



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN FLUIDOS MODELO Y  
CALDOS DE FERMENTACIÓN**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. ROSA ISELA CARBAJAL DE NOVA



TUTOR: DR. ALBERTO TECANTE CORONEL AÑO: 2007



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

A mi tutor el Dr. Alberto Tecante Coronel por su paciencia y dedicación, sin los cuáles no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado.

A DGAPA-UNAM por el financiamiento al proyecto.

Al Dr. Guillermo Aguilar Osorio y Blanca Trejo por haberme aceptado en su laboratorio y su casa.

A mi Comité Académico por las observaciones y correcciones hechas a este trabajo.

A los sinodales revisores de esta tesis por el tiempo que dedicaron a mejorar este trabajo.

A Rocío, Claudia, Alejandra, Itzel y Teo, los estudiantes de licenciatura que ayudaron a la realización del trabajo experimental, su ayuda fue invaluable.

Al M. en C. Carlos Orozco Álvarez y al M. en C. Leobardo Ordaz por todo el tiempo que se quedaron enseñando a armar y operar el reactor, sin su experiencia no hubiéramos podido usar el equipo correctamente .

A mis compañeros, Dr. Edgar Salgado, Dr. Juan Aranda e Ing. Esperanza Nateras por permitirme el acceso a laboratorios y equipos necesarios.

A las autoridades de UPIBI-IPN, mi centro de adscripción por las facilidades y permisos que fueron necesarios para terminar, especialmente al Dr. Gustavo Valencia y al Dr. Enrique Durán.

Al Posgrado en Ciencias Químicas y Control Escolar de la Facultad de Química que siempre estuvieron sacándome de problemas con mis documentos.

A los compañeros del Laboratorio 313 que han continuado con los estudios de transferencia de oxígeno.

A mis compañeros de trabajo, que siempre estuvieron al pendiente del avance, y que siempre me animaron para que continuara.

A todos aquellos de de alguna forma colaboraron para la realización de esta tesis.

A mi familia, mamá me cambiaste todo el tiempo para hacer el doctorado.  
A mis amigos, compañeros de mil aventuras, y que no necesitan ni nombrarse.

Este trabajo se llevo a cabo en el Laboratorio 313 del Conjunto E de la Facultad de Química.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Tema	Nombre del Tema	Página
	<b>RESUMEN</b>	
	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>I</b>	<b>TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN MEDIO LÍQUIDO</b>	4
I.1	Importancia de la disolución de oxígeno en un proceso de fermentación sumergida aerobia para producción de exopolisacáridos	4
I.2	Proceso de absorción y equilibrio entre fases	5
I.3	Transporte de un soluto a través de una interfase. Coeficientes de transferencia de masa	6
I.4	Proceso de disolución de oxígeno gaseoso en un líquido	8
I.4.1	Velocidad de transferencia de oxígeno en fermentaciones	11
I.5	Métodos experimentales para el cálculo de $k_L a$	12
I.6	Detección de oxígeno disuelto con sensores sumergidos	14
I.7	Método dinámico por variación de presión (MDVP) para la determinación de $k_L a$	15
1.7.1	Consideraciones teóricas para la aplicación del método dinámico por variación de presión (MDVP)	16
1.7.2	Descripción del método dinámico por variación de presión (MDVP)	16
<b>II</b>	<b>TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN CALDOS DE FERMENTACIÓN</b>	19
II.1	Ecuación de balance de oxígeno disuelto en caldos de fermentación	19
II.2	Efecto de las condiciones de mezclado	19
II.3	Obtención de la velocidad de disolución de oxígeno durante la fermentación	20
II.3.1	Estimación del $k_L a$ en caldos de fermentación	20
II.3.2	$k_L a$ en medios newtonianos	20
II.3.3	$k_L a$ en medios no newtonianos	22

<b>Tema</b>	<b>Nombre del Tema</b>	<b>Página</b>
II.3.4	Aplicabilidad de las correlaciones para el cálculo de $k_L a$	24
II.4	Estrategias para estudiar el efecto del oxígeno en fermentaciones para producción de polisacáridos	27
II.4.1	Fermentaciones con %TOD controlada	27
II.4.2	Sistemas modelo (soluciones de polisacárido con o sin células artificiales)	27
II.4.3	Estudios sobre transferencia de oxígeno en fermentaciones para producción de polisacáridos	28
II.5	Estrés en fermentaciones	31
II.5.1	Efecto del estrés subletal en el consumo de oxígeno	31
<b>III</b>	<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	34
III.1	Justificación	34
III.2	Estrategia de estudio	34
III.3	Hipótesis	35
III.4	Objetivos	35
<b>IV</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	36
IV.1	Biorreactor	36
IV.2	Mediciones de presión	36
IV.3	Cálculo de la concentración de oxígeno disuelto	37
IV.4	Determinaciones de potencia aplicada	37
IV.5	Mediciones reológicas	37
IV.6	Determinación de $k_L a$	37
IV.7	Selección de fluidos modelo	40
IV.8	Medios de cultivo para fermentaciones	42
IV.9	Microorganismos utilizados	42
IV.10	Conservación de las cepas	42
IV.11	Técnicas analíticas	43
IV.11.1	Determinación de biomasa por peso seco	43

<b>Tema</b>	<b>Nombre del Tema</b>	<b>Página</b>
IV.11.2	Determinación de la concentración de sustrato residual	44
IV.11.3	Determinación de la concentración de exopolisacárido	44
IV.11.4	Cálculo de parámetros cinéticos	44
IV.12	Tinción para seguimiento de la pureza del cultivo	46
IV.13	Preparación del inóculo	46
IV.14	Condiciones de operación	46
IV.15	Fermentaciones	47
IV.16	Estabilización del medio de cultivo	48
IV.17	Desaireación de los caldos de cultivo	48
<b>V</b>	<b>PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	49
V.1	Cálculo del $k_{1,a}$ por MDVP	49
V.2	Determinación de $k_{1,a}$ en fluidos modelo	53
V.2.1	Comparación del método dinámico por variación de presión (MDVP) con el método dinámico por intercambio de gases (MDIG)	53
V.2.1.1	Análisis de sensibilidad entre MDVP y MDIG, mediante el método de las diferencias absolutas	56
V.2.2	Efecto de la viscosidad	60
V.2.3	Efecto de la espuma	64
V.2.4	Efecto de las condiciones hidrodinámicas	64
V.2.5	Efecto de los índices de consistencia (K) y comportamiento al flujo (n)	66
V.2.6	Efecto de la composición del medio de cultivo	68
V.2.7	Efecto de la presencia de células vivas	69
V.2.7.1	Retención de gas en caldos de fermentación	72
V.2.7.2	Efecto de la determinación de $k_{1,a}$ en la velocidad de consumo de oxígeno	72
V.3	Determinación de $k_{1,a}$ en caldos de fermentación	72
V.3.1	Condición de limitación de oxígeno y estrés	73
V.3.1.1	Limitación en la cantidad de oxígeno disuelto	74
V.3.2	Estrés por ondas de choque	75

<b>Tema</b>	<b>Nombre del Tema</b>	<b>Página</b>
V.3.3	Oxígeno disuelto durante las fermentaciones	76
V.3.4	Comportamiento cinético	78
V.3.5	Determinaciones de $k_L a$ en caldos de fermentación	81
V.3.6	$k_L a$ en la fase lag (fase de adaptación del microorganismo)	84
V.3.7	$k_L a$ en la fase exponencial (fase de crecimiento)	85
V.3.8	$k_L a$ en la fase estacionaria	90
V.4	Efecto de la fase gaseosa en fluidos modelo y caldos de fermentación	91
V.5	Retroalimentación de la velocidad de transferencia de oxígeno en caldos de fermentación	92
	<b>CONCLUSIONES</b>	95
	<b>RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS</b>	97
	<b>REFERENCIAS</b>	98
	<b>ANEXOS</b>	105
A1	<b>VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA SEMIPURIFICACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS BACTERIANOS, A PARTIR DE CALDOS DE FERMENTACIÓN (TÉCNICA PFP)</b>	106
A2	<b>VARIANTES PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE FLUIDOS MODELO</b>	110
A3	<b>DATOS CINÉTICOS Y GRÁFICAS DE OXÍGENO DISUELTO DE LAS FERMENTACIONES REALIZADAS</b>	112
3.1	Fermentaciones consideradas	112
3.2	Datos cinéticos y de consumo de oxígeno	113
A4	<b>DESARROLLO DE LAS ECUACIONES DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO</b>	123
4.1	Introducción	123
4.2	Fase lag	124
4.3	Consumo de oxígeno disuelto tipo movimiento oscilatorio	126
4.4	Análisis de unidades	128
4.5	Cálculo de las constantes	129
4.5.1	Secuencia de cálculos	131



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre de la Tabla	Página
4.1	Viscosidad de los fluidos newtonianos a 30 °C	41
4.2	Parámetros reológicos (de acuerdo con el modelo de la potencia) de los fluidos no newtonianos a 30 °C	41
4.3	Composición de los medios de cultivo	42
4.4	Técnicas de análisis para muestras de caldos de fermentación	43
4.9	Condiciones de operación de las fermentaciones realizadas	47
5.1	Datos experimentales de la respuesta transitoria de los sensores de oxígeno y presión. Cálculo del MDVP	50
5.2	Valores normalizados. Cálculo del MDVP	51
5.3	Comparación entre los valores de $k_L a$ obtenidos por el MDVP y el MDIG	55
5.4	Diferencias absolutas entre $k_L a$ por MDVP y MDIG	57
5.5	Condiciones de agitación y viscosidad de las diferencias	57
5.6	Constantes de la ecuación de decremento del $k_L a$ con respecto a la viscosidad	59
5.7	Intervalo de viscosidad donde se detectan cambios en el valor de $k_L a$	59
5.8	Factor MDVP/MDIG con respecto a la viscosidad	60
5.9	Incremento del tiempo para alcanzar el estado estable de la señal del sensor de oxígeno, con el incremento de la viscosidad (N = 200 rpm)	60
5.10	Variación de $k_L a$ con el incremento de la viscosidad	63
5.11	Incremento de L con el incremento de la viscosidad	63
5.12	Comparación entre $b_H$ y área entre las curvas en la determinación de $k_L a$ por MDVP. Soluciones de glicerol, 100 rpm	65
5.13	Valores de L en fluidos no newtonianos	66
5.14	Valores de $k_L a$ en fluidos no newtonianos	67
5.15	Comparación entre los valores de L y $k_L a$ de agua y fluidos no newtonianos de bajo K y alto n (similares a fluidos newtonianos)	67

Tabla	Nombre de la Tabla	Página
5.16	Concentraciones de equilibrio para oxígeno en medios de cultivo para producción de polisacáridos	68
5.17	$k_L a$ en medios de cultivo	69
5.18	Parámetros reológicos en el caldo de fermentación para <i>S. paucimobilis</i> , fermentador semilla	73
5.19	Velocidad de acumulación de oxígeno disuelto ( $dC_L/dt$ ) en fermentación <i>Xanthomonas campestris</i> , $Fa = 12$ L/min	74
5.20	$k_L a$ para la fermentación con <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 30°C, 200 rpm, medio cazu, 1 vvm aireación, tanques piloto y control (laboratorio)	75
5.21	a) Velocidades cinéticas, b) Velocidades específicas	80
5.22	Velocidades específicas de consumo de oxígeno durante la fase lag	84
5.23	Velocidad de transferencia de oxígeno y velocidad específica de consumo de oxígeno en caldo de fermentación. Fermentación control (F10)	85
5.24	Valores de $K_{retro}$ para el cálculo del parámetro $a_1$	87
5.25	Efecto de $a_2$	88
A2.1	Valores de $K$ y $n$ encontrados durante la producción de gelana, usando cepas sobreproductoras	110
A2.2	Cambio de $K$ y $n$ con respecto al tiempo durante la producción de xantana utilizando variantes sobreproductoras	111
A.2.3	Valores de $K$ y $n$ encontrados durante la producción de gelana	111
A3.1	Condiciones de operación de las fermentaciones realizadas	112
A3.2	Parámetros cinéticos de las fermentaciones analizadas	112
A3.3	Velocidades específicas de las fermentaciones analizadas	113
A3.4	Datos cinéticos de F1 ( <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , $N = 100$ rpm, $Fa = 12$ L/min)	113
A3.5	Datos cinéticos de F2 ( <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , $N = 200$ rpm, $Fa = 12$ L/min)	114
A3.6	Datos cinéticos de F4 ( <i>Xanthomonas campestris</i> , $N = 200$ rpm, $Fa = 12$ L/min)	115

<b>Tabla</b>	<b>Nombre de la Tabla</b>	<b>Página</b>
A3.7	Datos cinéticos de F6 ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , N = 200 rpm, Fa = 12 L/min)	117
A3.8	Datos cinéticos de F7 ( <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , N = 100 rpm, 2.4 L/min)	118
A3.9	Datos cinéticos de F9 ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , N = 200, Fa = 2.4 L/min)	120
A3.10	Datos cinéticos F10, fermentación control ( <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , fermentador laboratorio, N = 200 rpm, 3.5 L/min)	121
A4.1	Datos de producción de xantana	130
A4.2	Oxígeno disuelto en fase lag	131
A4.3	Logaritmos de la velocidad de transferencia de oxígeno	132
A4.4	Datos de biomasa en la producción de xantana	132
A4.5	Calculo del consumo microbiano de oxígeno durante la producción de xantana	133
A4.6	Derivada del consumo microbiano de oxígeno	135
A4.7	Parámetros para el cálculo de la ecuación con retroalimentación para balance de oxígeno disuelto	136

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre de la Figura	Página
1.1	Dispersión de un gas en un tanque agitado mecánicamente	4
1.2	Esquema del paso de soluto en doble película	6
1.3	Dirección del soluto en la película	7
1.4	Transporte de oxígeno en un caldo de fermentación	11
2.1	Relación $k_L a$ experimental vs. $k_L a$ pronosticado empleando la ecuación de Fukada (Eq. 2.6), en fermentaciones newtonianas	25
2.2	Relación $k_L a$ experimental vs. $k_L a$ pronosticado usando la ecuación de Ryu y Humprey (Eq. 2.9), en fermentaciones no newtonianas	26
2.3	Cambio de una concentración de oxígeno disuelto constante a un sistema oscilante de consumo de oxígeno por estrés subletal	32
2.4	Consumo de oxígeno en fermentaciones para producción de polisacáridos, bajo condiciones de estrés	33
4.1	Biorreactor empleado	36
4.2	Diagrama para la determinación de $k_L a$ por MDVP	40
4.3	Tratamiento de las muestras de caldo para cuantificación de biomasa, sustrato residual y polisacárido	45
4.4	Tinción para identificación de polisacárido (técnica ST-PF)	46
4.5	Diagrama de realización de fermentaciones	47
5.1	Valores normalizados para la determinación del $k_L a$ por MDVP	51
5.2	Determinación de $k_L a$ por el método dinámico de intercambio de gases. Glucosa 76%, viscosidad 222 mPa*s	53
5.3	Tensión de oxígeno disuelto durante la determinación de $k_L a$ por el método dinámico de intercambio de gases. Jarabe de glucosa al 76% (GL2), 200 rpm	54
5.4	Correlación entre los valores de $k_L a$ obtenidos por MDVP y MDIG	55
5.5	Comportamiento del $k_L a$ al incrementarse la viscosidad	56

<b>Figura</b>	<b>Nombre de la Figura</b>	<b>Página</b>
5.6	Linealidad de la determinación de $k_La$ (método de las diferencias absolutas de Andrews)	58
5.7	Respuestas de los sensores durante la determinación de $k_La$ por MDVP. Agua, 100 rpm	61
5.8	Comportamiento del $k_La$ al incrementarse la viscosidad en fluidos newtonianos	61
5.9	Efecto de la viscosidad sobre el consumo de potencia en fluidos newtonianos	62
5.10	Inestabilidad de la señal de los sensores durante la determinación de $k_La$ por MDVP, en presencia de espuma, GS80, viscosidad 342 mPa*s, N = 200 rpm	64
5.11	Comparación del tiempo para alcanzar el estado estable entre agua (0.85 mPa*s) y solución de glicerol (GL81), 76 mPa*s	65
5.12	Tiempos para alcanzar el estado estable en medio de cultivo Silman-Bagley, 100 rpm.	69
5.13	Consumo de oxígeno en fermentaciones para prueba del MDVP	70
5.14	Comportamiento de los sensores en caldos de fermentación con microorganismo con alta velocidad de consumo de oxígeno, <i>S. paucimobilis</i> , medio S, 12 l	71
5.15	Evolución del $k_La$ determinado por MDVP, fermentación de caracterización, producción de xantana.	71
5.16	Fermentación control, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , 30 °C, medio cazu , 200 rpm, 3.5 L aire/min (1vvm)	74
5.17	Fermentación sin cambio en la concentración de oxígeno disuelto durante la fase lag del microorganismo. <i>S. paucimobilis</i> , 30 °C, 200 rpm, listón helicoidal, medio S, aireación 12 L/m (1 vvm)	77
5.18	Consumo de oxígeno, <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , 30 °C, medio S, 200 rpm, $Fa = 12$ L/min (1 vvm)	77
5.19	Variación del oxígeno disuelto en una fermentación sin determinación del $k_La$ , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , 30 °C, medio S, 100 rpm, $Fa = 12$ L/min, tanque piloto	78

<b>Figura</b>	<b>Nombre de la Figura</b>	<b>Página</b>
5.20	Datos cinéticos, <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , 30 °C, medio S, 200 rpm, Fa = 12 L/min.	78
5.21	Datos cinéticos, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , 30 °C, medio cazu , 200 rpm, 1 vvm aireación	79
5.22	Viscosidad a diferentes flujos de aire, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , 30 °C, medio cazu , 200 rpm	79
5.23	Variación del $k_L a$ obtenido en las fermentaciones, en reactor de 12 L con un flujo de aire de 12 L/min (1 vvm), a) N = 100 rpm, b) N = 200 rpm	82
5.24	Variación del $k_L a$ a) en las fermentaciones, reactor de 12 L, con un flujo de aire de 2.4 L/min (0.2 vvm), N = 200 rpm, b) en la fermentación control, reactor de 3.5 L, flujo de aire 3.5 L/min (1vvm), N = 200 rpm	83
5.25	$k_L a$ calculado por la ecuación retroalimentada vs $k_L a$ experimental	86
5.26	Error durante la estimación del parámetro $a_3$	89
5.27	Parámetro $a_3$ en función de la biomasa	90
A1.1	Material proteínico contaminante en exopolisacáridos bacterianos	106
A1.2	Diagrama de semi-purificación del polisacárido	107
A1.3	Concentración de azúcares totales y fracción proteínica hidrolizable durante la extracción etanólica de células	108
A1.4	Eficiencia de extracción de la fracción proteínica hidrolizable	109
A3.1	Oxígeno disuelto en F1	114
A3.2	Oxígeno disuelto en F2	115
A3.3	Oxígeno disuelto en F3	115
A3.4	Oxígeno disuelto en F4	116
A3.5	Oxígeno disuelto en F5	117
A3.6	Oxígeno disuelto en F6	118
A3.7	Oxígeno disuelto en F7	119
A3.8	Oxígeno disuelto en F8	119
A3.9	Oxígeno disuelto en F9	120
A3.10	Oxígeno disuelto en F10 (control)	122

<b>Figura</b>	<b>Nombre de la Figura</b>	<b>Página</b>
A4.1	Fermentación sin cambio en la concentración de oxígeno disuelto durante la fase lag del microorganismo. <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , 30 °C, N= 200 rpm, listón helicoidal, medio s, Fa = 12 L/min (1 vvm)	124
A4.2	Oxígeno disuelto para ejemplo de cálculo, % DOT	130
A4.3	Oxígeno disuelto en fermentación	131
A4.4	Obtención del coeficiente de consumo en fase lag	132
A4.5	Obtención de la velocidad de crecimiento	133
A4.6	Consumo microbiano de oxígeno durante la producción de xantana	134
A4.7	Aproximación a la derivada del consumo microbiano de oxígeno	134
A4.8	Función para el cálculo de la derivada del consumo microbiano de oxígeno	135

## NOMENCLATURA

A	Constante de la ecuación 1.31
$A_i$	Área interfacial de las burbujas de gas
$A_O$	Área bajo la curva de la respuesta normalizada del sensor de oxígeno
$A_P$	Área bajo la curva de la respuesta normalizada del sensor de presión
a	Constante de las correlaciones para cálculo de $k_L a$ (ecuaciones 2.2 a 2.14)
a1	Parámetro de la ecuación 5.8, función del tiempo
a2	Parámetro de la ecuación 5.8 relacionado con las condiciones iniciales del sistema, para este trabajo definida como $C_{L0}/C^*$
a3	Parámetro de la ecuación 5.8 relacionado con el amortiguamiento de la señal de oxígeno disuelto
$a_0$	Coefficiente de la ecuación 5.11
$a_1$	Coefficiente de la ecuación 5.11
$a_2$	Coefficiente de la ecuación 5.11
$a^*$	Área interfacial por unidad de volumen del reactor (líquido + gas)
$a'$	Área interfacial por unidad de volumen de líquido
b	Constante de las correlaciones para cálculo de $k_L a$ (ecuaciones 2.2 a 2.14)
$b_H$	Momento del sensor de oxígeno con el efecto de la película de líquido incluido
$b_O$	Momento del sensor de oxígeno sin considerar la película de líquido
$b_P$	Momento del sensor de presión
$C_A$	Concentración de un componente través de la película
$C_{gi}$	Concentración de un componente (vgr oxígeno) en las capa gas de la interfase
$C_g$	Concentración de un componente disuelto en el seno de un medio gaseoso
$C_L$	Concentración de un componente disuelto en el seno de un medio líquido
$C_{Li}$	Concentración de un componente (vgr oxígeno) en las capa líquido de la interfase
$C_{L0}$	Concentración de oxígeno disuelto al tiempo cero de la fermentación
$C^*$	Concentración de equilibrio de un componente en fase líquida
c	Constante de las correlaciones para cálculo de $k_L a$ (ecuaciones 2.2 a 2.14)
De	Número de Deborah
$D_{AB}$	Coefficiente de difusividad del soluto en la película adherida a la interfase
$D_i$	Diámetro del impulsor
$D_{O_2}$	Difusividad del oxígeno en el medio líquido
$D_T$	Diámetro del tanque
$dC_L/dt$	Velocidad de acumulación de oxígeno disuelto en medio líquido
$dP/dt$	Velocidad de formación de producto (polisacárido)
$dQ/dt$	Derivada de la velocidad específica de consumo de oxígeno por el microorganismo
$dS/dt$	Velocidad de consumo de sustrato
$dX/dt$	Velocidad de formación de biomasa
Fa	Flujo de aire
g	Constante de aceleración de la gravedad
H	Constante de Henry
$H_i$	Respuesta normalizada de una variable
h	Altura de líquido en el tanque
K	Índice de consistencia



