en el consumo de potencia requerido por los impulsores lo cual coincide con el incremento de la viscosidad a

través del tiempo que se llevó a cabo el cultivo puesto que se requería suministrar una mayor cantidad de energía al sistema para poder impulsar el líquido en este debido al aumento en la viscosidad.

Debido a que la transferencia de masa disminuye en sistemas con alta viscosidad el rendimiento del producto y la biomasa se verá consecuentemente afectado como ya se ha estudiado con otras geometrías de impulsores; a pesar de lo anterior, para este sistema en particular, el uso de impulsores con geometría híbrida permitió que la transferencia de oxígeno en el sistema no se viera afectada lo que estuvo reflejado en la obtención de un alto rendimiento en producto.

Para futuras investigaciones se recomienda un análisis más a fondo del producto obteniendo, con el fin de determinar la calidad del alginato producido, ya que esto dependerá del peso molecular que tenga este. Además, se recomienda el uso de un control en la alimentación de oxígeno al sistema para poder superar las condiciones de limitación de oxígeno obtenidas y con ello establecer un sistema de control que permita tomar mediciones a la salida del cultivo del % de oxígeno disuelto y calcular de manera cuantitativa el coeficiente de transferencia de masa de oxígeno.

Bibliografía

- Amer, M., Feng, Y., & Ramsey, J. D. (2019). Using CFD simulations and statistical analysis to correlate oxygen mass transfer coefficient to both geometrical parameters and operating conditions in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnology Progress*, 35(3), 1–15. <https://doi.org/10.1002/btpr.2785>
- Ascanio, G., Castro, B., & Galindo, E. (2004). Measurement of power consumption in stirred vessels—a review. *Chemical Engineering Research and Design*, 82(9 SPEC. ISS.), 1282–1290. <https://doi.org/10.1205/cerd.82.9.1282.44164>
- Ascanio, G., Foucault, S., & Tanguy, P. A. (2003). Performance of a new mixed down pumping impeller. *Chemical Engineering and Technology*, 26(8), 908–911. <https://doi.org/10.1002/ceat.200301652>
- Bernauer, S., Schöpf, M., Eibl, P., Christian Witz, |, Khinast, J., & Hardiman, | Timo. (2021). Characterization of the gas dispersion behavior of multiple impeller stages by flow regime analysis and CFD simulations. *Biotechnol Bioeng*, 118, 3058–3068. <https://doi.org/10.1002/bit.27815>
- Buffo, M. M., Corrêa, L. J., Esperanç, M. N., Cruz, A. J. G., Farinas, C. S., & Badino, A. C. (2016). Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.07.003>
- Buffo, M. M., Corrêa, L. J., Esperança, M. N., Cruz, A. J. G., Farinas, C. S., & Badino, A. C. (2016). Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.07.003>
- Castillo, T., Heinzle, E., Peifer, S., Schneider, K., & Peña M, C. F. (2013). Oxygen supply strongly influences metabolic fluxes, the production of poly(3-hydroxybutyrate) and alginate, and the degree of acetylation of alginate in *Azotobacter vinelandii*. *Process Biochemistry*, 48(7), 995–1003. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.014>
- Clementi, F., Crudele, M. A., Parente, E., Mancini, M., & Moresi, M. (1999). Production and characterisation of alginate from *azotobacter vinelandii*. *Journal of the Science of*

-
- Food and Agriculture*, 79(4), 602–610. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990315\)79:4<602::AID-JSFA224>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990315)79:4<602::AID-JSFA224>3.0.CO;2-N)
- Clementi, F., Fantozzi, P., Mancini, F., & Moresi, M. (1995). Optimal conditions for alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(11), 983–988. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(95\)00007-0](https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00007-0)
- Díaz-Barrera, A., Aguirre, A., Berrios, J., & Acevedo, F. (2011). Continuous cultures for alginate production by *Azotobacter vinelandii* growing at different oxygen uptake rates. *Process Biochemistry*, 46(9), 1879–1883. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.022>
- Díaz-Barrera, A., Gutierrez, J., Martínez, F., & Altamirano, C. (2014). Production of alginate by *Azotobacter vinelandii* grown at two bioreactor scales under oxygen-limited conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(6), 1133–1140. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1084-2>
- Díaz-Barrera, A., Martínez, F., Pezoa, F. G., & Acevedo, F. (2014). Evaluation of gene expression and alginate production in response to oxygen transfer in continuous culture of *Azotobacter vinelandii*. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105993>
- Díaz-Barrera, A., Soto, E., & Altamirano, C. (2012). Alginate production and alg8 gene expression by *Azotobacter vinelandii* in continuous cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 613–621. <https://doi.org/10.1007/s10295-011-1055-z>
- Flores, C., Moreno, S., Espín, G., Peña, C., Peña, P., & Galindo, E. (2013). Expression of alginases and alginate polymerase genes in response to oxygen, and their relationship with the alginate molecular weight in *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme and Microbial Technology*, 53, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.04.010>
- Fujasová, M., Linek, V., & Moucha, T. (2007). Mass transfer correlations for multiple-impeller gas-liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phases on “local” kL a values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. *Chemical Engineering Science*, 62(6), 1650–1669. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2006.12.003>
- Gacesa, P. (1998). Alginate biosynthesis-recent and future prospects. *J Microbiology*, 144,
-