$K'$	Coefficiente global de transferencia de masa
$K_{At}$	Constante de la ecuación 2.10
$K_E$	Constante de la ecuación 2.14
$K_H$	Constante de la ecuación de Cooper, Fernstrom y Miller ( ecuación 2.2)
$K_M$	Constante de la ecuación de Moresi (ecuación 2.5)
$K_R$	Constante de la ecuación de Richards (ecuación 2.3)
$K_{retro}$	Constante de la ecuación 5.9
$K_S$	Constante de la ecuación de Shin (ecuación 2.7)
$K_Z$	Constante de la ecuación de Zlokarnik <i>et. al.</i> ( ecuación2.4)
$K_{hr}$	Constante de la ecuación de Ryu y Humphrey (ecuación 2.9)
$K_{tm}$	Constante de la ecuación 2.16
$K_1$	Constante de la ecuación 1.31
$K_2$	Constante de la ecuación 1.31
$K_3$	Constante de la ecuación 2.21
$K_4$	Constante de la ecuación 2.22
$K_{1t}$	Constante de la ecuación 2.11
$K_{2t}$	Constante de la ecuación 2.11
$k$	Velocidad específica de consumo de oxígeno durante la fase lag.
$k_g$	Coefficiente de transferencia de masa en la película de gas
$k_i$	Coefficiente de transferencia de masa local
$k_L$	Coefficiente de transferencia de masa en la película de líquido
$k_{La}$	Coefficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
$L$	Parámetro de la ecuación 1.32, referente al espesor de la película de líquido sobre un sensor
$L_1$	Constante de la ecuación 1.33
$L_2$	Constante de la ecuación 1.34
$L_p$	Altura de la paleta del impulsor
MDIG	Método dinámico por intercambio de gases para cálculo de $k_{La}$
MDVP	Método dinámico por variación de presión para cálculo de $k_{La}$
$M_G$	Señal del sensor en aire (100%)
$M_L$	Señal del sensor en el líquido bajo las condiciones de mezclado existentes
$N$	Velocidad de giro del impulsor
$N_a$	Densidad de flujo de un componente (flux) Densidad de flujo de oxígeno disuelto
ND	No determinado
$N_i$	Número de impulsores en el tanque
$n$	Índice de comportamiento al flujo
$n'$	Número de términos incluidos en la serie de la ecuación 1.31
$P$	Presión de vapor de una mezcla gaseosa
$Pe$	Número de Peclet,
$P_q$	Potencial químico de la fase
$P_T$	Presión total de una mezcla gaseosa
$p^*$	Presión parcial de un soluto gaseoso
$p_1$	Constante de la ecuación 2.22
$P_g/V_L$	Potencia aplicada por unidad de volumen
$Q$	Velocidad de consumo específico de oxígeno por el microorganismo
$q_G$	Flujo volumétrico de aire
$q_1$	Constante de la ecuación 2.22

$q_{Pm\acute{a}x}$	Velocidad específica de consumo de producto máxima
$q_{Sm\acute{a}x}$	Velocidad específica de consumo de sustrato máxima
Re	Número de Reynolds
Si	Factor de coalescencia del medio (ecuación 2.14)
TOD	Tensión de oxígeno disuelto (%)
t	tiempo
V	Volumen de líquido en un recipiente
VTO	Velocidad de transferencia de oxígeno
VTO <sub>0</sub>	Velocidad de transferencia de oxígeno al tiempo cero de la fermentación
V <sub>L</sub>	Volumen de líquido
V <sub>i</sub>	Valor al tiempo i de una variable
V <sub>f</sub>	Valor al tiempo final de una variable
V <sub>0</sub>	Valor al tiempo inicial de una variable
vvm	Flujo de aire expresado como volumen de aire por volumen de líquido por minuto
v <sub>s</sub>	Velocidad superficial de las burbujas de gas en el líquido
W	Ancho de paleta del impulsor
w	Espacio entre las paletas del impulsor
X	Concentración de biomasa
X <sub>d</sub>	Constante de la ecuación 2.20
X <sub>0</sub>	Concentración de biomasa al tiempo cero de la fermentación
x	Fracción mol media de un componente en medio líquido
x <sub>A</sub>	Fracción mol de un componente en el seno de la fase líquida
x <sub>Ai</sub>	Fracción mol de un componente en el lado de la interfase líquido.
Y <sub>X/O</sub>	Rendimiento de formación de biomasa por unidad de oxígeno
y	Fracción mol de un soluto en la fase gaseosa
y <sub>A</sub>	Fracción mol de un componente en el seno de la fase líquida
y <sub>Ai</sub>	Fracción mol de un componente en el lado de la interfase gas
Z	Distancia que recorre el soluto dentro de la película
$\alpha$	Constante de la ecuación de Shin (ecuación 2.7)
$\alpha_1$	Constante de la ecuación de Galation (ecuación 2.8)
$\alpha_2$	Constante de la ecuación 2.11
$\beta$	Constante de la ecuación de Fukada (ecuación 2.6)
$\beta_1$	Constante de la ecuación de Shin (ecuación 2.7)
$\gamma$	Constante de la ecuación de Fukada (ecuación 2.6)
$\delta$	Espesor de la película
$\eta$	Viscosidad aparente del medio
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento de un microorganismo
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidad específica de crecimiento máxima de un microorganismo
$\mu_w$	Viscosidad del agua
$\rho_L$	Densidad del medio líquido
$\sigma$	Tensión interfacial del medio
$\Delta P_q$	Diferencia de potencial entre fases

## RESUMEN

Durante la producción de exopolisacáridos, la determinación experimental de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) no es frecuente, por las dificultades asociadas con el cambio de los patrones de mezclado y de las propiedades reológicas y/o fisicoquímicas de los caldos de fermentación. El método dinámico por variación de presión (MDVP) se plantea como una alternativa para la obtención de la VTO. En el presente trabajo, el primer objetivo fue encontrar el intervalo de aplicación del método en fluidos de características reológicas similares a los caldos de fermentación; el segundo objetivo fue utilizar el MDVP en fermentaciones, empleando diferentes condiciones de operación y microorganismos, mientras que el tercer objetivo fue identificar las características de operación del MDVP en los fluidos modelo y caldos de fermentación utilizados. Los resultados obtenidos indican que el MDVP es aplicable en un intervalo de viscosidad, índice de consistencia e índice de comportamiento de flujo compatibles con lo esperado en caldos de fermentación para producción de exopolisacáridos, con una variación del coeficiente global de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) similar al reportado para otros métodos dinámicos, pero con un mayor intervalo de detección. El MDVP es aplicable en medios de cultivo y la determinación experimental no es afectada por el cambio del microorganismo o de las condiciones de operación de la fermentación. El método no es aplicable a) Cuando el microorganismo tiene una velocidad de consumo de oxígeno alta, b) Se produce un cambio en el estado de dispersión de la mezcla líquido-gas; en fluidos modelo por formación de espuma, y en caldos de fermentación por formación de una dispersión semi-estable durante la fase estacionaria.

Las fermentaciones realizadas no presentaron cambios significativos en la viscosidad del caldo, pero sí en la velocidad de disolución de oxígeno. Los datos de velocidad de disolución de oxígeno se ajustaron a un modelo retroalimentado, indicando una reacción de consumo en la interfase, posiblemente una colonización bacteriana. La obtención de la VTO en un intervalo amplio de condiciones, permitió la identificación de dos factores (colonización bacteriana en la interfase, y estado de agregación de la fase gaseosa) no especificados en estudios previos sobre la producción de exopolisacáridos.

## INTRODUCCIÓN

Los exopolisacáridos son cadenas de azúcares sintetizadas por bacterias, que tienen aplicaciones, en las industrias alimentaria y farmacéutica, por sus propiedades espesantes y gelificantes. Los exopolisacáridos bacterianos son una alternativa al uso de polisacáridos vegetales los cuales están sujetos a las condiciones de cosecha o a la recolección en su fuente de origen. La forma industrial de producir los exopolisacáridos es cultivando bacterias bajo condiciones controladas en tanques de fermentación donde se realiza un proceso aerobio que transforma azúcares simples del medio de cultivo en los exopolisacáridos que secreta la bacteria. El aislamiento y caracterización de nuevos exopolisacáridos, así como la formulación de nuevas combinaciones entre ellos, es un campo en constante desarrollo. Sin embargo, el establecimiento de las condiciones óptimas de producción y el escalamiento del proceso del laboratorio a nivel piloto e industrial presentan el reto de obtener lotes con rendimientos constantes. El rendimiento está afectado principalmente por la disposición de nutrientes en el medio y las condiciones de agitación y mezclado que se modifican rápidamente durante el transcurso de la fermentación por acumulación del exopolisacárido en el medio.

Uno de los nutrientes cuyo suministro tiene mayores limitantes es el oxígeno empleado como donador de electrones en el metabolismo. Para ser asimilable por las bacterias el oxígeno debe encontrarse disuelto en el líquido. El oxígeno es un gas que se disuelve en cantidades pequeñas en medios acuosos, por lo que se incorpora al caldo en forma continua haciendo circular un flujo de gas que atraviesa el líquido en forma de burbujas. El proceso por el cual el oxígeno gaseoso se desplaza hasta la pared de la burbuja, la atraviesa, y se disuelve en el medio líquido es llamado proceso de transferencia de oxígeno, el cual depende de las condiciones de equilibrio químico. Como indicador del funcionamiento del proceso de transferencia, se emplea la velocidad de transferencia de oxígeno, que está referida a la cantidad de oxígeno que se disuelve por unidad de área de contacto entre la burbuja y el líquido, y por unidad de tiempo. Las determinaciones experimentales de la velocidad de transferencia de oxígeno requieren conocer las concentraciones de oxígeno disuelto, tanto en el equilibrio como en el momento de la determinación, y el coeficiente global de transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa al medio líquido.

Considerando los componentes de la determinación de la velocidad de transferencia de oxígeno y las características de los caldos de fermentación para producción de exopolisacáridos, al menos se enlazan cuatro tipos básicos de comportamientos teóricos diferentes entre sí, pero estrechamente asociados:

- 1) El comportamiento del sensor de oxígeno disuelto, que es un dispositivo electrónico que mide la concentración de oxígeno a través de una reacción de oxidación-reducción que se lleva a cabo dentro de una cámara instalada dentro del dispositivo, y que amplifica la corriente resultante hasta hacerla detectable.
- 2) La determinación experimental del coeficiente global de transferencia de oxígeno que está relacionada con la migración del oxígeno gaseoso contenido en una burbuja hacia un medio líquido, donde cada fase tiene un movimiento propio, y que está afectada por las resistencias de las películas de gas y de líquido, y con la difusión del oxígeno en la pared de la burbuja.

- 3) El consumo de oxígeno disuelto por parte de las células, que no se detiene en el lapso en que se realiza la determinación experimental.
- 4) Los cambios en las condiciones de mezclado del caldo de fermentación.

Como cada uno de estos aspectos tiene una base teórica diferente, se pueden estudiar por separado o agrupando uno o dos de ellos.

El estudio de la producción de exopolisacáridos ha tenido un desarrollo constante, junto con los trabajos sobre los aspectos relativos a la transferencia de oxígeno, con amplio predominio del enfoque que estudia cada aspecto por separado. Los trabajos que integran los cuatro aspectos descritos son escasos, con una frecuencia de 3 a 4 estudios por década. El principal obstáculo para lograr trabajos que describan qué sucede con la velocidad de transferencia de oxígeno integrando los cuatro aspectos explicados, está en el desarrollo desigual de cada una de las áreas teóricas que los soportan. En años recientes ha avanzado con rapidez la comprensión de lo que sucede con las células bacterianas cuando consumen oxígeno y lo transforman en exopolisacáridos, y se ha desarrollado tecnología electrónica que permite obtener sensores de oxígeno que minimizan los efectos de la configuración y los tiempos de respuesta; mientras que las otras dos áreas el estudio del mezclado en caldos de fermentación y el desarrollo de métodos experimentales para la determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno, no han avanzado al mismo ritmo. A su vez, el conocimiento sobre el efecto del cambio en las condiciones de mezclado, sobre la productividad del exopolisacárido, está más desarrollado que el efecto del cambio en la velocidad de transferencia de oxígeno, principalmente porque los métodos experimentales para la determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno son aplicables en un intervalo definido de condiciones de mezclado; teniendo como consecuencia práctica que en el transcurso de una fermentación se pueda determinar el coeficiente global de transferencia de oxígeno con un método hasta cierto tiempo o volumen de caldo, y después se tenga que cambiar a otro método o a soluciones artificiales de características similares a las del caldo.

El método dinámico por variación de presión para la determinación experimental del coeficiente global de transferencia de oxígeno, fue desarrollado hace veinte años (Linek *et al.*, 1987) y se plantea como una alternativa para obtener el coeficiente global de transferencia de oxígeno durante la fermentación. El método dinámico de variación por presión se fundamenta en un cambio de presión interna en el fermentador, que provoca un cambio en la presión parcial del oxígeno en las burbujas de gas, como este cambio depende de la presión y no de la distribución de las burbujas de gas o de las corrientes de líquido, tiene un menor efecto de las condiciones de mezclado sobre la determinación. También tiene la ventaja de incluir en el cálculo del coeficiente global de transferencia de oxígeno, el efecto del funcionamiento del sensor.

Así, el objetivo de esta tesis es cuantificar la velocidad de transferencia de oxígeno en caldos de fermentación para producción de exopolisacáridos, utilizando el método dinámico por variación de presión para la determinación experimental del coeficiente global de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ), empleando un fermentador piloto de 12 litros agitado por un impulsor helicoidal. El método dinámico de variación por presión ha sido probado hasta escala piloto, pero sólo en soluciones acuosas coalescentes y no coalescentes, por lo que el alcance del

trabajo es encontrar cuáles son las características de funcionamiento del método durante la fermentación, encontrar los intervalos de operación y las limitantes que pudiera presentar. La meta del trabajo es utilizar los valores del coeficiente global de transferencia de oxígeno, obtenidos por el método dinámico por variación de presión, para calcular la velocidad de transferencia de oxígeno y contrastar la consistencia de las determinaciones con los antecedentes que se tienen sobre el comportamiento de la velocidad de transferencia de oxígeno en caldos de fermentación. Para ello, en el capítulo I se presentan los antecedentes teóricos del proceso de transferencia de masa y del consumo de oxígeno disuelto en caldos de fermentación, así como una revisión de los métodos experimentales para el cálculo del coeficiente global de transferencia de masa y una descripción de los fundamentos teóricos del método dinámico por variación de presión. En el capítulo II se presentan los trabajos referentes a la determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno y la velocidad de transferencia de oxígeno, en caldos de fermentación, finalizando con la revisión de los trabajos de transferencia de oxígeno en caldos para producción de polisacáridos incluidos los enfoques experimentales utilizados, los principales resultados obtenidos y las dificultades encontradas en la interpretación de los datos. El capítulo III contiene el planteamiento y objetivos del trabajo y el IV la metodología empleada para realizar las determinaciones analíticas, de cinética microbiana, y de proceso necesarias para calcular concentraciones de oxígeno, coeficientes globales de transferencia de oxígeno y consumo microbiano de oxígeno disuelto. En el capítulo V se presentan los resultados experimentales junto con el análisis y discusión correspondientes. Contiene tres partes principales; en la primera se presentan los datos correspondientes a la determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno en soluciones modelo de características reológicas similares a las presentadas por los caldos de fermentación. En la segunda sección se presentan los datos de coeficiente global de transferencia de oxígeno y velocidad de transferencia de oxígeno obtenidos en caldos de fermentación empleando 3 microorganismos y dos flujos de aire. La tercera parte corresponde al análisis del comportamiento de la velocidad de transferencia de masa mediante ecuaciones de ajuste y la descripción de las características, de operación y respuesta a las condiciones del caldo, que presento de la determinación del coeficiente global de transferencia de oxígeno por el método dinámico de variación de presión.

Finalmente se incluyen las conclusiones del trabajo y las referencias empleadas.

Se incluyen cuatro anexos que contienen información que complementa los resultados experimentales. El anexo 1 incluye la validación de la técnica desarrollada para cuantificar los exopolisacáridos obtenidos a partir de los caldos de fermentación. El anexo 2 incluye datos de producción de exopolisacáridos y características reológicas de caldos, que sirvieron como criterio de selección de los fluidos modelo empleados en el trabajo. El anexo 3 contiene los datos de formación de biomasa, consumo de sustrato y formación de exopolisacárido, y los perfiles de oxígeno disuelto durante la fermentación, necesarios para el cálculo del consumo microbiano de oxígeno disuelto. El anexo 4 contiene las bases teóricas y la metodología empleada para el cálculo de los parámetros de las ecuaciones descriptivas de la transferencia de oxígeno en los caldos de fermentación.

# CAPITULO I

## TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN MEDIO LÍQUIDO

### I.1- Importancia de la disolución de oxígeno en un proceso de fermentación sumergida aerobia para producción de exopolisacáridos

Es de interés para este trabajo el estudio de la velocidad de transferencia de oxígeno en fermentaciones aerobias para la producción de metabolitos llamados exopolisacáridos, en fermentadores tipo tanque agitado donde el movimiento del líquido es producido por la presencia de impulsores mecánicos.

Los exopolisacáridos son largas cadenas de monómeros de azúcar unidos en un orden fijo formando unidades básicas que se repiten en la cadena. Se les llama exo, porque su fase final de ensamblado se realiza fuera de la célula, y porque se disuelven en el caldo de fermentación. Al disolverse cambian las propiedades reológicas del caldo, pues poseen características espesante o plásticas. Estas sustancias tienen una amplia variedad de aplicaciones en industrias como las petrolera, farmacéutica y alimentaria (Pace y Rigelato, 1980; Morris, 1987).

En un proceso para producción de exopolisacáridos existe una interacción recíproca entre la acumulación de polisacárido y la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de fermentación (Winkler, 1990). La concentración de oxígeno disuelto determina la productividad del proceso, ya que la disponibilidad de oxígeno como receptor de electrones regula el ritmo metabólico de las células y por lo tanto la velocidad de formación de polisacárido; pero a su vez la cantidad de oxígeno que puede disolverse en el medio depende de las características reológicas del medio.

El oxígeno es un gas de baja solubilidad en medio acuoso por lo que la cantidad requerida por las células supera al valor que puede disolverse a partir del gas, y éste debe suministrarse en forma continua. La adición del gas al medio se realiza haciendo burbujear una corriente gaseosa (aire, oxígeno puro, o mezclas enriquecidas en oxígeno) dentro del caldo de fermentación; las burbujas generadas son distribuidas en todo el medio por las corrientes del líquido. Estas corrientes son generadas tanto por el movimiento del gas, como por la presencia de impulsores mecánicos (ver figura 1.1).

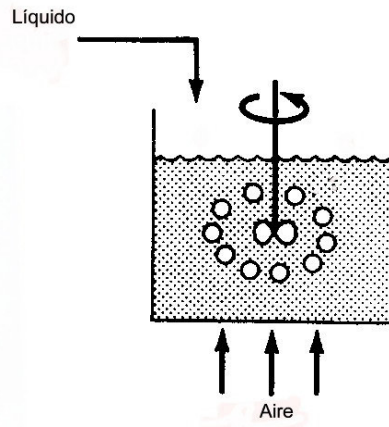


Figura 1.1.- Dispersión de un gas en un tanque agitado mecánicamente

## I.2.- Proceso de absorción y equilibrio entre fases

La absorción de gases es una operación en la cual una mezcla gaseosa se pone en contacto con un líquido, a fin de disolver de manera selectiva uno o más componentes del gas y obtener una solución. La operación requiere la transferencia de masa de la sustancia en la fase gaseosa a la fase líquida. Para ello se hace pasar la fase gaseosa en forma de burbujas que atraviesan una columna de líquido, formándose una interfase localizada en la superficie de las burbujas de gas. La rapidez con la cual se disolverá el componente gaseoso en el líquido depende de la desviación del equilibrio que se tenga en el sistema (Treybal, 1980).

La cantidad de componente gaseoso que se disuelve en la fase líquida, es una función de la diferencia de potencial químico entre las fases. A medida que el soluto pasa de una fase a otra, se consume la energía del gradiente de potencial químico. Cuando se llega a una diferencia de potencia químico igual a cero, el transporte del soluto se detiene, quedando una fracción de soluto en la fase gaseosa y otra en la fase líquida; estas concentraciones no son iguales entre sí, y son llamadas concentraciones de equilibrio, las cuales se denotan colocando un asterisco junto a la variable utilizada para expresar la concentración.

$$\text{Condición de equilibrio} = \Delta P_q = P_{q_{\text{gas}}} = P_{q_{\text{líquido}}} \quad (1.1)$$

Donde  $P_q$  es el potencial químico de la fase

La relación entre las concentraciones del soluto en fase líquida y gaseosa en el equilibrio, pueden expresarse en términos de las leyes de Raoult y Henry.

Cuando la mezcla gaseosa en equilibrio con un líquido sigue la ley de los gases ideales, la presión parcial  $p^*$  de un soluto gaseoso A es igual a la presión de vapor ( $p$ ) a la misma temperatura por su fracción mol en el líquido ( $x$ ). Esta proporción es llamada ley de Raoult.

$$p^* = px \quad (1.2)$$

Y la relación entre las concentraciones de la fase líquida y gaseosa está dada por la ecuación de la ley de Henry.

$$y = \frac{p^*}{P_T} = Hx \quad (1.3)$$

Donde  $P_T$  es la presión total,  $y$  es la fracción mol del componente A en la fase gaseosa y  $H$  es la constante de Henry.

Cuando la ley de Henry no es aplicable en un intervalo amplio de concentraciones, puede deberse a una interacción química con el líquido o a disociación electrolítica. Puede esperarse que muchos gases sigan la ley de Henry hasta presiones en el equilibrio de  $5 \times 10^5$  N/m<sup>2</sup>, aunque si la solubilidad es baja, estas presiones pueden llegar hasta  $34 \times 10^5$  N/m<sup>2</sup> (Treybal, 1980).



### I.3.- Transporte de un soluto a través de una interfase. Coeficientes de transferencia de masa

El proceso de transferencia de masa entre las dos fases involucra el contacto entre la superficie de la burbuja y el líquido, y por lo tanto el paso del soluto a través de un límite de fase. En la absorción el soluto se difunde de la fase gaseosa portadora hacia una superficie líquida, donde se disuelve, y ya en el líquido, se transfiere por difusión o mezclado convectivo.

Se han propuesto varios modelos para describir la transferencia de un soluto a través de un límite de fase. La teoría de la doble película, desarrollada por Lewis y Whitman en 1924, describe la transferencia en la interfase como el paso del soluto a través de dos películas estáticas adheridas a cada lado de la interfase gas-líquido. Estas películas son estáticas con un flujo laminar y el soluto las atraviesa por un proceso de difusión (Hines y Maddox, 1987).

El modelo considera que toda la resistencia a la transferencia de masa está contenida en las dos películas y nada en la interfase. Por tal motivo las concentraciones dentro de la interfase están en equilibrio y se pueden determinar a través de una curva de distribución del equilibrio expresada como:

$$y_i = f(x_i) \quad (1.4)$$

La figura 1.2 muestra la descripción gráfica del modelo de doble película para el contacto gas-líquido. Las concentraciones  $y_A$  y  $x_A$  son las composiciones en el seno de la fase, y  $y_{Ai}$  y  $x_{Ai}$  son las composiciones en la interfase gas-líquido.

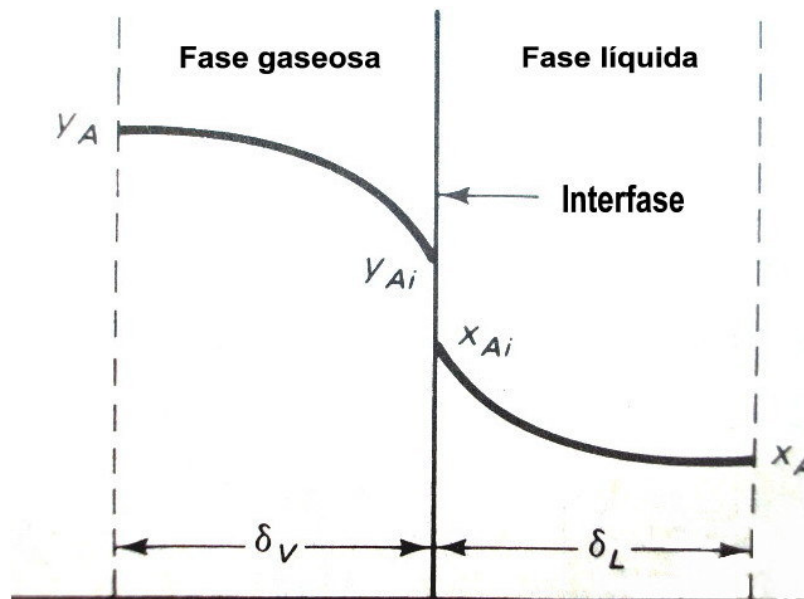
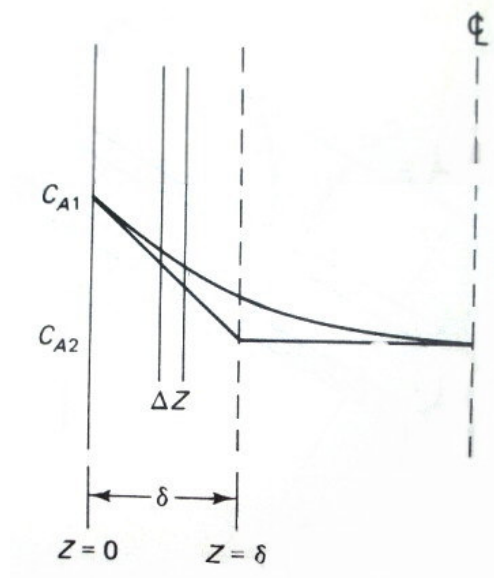


Figura 1.2.- Esquema del paso de soluto en doble película

En estado estacionario el flujo de soluto a través de una película tiene que ser igual al flujo de soluto en la otra película. Definiendo el flujo de soluto a través de la película en términos de la ley de Fick.

$$N_a = -D_{AB} \frac{dC_A}{dZ} \quad (1.5)$$

Donde  $N_a$  es la densidad de flujo del soluto (flux),  $D_{AB}$  es el coeficiente de difusividad del soluto en la película adherida a la interfase,  $C_A$  es la concentración del soluto a través de la película y  $Z$  es la distancia que recorre el soluto dentro de la película.



**Figura 1.3.-** Dirección del soluto en la película

De acuerdo con el perfil de concentraciones en la película presentado en la figura 1.3, la ecuación 1.5 se puede expresar como:

$$N_a = \frac{D_{AB}}{\delta} (C_{A1} - C_{A2}) \quad (1.6)$$

Donde  $\delta$  es el espesor de la película.

Definiendo:

$$\frac{D_{AB}}{\delta} = k_i \quad (1.7)$$

$k_i$  es llamado coeficiente de transferencia de masa local. De acuerdo con la teoría de la doble película se tendrían dos coeficientes locales,  $k_g$  el coeficiente de la película de gas y  $k_L$  el coeficiente de la película de líquido.

La resistencia total al paso del soluto, estará dada por la suma de las resistencias de cada película, de acuerdo a la expresión

$$\frac{1}{K'} = \frac{1}{k_l} + \frac{1}{Hk_g} \quad (1.8)$$

Donde  $K'$  es el coeficiente global de transferencia de masa, el cual tiene la ventaja de poder expresarse en términos de las concentraciones en el seno de los fluidos, y no en las concentraciones en la interfase como los coeficientes locales.

Para un sistema en que el soluto es altamente soluble en la fase líquida, la constante de Henry es muy pequeña, por lo que el coeficiente global ( $K'$ ) se puede aproximar con el coeficiente local de la película gaseosa ( $k_g$ ). A la inversa si el soluto es relativamente insoluble en el líquido, la constante de Henry es grande, por lo que el coeficiente global ( $K'$ ) se puede aproximar con el coeficiente local de la película líquida ( $k_l$ ).

La deducción de los coeficientes de transferencia de masa, implica que las películas consideradas tengan las siguientes bases teóricas (Lobo 1996):

- 1.- No hay reacción química en la película
- 2.- La dirección del transporte del soluto se realiza solo en la dirección mostrada en la figura 1.3.
- 3.- La película esta en estado estacionario
- 4.- Las propiedades físicas de la película son constantes
- 5.- El espesor de película es muy pequeño
- 6.- La cantidad de soluto acumulada en la película es muy pequeña en comparación con la cantidad que pasa a través de ella

La teoría de la película se opone a las condiciones de transferencia en flujo turbulento; sin embargo, funciona bien cuando se trabaja con un flux de transferencia de masa elevado, y permite predecir el efecto de la transferencia de masa sobre la transferencia de calor, y sobre todo permite predecir el efecto de una velocidad de reacción química sobre la transferencia de masa, que es el caso que se presenta en los tanques de fermentación.

#### **I.4.- Proceso de disolución de oxígeno gaseoso en un líquido**

El oxígeno es un gas que compone el 21% de la atmósfera, e interviene en un amplio espectro de reacciones químicas, físicas y biológicas, sobre todo en su forma soluble.

La disolución del oxígeno es un proceso de absorción, en donde el gas atraviesa un líquido y una parte del gas migra hacia el líquido. La proporción de gas que pasa al líquido está fijada por las condiciones de equilibrio químico y se expresa como concentración de equilibrio ( $C^*$ ) que es la concentración máxima de oxígeno que puede disolverse a las condiciones de temperatura, presión y potencial químico utilizadas. Mientras que la densidad de flujo de oxígeno disuelto ( $N_a$ ) es dependiente del gradiente de concentración entre la concentración de equilibrio y la concentración disuelta en el líquido ( $C_l$ ), del área de contacto entre el gas y el líquido (área de la interfase), de la resistencia que el oxígeno encuentre en la interfase, y del tiempo de contacto entre la fases.

De acuerdo a la teoría más aceptada para describir la disolución del oxígeno, que es la teoría de la doble película de Whitman, la interfase tiene una película de gas y una de líquido adheridas que el oxígeno debe atravesar para incorporarse al líquido, en donde la mayor resistencia se encuentra en la película de líquido siendo la del gas muy pequeña en comparación; así mismo se asume un flujo equimolar de oxígeno en las dos películas

En estado estable la velocidad de transferencia de oxígeno en la interfase gas-líquido, es igual a la velocidad de transferencia en la película de líquido estancada (flujo equimolar). Si  $C_{gi}$  y  $C_{li}$  son las concentraciones de oxígeno en las capas gas y líquido de la interfase, y  $C_g$  y  $C_L$  las concentraciones de oxígeno en el seno del gas y del líquido respectivamente. Las concentraciones dentro de la interfase pueden relacionarse entre sí a través de la ley de Henry:

$$HC_{Li} = C_{gi} \quad (1.9)$$

Donde H es la constante de Henry.

Así la densidad de flujo (flux) de oxígeno puede expresarse como:

$$\text{Flux de oxígeno} = \text{mol O}_2/\text{cm}^2 \text{ s} \quad (1.10)$$

$$\text{Flux} = k_g(C_g - C_{gi}) \quad \text{Película de gas} \quad (1.11)$$

$$\text{Flux} = k_L(C_{li} - C_L) \quad \text{Película de líquido} \quad (1.12)$$

Puesto que las concentraciones dentro de la interfase son difíciles de medir, la ecuación de flux de oxígeno se puede reescribir en términos del coeficiente global de transferencia K, y del gradiente de concentración global ( $C^* - C_L$ ) donde  $C^*$  es la concentración en el líquido en equilibrio con la fase gas. Así la ley de Henry se puede aproximar como:

$$HC^* \in C_{gi} \quad (1.13)$$

Y el flux puede reescribirse como

$$\text{Flux} = K_L(C^* - C_L) \quad (1.14)$$

De acuerdo con la relación entre el coeficiente global y los coeficientes locales de transferencia en la interfase:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{Hk_g} \quad (1.15)$$

Dado que el valor de H es más grande que la unidad y que  $k_g$  es más grande que  $k_L$ , el valor del coeficiente global de transferencia se puede aproximar al valor del coeficiente local en fase líquida.

$$\frac{1}{K_L} \approx \frac{1}{k_L} \quad (1.16)$$

La velocidad de transferencia de oxígeno es:

$$\text{Velocidad de transferencia de oxígeno} = \text{VTO} = \frac{(\text{flux})(\text{área interfacial})}{\text{Volumen de líquido}} \quad (1.17)$$

$$\text{VTO} = k_L (C^* - C_L) \frac{A_i}{V_L} \quad (1.18)$$

Sustituyendo el coeficiente  $A_i/V_L$  por el parámetro  $a'$  (área de la interfase por unidad de volumen), se tiene la expresión:

$$\text{VTO} = k_L a' (C^* - C_L) \quad (1.19)$$

Que también puede expresarse como:

$$\text{VTO} = k_L a^* (C^* - C_L) \quad (1.20)$$

Donde  $a$  es el área de la interfase por unidad de volumen del reactor (líquido + gas),  $\text{VTO}$  = velocidad de transferencia de oxígeno,  $k_L a$  es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $C^*$  es la concentración de oxígeno disuelto en el equilibrio y  $C_L$  es la concentración de oxígeno disuelto en el medio a cualquier tiempo. El área de la interfase, en un tanque agitado mecánicamente, no es constante y es dependiente de la distribución de tamaños de las burbujas y del patrón de coalescencia, siendo su efecto incorporado al del coeficiente de transferencia de oxígeno, formando el parámetro llamado coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ); así la velocidad de transferencia de oxígeno esta descrita por la ecuación:

$$\text{VTO} = k_L a (C^* - C_L) \quad (1.21)$$

En condiciones de temperatura y presión constante, serán las variables relacionadas con la energía necesaria para realizar la dispersión gas-líquido ( $P_g/V$  potencia aplicada por unidad de volumen), la velocidad de giro del impulsor ( $N$ ) y el tiempo de contacto entre las dos fases (expresado como  $v_s$ , velocidad superficial)

Hospadka *et al.* (1942), Cooper, Fernstrom y Miller (1944), y Carlson (1946), quienes estudiaron la transferencia de oxígeno de oxígeno, en soluciones de sulfito, como función de las variables anteriormente descritas ( $P/V_L$ ,  $N$ ,  $v_s$ ), determinaron el  $k_L a$  en tanques con agitadores mecánicos. En los tres trabajos se llegó a ecuaciones del tipo:

$$k_L a = K_H \left( \frac{P_g}{V_L} \right)^a v_s^b \quad (1.22)$$

En el trabajo de Cooper *et al.* (1944), el valor de las constantes es  $K_H = 0.0635$  para un impulsor de disco, 0.0380 para un impulsor de paleta,  $a = 0.95$ ,  $b = 0.67$ , con  $P_g/V_L > 0.06$  HP/m<sup>3</sup> y  $v_s < 21$  m/h.  $k_L a$  en mMO<sub>2</sub>/L atm h.

#### I.4.1.- Velocidad de transferencia de oxígeno en fermentaciones

En la ecuación de velocidad de transferencia de oxígeno (ecuación 1.21)  $(C^* - C_L)$  es el gradiente de concentración y se le asocia con la fuerza impulsora de la transferencia de oxígeno, mientras que el  $k_L a$  engloba las resistencias a la transferencia.

El transporte de oxígeno desde la burbuja hasta la célula microbiana se conceptualiza de acuerdo con un modelo de resistencias que se basa en las etapas que se muestran en la figura 1.4 (Bailey y Ollis, 1986):

- Difusión desde el seno del gas hasta la interfase gas-líquido
- Paso a través de la interfase
- Difusión desde la zona adyacente a la interfase hasta el seno del líquido
- Transporte a través del líquido hasta las zonas cercanas a las células
- Difusión desde la zona adyacente a las células hasta la superficie celular
- Paso a través de la membrana celular y llegada al sitio de reacción intracelular.

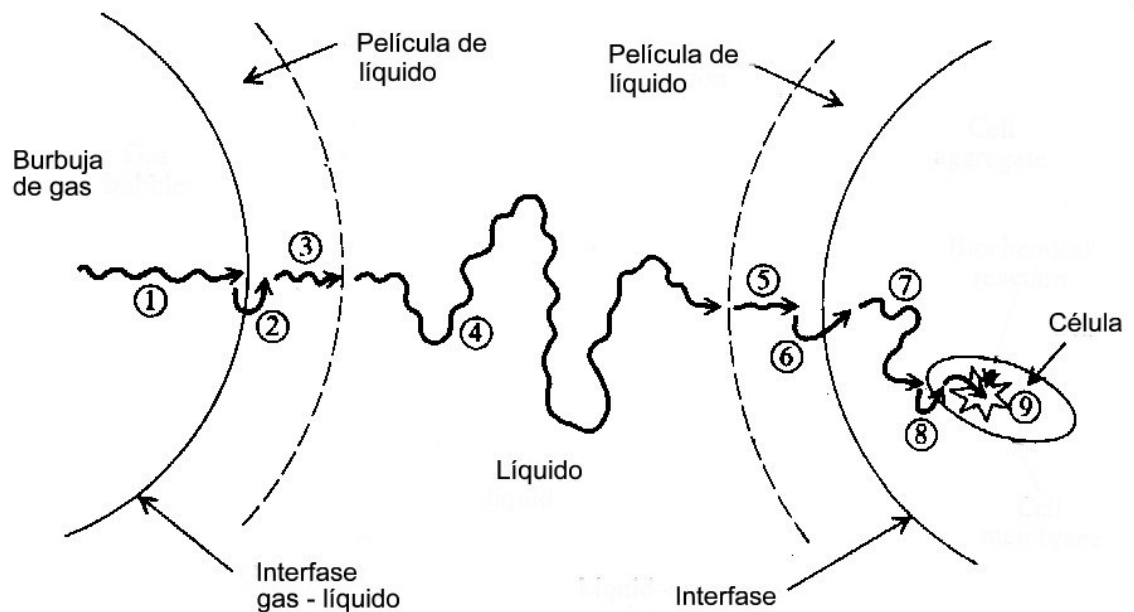


Figura 1.4.- Transporte de oxígeno en un caldo de fermentación

Este modelo considera una burbuja aislada en el medio de fermentación, y al hacerlo extensivo a sistemas agitados mecánicamente, intervienen factores como:

- a) La velocidad terminal de la gota
- b) La frecuencia de coalescencia-ruptura de las burbujas
- c) El patrón de corrientes de líquido dentro del tanque (condiciones hidrodinámicas)
- d) Las características fisicoquímicas del medio por donde se desplazan las burbujas (densidad, viscosidad, tensión de la interfase).

### **I.5.- Métodos experimentales para el cálculo de $k_L a$**

En los tanques donde interviene el flujo turbulento es difícil hacer extrapolaciones teóricas para el cálculo de los coeficientes de transferencia de masa, debido a la complejidad para describir matemáticamente las condiciones de flujo. Por lo que es necesario obtener datos experimentales; la aplicación de los coeficientes generados se limita a casos similares de condiciones geométricas y de operación así como al intervalo de propiedades consideradas en las determinaciones experimentales (Lobo, 1996).

Los métodos comúnmente usados para la determinación del  $k_L a$ , se pueden clasificar de acuerdo al comportamiento de la concentración de oxígeno disuelto (Linek *et al.* 1987). De esta forma se tienen métodos en estado estable en los que la concentración de oxígeno disuelto no cambia durante la determinación, y métodos dinámicos en los que la concentración de oxígeno disuelto tiene cambios durante la determinación.

#### 1) Métodos en estado estable

Los métodos en estado estable involucran la transferencia de oxígeno en sistemas de flujo continuo o en sistemas semi-lote. La transferencia es acompañada por una reacción química o enzimática lo suficientemente rápida para mantener la concentración de oxígeno por debajo del valor de equilibrio, pero no tan rápida para afectar a la velocidad de transferencia del oxígeno.

#### 2) Métodos dinámicos

Los métodos dinámicos miden la concentración de oxígeno disuelto generalmente en la fase líquida, mientras se realiza un cambio escalonado en las condiciones de operación (concentración de oxígeno en la corriente gaseosa, presión, velocidad de agitación, impulso electromagnético)

Estos métodos pueden desglosarse en varias técnicas para la determinación de  $k_L a$ , casi todas adaptaciones de algunos métodos base, que son los empleados con mayor frecuencia.

Los métodos para determinación de  $k_L a$  utilizados con mayor frecuencia pueden dividirse (Gogate y Pandit, 1999; Rainer 1990) en:

#### a) Métodos indirectos (métodos en estado estable)

Donde no participan sistemas biológicos. Están basados en un sistema de reacción de estequiometría definida, donde uno de los reactivos es el oxígeno disuelto. Se mide la

concentración de los productos de reacción y por balance estequiométrico se obtiene la concentración de oxígeno disuelto. En estos métodos es importante mantener constantes la temperatura, pH y fuerza iónica del medio líquido. Los más usados de estos métodos son:

Método de oxidación del sulfito.- El oxígeno disuelto reacciona con el radical sulfito para formar sulfato, en presencia de un catalizador inorgánico que puede ser cobre o cobalto. El sulfato reacciona con el ión yoduro para formar una sal, el yoduro residual es cuantificado por titulación con tiosulfato de sodio.

Método de la glucosa oxidasa.- Se mide la concentración de oxígeno disuelto usando un sistema enzimático acoplado, en donde se agrega glucosa que reacciona con el oxígeno por catálisis de la glucosa oxidasa en presencia de la coenzima flavin adenin difosfato (FAD) y catalasa como cofactores para formar glucono-lactona y agua. La glucono-lactona es transformada en ácido glucónico por acción de la enzima lactonasa. La concentración de ácido glucónico se obtiene titulando con hidróxido de sodio.

Método de la catalasa.- Se agrega peróxido de hidrógeno al medio, que sirve como inductor para que el oxígeno disuelto forme más peróxido, que después por acción de la catalasa se descompone en agua y oxígeno gaseoso. El oxígeno gaseoso es arrastrado por un gas inerte que se hace pasar por el líquido al que se le mide la concentración de oxígeno a la entrada y salida del tanque. El incremento en la concentración de oxígeno gaseoso es proporcional a la cantidad de oxígeno disuelto.

b) Métodos directos (métodos en estado no estable)

Son utilizados en sistemas biológicos. El  $k_L a$  se obtiene del cambio en la concentración de oxígeno disuelto que se obtiene al introducir una perturbación, y de los datos de consumo de oxígeno disuelto del microorganismo utilizado. Estos métodos pueden ser:

Método del cultivo continuo.- En un cultivo continuo se mantienen constantes la concentración de biomasa ( $X$ ), la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), la concentración de oxígeno disuelto y el consumo microbiano, por lo que la velocidad de transferencia de oxígeno es igual al consumo específico del microorganismo ( $Q$ ), de acuerdo con la expresión:

$$k_L a(C^* - C_L) = Q \quad (1.23)$$

Método por balance de gas.- Se mide la concentración de oxígeno (con un cromatógrafo de gases o con un detector infrarrojo) en la corriente de gas a la entrada y salida del reactor. La diferencia entre ambas corresponde al oxígeno consumido por los microorganismos ( $Q$ ) y al oxígeno disuelto acumulado en el líquido ( $dC_L/dt$ ). Es exacto cuando se tienen reactores con condiciones de mezclado cercanas a las ideales, y cuando las propiedades del medio permiten que el tiempo de recirculación de las burbujas de gas sea constante. Su ecuación base es:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a(C^* - C_L) - Q \quad (1.24)$$



Métodos dinámicos.- Se introduce una perturbación en la concentración de oxígeno del medio, y se obtiene el  $k_{L,a}$  a partir de la respuesta que presenta el caldo al recuperar un estado estable. Existen varios tipos de método dinámico, de acuerdo a cómo se realice la perturbación, pudiéndose aplicar vacío, suspendiendo el aporte de gas o sustituyendo el oxígeno por un gas inerte. El más usado de los métodos dinámicos es donde se disminuye la concentración de oxígeno por desplazamiento con una corriente de nitrógeno; cuando cesa el flujo de nitrógeno se inyecta aire y se mide la recuperación de la concentración de oxígeno. Es un método de fácil aplicación, que puede incorporar los tiempos de respuesta del sensor (Ruchti *et al.*, 1981), pero no considera las características de la película adherida al sensor. Deja de ser aplicable a viscosidades altas por los cambios en el tiempo de retención de la fase gaseosa.

Los métodos más usados en las fermentaciones para producción de polisacáridos son los dinámicos y el método por balance de gases. Si bien los métodos dinámicos están incluidos en este rubro, también se pueden utilizar para medir el  $k_{L,a}$  en sistemas donde no participen componentes biológicos.

Una alternativa de los métodos dinámicos es el método dinámico por variación de presión (MDVP) (Linek *et al.*, 1989a, 1989b, 1993, 1994) donde el cambio en la concentración de oxígeno en el caldo, se induce al presurizar el tanque. La solubilidad del oxígeno es dependiente de la presión total del sistema; este cambio en la concentración sucede al mismo tiempo en todas las burbujas que estén dentro del tanque, por lo que la prueba se vuelve independiente del patrón de mezclado y del tiempo de retención de las burbujas. Incluye el efecto de la función de respuesta del sensor y el efecto del espesor de la película de líquido adherida al sensor. Una descripción más detallada del método y un ejemplo de cálculo se presentan más adelante.