- 1133–1143.
- García-Cortés, D., & Jáuregui-Haza, U. (2006). Hydrodynamics in stirred vessels with flat-bladed disk-style turbine. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 38, 97–113.
- García-Ochoa, F., & Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. In *Biotechnology Advances* (Vol. 27, Issue 2, pp. 153–176). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- García-Ochoa, F., & Gómez, E. (1998). Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. *Biochemical Engineering Journal*, 1(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(97\)00002-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(97)00002-8)
- Gogate, P. R., Beenackers, A. A. C. M., & Pandit, A. B. (2000). Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. *Biochemical Engineering Journal*, 6, 109–144.
- Gómez-Pazarín, K., Flores, C., Castillo, T., Büchs, J., Galindo, E., & Peña, C. (2015). *Molecular weight and viscosifying power of alginates produced in Azotobacter vinelandii cultures in shake flasks under low power input*. <https://doi.org/10.1002/jctb.4747>
- Harnby, N., Edwards, M. ., & Nienow, A. . (1997). Mixing in the Process Industries. In *BH* (Vol. 2).
- Kracík, T., Moucha, T., & Petříček, R. (2019). Power Input Prediction in Agitated Gas-Liquid Contactors with Non-coalescent Batch. *Chemical Engineering and Technology*, 42(12), 2673–2680. <https://doi.org/10.1002/ceat.201900165>
- Kulkarni, A. V, Roy, S. S., & Joshi, J. B. (2007). Pressure and flow distribution in pipe and ring spargers: Experimental measurements and CFD simulation. *Chemical Engineering Journal*, 133, 173–186. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.03.011>
- Maluta, F., Paglianti, A., & Montante, G. (2021). Two-fluids RANS predictions of gas cavities, power consumption, mixing time and oxygen transfer rate in an aerated fermenter scale-down stirred with multiple impellers. *Biochemical Engineering Journal*, 166, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107867>
- McCabe, W. L., Smith, J. C., & Harriot, P. (2007). Operaciones Unitarias en Ingeniería Química .pdf. In *Operaciones Unitarias en Ingeniería Química* (pp. 259–310).

McGraw-Hill.

- Moilanen, P., Laakkonen, M., Visuri, O., Alopaeus, V., & Aittamaa, J. (2008). Modelling mass transfer in an aerated 0.2 m³ vessel agitated by Rushton, Phasejet and Combijet impellers. *Chemical Engineering Journal*, *142*(1), 95–108.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.01.033>
- Moucha, T., Linek, V., & Prokopová, E. (2003). Gas hold-up, mixing time and gas-liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade and techmix impeller and their combinations. *Chemical Engineering Science*, *58*(9), 1839–1846. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(02\)00682-6](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(02)00682-6)
- Pakzad, L., Ein-Mozaffari, F., Upreti, S. R., & Lohi, A. (2013a). A novel and energy-efficient coaxial mixer for agitation of non-Newtonian fluids possessing yield stress. *Chemical Engineering Science*, *101*, 642–654.
<https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.07.027>
- Pakzad, L., Ein-Mozaffari, F., Upreti, S. R., & Lohi, A. (2013b). Evaluation of the mixing of non-Newtonian biopolymer solutions in the reactors equipped with the coaxial mixers through tomography and CFD. *Chemical Engineering Journal*, *215–216*, 279–296. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.10.060>
- Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A., & Kresta, S. M. (2003). *Handbook of industrial mixing: science and practice*. John Wiley & Sons.
- Peña, C., Campos, N., & Galindo, E. (1997). Changes in alginate molecular mass distributions, broth viscosity and morphology of *Azotobacter vinelandii* cultured in shake flasks. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *48*(4), 510–515.
<https://doi.org/10.1007/s002530051088>
- Peña, C., Galindo, E., & Büchs, J. (2011). The viscosifying power, degree of acetylation and molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii* in shake flasks are determined by the oxygen transfer rate. *Process Biochemistry*, *46*(1), 290–297.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.08.025>
- Petříček, R., Moucha, T., František Rejl, J., Valenz, L., Haidl, J., & Melíková, T. C. (2018). *Gas-liquid-solid volumetric mass transfer coefficient and impeller power consumptions for industrial vessel design*.

<https://doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2018.01.041>

Ponce, B., Urtuvia, V., Maturana, N., Peña, C., & Díaz-Barrera, A. (2021). Increases in alginate production and transcription levels of alginate lyase (alyA1) by control of the oxygen transfer rate in *Azotobacter vinelandii* cultures under diazotrophic conditions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 52, 35–44.

<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.04.007>

Posadas Navarro, D., Palacios, C., Blancas-Cabrera, A., Trujillo-Roldán, M. A., Salinas-Vázquez, M., & Ascanio, G. (2022). Flow Patterns of Multiple Axial-Radial Impellers for Potential Use in Aerated Stirred Tanks. *Chemical Engineering and Technology*, 45(5), 860–867. <https://doi.org/10.1002/ceat.202100521>

Punita, Jafri, S., Reddy, M. A., & Das, H. K. (1989). Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 171(6), 3133–3138.

<https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3133-3138.1989>

Whitman, W. G. (1923). THE TWO-FILM THEORY OF GAS ABSORPTION* It Seems to Explain Satisfactorily the Well-Recognized Differences of Absorption Rate for Varying Concentrations. In *J. Heat Mass Transfer* (Vol. 5, Issue 4).

Xie, M. hui, Xia, J. ye, Zhou, Z., Zhou, G. zhong, Chu, J., Zhuang, Y. ping, Zhang, S. liang, & Noorman, H. (2014). Power consumption, local and average volumetric mass transfer coefficient in multiple-impeller stirred bioreactors for xanthan gum solutions. *Chemical Engineering Science*, 106, 144–156.

<https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.10.032>