## **I.6.- Detección de oxígeno disuelto con sensores sumergidos**

Para obtener el valor de la concentración de oxígeno disuelto que se necesita para calcular el  $k_{L,a}$ , generalmente se utilizan sensores, que son dispositivos electrónicos con una cámara conteniendo un electrolito; esta cámara está rodeada por una membrana semipermeable al oxígeno, que puede ser de diferentes materiales como el vidrio o el polipropileno. Cuando el oxígeno atraviesa la membrana del sensor se produce un intercambio de electrones con el electrolito; este cambio es convertido por los componentes electrónicos a una corriente eléctrica que viaja a través del sensor y de cables para llegar a un detector que convierte la corriente eléctrica en una señal analógica (como concentración o %TOD) cuyo valor se registra y se utiliza para calcular la concentración de oxígeno disuelto. Este proceso indica que dependiendo del tipo, tamaño, material y configuración de los componentes del sensor y de la forma en que se convierte y transmiten las señales, habrá una divergencia entre la señal indicada en el detector y la concentración real en el medio líquido; la forma de corregir el valor del detector es incluir una función que relacione las concentraciones con el funcionamiento del sensor, y que es llamada función de respuesta del sensor o función característica del sensor. Hay disponibles múltiples modelos que describen esta función, pueden ser de primer orden (Merchuk *et al.*, 1990), de segundo orden (Rainer, 1990), no lineales (Linek *et al.*, 1990) o de efecto mínimo (Badino, 2001).

Cuando el sensor está sumergido en el líquido se produce una divergencia entre las concentraciones, real y detectada, por efecto de las resistencias que el oxígeno debe atravesar para poder llegar a la cámara del electrolito. Cualquier objeto sumergido en un líquido es rodeado por una película del líquido circundante. En el caso de la transferencia de oxígeno, el oxígeno disuelto en el medio líquido, para poder ser detectado debe atravesar esta película, además de la membrana del sensor, y el electrolito que rodea a los electrodos del sensor; estas dos últimas resistencias se consideran muy pequeñas en comparación con la resistencia que presenta la película de líquido. La presencia de esta película de líquido afecta en gran medida a los cálculos de la velocidad de transferencia de masa porque produce un retardo en la detección de la concentración verdadera en el medio, ya que mientras el oxígeno atraviesa la película, el sensor seguirá marcando la concentración anterior, quedando el cambio verdadero enmascarado por un factor de tiempo, para el cual no existe un método confiable de cálculo, mientras no se tome en cuenta el espesor de película.

En procesos donde la viscosidad del medio aumenta, el espesor y la viscosidad de la película se vuelve un factor crítico para el cálculo de la velocidad de transferencia de oxígeno, ya que la velocidad de desplazamiento del oxígeno es inversamente proporcional a la viscosidad del líquido de la película (Geankoplis, 1999). En procesos donde se considera que el espesor y las propiedades de la película se mantienen constantes, se considera que el efecto del retardo sobre la detección de la concentración de oxígeno disuelto, está presente en todos los datos (Linek *et al.*, 1989), y estos de alguna manera pueden relacionarse entre sí para indicar el seguimiento del proceso; pero cuando las propiedades de la película son variables, es difícil distinguir si las variaciones observadas son debidas al proceso o al sistema de detección.

### **I.7.- Método dinámico por variación de presión (MDVP) para la determinación de $k_L a$**

El método dinámico por variación de presión (MDVP), fue propuesto por Linek y colaboradores (1987), como una alternativa para poder cuantificar los efectos de la película de líquido que rodea a los sensores que detectan la concentración de oxígeno disuelto, sobre el coeficiente global de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ). En este método se determina un parámetro ( $L$ ) que sirve para indicar el espesor de la película, el cual es incluido en el cálculo del  $k_L a$ .

El método dinámico por variación de presión, mide el cambio en la concentración de oxígeno disuelto en respuesta a una perturbación introducida en el medio, y relaciona la capacidad de respuesta a la perturbación con la capacidad de transferencia de oxígeno que tiene el medio. La perturbación introducida es un cambio en la presión interna del tanque, la cual se logra al ocluir parcialmente la salida de la corriente de gas que se introduce en el reactor. Al aumentar la presión dentro del tanque la presión parcial del oxígeno dentro de cada burbuja de aire también se incrementa, por lo que hay un incremento en la solubilidad, hasta alcanzar el estado de equilibrio correspondiente a la nueva presión. Como el cambio se lleva a cabo en todas las burbujas al mismo tiempo la determinación es independiente del patrón de mezclado.

### 1.7.1.- Consideraciones teóricas para la aplicación del método dinámico por variación de presión (MDVP)

Para que el cambio en la señal de oxígeno disuelto corresponda a un cambio en la presión parcial de oxígeno dentro de las burbujas, y estos cambios puedan relacionarse con la velocidad de transferencia de oxígeno dentro del reactor se requiere que el oxígeno sea la especie que reaccione al cambio de presión; en una corriente de aire también se encuentran otras especies gaseosas como el nitrógeno y el vapor de agua, por lo que el flux de nitrógeno que también es un gas de baja solubilidad debe ser equimolar con el de oxígeno y la presión de vapor del agua debe permanecer constante en el intervalo de cambio de la presión interna del tanque (cambio pequeño de la presión interna). Así mismo las propiedades de las burbujas de la fase gaseosa como el volumen, la densidad (el gas se comporta como fluido incompresible) y el área superficial deben permanecer constantes durante la determinación, lo que trae como consecuencias prácticas que la temperatura, el hold-up (fracción de gas en la dispersión gas-líquido), y el flujo másico de gas, sean constantes durante la determinación. Y para que el  $k_{La}$  sea el parámetro representativo de la velocidad de transferencia de oxígeno, se requiere que la mayor resistencia a la transferencia sea la película de líquido adyacente a la burbuja.

### 1.7.2.- Descripción del método dinámico por variación de presión (MDVP)

El registro del estado en transitorio ocasionado por el cambio de presión, es la base del cálculo del  $k_{La}$ . El cambio de presión es posible efectuarlo en ambos sentidos, aumentándola o disminuyéndola, pero el incremento es la forma práctica más fácil de lograrlo, y tiene resultados más exactos (Linek *et al.* 1994). El cambio de presión no es mayor a 20 kPa, ya que cambios mayores pueden inducir la nucleación espontánea de las burbujas en el medio y cambiar el patrón de distribución del oxígeno disuelto. Como el cambio en la concentración de oxígeno depende del cambio en la presión dentro de las burbujas, se produce en todos los sitios del reactor al mismo tiempo, sin que intervengan el desplazamiento de las burbujas en las corrientes de líquido, por lo que la determinación de  $k_{La}$  se vuelve independiente del patrón de mezclado. Los cambios que se registran tanto en la concentración de oxígeno como en la presión dentro del tanque, están afectados por las características de funcionamiento de los sensores utilizados. Las respuestas de los sensores se obtienen experimentalmente, mediante la utilización de la teoría de los momentos, que dice que el funcionamiento de los sensores puede deducirse a través de las características de las señales. La respuesta del sensor de oxígeno, obtenida a partir de las señales, es corregida al tomar en cuenta la respuesta de la parte electrónica del sensor, y el espesor de la película de líquido adherida a la superficie del sensor. La respuesta electrónica del sensor se obtiene a partir de la respuesta al cambio en una corriente gaseosa, la cual primero está compuesta por un gas inerte (el más usado es nitrógeno) y después por una corriente que contiene oxígeno (aire, mezclas enriquecidas u oxígeno puro). El cambio puede hacerse en varias opciones descritas por Linek *et al.* (1993). La medida del espesor de la película ( $L$ ) se obtiene experimentalmente a partir de la desviación en la señal obtenida en aire, en donde hay una ausencia de película de líquido sobre la superficie, y la obtenida en el líquido saturado bajo las condiciones de mezclado del tanque. Los momentos de los sensores de presión y de oxígeno (sin considerar el efecto de la película de líquido) se obtienen a partir del área entre la respuesta normalizada de los sensores de oxígeno y presión. El  $k_{La}$  se calcula a través de los momentos de los sensores.

Para ejecutarlo, se realiza de acuerdo con el procedimiento propuesto por Linek *et al.* (1989a, 1989b, 1993, 1994), en donde las principales etapas se describen a continuación:

Obtención de las constantes de respuesta del sensor. El sensor se coloca sobre una válvula de 3 vías, de manera que la corriente de gas actúe perpendicularmente sobre la membrana del sensor. Se hace pasar nitrógeno por la membrana, hasta obtener una lectura de cero, y después se hace pasar aire (a la presión de entrada al tanque), registrándose el % de presión parcial registrado por el sensor cada 3 segundos, durante los primeros 30 segundos y después cada 5 segundos. Los porcentajes de presión parcial se normalizan de acuerdo con la expresión:

$$H_i = \frac{(V_i - V_0)}{(V_f - V_0)} \quad (1.25)$$

Donde  $V_0$  es el valor inicial,  $V_f$  es el valor final, y  $V_i$  es el valor al tiempo  $i$

Los valores experimentales así obtenidos son comparados con valores calculados a partir de la ecuación que describe la respuesta del sensor. Esta ecuación es seleccionada de acuerdo con las características, tipo y marca del sensor. Estas ecuaciones son presentadas por Linek *et al.* (1989). La ecuación para un sensor polarográfico, marca Ingold, (el utilizado en este trabajo) es:

$$H_i = 1 + 2A \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp(-\pi^2 n^2 K_1 t) + 2(1 - A) \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp(-\pi^2 n^2 K_2 t) \quad (1.26)$$

Donde  $H$  es la respuesta normalizada del sensor,  $t$  es el tiempo al que se obtiene la respuesta,  $A$ ,  $K_1$  y  $K_2$  son constantes, y son propuestas para que mediante un procedimiento de regresión no lineal (resuelto mediante la herramienta “Solver” de Excel) iteren hasta encontrar el conjunto que minimice la diferencia entre los valores teóricos y experimentales. La serie  $\sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp(-\pi^2 n^2 K_2 t)$  se utiliza hasta  $n = 4$ , por ser estos los términos más significativos.

Calibrar el sensor en aire. Se hace pasar una corriente de aire (a la presión de entrada al tanque) y se hace pasar perpendicularmente sobre la membrana del sensor. Se calibra a 100 % de presión parcial de oxígeno.

Obtención del parámetro  $L$  (indicador del espesor de la película). Colocar el sensor en el líquido, por el que circula la corriente gaseosa (en nuestro caso aire) y conectar el sistema de agitación del tanque. Registrar el % de presión parcial (el cual por la presencia de la película de líquido, será menor que el obtenido en aire). El parámetro  $L$  se calcula mediante la expresión (1.32) donde  $M_c$  es la señal en aire (100%) y  $ML$  es la señal del sensor en el líquido bajo las condiciones de mezclado existentes en el tanque.

$$L = \frac{M_G - M_L}{M_L} \quad (1.27)$$

Cálculo del momento del sensor de oxígeno con el efecto de la película de líquido incluido ( $b_H$ ), aplicando las ecuaciones que definen la respuesta del sensor:

$$\frac{1}{1+L} = \frac{A}{1+L_1} + \frac{1-A}{1+L_1(K_2/K_1)^{1/2}} \quad (1.28)$$

$$L_2 = L_1 \left( \frac{K_2}{K_1} \right)^{1/2} \quad (1.29)$$

$$b_H = A \left[ \frac{1+L}{(1+L_1)^2} \right] \left[ \frac{1+3L_1}{6K_1} \right] + (1-A) \left[ \frac{1+L}{(1+L_2)^2} \right] \left[ \frac{1+3L_2}{6K_2} \right] \quad (1.30)$$

Obtención de la señal en período de transición. Se cierra parcialmente la salida de gas del tanque, de manera que el aumento de presión no sea mayor a 20 kPa, y se registra a intervalos de tiempo, el cambio en el % de presión parcial y de presión, hasta alcanzar el estado estable.

Normalizar las señales de presión y de presión parcial, usando la expresión (1.30)

Obtener el área entre las curvas de respuesta de los sensores de oxígeno y presión. En este trabajo, el área bajo la curva es calculada usando métodos numéricos, por la técnica de Simpson 1/3 de segmentos múltiples, cuyos requerimientos son tener un número impar de puntos e intervalos regulares entre cada punto. El área entre las curvas normalizadas se relaciona con el momento del sensor de presión ( $b_p$ ) y del sensor de oxígeno en ausencia del efecto de película ( $b_G$ ), mediante la expresión:

$$\text{Área} = b_G - b_p \quad (1.31)$$

Calcular el  $k_L a$  mediante la ecuación:

$$k_L a = \frac{1}{b_G - b_p - b_H} \quad (1.32)$$

## CAPITULO II

### TRANSFERENCIA DE OXÍGENO EN CALDOS DE FERMENTACIÓN

#### II.1.- Ecuación de balance de oxígeno disuelto en caldos de fermentación

La transferencia de oxígeno en una fermentación es un proceso de equilibrio, en donde una vez alcanzada la máxima concentración posible de oxígeno disuelto ( $C^*$ ), de acuerdo con las condiciones de operación del biorreactor y los solutos disueltos en el medio de cultivo, ya no migrara más oxígeno desde la fase gaseosa, a menos que exista un factor que altere esta concentración. En el caldo de fermentación este factor son las células microbianas, las cuales consumen el oxígeno disuelto, producto del proceso de transferencia, para utilizarlo en sus rutas metabólicas, produciéndose una diferencia expresada.

Realizando un balance de oxígeno disuelto en fase líquida, durante una fermentación aerobia se tiene la ecuación:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a(C^* - C_L) - Q \quad (2.1)$$

Donde  $dC_L/dt$  es la velocidad de acumulación de oxígeno disuelto en la fase líquida,  $k_L a$  es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno,  $C^*$  es la concentración de oxígeno disuelto en el equilibrio,  $C_L$  es la concentración de oxígeno disuelto al tiempo  $t$ , y  $Q$  es la velocidad específica de consumo de oxígeno por el microorganismo.

#### II.2.- Efecto de las condiciones de mezclado

Las fermentaciones para la producción de exopolisacáridos son especialmente demandantes desde el punto de vista del consumo de oxígeno (Winkley, 1990; Margaritis y Zajic, 1978), ya que los cambios en las propiedades del caldo se producen en intervalos cortos de tiempo, con cambios en el valor de la viscosidad aparente y las características fisicoquímicas del caldo, no sólo por la acumulación de polímeros de alto peso molecular, sino también porque estos compuestos manifiestan propiedades espesantes, gelificantes y con grupos funcionales activos que pueden unirse a la interfase (Audet *et al.*, 1996). Al inicio de la fermentación se tiene un caldo con características parecidas a las del agua, con un comportamiento reológico de tipo newtoniano (Drevetton *et al.*, 1994) y pocas células en suspensión, así el oxígeno proporcionado por el flujo de aire es suficiente para cubrir las necesidades del microorganismo, produciéndose una acumulación de células y exopolisacárido; conforme avanza la fermentación, se acumula exopolisacárido y otros metabolitos y el caldo se convierte en un fluido no newtoniano de tipo fluidificado por cizalla (en la mayoría de las fermentaciones), cambiando las condiciones de mezclado dentro del tanque, ya que la viscosidad aparente es menor en la región cercana al impulsor y mayor en las cercanías de las paredes del tanque, efecto también se presenta un cambio de las condiciones hidrodinámicas donde se tienen zonas muertas de mezclado en el tanque; de acuerdo con la proporción que guarden entre sí estas zonas se han observado diferencias en las propiedades y la productividad del exopolisacárido, dándole una gran variabilidad a los procesos de obtención de estos metabolitos.

### II.3.- Obtención de la velocidad de transferencia de oxígeno durante la fermentación

Mantener la eficiencia de la transferencia de oxígeno es el principal problema que se tiene al escalar un proceso a nivel industrial competitivo (Bailey y Ollis, 1986). Así, el diseño del proceso fermentativo y la optimización dependen de conocer la velocidad de transferencia de oxígeno en cada uno de los diferentes estados por los que evoluciona el caldo, lo cual no es fácil de obtener, ya que implica la determinación experimental del  $k_L a$ .

Los métodos para cálculo del  $k_L a$  están limitados cuando se aplican en fluidos de comportamiento no newtoniano, de alta viscosidad aparente, donde cambian los patrones de coalescencia de las burbujas y los tiempos de retención de la fase gaseosa.

#### II.3.1.- Estimación del $k_L a$ en caldos de fermentación

Los estudios sobre la transferencia de oxígeno se han llevado a cabo desde los años cuarentas, pero se encuentran espaciados entre sí por períodos cercanos a la década, por lo que después de 60 años muchas de las referencias originales ya no se encuentran disponibles; dado que los trabajos en este campo son escasos y que muchos de los trabajos anteriores a los años ochentas obtuvieron resultados aún vigentes, se les puede encontrar referenciados en revisiones sobre el tema.

Las ecuaciones desarrolladas, en los estudios revisados, indican que bajo condiciones de temperatura y presión constante, serán las variables relacionadas con la energía necesaria para realizar la mezcla gas-líquido como la potencia aplicada por unidad de volumen ( $P_g/V$ ), la velocidad de giro del impulsor (N) y el tiempo de contacto entre las dos fases (expresado como  $v_s$ , velocidad superficial), las que tienen mayor influencia sobre el cálculo del  $k_L a$ .

#### II.3.2.- $k_L a$ en medios newtonianos

Hospadka *et al.* (1942), Cooper, Fernstrom y Miller (1944), y Carlson (1946), estudiaron la absorción de oxígeno en soluciones de sulfito y determinaron  $k_L a$  en tanques con agitadores mecánicos. Los tres trabajos llegaron a ecuaciones del tipo:

$$k_L a = K_H \left( \frac{P_g}{V_L} \right)^a v_s^b \quad (2.2)$$

En el trabajo de Cooper *et al.* (1944), el valor de las constantes es  $K_H = 0.0635$  para un impulsor de disco, 0.0380 para un impulsor de paleta,  $a = 0.95$ ,  $b = 0.67$ , con  $P_g/V_L > 0.06$  HP/m<sup>3</sup> y  $v_s < 21$  m/h.  $k_L a$  en mMO<sub>2</sub>/l atm h.

En 1961 Richards estudió la obtención de  $k_L a$  en fermentaciones de levadura, por el método dinámico, y encontró que para organismos unicelulares que se mantienen en suspensión, de baja viscosidad y sin alta concentración celular, el  $k_L a$  puede ser descrito por una ecuación similar a la de Cooper *et al.* (1944), incluyendo el efecto de la velocidad de agitación. La relación de Richards (1961) es:

$$k_L a = K_R \left( \frac{P_g}{V_L} \right)^a v_s^b N^c \quad (2.3)$$

En el trabajo de Richards (1961) el valor de las constantes es  $K_R = 0.0635$  para un impulsor de disco, 0.0380 para un impulsor de paleta,  $a = 0.40$ ,  $b = 0.50$ ,  $c = 0.5$ , con  $P_g/V_L > 0.06 \text{ HP/m}^3$ ,  $v_s < 21 \text{ m/h}$ ,  $1 \text{ l} < V_L < 100 \text{ l}$ , y  $N$  en rpm.  $k_L a$  en  $\text{mMO}_2/\text{l atm h}$ .

Zlokarnik (1978) propuso una ecuación de la forma:

$$k_L a \left[ \frac{V_L}{q_G} \right] = K_Z \left( \frac{P_g}{V_L \rho_L (v_s^a)^b} \right)^c \quad (2.4)$$

Donde  $K_Z = 0.015$ ,  $a = 1$  para medios acuosos coalescentes,  $b = 2/3$  para medios acuosos coalescentes,  $c = 0.5$  para medios acuosos coalescentes,  $\rho_L$  es la densidad del medio y  $q_G$  es el flujo volumétrico de aire.

Moresi y Patete (1988) presentaron la ecuación:

$$k_L a = K_M \left( \frac{P_g}{V_L} \right)^a \left( \frac{q_G}{V_L} \right)^b \quad (2.5)$$

Donde  $K_M = 0.0229$ ,  $a = 0.7561$ ,  $b = 0.81$

En fermentaciones newtonianas a mayor escala, donde se requiere el uso de impulsores múltiples para mover el líquido, Fukada *et al.* (1966) (en Margaritis y Zajic, 1978), encontraron la relación:

$$k_L a = (\beta + \gamma N_i) \left( \frac{P_g}{V_L} \right)^a v_s^b \quad (2.6)$$

En medios de composición compleja, donde los componentes abaten la solubilidad del oxígeno Wang *et al.* en 1979 (en Schugerl, 1981) propusieron dividir el  $k_L a$  de las ecuaciones de Richards (Eq. 2.3) y Fukada(1966) (Eq. 2.6) entre la constante de solubilidad del medio.

Shin *et al.* (2000) incorporaron el efecto de la concentración celular en las ecuaciones para estimación del  $k_L a$  (Badino, 2001)

$$k_L a = K_S \left( \frac{P_g}{V_L} \right)^a v_s^b (1 + \alpha X + \beta_1 X^2)^c \quad (2.7)$$

Donde  $X$  es la concentración celular en g/L



Galation *et al.* (2004) propusieron una correlación para estimar el  $k_L a$ , en reactores con impulsores múltiples tipo turbina, que es utilizable tanto en caldos newtonianos como en los no newtonianos. Esta correlación fue probada por los autores en caldos de bacterias (*Propionibacterium shermanii*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y hongos (*Penicillium chrysogenum*).

$$k_L a = \alpha_1 X^a \left( \frac{P_g}{V_L} \right)^b v_s^c \quad (2.8)$$

Donde  $\alpha_1$  es un parámetro de la ecuación, X es la concentración de biomasa en  $g_{p/seco}/l$ ,  $P_g/V_L$  esta en  $W/m^3$ ,  $V_L < 10 l$ ,  $v_s$  en  $m/s$  y  $k_L a$  en  $s^{-1}$ . Para una fermentación no newtoniana con *Penicillium chrysogenum*,  $\alpha_1 = 33.59$ ,  $a = -1.012$ ,  $b = -0.0463$ ,  $c = 0.94$ .

En caldos de fermentación donde la viscosidad del medio se incrementa Ryu y Humphrey (1972) incorporaron el efecto de la viscosidad aparente a la ecuación de  $k_L a$

$$k_L a = K_{hr} \left[ \frac{P_g}{V_L} \right]^a (v_s)^b (\eta)^c \quad (2.9)$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad aparente del medio.

### II.3.3.- $k_L a$ en medios no newtonianos

Para caldos de fermentación de comportamiento no newtoniano, con viscosidades aparentes bajas, aplica la ecuación de Ryu y Humphrey (1972) (Eq. 2.9), o las ecuaciones de Fukada (1966) (Eq. 2.6) y Shin (2000) (Eq. 2.7) incorporando el factor de la viscosidad aparente ( $\eta$ ) con su exponente correspondiente.

En medios altamente viscosos se impide la coalescencia de las burbujas y el área de la interfase, generada en la región de alta turbulencia cerca del impulsor, es estable durante el tiempo que las burbujas tardan en circular por el tanque; por lo que la transferencia de oxígeno en vez de expresarse en los términos de variables relacionadas con la dispersión del gas en el líquido, también está influida por el tiempo de circulación, expresado en términos de la geometría del tanque y del impulsor.

Así Atkinson y Mavituna (1991) reportan las relaciones 2.10 y 2.11:

$$k_L a (C^* - C_L) = K_{At} P_g^a \quad (2.10)$$

Donde K aumenta cuando el diámetro del impulsor disminuye, y  $a = 0.46$  para un cultivo de *Streptomyces niveus* en tanque agitado por impulsor de 6 paletas planas.

$$\log[k_L a (C^* - C_L)] = \alpha_2 \log(K_{1t} \pi N D_i) + K_{2t} \quad (2.11)$$

Donde  $\alpha_2$ ,  $K_{1t}$  y  $K_{2t}$  son constantes de la ecuación,  $K_{1t}$  y  $K_{2t}$  dependen de la geometría del impulsor,  $N$  es la velocidad de giro del impulsor (rpm) y  $D_i$  es el diámetro del impulsor.

Ollis (1977) (en Atkinson y Mavituna, 1991) propuso la relación:

$$k_L a = 0.13 \left( \frac{\rho_L D_i}{\eta_a} \right)^{2/3} \left( \frac{\left[ \frac{P_g}{V_L} \right] \eta}{\rho_L^2} \right)^{1/4} \quad (2.12)$$

En 1978 Yagi y Yoshida, propusieron las siguientes ecuaciones:

Para medios fluidificados por cizalla (pseudoplásticos), no coalescentes, con índices de consistencia de 0.0117 a 1.32 Pa\*s<sup>n</sup> e índices de flujo de 0.42 a 0.95, agitados en tanque con un impulsor de 6 paletas planas.

$$\left( \frac{k_L a D_i^2}{D_{O_2}} \right) = 0.06 \text{Re}^{1.5} \left( \frac{ND_i}{g} \right)^{0.19} \left( \frac{\eta}{\rho_L D_{O_2}} \right)^{0.5} \left( \frac{v_s \eta}{\sigma} \right)^{0.6} \left( \frac{ND_i}{v_s} \right)^{0.32} (1 + 2De^{0.5})^{-0.67} \quad (2.13)$$

Donde  $D_{O_2}$  es la difusividad del oxígeno en el medio,  $\sigma$  es la tensión en la interfase del medio y  $De$  es el número de Deborah ( $De = \lambda * N$ , con  $\lambda = 0.67$ )

Para medios coalescentes:

$$k_L a \left( \frac{\rho_G}{V_L} \right)^{-1} = K_E \left( \frac{P_G}{\rho_G} \right)^a \left( \frac{ND_i}{g} \right)^b (\sigma)^c (Si)^d \quad (2.14)$$

Donde  $Si$  es el factor de coalescencia del medio.

Hirose y Moo-Young (Margaritis y Zajic, 1978) propusieron:

$$\left( \frac{k_L a D_i^2}{D_{O_2}} \right) = 0.65 \left( 1 - \frac{4n(n-1)}{2n-1} \right)^{1/2} (Pe)^{1/2} \quad (2.15)$$

Donde  $Pe$  es el número de Peclet, y  $n$  es el índice de comportamiento al flujo

Taguchi y Minamoto (1966), Taguchi y Yoshida (1966) encontraron en fermentaciones miceliarias y en suspensiones de pulpa:

$$\frac{k_L a}{N_i} = K_{tm} \left( \frac{D_T^2 h}{W L_p (D_i - w)} \right)^a (N_i t)^b \left( \frac{D_i}{D_T} \right)^c \quad (2.16)$$

Donde  $K_{tm}$  es constante,  $D_T$  es el diámetro del tanque,  $h$  es la altura de líquido,  $N_i$  es el número de impulsores,  $W$  es el ancho de paleta del impulsor,  $L_p$  es la altura de la paleta del impulsor y  $w$  es el espacio entre las paletas.

Li *et al.* (2000) proponen una relación entre el  $k_L a$ , la velocidad del impulsor ( $N$ ) y la viscosidad aparente ( $\eta_a$ ) para caldos de fermentación de *Aureobasidium pullulans* y *Xanthomonas campestris*.

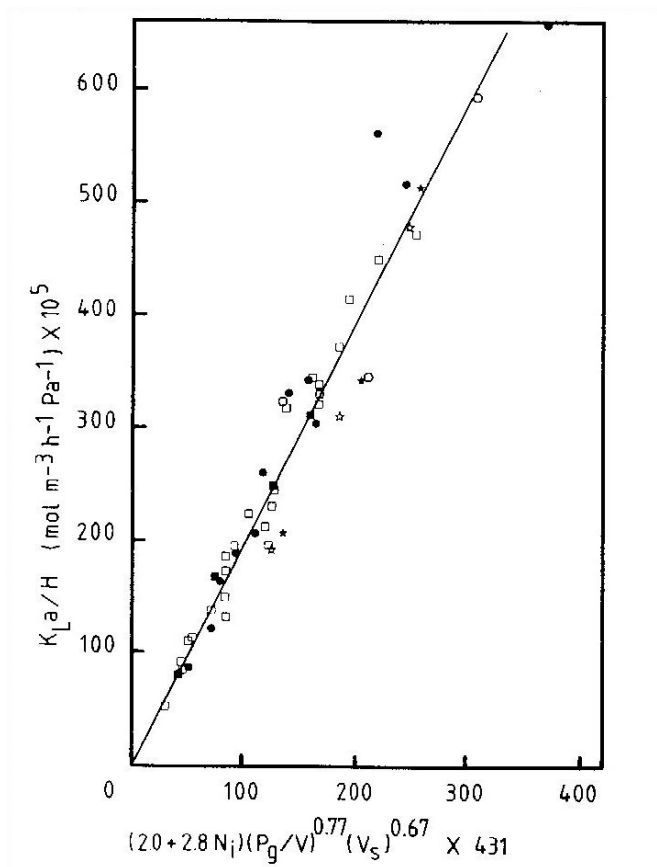
$$\left( \frac{k_L a D_i^2}{D_{O_2}} \right) = K \left( \frac{\eta}{\rho_L D_{O_2}} \right)^{0.23} \left( \frac{\eta}{\mu_w} \right) \quad (2.17)$$

Donde  $D_{O_2}$  es la difusividad del oxígeno en el medio,  $D_i$  es el diámetro del impulsor y  $\mu_w$  es la viscosidad del agua.

### II.3.4.- Aplicabilidad de las correlaciones para el cálculo de $k_L a$

Las ecuaciones utilizadas con mayor frecuencia para calcular el  $k_L a$ , son aquellas donde el  $k_L a$  es una función de las variables que controlan el proceso de dispersión del gas en el líquido, como la ecuación de Richards (1961) (Eq. 2.3), la de Fukada (1966) (Eq. 2.6) o la de Ryu y Humphrey (1972) (Eq. 2.9).

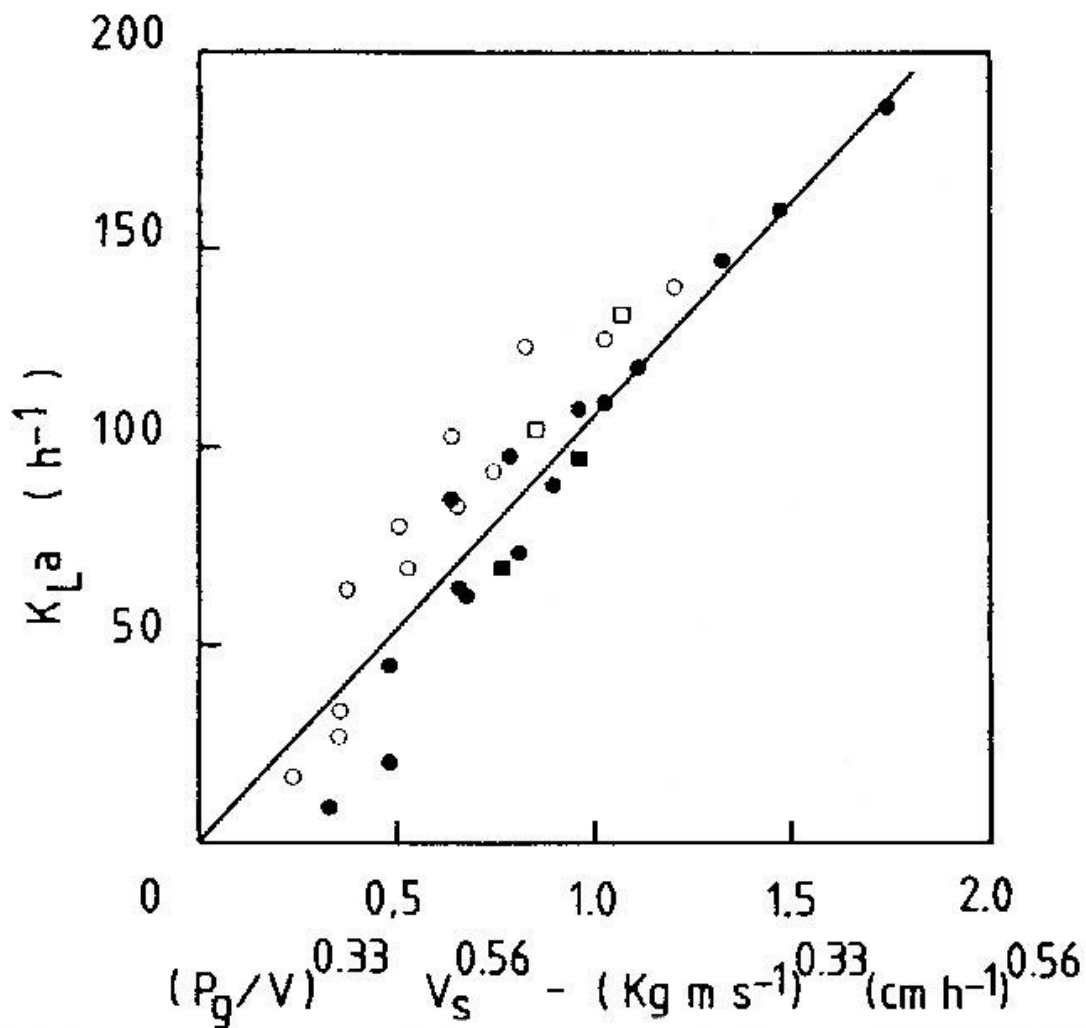
Cuando se usan estas ecuaciones para predecir el  $k_L a$  de fermentaciones newtonianas, la mayoría de los autores (Badino, 2001) coinciden en que no se encuentran desviaciones mayores al 25 %, entre los valores experimentales y los pronosticados, como puede observarse en la figura 2.1 (tomada de Atkinson y Mavituna, 1991), donde se aplica la ecuación de Fukada (1966) (Eq. 2.6)



**Figura 2.1.-** Relación  $k_{L,a}$  experimental vs.  $k_{L,a}$  pronosticado empleando la ecuación de Fukada (1966) (Eq. 2.6), en fermentaciones newtonianas

En fermentaciones no newtonianas la opción de estimar el  $k_{L,a}$  a partir de correlaciones es poco utilizada; las ecuaciones de Ryu y Humphrey (1972), y Yagi y Yoshida (1978), son las ecuaciones que tienen una mayor aplicabilidad en el pronóstico del  $k_{L,a}$  en fluidos no newtonianos, en cuanto a la amplitud del intervalo de condiciones de operación y geometrías de tanque que pueden describir. Aun así se ha encontrado que los datos de  $k_{L,a}$  pronosticados se acercan a los experimentales sólo en limitados intervalos de trabajo, así la ecuación de Ryu y Humphrey (1972) puede presentar desviaciones hasta del 80% cuando se le emplea en fermentaciones de reología evolutiva (Salgado, 1994). Herbst *et al.* (1987), en su estudio sobre la transferencia de oxígeno en caldos para producción de xantana reportaron desviaciones de la ecuación de Yagi y Yoshida (1978) en un factor hasta 65 veces más grande del valor pronosticado con respecto al experimental, con un error promedio del 143%.

Así las ecuaciones mostradas, son aproximaciones al comportamiento del  $k_{L,a}$  en una fermentación no newtoniana, como puede observarse en la figura 2.2 (tomada de Demain, 1986), donde se presentan los datos para un caldo de *Endomyces sp.* a 30,100, 5000 y 50000 L, y la aplicación de la ecuación de Ruy y Humphrey (1972) (Eq. 2.9).



**Figura 2.2.-** Relación  $k_{La}$  experimental vs.  $k_{La}$  pronosticado usando la ecuación de Ryu y Humprey (1972) (Eq. 2.9), en fermentaciones no newtonianas

Galaction *et al.*, (2004) hicieron un recuento de los factores que hacen que las correlaciones encontradas en sistemas newtonianos para determinar el  $k_{La}$  no se ajusten a las condiciones de una fermentación real no newtoniana, en las cuales las velocidades de transferencia de oxígeno son más bajas que las calculadas con ecuación. Entre los factores que causan esta desviación, mencionan la adsorción de las células vivas sobre la superficie de las burbujas, que disminuye el área de interfase efectiva, el cambio de los patrones de coalescencia producidos por los otros metabolitos de la célula, y el que la velocidad de transferencia de oxígeno no sea proporcional a la potencia aplicada (como indican las ecuaciones 2.3 a 2.9), ya que la máxima velocidad de transferencia de oxígeno puede alcanzarse a bajos valores de potencia aplicada.

## II.4.- Estrategias para estudiar el efecto del oxígeno en fermentaciones para producción de polisacáridos

Debido a la importancia que tiene el oxígeno sobre la productividad de las fermentaciones, existen múltiples estudios sobre su efecto, la mayoría no cuantifica la velocidad de transferencia de oxígeno, ni determina  $k_La$  sino que se basan en el efecto del flujo de aire. Los trabajos que definen la relación del oxígeno con las propiedades de una fermentación, se pueden clasificar como:

- a) Fermentaciones con TOD (tensión de oxígeno disuelto) controlada
- b) Sistemas modelo (soluciones de polisacárido con o sin partículas sólidas que simulen la presencia de células vivas)
- c) Estudios sobre transferencia de oxígeno

### II.4.1.- Fermentaciones con %TOD controlada

La mayoría de los estudios sobre fermentaciones para producción de exopolisacáridos se realizan bajo tensión de oxígeno disuelto (% TOD), que es la forma como se indica la concentración de oxígeno soluble cuando se usan sensores polarográficos, constante; contrarrestando el efecto del consumo del microorganismo con un incremento en el flujo de la fase gaseosa o de la velocidad de agitación. Algunos ejemplos son los trabajos de: Funahashi *et al.*, (1987), Funahashi *et al.*, (1988), Peters *et al.* (1989), Amanullah (1998a), Amanullah (1998b), Serrano-Carreón (1998), Casas *et al.* (2000). Mantener un %TOD controlado permite observar los cambios en la acumulación de producto y la productividad volumétrica, siendo fácilmente distinguibles los efectos del cambio de variables de operación como el flujo de gas, la potencia aplicada, la velocidad de agitación, la reología del caldo y la geometría del tanque y del impulsor. En estos trabajos no se cuantifica una variación en el  $k_La$ .

### II.4.3.- Sistemas modelo (soluciones de polisacárido con o sin células artificiales)

Un sistema modelo es un fluido de características reológicas similares a un caldo de fermentación. Se considera que el comportamiento del caldo a un tiempo específico puede ser descrito a partir de soluciones de polisacárido que tengan las mismas características reológicas; o bien se puede simular la posible evolución del caldo realizando un barrido de concentraciones. Bajo este enfoque se han realizado una cantidad limitada de investigaciones. Se determina el  $k_La$  y se busca establecer una relación con las variables de operación como la velocidad del gas y la potencia aplicada. Los resultados obtenidos se han ajustado a la ecuación de Ryu y Humphrey (1972) (Eq. 2.9). Entre los trabajos realizados se encuentran:

Audet *et al.* (1996) estudiaron el comportamiento del  $k_La$  en medios de fermentación artificiales compuestos por soluciones de polisacárido (dextrana) y perlas de agar para simular células, utilizando diferentes concentraciones de partículas, velocidades del gas y niveles de potencia aplicada.

Tecante *et al.* (1996) estudiaron el comportamiento del  $k_La$  en soluciones de polisacárido, utilizando diferentes polímeros, concentraciones, velocidades del gas y niveles de potencia aplicada, en tanques agitados con listones helicoidales.

Wang *et al.*, (1996) estudiaron el comportamiento del  $k_L a$  en soluciones de polisacárido, utilizando diferentes velocidades del gas y niveles de potencia aplicada.

Hardjomidjojo *et al.*, (1997) estudiaron el comportamiento del  $k_L a$  en medios de fermentación artificiales compuestos por soluciones de polisacárido (xantana) y células muertas de *Krebsiella*, utilizando diferentes velocidades del gas y niveles de potencia aplicada.

Ozbek y Gayik (2001) estudiaron el comportamiento del  $k_L a$  en medios de fermentación artificiales compuestos por soluciones de glicerol y fragmentos de esponja para simular células, utilizando diferentes concentraciones de partículas, velocidades del gas y niveles de potencia aplicada, y se encontró que los datos de  $k_L a$  tienen una proporcionalidad con los parámetros de la ecuación de Ryu y Humphrey (1972), aunque no indican si la correlación con la ecuación es posible.

#### II.4.3.- Estudios sobre transferencia de oxígeno en fermentaciones para producción de polisacáridos

En fermentaciones para producción de polisacáridos, los trabajos sobre la evolución de las condiciones de transferencia de masa, son escasos. Los trabajos realizados, en esta área, son:

Herbst *et al.* (1987) realizaron el estudio sobre la evolución del  $k_L a$  en la fermentación para producción de xantana, en tanque con impulsores tipo Intermig. Pudieron determinar  $k_L a$  por el método dinámico en volúmenes inferiores a 50 L. En los tanques de 50 L se utilizaron soluciones de xantana para simular el caldo. Encontraron un efecto de la velocidad de aireación que incrementaba el  $k_L a$  a bajas concentraciones de polisacárido, mientras que a altas concentraciones de polisacárido un incremento de la velocidad de aireación ya no produce efecto sobre el  $k_L a$ . También establecieron que el  $k_L a$  es proporcional a la viscosidad aparente del caldo de acuerdo con la ecuación:

$$k_L a \propto \eta^{-0.7} \quad (2.18)$$

Yagi y Yoshida en 1975 encontraron una relación similar en caldos con actinomicetos, pero a un intervalo de viscosidad menor (1-60 mPa\*s) al utilizado por Herbst *et al.* (1987) (1-600 mPa\*s).

$$k_L a \propto \eta^{-0.4} \quad (2.19)$$

La influencia de  $P_g/V_L$  y el flujo de aireación no pudo ser descrita a través de ecuaciones.

Vashitz *et al.* (1988), estudiaron un cultivo continuo en tanque agitado para la producción de xantana, utilizaron una cepa modificada de *Xanthomonas campestris* que produce una proteína extracelular que reacciona con el oxígeno disuelto del medio al aplicar un estímulo electromagnético, que genera una reacción de bioluminiscencia que permite cuantificar el  $k_L a$ . Validan el método de bioluminiscencia comparándolo con el método dinámico en sistemas

modelo. Encontraron que el  $k_L a$  es proporcional a la velocidad de rotación del impulsor, de acuerdo con la ecuación:

$$k_L a \propto N^{X_d} \quad (2.20)$$

A bajas viscosidades aparentes ( $K < 10 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ ) el valor de  $X_d$  es variable para cada  $K$  probado, mientras que para altas viscosidades aparentes ( $10 < K < 30 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ )  $X_d$  es constante para cada  $K$  utilizado y tiene un valor de 1.6.

Vashitz y Ulitzur (1989), utilizaron un cultivo en tanque agitado para la producción de xantana, con la misma cepa modificada de *Xanthomonas campestris* del trabajo anterior. Describen el comportamiento del  $k_L a$  en el caldo de fermentación sólo en la zona de alta viscosidad, sin referencia al comportamiento del coeficiente de transferencia de masa en las etapas del cultivo con baja viscosidad. La relación reportada para el comportamiento del  $k_L a$  en zona de baja viscosidad fue encontrada utilizando sistemas modelo. Encontraron que el  $k_L a$  es proporcional a la velocidad de rotación del impulsor y a la viscosidad aparente del caldo ( $k_L a \propto N^a \eta^b$ ). Los datos de  $k_L a$  obtenidos se ajustaron a la ecuación 2.21, basada en la ecuación de Yagi y Yoshida (1978) (Eq. 2.13):

$$\left( \frac{k_L a D_T^2}{D_{O_2}} \right) = K_3 \text{Re} \left( \frac{N^2 D_T}{g} \right) \left( \frac{\eta}{\rho_L D_{O_2}} \right) \quad (2.21)$$

Mientras que la relación con las variables de operación es.

$$k_L a = K_4 N^{p_1} \eta^{q_1} \quad (2.22)$$

Donde el valor de  $K_4$  es 2.5-2.6, para zona de baja viscosidad  $p_1 = 1.5$ ,  $q_1 = 0$  ( $K < 10 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ ), en la zona de alta viscosidad ( $10 < K < 30 \text{ Pa}\cdot\text{s}^n$ )  $p = 2.4$ ,  $q = -0.9$ .

Vashitz y Ulitzur (1989) mostraron datos exploratorios sobre el balance de oxígeno en la fermentación. La ecuación de balance es la base para el cálculo del consumo microbiano, el cual aproximaron como:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C^* - C_L) - Q \quad (2.23)$$

En ausencia de aireación:

$$\frac{dC_L}{dt} = -Q \quad (2.24)$$

Aproximado como:

$$\frac{\Delta d_L}{\Delta t} = -Q \quad (2.25)$$



Con la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $Q$ ) expresada como %TOD/s.

Vashitz y Ulitzur (1989) indicaron que hay una relación lineal entre el consumo y el  $k_L a$ , que es lo esperado de acuerdo a la forma de las ecuaciones 2.23 a 2.25. Sin embargo los datos mostrados, por los mismo autores, a velocidades de agitación de 800 y 900 rpm ya no son lineales.

Pons *et al.* (1990) obtuvieron el  $k_L a$  durante la fermentación para producción de xantana, en tanque y columna agitados. Pudieron determinar  $k_L a$  durante toda la fermentación, en intervalos muy cortos de tiempo, pero no lo pudieron correlacionar con las variables de operación; tampoco describen cómo son los cambios de valor del  $k_L a$  en el transcurso del tiempo. Reportaron velocidades de consumo de oxígeno por el cultivo de bacterias de  $8.77 \text{ mol O}_2/\text{kg}_{\text{biomasa}}\text{h}$ , y velocidades de transferencia de oxígeno entre 25 y  $15 \text{ molO}_2/\text{m}^3\text{h}$ . Consideraron que para valores pequeños de  $C_L$  (abajo del 10% de saturación), la ecuación de balance de oxígeno disuelto puede describirse como:

$$Q = k_L a C^* \quad (2.26)$$

Dreveton *et al.* (1994) obtuvieron el  $k_L a$  durante la fermentación para producción de gelana, utilizando diferentes configuraciones de impulsores (helicoidales con turbina de seis paletas), bajo diferentes velocidades de agitación y aireación. Cuantificaron las condiciones de mezclado, y el trabajo se centra en ellas, pues no pudieron determinar  $k_L a$  durante toda la fermentación, en algunos casos al incrementarse la viscosidad del caldo ya no fue posible determinar  $k_L a$  (calculado por balance de gases), en otros casos la cepa presentó problemas de asimilación de la fuente de nitrógeno, y a bajas velocidades de agitación el crecimiento fue escaso y se tuvo que recurrir al control del %TOD para poder observar el aumento de viscosidad. En las fermentaciones donde se pudo calcular  $k_L a$ , este no se logro correlacionar con las condiciones del caldo. Los autores describen como son los cambios de valor del  $k_L a$  en el transcurso del tiempo, sin relacionarlo con alguna otra variable. En sus datos hay indicativos de que el  $k_L a$  no tiene una relación directa con el %TOD (o  $dC_L/dt$ ) como indican Vashitz y Ulitzur (1989), puesto que mientras el %TOD cae a casi cero, el  $k_L a$  tiene una tendencia diferente.

Los trabajos realizados en fermentaciones para producción de polisacáridos, difieren significativamente de los realizados en sistemas modelo, ya que aunque se aplica un esquema de estudio similar, variando las condiciones de operación, no se establecen relaciones directas, a excepción del trabajo de Vashitz y Ulitzur, 1989, entre las variables de operación, las propiedades del caldo y la velocidad de transferencia de oxígeno. Los valores de  $k_L a$  presentan un patrón errático, y la velocidad de transferencia de oxígeno no se reporta; a pesar de conocer la evolución de la velocidad de transferencia de oxígeno que permitiría obtener un proceso productivo menos variable, escalable y optimizado. En todos los trabajos para cuantificación de la velocidad de transferencia de oxígeno se presentaron dificultades experimentales para el cálculo del  $k_L a$ , teniendo que recurrir a combinar formas de operación y valores de  $k_L a$  obtenidos en sistemas modelo. El único estudio que describe relaciones cuantitativas entre la velocidad de transferencia de oxígeno con variables de operación y consumo microbiano (Vashitz y Ulitzur, 1989) corresponde al que utilizó un método para el cálculo del  $k_L a$  independiente de las condiciones de mezclado en el tanque.

## II.5.- Estrés en fermentaciones

La razón por la cual se tiene poca información sobre los procesos de transferencia de oxígeno durante la producción de polisacáridos, es porque dependen de la consideración básica de que el microorganismo debe funcionar como un biocatalizador, sin que sus procesos internos intervengan en la velocidad de transformación del oxígeno; lo cual resulta utópico en un fermentador real, donde el sistema no se encuentra aislado, sino que forma un microambiente en comunicación con el exterior.

El factor que hace que la transformación del oxígeno en producto sea más lenta, es llamado “condición de estrés”. Si el estrés no lesiona la integridad de la célula, es llamado estrés subletal. El estrés es una respuesta de las células al cambio en las condiciones de su medio ambiente (Campbell, 1987; Meyer, 1985), y los microorganismos productores de polisacáridos pertenecen a un grupo taxonómico (Enterobacterias) caracterizado por la rapidez y variedad de las respuestas adaptativas que presentan a cualquier cambio en las condiciones microambientales (Brock y Madigan, 1991).

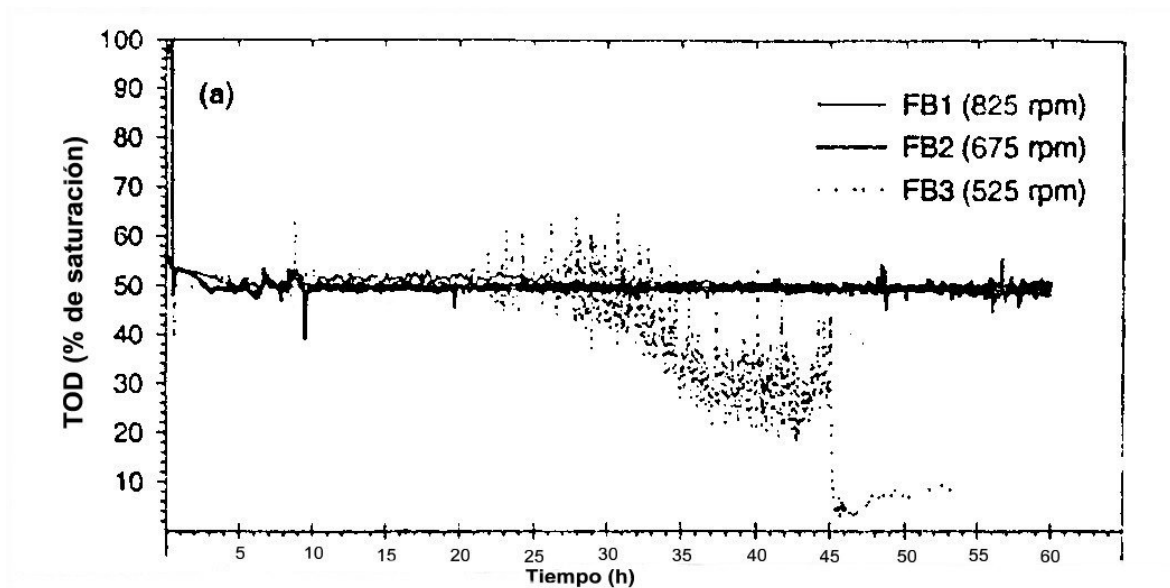
Herbst *et al.* (1987) determinaron la demanda de oxígeno para diferentes actividades metabólicas durante la fermentación para producción de xantana, y encontraron que la demanda de oxígeno para la síntesis de polisacárido ( $70 \text{ mgO}_2/\text{g}_{\text{cel}} \text{ h}$ ) era menor a la requerida para la formación de biomasa ( $182 \text{ mgO}_2/\text{g}_{\text{cel}} \text{ h}$ ) y la de mantenimiento ( $78 \text{ mgO}_2/\text{g}_{\text{cel}} \text{ h}$ ), por lo que el principio de transformación inmediata (biocatalizador) no se cumple, y el proceso es mixto en cuanto a que intervienen tanto la velocidad de transferencia de oxígeno como la velocidad de la reacción bioquímica.

### II.5.1.- Efecto del estrés subletal en el consumo de oxígeno

Las condiciones de estrés subletal afectan al consumo de oxígeno; en cuanto una cepa es sometida a la condición de estrés el oxígeno disuelto en el caldo de fermentación ya no presenta una tendencia de aumento o disminución regular, y se convierte en un sistema de tipo oscilante.

Esgalhado *et al.* (2002), en su estudio sobre la producción de xantana bajo condiciones de estrés ácido, encontraron que los patrones de variación del %TOD eran repetibles hasta que se adicionaba un pulso de ácido (a las 36 horas de fermentación) creando la condición de estrés. Una vez bajo estrés la cepa produce un patrón de variación del %DTO de tipo oscilante.

Amanullah *et al.* (2002) encontraron que en un cultivo miceliar, cuando se baja la agitación y se entra en una condición de estrés, un sistema que tiene un patrón de variación de oxígeno regular, adquiere un comportamiento oscilante (ver figura 2.3).



**Figura 2.3.-** Cambio de una concentración de oxígeno disuelto constante a un sistema oscilante de consumo de oxígeno por estrés subletal (Amanullah *et al.*, 2002).

Vanrolleghem *et al.* (2004) describen en un cultivo de bacterias un patrón similar de oscilación de la concentración de oxígeno disuelto, que se presenta cuando se agrega un pulso de agente provocador de estrés (similar a lo observado por Esgalhado *et al.*, 2002), y describen esta variación a través de una ecuación diferencial de primer orden, similar a la que describe la respuesta transitoria de un controlador.

No se tienen antecedentes de que se haya reconocido los efectos del estrés subletal en fermentaciones para producción de polisacáridos, aunque en los perfiles de consumo de oxígeno de Herbst *et al.* (1987), Pons *et al.* (1990) y Dreveton *et al.* (1994) muestran que el sistema se encontraba en estrés (ver figura 2.4). En estas condiciones el consumo de oxígeno puede describirse a través de ecuaciones que indiquen como desaparece un nutriente del medio que rodea a una población bacteriana, de acuerdo con lo encontrado por Chudoba *et al.* (1992), Grady *et al.* (1996) y Goudar y Ellis (2001) en sus trabajos sobre la caracterización de los parámetros cinéticos de cepas degradadoras de compuestos tóxicos en donde las poblaciones se desarrollan en condiciones de estrés.

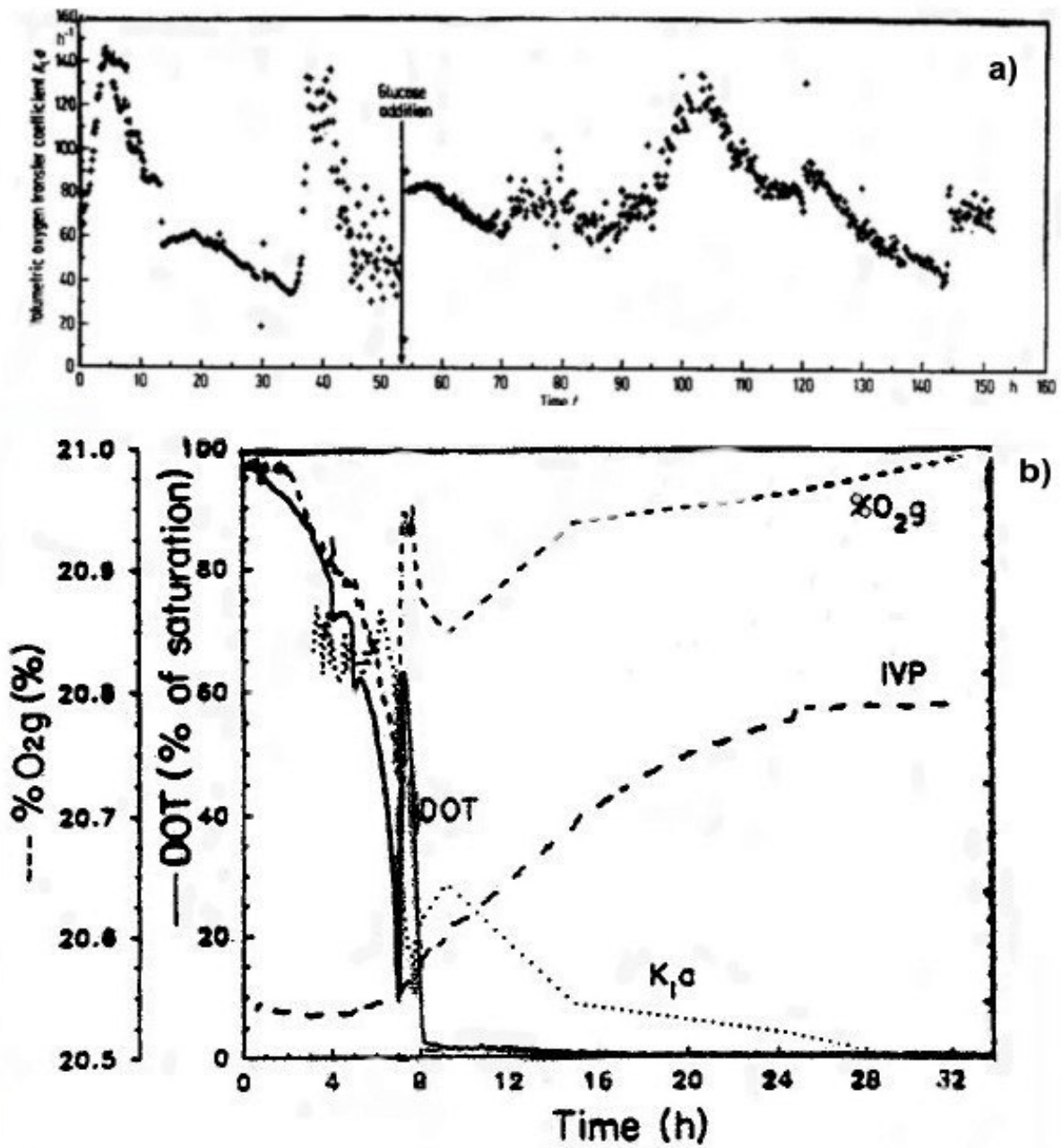


Figura 2.4.- Consumo de oxígeno en fermentaciones para producción de polisacáridos, bajo condiciones de estrés a) Datos de Pons *et al.*, 1990 b) Datos de Drevetón *et al.*, 1994.

## CAPITULO III JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

### III.1.- Justificación

Existe poca información de cómo se modifica la velocidad de transferencia de oxígeno a medida que transcurre el proceso fermentativo para la producción de exopolisacáridos bacterianos, a pesar de que conocer su variación puede permitir la optimización y seguimiento del proceso, a fin de obtener lotes de concentraciones homogéneas.

El principal impedimento para conocer la evolución de la velocidad de transferencia de oxígeno, es la dificultad experimental para determinar el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) ya que los métodos empleados tienen limitaciones de uso al llegar a fases avanzadas de la fermentación, o al emplear volúmenes grandes. Las limitaciones están dadas por las condiciones de mezclado a volúmenes grandes, por el cambio de las características reológicas y por las características de la detección de oxígeno disuelto. Las condiciones reológicas alteran los tiempos de retención de las burbujas y las condiciones de mezclado dentro del biorreactor. Por otro lado el uso de sensores sumergidos, para detectar la concentración de oxígeno disuelto, requiere separar los efectos causados por la transferencia y consumo de oxígeno de aquellos atribuibles al funcionamiento del sensor, como el tiempo de respuesta y el espesor de la película de líquido que le rodea.

El método dinámico por variación de presión (MDVP) tiene fundamentos teóricos, principalmente el cambio de la concentración de oxígeno disuelto por el cambio en la presión de oxígeno en la burbuja de gas y no por la distribución de burbujas en el biorreactor (Linek *et al.* 1987), que permiten prever una determinación del  $k_L a$  con mayor independiencia de las condiciones reológicas y de mezclado del caldo, al mismo tiempo que incluye en el cálculo del  $k_L a$  los efectos de la detección empleando sensores sumergidos. Así mismo se ha encontrado que es aplicable en volúmenes grandes de fluido (Linek *et al.* 1994).

Sin embargo, el método dinámico por variación de presión (MDVP) se ha empleado solamente en la determinación de  $k_L a$  en soluciones acuosas; por lo que es necesario identificar si bajo condiciones de producción del exopolisacárido (presencia de nutrientes, células vivas y producto acumulado) las características del método se mantienen.

### III.2.- Estrategia de estudio

Para identificar las características de la determinación de  $k_L a$  en el proceso fermentativo en una primera etapa experimental se realizó la determinación de  $k_L a$  en soluciones modelo (soluciones de polisacáridos de características reológicas similares a los caldos de fermentación), para determinar el efecto del incremento de la viscosidad, del cambio en los índices de consistencia y comportamiento al flujo.

Posteriormente se estudió el efecto del agregado de los nutrientes para formar medios de cultivo, y de la velocidad de consumo de oxígeno por bacterias productoras de exopolisacáridos.

Finalmente el método dinámico por variación de presión (MDVP) se empleó para la obtención del  $k_La$  durante procesos de fermentación para obtención de exopolisacáridos, de acuerdo con un diseño experimental con dos niveles de aireación (2.4 y 12 litros aire/minuto), dos niveles de agitación (100 y 200 rpm) y tres cepas bacterianas productoras de exopolisacáridos, *Sphingomonas paucimobilis* productor de gelana, *Xanthomonas campestris*, productor de xantana y *Leuconostoc mesenteroides* productor de dextrana.

### III.3.- Hipótesis

El método dinámico por variación de presión es aplicable para el cálculo del  $k_La$  en caldos de fermentación para la producción de exopolisacáridos, y fluidos modelo de características similares a los caldos de fermentación.

### III.4.- Objetivos

Los objetivos planteados para la presente tesis son:

- 1) Determinar el efecto del incremento de la viscosidad, el índice de consistencia, el índice de comportamiento al flujo, la composición del medio de cultivo y el consumo celular sobre la determinación de  $k_La$  por el método dinámico de variación de presión (MDVP).
- 2) Cuantificar la velocidad de transferencia de oxígeno en fermentaciones para producción de exopolisacárido utilizando el método dinámico de variación de presión (MDVP) para la determinación de  $k_La$ .
- 3) Identificar las condiciones que afectan la determinación de  $k_La$ , por el método dinámico de variación de presión (MDVP), en fluidos modelo y durante un proceso fermentativo para producción de exopolisacáridos.

## CAPÍTULO IV METODOLOGIA

### IV.1.- Biorreactor

Se utilizó un biorreactor, tipo tanque enchaquetado de acero inoxidable, de 20 L de capacidad, con fondo hemisférico, agitador mecánico central y puertos para muestreo e instrumentación. El diámetro del tanque fue 13.3 cm con 4 placas deflectoras de 1.5 cm de ancho. En la tapa del reactor se instalaron 2 puertos con extensión de tubing de acero inoxidable de 1/8 in; en uno de los puertos se instaló una válvula reguladora para restringir la salida del flujo de aire, en el otro puerto se instaló un sensor digital para medición de presión (Cole-Parmer, USA). El flujo de aire se introduce al tanque a través de un difusor de anillo, de 10.2 cm de diámetro colocado bajo el impulsor. El impulsor utilizado es un listón helicoidal de 9.7 cm de diámetro, con un listón de 1.59 cm de ancho y 1.59 mm de espesor. A la flecha del impulsor se acopló un torquímetro externo (modelo MCRT 28001T, Himmelstein) con un detector (modelo 66032 S, Himmelstein). El volumen de trabajo en el tanque fue de 12 L.



**Figura 4.1.-** Biorreactor empleado

### IV.2.- Mediciones de presión

La presurización del tanque se realizó restringiendo la salida del aire del reactor cerrando parcialmente la válvula reguladora del puerto sobre la tapa del tanque. El sensor de presión se conectó directamente al otro puerto de salida, para medir la presión del gas en el interior del tanque.

### IV.3.- Cálculo de la concentración de oxígeno disuelto

La máxima solubilidad del oxígeno en el medio de cultivo ( $C^*$ ) se calculó a través del procedimiento propuesto por Schumpe y Quicker (1982), en donde se considera la disminución de la solubilidad del oxígeno por la presencia de los componentes del medio. En el tanque se colocó un sensor polarográfico para oxígeno marca Ingold acoplado a un detector. El % de tensión de oxígeno disuelto (%TOD) indicado por el sensor se convierte a concentración de oxígeno disuelto ( $C_L$ ) mediante la ley de Henry; donde la constante de Henry (H) incluye el efecto de los solutos y se expresa como coeficiente de Bunsen ( $\alpha$ )

### IV.4.- Determinaciones de potencia aplicada

La potencia gaseada se calculó con la expresión

$$P_g = \frac{2\pi NT}{60} \quad (4.1)$$

Donde  $P_g$  es la potencia gaseada transmitida al fluido,  $N$  es la velocidad de rotación del impulsor (rpm) y  $T$  es el torque real desarrollado por el fluido. El torque real se calculó sustrayendo al torque experimental ( $T_F$ ) el torque residual ( $T_R$ ) que es el torque desarrollado por el giro del impulsor en el tanque vacío.

$$T = T_F - T_R \quad (4.2)$$

### IV.5.- Mediciones reológicas

Los parámetros reológicos de los fluidos utilizados en la caracterización del MDVP y de las muestras de los caldos de fermentación, se obtuvieron a 30 °C en un viscosímetro rotacional (Haake Rotovisco RV20), usando sensores en configuración de cilindros huecos. Los sensores empleados fueron el NV-II (volumen de muestra 9 mL, relación de radio 1.02, gap 0.35 mm) y MV-II (volumen de muestra 45 mL, relación de radios 1.14, gap 2.6 mm), con un intervalo de cizalla de 0-1000  $s^{-1}$ .

### IV.6.- Determinación de $k_L a$

Dado que el método dinámico por variación de presión (MDVP) ha sido empleado preferentemente en soluciones acuosas, se comparó con el método dinámico por intercambio de gases (MDIG), que es el método empleado con mayor frecuencia para la determinación del  $k_L a$  en fermentaciones.

En el método dinámico por intercambio de gases (MDIG), se tiene el medio líquido al que se suministra aire. Cuando se inicia la determinación se sustituye la corriente de aire por una con gas carente de oxígeno, generalmente nitrógeno, que desplaza al aire a medida que se cumple el tiempo de residencia de las burbujas en el líquido. Este desplazamiento causa una



baja en la concentración de oxígeno disuelto. Después se vuelve a alimentar aire y se mide la recuperación en la concentración de oxígeno disuelto.

El método dinámico por intercambio de gases (MDIG) no considera:

- 1) El tiempo de respuesta del sensor
- 2) La película de líquido adherida al sensor
- 3) La dinámica de las burbujas de gas retenidas en el líquido

El tiempo de respuesta del sensor corresponde a la diferencia de tiempo que hay entre el momento en que se tiene la concentración en el líquido y aquel en que es detectado. La concentración de oxígeno es detectada por una reacción química del oxígeno con un electrolito, contenido en un compartimiento de un sensor. La reacción produce una transferencia de electrones que se convierte en una diferencia de potencial eléctrico que viaja a través del sensor y llega a un detector.

La película de líquido adherida al sensor se forma al sumergirlo en el líquido. El oxígeno disuelto en el medio líquido debe atravesar esta película, además de la membrana del sensor, y el electrolito que rodea a los electrodos del sensor; estas dos últimas resistencias se consideran muy pequeñas en comparación con la resistencia que presenta la película de líquido. La presencia de esta película de líquido afecta en gran medida a los cálculos de la velocidad de transferencia de masa porque produce un retardo en la detección de la concentración verdadera en el medio, ya que mientras el oxígeno atraviesa la película, el sensor seguirá marcando la concentración anterior, quedando el cambio verdadero enmascarado por un factor de tiempo. Cuando la viscosidad del medio aumenta, el espesor y la viscosidad de la película se vuelve un factor crítico para el cálculo de la velocidad de transferencia de oxígeno, ya que la velocidad de desplazamiento del oxígeno es inversamente proporcional a la viscosidad del líquido de la película (Geankoplis, 1999). En procesos donde el espesor y las propiedades de la película se mantienen constantes, se considera que el efecto del retardo sobre la detección de la concentración de oxígeno disuelto, está presente en todos los datos (Linek *et al.*, 1989), y éstos de alguna manera pueden relacionarse entre sí para indicar el seguimiento del proceso, pero cuando las propiedades de la película son variables, es difícil distinguir si las variaciones observadas son debidas al proceso o al sistema de detección.

La dinámica de las burbujas de gas retenidas tiene un efecto pronunciado en dos aspectos, la concentración de oxígeno disuelto detectada y el tiempo en que se da el cambio de la concentración de oxígeno durante la fase transitoria. Al detectar la concentración de oxígeno disuelto se asume que es uniforme en todos los puntos de la mezcla gas-líquido, y por lo tanto también se asume que la distribución de burbujas de gas también será homogénea (condición llamada mezclado perfecto). El mezclado perfecto también permite asumir que el tiempo de retención de todas las burbujas es igual. Cuando se tienen zonas de mezclado diferenciado se presentan diferentes tiempos de retención para las burbujas de gas. En grandes volúmenes de líquido, el desplazamiento de las burbujas de gas constituye una fuente de error de fuerte impacto (Rainer, 1990).

Considerando el tiempo de respuesta del sensor, la película de líquido adherida y la dinámica de las burbujas de gas, el método dinámico por intercambio de gases (MDIG), estaría recomendado para determinación del  $k_{L,a}$  en dispersiones gas-líquido donde el tiempo de respuesta del sensor y el espesor de la película de líquido adherida al sensor sean constantes,

donde se tenga mezclado perfecto y se utilicen volúmenes pequeños de líquido en donde el tiempo de retención de las burbujas de gas sea pequeño en comparación con el tiempo de duración de la señal transitoria.

El método dinámico por variación de presión (MDVP), fue propuesto por Linek y colaboradores (1987), como una alternativa para poder cuantificar los efectos de la película de líquido que rodea al sensor, el tiempo de respuesta del sensor y la retención de las burbujas de gas, sobre el coeficiente global de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ).

En el MDVP la perturbación introducida es un cambio en la presión interna del tanque (no mayor a 20 kPa, ya que cambios mayores pueden inducir la nucleación espontánea de las burbujas en el medio), la cual se logra al ocluir parcialmente la salida de la corriente de gas que se introduce en el reactor. Al aumentar la presión dentro del tanque la presión parcial del oxígeno dentro de cada burbuja de aire también se incrementa, por lo que hay un incremento en la solubilidad, hasta alcanzar el estado de equilibrio correspondiente a la nueva presión. El registro de este estado transitorio es la base del cálculo del  $k_L a$ .

Como el cambio en la concentración de oxígeno depende del cambio en la presión dentro de las burbujas, se produce en todos los puntos del reactor al mismo tiempo, sin que intervengan el desplazamiento de las burbujas en las corrientes de líquido, por lo que la determinación de  $k_L a$  se vuelve independiente del patrón de mezclado.

Los cambios que se registran tanto en la concentración de oxígeno como en la presión dentro del tanque, están afectados por las características de funcionamiento de los sensores utilizados. Las respuestas de los sensores se obtienen experimentalmente, mediante la utilización de la teoría de los momentos, que dice que el funcionamiento de los sensores puede deducirse a través de las características de las señales.

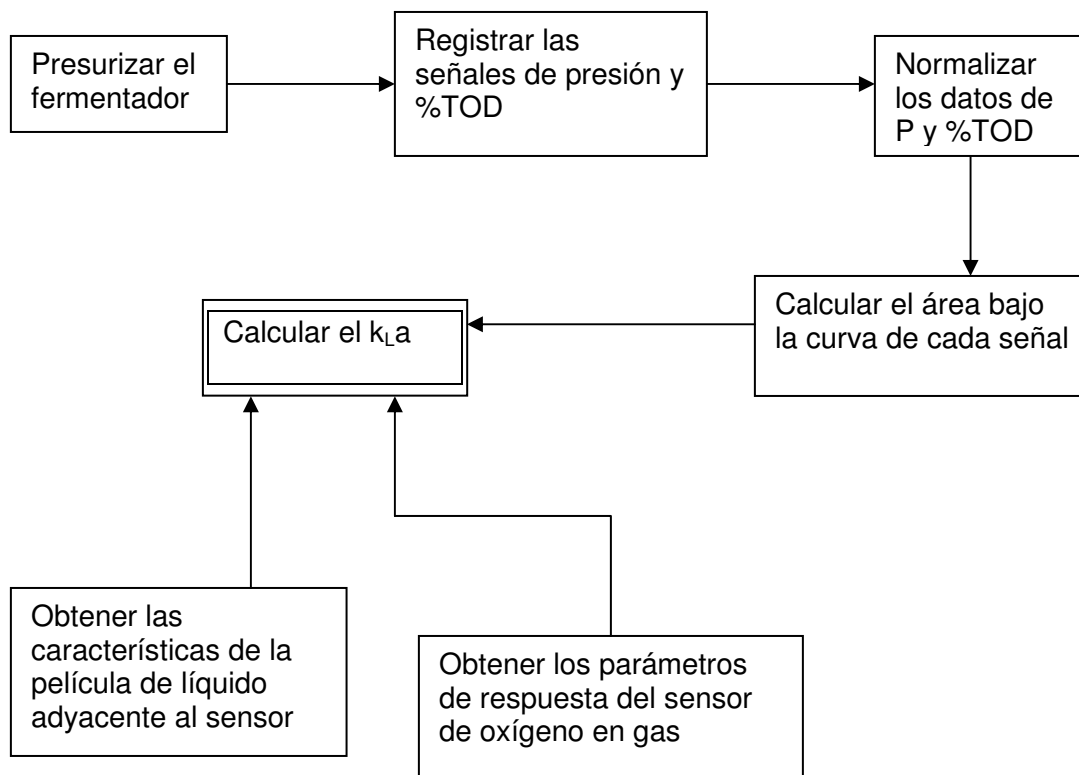
La concentración de oxígeno obtenido a partir de las señales, es corregida al tomar en cuenta la respuesta de la parte mecánica del sensor, y el espesor de la película de líquido adherida a la superficie del sensor.

La respuesta no estacionaria del sensor se obtiene a partir de la respuesta al cambio en una corriente gaseosa, la cual primero está compuesta por un gas inerte (el más usado es nitrógeno) y después por una corriente que contiene oxígeno (aire, mezclas enriquecidas u oxígeno puro). El cambio puede hacerse en varias opciones descritas por Linek *et al.* (1993), donde las constantes de respuesta del sensor se obtienen colocando el sensor sobre una válvula de 3 vías, de manera que la corriente de gas actúe perpendicularmente sobre la membrana del sensor. Se hace pasar nitrógeno por la membrana, hasta obtener una lectura de cero, y después se hace pasar aire (a la presión de entrada al tanque), registrándose el porcentaje de presión parcial registrado por el sensor cada 3 segundos, durante los primeros 30 segundos y después cada 5 segundos. Los porcentajes de presión parcial de oxígeno se normalizan (ver ecuación 1.25 capítulo I).

La medida del efecto del espesor de la película sobre la señal de oxígeno (parámetro L) se obtiene experimentalmente a partir de la desviación en la señal obtenida en aire, en donde hay una ausencia de película de líquido sobre la superficie que se calibra al 100% de saturación, y la obtenida en el líquido saturado bajo las condiciones de mezclado del tanque.

Los momentos de los sensores de presión y de oxígeno (sin considerar el efecto de la película de líquido) se obtienen a partir del área entre la respuesta normalizada de los sensores de oxígeno y presión. El  $k_L a$  se calcula a través de los momentos de los sensores (ver ecuaciones 1.25 a 1.32, capítulo I).

De acuerdo con lo propuesto para el método dinámico por variación de la presión (MDVP) por Linek *et al.* (1989a, 1989b, 1993, 1994), el diagrama del procedimiento para la determinación de  $k_L a$  por MDVP se presenta en la figura 4.2.



**Figura 4.2.-** Diagrama para la determinación de  $k_L a$  por MDVP

#### IV.7.- Selección de fluidos modelo

Los fluidos modelo, empleados en este trabajo, son similares a los esperados en la producción de exopolisacáridos bacterianos; fluidos de viscosidad variable, con comportamiento reológico fluidificado por cizalla (pseudoplástico).

Los fluidos modelo se prepararon disolviendo a diferentes concentraciones de glicerol y jarabe de glucosa, para conseguir soluciones newtonianas de viscosidad variable; y disolviendo polisacáridos a diferentes concentraciones para obtener soluciones no newtonianas.

Con las soluciones newtonianas de viscosidad creciente se estudio el efecto del incremento de la viscosidad sobre el  $k_{1a}$  calculado por el MDVP. En estos fluidos también se determinó el  $k_{1a}$  por el método dinámico de intercambio de gases (Gogate y Pandit, 1999; Rainer, 1990), desgaseando con nitrógeno y midiendo la respuesta a la restauración del aire. El intervalo de viscosidad en los fluidos newtonianos corresponde con los intervalos utilizados en estudios de caracterización de métodos dinámicos reportados por Ozbek y Gayik (2001) y Rainer (1990).

En las soluciones no newtonianas se estudió el efecto del índice de consistencia (K) y del índice de comportamiento al flujo (n). Los fluidos seleccionados cubren un intervalo de viscosidad de 0.85 a 346 mPa\*s, de índice de consistencia (K) de 0.0622 a 4.41, y de índice de comportamiento al flujo de 1 a 0.41. Los intervalos de K y n son lo más cercanos posibles, a lo esperado en un sistema de fermentación para los exopolisacáridos considerados en este trabajo: Gelana (*Sphingomonas paucimobilis*), xantana (*Xanthomonas campestris*) y dextrana (*Leuconostoc mesenteroides*) (ver anexo 2). Todas las cepas utilizadas fueron cepas de producción estándar sin características sobreproductoras.

La temperatura de los fluidos (30 °C) fue seleccionada por ser la temperatura de producción de las fermentaciones para producción de polisacáridos.

Cada fluido probado se agitó a 3 velocidades diferentes (100, 200 y 300 rpm).

La viscosidad y los parámetros reológicos de los fluidos utilizados se presentan en las tablas 4.1 y 4.2.

**Tabla 4.1**  
Viscosidad de los fluidos newtonianos a 30 °C

Fluido	Clave	Viscosidad (mPa*s)
Agua		0.85
Solución de glicerol al 81%	GL81	76
Solución de glicerol al 86%	GL86	85
Solución de jarabe de glucosa 76%	GS76	222
Solución de jarabe de glucosa 78%	GS78	279
Solución de jarabe de glucosa 80%	GS80	343

**Tabla 4.2**  
Parámetros reológicos (de acuerdo con el modelo de la potencia) de los fluidos no newtonianos a 30 °C

Fluido	Clave	K (mPa*s <sup>n</sup> )	n (adimensional)
Solución de goma de algarrobo 2	LBG2	0.0622	0.85
Solución de goma guar 2	GU2	0.1450	0.80
Solución de goma de algarrobo 1	LBG1	0.3470	0.70
Solución de goma guar 1	GU1	0.6060	0.58
Solución de goma karaya	KAR	4.4100	0.41

#### IV.8.- Medios de cultivo para fermentaciones

Los medios de cultivo utilizados para la producción de exopolisacáridos fueron: Medio S (Martins y Sa-Correia, 1994), medio Silman-Bagley para producción de polisacáridos (Pons, *et al.*, 1990) y medio cazu (café-azúcar) para producción de dextrana (formulado para este trabajo). La composición de estos medio se presenta en la tabla 4.3

**Tabla 4.3**  
Composición de los medios de cultivo

Componente (g/L)	Medio de Cultivo		
	S	Silman-Bagley	cazu
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10.000		18.9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.000		9.1
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.000		
NaCl	1.000		
MgSO <sub>4</sub>	0.200	0.3	
CaCl <sub>2</sub>	0.010	0.5	
FeSO <sub>4</sub>	0.001		
Extracto de levadura	1.000	1.0	1.0
Peptona de caseína	1.000		
Glucosa	20.000	25.0	20.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		5.0	
Extracto de malta		1.0	
Peptona		1.7	
Extracto de café			1.0

#### IV.9.- Microorganismos utilizados

*Sphingomonas paucimobilis* ATCC 35461 (productor de gelana, proveniente de ATCC), *Xanthomonas campestris* CDBB-B-157 (productor de xantana, proveniente de la colección microbiana del CINVESTAV-IPN) y *Leuconostoc mesenteroides* (productor de dextrana, proveniente de la FQ-UNAM). Ninguna de las cepas utilizadas en este trabajo fue sobreproductora del exopolisacárido.

#### IV.10.- Conservación de las cepas

*Xanthomonas campestris* y *Leuconostoc mesenteroides* se conservaron en tubos con agar inclinado de medio infusión cerebro corazón, cubiertos de aceite mineral y mantenidos en refrigeración a 4 °C. La bacteria *Sphingomonas paucimobilis* es un microorganismo que rápidamente produce variantes no productoras de polisacárido (Martins y Sá-Correia, 1991), por lo que se desarrolló un método para mantener la viabilidad de la cepa, y se conservó a 20°C en tubos con agar inclinado de medio S, sin cobertura de aceite para permitir el paso de oxígeno, en atmósfera humidificada para reducir la deshidratación del agar (Carbajal *et al.*, 1999).

#### IV.11.- Técnicas analíticas

A las muestras de los caldos de fermentación se les cuantificó el contenido de biomasa, la concentración de sustrato residual y la concentración de polisacárido, de acuerdo con las técnicas indicadas en la tabla 4.4. La técnica de cuantificación del polisacárido, desarrollada en este trabajo, se presenta en el anexo 1.

**Tabla 4.4**

Técnicas de análisis para muestras de caldos de fermentación

Determinación	Técnica	Referencia
Biomasa	Peso seco	Apha (1982), Brewster <i>et al.</i> (1978)
Sustrato residual	Azucares totales por fenol-sulfúrico	Calmet y García Monjo (1979)
Polisacárido	Semipurificación del polisacárido por extracción etanólica de las células, y cuantificación por azucares totales por el método del fenol-sulfúrico	Carbajal <i>et al.</i> (2002)

Cada determinación se realizó por triplicado, los datos de producción se reportan en el anexo 3 y el valor mostrado es el promedio de las tres determinaciones. Las muestras de caldo se procesaron de acuerdo con el diagrama mostrado en la figura 4.3.

La desviación estándar promedio de las determinaciones de sustrato residual fue de 5.3%, la de exopolisacárido de 2.1% y la de biomasa de 8.7%.

##### IV.11.1.- Determinación de biomasa por peso seco

La muestra de caldo de fermentación se diluyó para permitir la centrifugación de los sólidos suspendidos (células y polisacárido). La muestra se centrifugó 20 minutos a 3500 rpm, obteniéndose un floculo que contiene células (biomasa) y polisacárido. El flóculo se separó del sobrenadante, y se colocó en un recipiente a peso constante. Si el flóculo se deshidrata rápidamente; el polisacárido en la superficie al estar en contacto con el calor forma una capa impermeable que no permite la salida del líquido en el interior; como la forma del flóculo es irregular, la cantidad de líquido remanente es variable en cada muestra. Para evitar ese efecto, la muestra se sometió a una deshidratación previa colocándola en refrigeración durante 12 horas, para después colocarla en un horno de calor seco a 60 °C durante 24 horas. Al término del secado el recipiente con la muestra se pesó, obteniéndose por diferencia el peso de la materia seca contenida en el flóculo. El contenido de biomasa se obtiene al restarle al peso obtenido en esta determinación, el peso del polisacárido semi purificado.

#### **IV.11.2.- Determinación de la concentración de sustrato residual**

El sobrenadante obtenido del proceso de centrifugación para recuperación de biomasa se usó para la determinación de sustrato residual, en forma de azúcares totales. La determinación de azúcares totales es aconsejable cuando se manejan polisacáridos, ya que éstos en su forma nativa contienen sustituyentes que pueden hidrolizarse y alterar una determinación de azúcares reductores.

A partir del sobrenadante se realizó la dilución necesaria, 1:100, 1:20 y 1:10. Se hicieron reaccionar 2 mL de la dilución con 0.1 mL de solución de fenol al 80% y 5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puro, agitando suavemente para evitar una reacción exotérmica que proyecte el líquido fuera del tubo, y se dejó reposar hasta enfriar. La solución desarrolló un color canela que se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm; el valor de absorbancia obtenido se interpoló en una curva tipo elaborada con glucosa para los medios de *S. paucimobilis* y *Xanthomas campestris*, y con sacarosa para los medios de *Leuconostoc mesenteroides*.

#### **IV.11.3.- Determinación de la concentración de exopolisacárido**

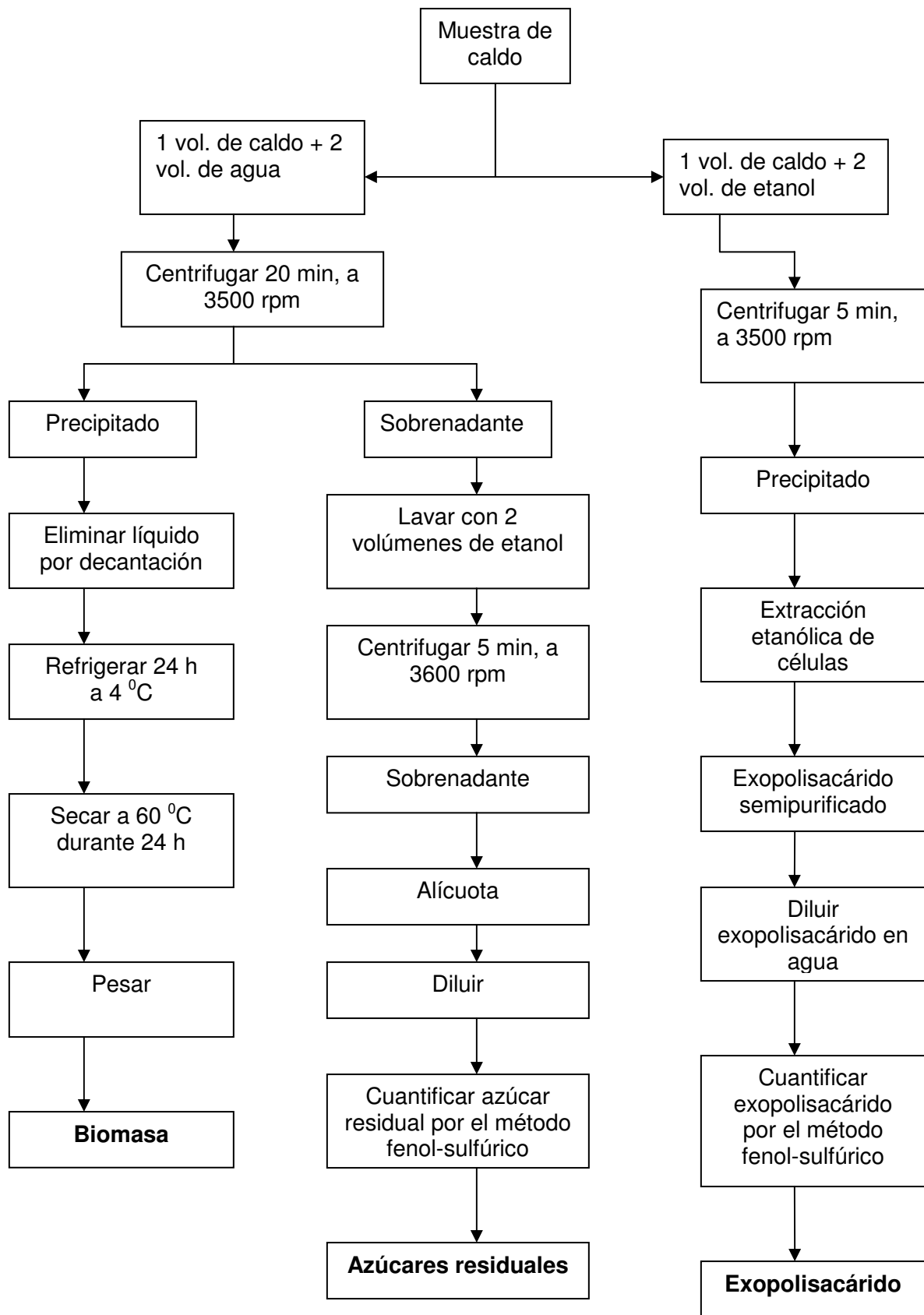
Para ser cuantificado, el exopolisacárido debe estar libre del material proteínico presente en el caldo pues éste reacciona con el fenol y el ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) formando un precipitado. Para ello se realizó una etapa de semipurificación del polisacárido que eliminó material proteínico pero no las sales asociadas (ver anexo 1).

La muestra de caldo se sometió a precipitación por disolvente (etanol a 4 °C). El precipitado se separó por centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos, y contiene células y exopolisacárido. Las células se separaron por extracción etanólica (la validación de la técnica puede consultarse en el anexo 1), obteniéndose hebras de exopolisacárido que se disolvieron en 2 mL de agua destilada.

En la solución resultante, el polisacárido es cuantificado como azúcares totales por la técnica del fenol-sulfúrico descrita en el punto IV.11.2. La absorbancia obtenida se interpoló en curvas tipo de gelana, xantana y dextrana, según corresponda al microorganismo utilizado.

#### **IV.11.4.- Cálculo de parámetros cinéticos**

Los datos de concentración de biomasa, azúcar residual y exopolisacárido obtenidos durante las fermentaciones (reportados en el anexo 3), se emplearon para calcular las velocidades específicas de crecimiento ( $\mu$ ), consumo de sustrato ( $r_s$ ) y formación de exopolisacárido ( $r_p$ ), mediante las velocidades de cambio de concentración de biomasa ( $dX/dt$ ), azúcar residual ( $dS/dt$ ) y exopolisacárido ( $dP/dt$ ). El cálculo de estos parámetros se encuentra en el anexo 3.

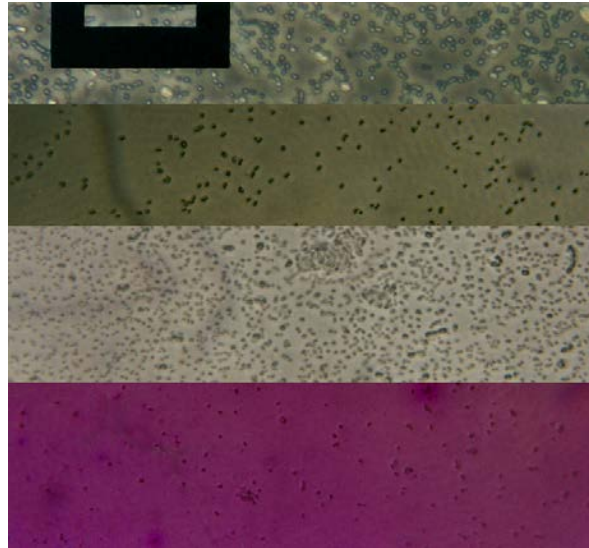


**Figura 4.3.-** Tratamiento de las muestras de caldo para cuantificación de biomasa, azúcar residual y exopolisacárido



#### IV.12.- Tinción para seguimiento de la pureza del cultivo

Se tomó una alícuota de la muestra de caldo de fermentación para realizar una tinción fija ST-PF (modificación de la descrita por Salle, 1988) con la finalidad de identificar exopolisacáridos y microorganismos extraños que pudieran estar contaminando el caldo.



**Figura 4.4.-** Tinción para identificación de exopolisacáridos y microorganismos extraños (técnica ST-PF)

#### IV.13.- Preparación del inóculo

Los microorganismos en conservación son reactivados por siembra en estría en placas de agar infusión cerebro corazón e incubados a 30 °C durante 72 h. De esta primera resiembra, se tomó una asada y se sembró nuevamente en placa y se incubó a 30 °C durante 48 horas. De la caja de la segunda resiembra, se tomó una asada y se sembró una placa nueva que se incubó a 30 °C por 24 horas. Los microorganismos de la tercera resiembra fueron usados para inocular un matraz con 150 mL de medio S, el cual fue incubado con agitación de 150 rpm a 30 °C durante 24 horas. El contenido del matraz se utilizó para inocular un tanque semilla (reactor Bioflo de laboratorio de 2 L) con 1.2 L de volumen de trabajo; la edad del inóculo fue 12 horas, en fase exponencial de crecimiento, equivalente a una densidad óptica de  $0.959 \pm 0.015$  a 540 nm.

#### IV.14.- Condiciones de operación

Durante las fermentaciones se mantuvo constante la temperatura (30 °C) y el pH de 7 (en caso necesario, fue ajustado con KOH 4 N).

Se varió la velocidad de giro del impulsor (N), empleándose 100 y 200 rpm como velocidades de agitación, y el flujo de aire en el tanque: 12 L/min (equivalente a 1 vvm) y 2.4 L/min (equivalente a 0.2 vvm).

4.5. La distribución de condiciones de operación y microorganismo se muestra en la tabla

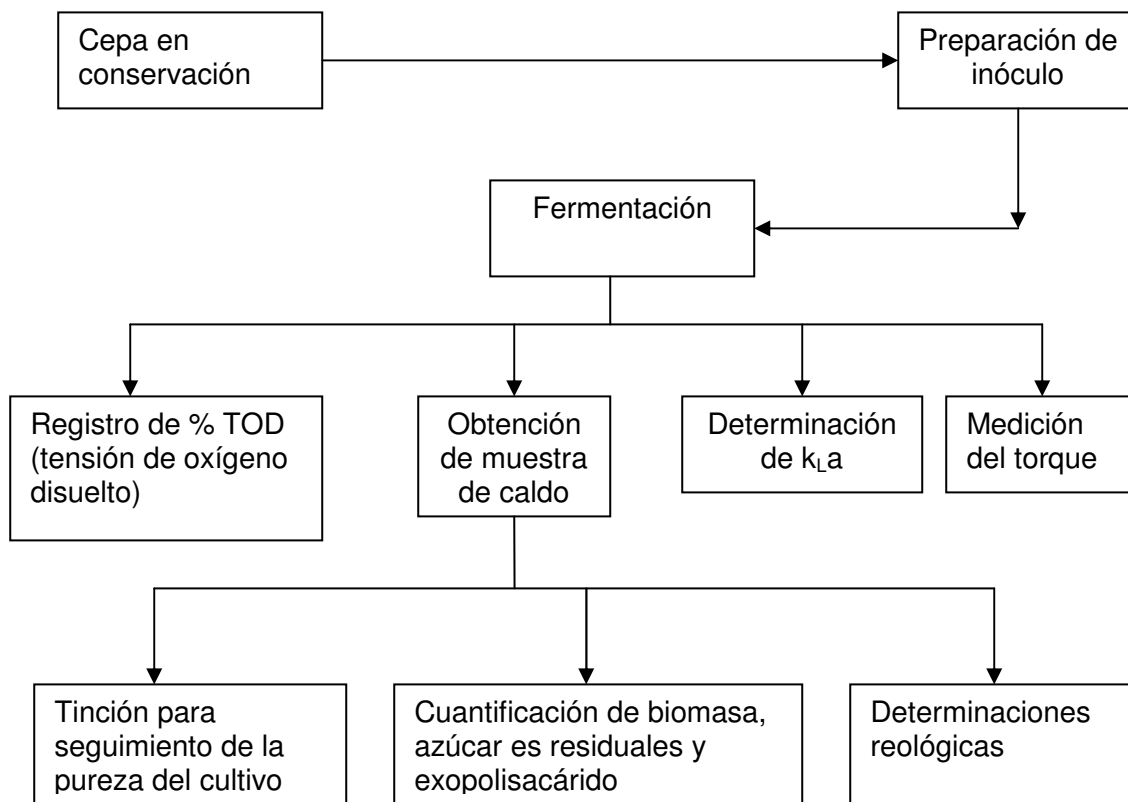
**Tabla 4.5**  
Condiciones de operación de las fermentaciones realizadas

Microorganismo	N (rpm) ( $F_a = 12 \text{ L/min}$ )		Flujo de aire (L/min) ( $N = 200 \text{ rpm}$ )	
	100	200	12	2.4
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	F1	F2	F2	F7
<i>Xanthomonas campestris</i>	F3	F4	F4	F8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	F5	F6	F6	F9

Adicionalmente se realizó un control de producción con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* (F10), en un fermentador de laboratorio con volumen de operación 3.5 L, las condiciones de operación fueron 30 °C, agitación de 200 rpm y flujo de aire de 3.5 L/min, equivalente a 1 vvm.

#### IV.15.- Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron de acuerdo con el diagrama mostrado en la figura 4.5



**Figura 4.5.-** Diagrama de seguimiento de las fermentaciones

#### **IV.16.- Estabilización del medio de cultivo**

Al inicio de la fermentación se debe tener cuidado en la preparación del medio de cultivo, para evitar que durante las primeras horas no se pueda determinar la VTO. En los medios para producción de polisacáridos donde se tiene material nitrogenado y altas concentraciones de monosacáridos, el medio de cultivo se divide en dos lotes que se esterilizan por separado para evitar reacciones de caramelización; normalmente la solución de azúcar se agrega al medio junto con el inóculo; como el azúcar tiene un fuerte efecto sobre la solubilidad del oxígeno, modifica la concentración de equilibrio del oxígeno en el medio, y la concentración empieza a variar hasta que se completa el mezclado, y de ahí no se estabiliza, sino que reinicia el proceso de saturación del medio, que para el volumen de trabajo del reactor utilizado es un proceso que tarda entre 2 y 4 horas. En estas condiciones, no se puede discriminar si la variación de oxígeno soluble es por la modificación de la concentración de equilibrio del medio o por el consumo por parte del microorganismo.

#### **IV.17.- Eliminación de las burbujas de aire en caldos de cultivo**

En los caldos de fermentación, una vez alcanzada la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo; se observó una retención de pequeñas burbujas de gas. A fin de establecer el efecto de las burbujas retenidas, se empleó un blanco de caldo sin burbujas de aire.

El caldo fue retirado del tanque en condiciones asépticas, y colocado en refrigeración a 4 °C durante 48 horas para eliminar el gas retenido en el líquido; después el caldo se regresó al tanque, y se volvió a suministrar aire, reactivando el consumo por las células.

## CAPITULO V PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### V.1.- Cálculo del $k_L a$ por el MDVP

El caso que aquí se detalla corresponde a la determinación del  $k_L a$  para agua a 100 rpm, 12 L de volumen de trabajo, impulsor de listón helicoidal, 30 °C, y líquido saturado con aire

Los datos de la respuesta transitoria en aire, se correlacionan mediante regresión no lineal con la ecuación (5.1) para calcular los parámetros característicos del sensor de oxígeno.

$$H = 1 + 2A \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp(-\pi^2 n^2 K_1 t) + 2(1 - A) \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \exp(-\pi^2 n^2 K_2 t) \quad (5.1)$$

Donde H es la respuesta normalizada del sensor en aire, y los valores  $V_d$ ,  $V_i$  y  $V_f$  se obtienen tomando lecturas del porcentaje de oxígeno en el aire detectado por el sensor cada 5 segundos.

$$H = \frac{(V_i - V_0)}{(V_f - V_0)} \quad (5.2)$$

Donde  $V_i$  es el valor de la señal considerada,  $V_0$  el valor de la señal al inicio de la determinación y  $V_f$  el valor de la señal al final de la determinación.

Los datos experimentales de H, junto con los de tiempo se introducen a la herramienta Solver de Excel para realizar un ajuste no lineal a la ecuación (5.1) que minimice el error. Así para el sensor utilizado, los parámetros son:

$$A = 0.8023, K_1 = 0.0591, K_2 = 0.0047$$

El valor de L (indicativo del espesor de película) se calcula usando la ecuación:

$$L = \frac{M_G - M_L}{M_L} \quad (5.3)$$

Donde  $M_G$  es la señal del sensor en el aire calibrada a 100%, y  $M_L$  es la señal del mismo sensor en agua a 100 rpm, correspondiente a una lectura experimental del 96 %, por lo que  $L = 0.0417$

Los valores de las constantes  $L_1$ ,  $L_2$  que relacionan la respuesta electrónica del sensor y el parámetro de espesor la película de líquido adherida(L) con el momento del sensor de oxígeno con película adherida ( $b_H$ ) se obtienen mediante las ecuaciones:

$$\frac{1}{1 + L} = \frac{A}{1 + L_1} + \frac{1 - A}{1 + L_1(K_2/K_1)^{1/2}} \quad (5.4)$$

$$L_2 = L_1 \left( \frac{K_2}{K_1} \right)^{1/2} \quad (5.5)$$

$$b_H = A \left[ \frac{1+L}{(1+L_1)^2} \right] \left[ \frac{1+3L_1}{6K_1} \right] + (1-A) \left[ \frac{1+L}{(1+L_2)^2} \right] \left[ \frac{1+3L_2}{6K_2} \right] \quad (5.6)$$

$$L_1 = 0.7568, L_2 = 0.2134 \text{ y } b_H = 15.4854$$

Para calcular los momentos del sensor de oxígeno, sin película de líquido adherida, y del sensor de presión, se normalizan los valores experimentales (ver tabla 5.1 y 5.2)

**Tabla 5.1**  
Datos experimentales de la respuesta transitoria de los sensores de oxígeno y presión para el MDVP.

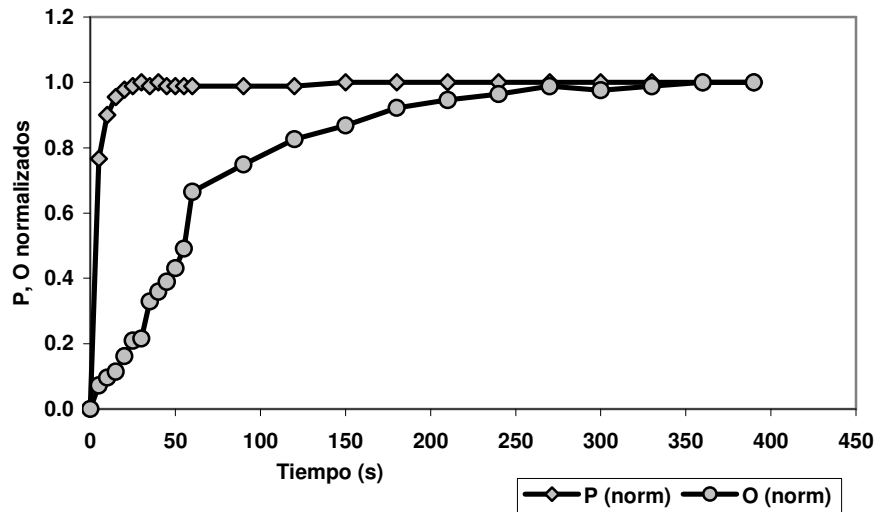
t(s)	Presión (kPa)	Oxígeno (%TDO)
0	78.0	96.0
5	84.9	97.0
10	86.1	97.3
15	86.6	97.5
20	86.8	98.2
25	86.9	98.8
30	87.0	98.9
35	86.9	100.5
40	87.0	100.9
45	86.9	101.3
50	86.9	101.8
55	86.9	102.6
60	86.9	105.0
90	86.9	106.1
120	86.9	107.2
150	87.0	107.8
180	87.0	108.5
210	87.0	108.8
240	87.0	109.1
270	87.0	109.4
300	87.0	109.2
330	87.0	109.4
360	87.0	109.5
390	87.0	109.5

Los datos se dividen en dos zonas, de acuerdo con el intervalo de tiempo entre los puntos, para poder obtener el área bajo la curva por el método de integración numérica de Simpson 1/3 de segmentos múltiples. Los puntos tomados cada 5 segundos son la zona 1, y los puntos tomados cada 30 segundos son la zona 2.

**Tabla 5.2**  
Valores normalizados. Ejemplo de cálculo del MDVP

t (s)	Presión	Oxígeno	Zona 1	Zona 2
0	0.0000	0.0000	0	
5	0.7667	0.0719	1	
10	0.9000	0.0958	2	
15	0.9556	0.1138	3	
20	0.9778	0.1617	4	
25	0.9889	0.2096	5	
30	1.0000	0.2156	6	
35	0.9889	0.3293	7	
40	1.0000	0.3593	8	
45	0.9889	0.3892	9	
50	0.9889	0.4311	10	
55	0.9889	0.4910	11	
60	0.9889	0.6647	12	0
90	0.9889	0.7485		1
120	0.9889	0.8263		2
150	1.0000	0.8683		3
180	1.0000	0.9222		4
210	1.0000	0.9461		5
240	1.0000	0.9641		6
270	1.0000	0.9880		7
300	1.0000	0.9760		8
330	1.0000	0.9880		9
360	1.0000	1.0000		10

La figura 5.1 muestra la gráfica de las señales normalizadas.



**Figura 5.1.-** Valores normalizados de presión y oxígeno para la determinación de  $k_{l,a}$  por el MDVP

Calculando el área por la regla de Simpson 1/3 de segmentos múltiples:

$$A = (\text{Intervalo}) \left[ \frac{f(x_0) + 4 \sum f(x_{\text{impares}}) + 2 \sum f(x_{\text{pares}}) + f(x_{\text{final}})}{3n} \right]$$

Zona 1

$$A_p = (60 - 0) \left[ \frac{0 + 22.71 + 9.73 + 0.98}{3(13)} \right] = 51.44 \text{ s}$$

(área bajo la curva del sensor de presión en la zona 1)

$$A_o = (60 - 0) \left[ \frac{0 + 6.34 + 2.53 + 0.66}{3(13)} \right] = 14.67 \text{ s}$$

(área bajo la curva del sensor de oxígeno en la zona 2)

Zona 2

$$A_p = (300 - 60) \left[ \frac{0.99 + 19.96 + 7.98 + 1}{3(11)} \right] = 272.02 \text{ s}$$

(área bajo la curva del sensor de presión en la zona 2)

$$A_o = (300 - 60) \left[ \frac{0.66 + 18.15 + 7.38 + 1}{3(11)} \right] = 247.25 \text{ s}$$

(área bajo la curva del sensor de oxígeno en la zona 2)

Áreas totales (suma del área en las dos zonas):

Presión: 323.4576 s

Oxígeno: 261.9153 s

Área entre las curvas normalizadas:

Área bajo la curva del sensor de presión – Área bajo la curva del sensor de oxígeno = 61.5423 s

Obteniendo el  $k_L a$  de la expresión:

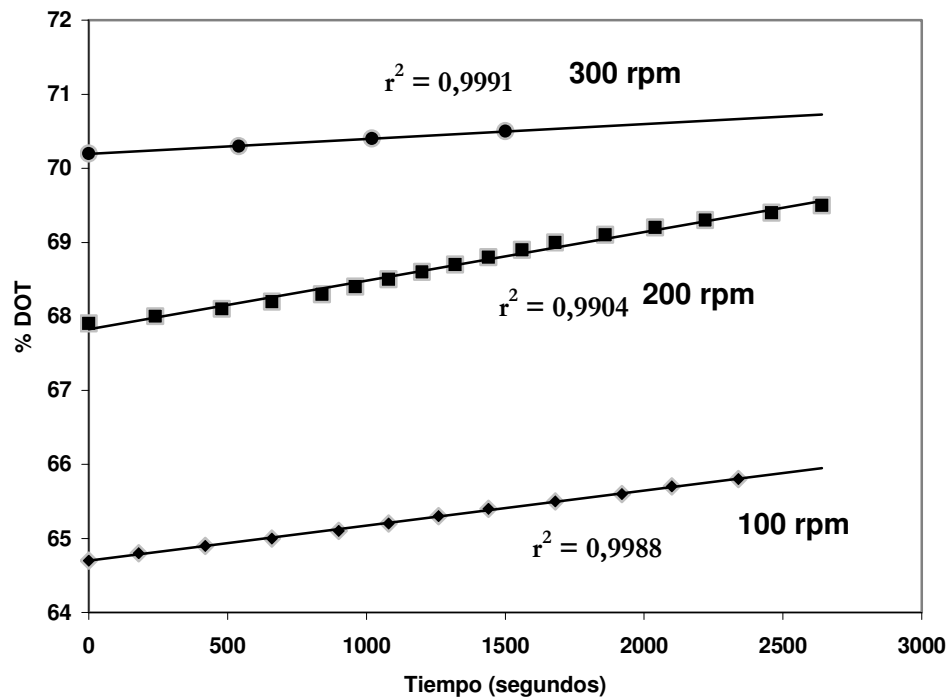
$$k_L a = \frac{1}{\text{Area} - b_H} = \frac{1}{61.54 \text{ s} - 15.48 \text{ s}} = 0.01946 \text{ s}^{-1}$$

## V.2.- Determinación de $k_L a$ en fluidos modelo

### V.2.1.- Comparación del método dinámico por variación de presión (MDVP) con el método dinámico por intercambio de gases (MDIG)

En el método dinámico por intercambio de gases (MDIG), se tiene el medio líquido al que se suministra aire. Cuando se inicia la determinación se sustituye la corriente de aire por una con nitrógeno, que desplaza gradualmente al aire.

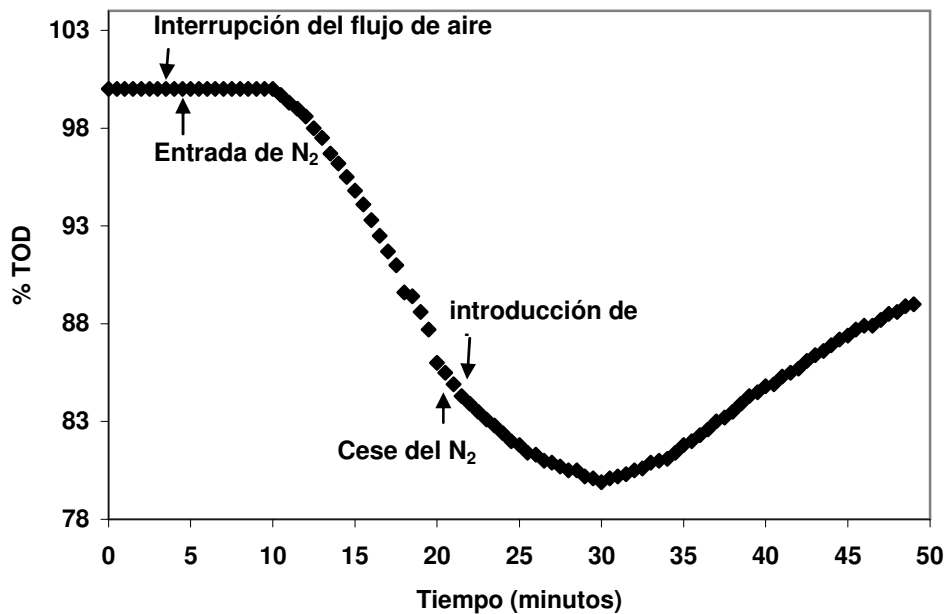
De la linealización de la diferencia de concentraciones de oxígeno disuelto con respecto al tiempo, puede obtenerse el  $k_L a$  como la pendiente de la recta, como puede observarse en la figura 5.2 la cual describe la obtención de  $k_L a$  en un fluido de alta viscosidad (jarabe de glucosa al 76%, 222 mPa\*s).



**Figura 5.2.-** Determinación de  $k_L a$  por el método dinámico de intercambio de gases. Glucosa 76%, viscosidad 222 mPa\*s

En el MDIG el efecto de la retención de las burbujas afecta la homogeneidad de la concentración de oxígeno disuelto, pero de una forma más importante afecta al tiempo de duración de la señal transitoria. En líquidos con deficientes condiciones de mezclado, como los líquidos de alta viscosidad utilizados en este estudio (222 y 279 mPa\*s) se observa que existe un retraso de 5 a 7 minutos entre la introducción de la corriente gaseosa de diferente concentración y la detección de un cambio en la concentración de oxígeno disuelto, correspondiente al tiempo que las nuevas burbujas necesitan para desplazar a las burbujas existentes en el medio (figura 5.3).





**Figura 5.3.-** Tensión de oxígeno disuelto durante la determinación de  $k_La$  por el método dinámico de intercambio de gases. Jarabe de glucosa al 76% (GL2), 200 rpm

Los valores de  $k_La$  obtenidos por el MDVP fueron mayores, que los obtenidos por el MDIG. La diferencia entre los valores de  $k_La$  se incrementa a medida que aumenta la viscosidad, ver tabla 5.3.

En el MDIG hay un efecto pronunciado de la retención de burbujas a medida que se incrementa la viscosidad. Como las burbujas se desplazan lentamente en el fluido los cambios en la concentración de oxígeno disuelto se detectan mucho después de que se ha efectuado el intercambio de gases; como el cálculo del  $k_La$  se realiza a través de la velocidad de variación de la concentración de oxígeno disuelto, este retardo ocasiona que el valor de  $k_La$  sea más pequeño del que realmente se tiene (figura 5.3).

La diferencia en el valor de  $k_La$ , es debido a que el  $k_La$  obtenido por el método de intercambio de gases está subestimado, ya que la viscosidad impide el desplazamiento de las burbujas de nitrógeno que permanecen en el tanque por varios minutos durante los cuales el aire se encuentra mezclado con él y el incremento en la concentración se percibe con lentitud, como puede observarse en la figura 5.3, lo que produce pendientes más pequeñas.

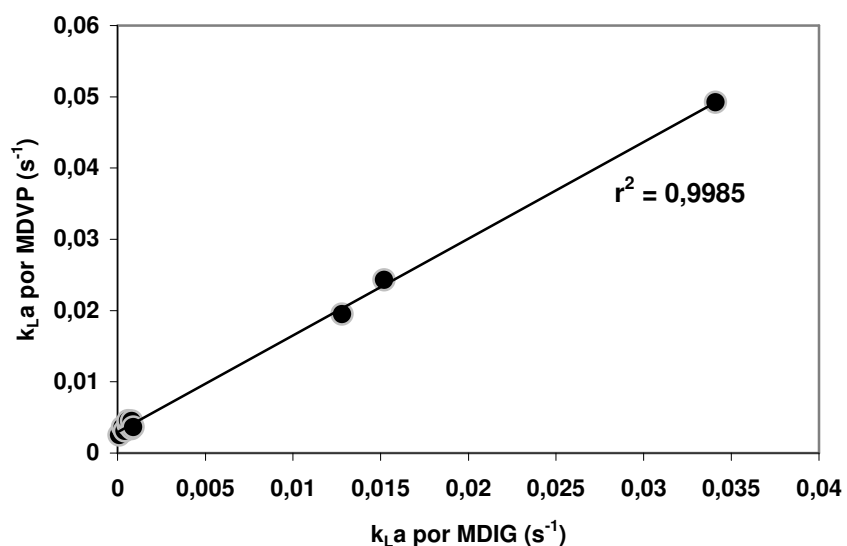
A viscosidades superiores de 76 mPa\*s, el  $k_La$  obtenido por el MDVP es más sensible que el método dinámico por intercambio de gases, ya que no se tienen los problemas de retención de las burbujas indicados en la figura 5.3; y esto se manifiesta en los valores de  $k_La$  obtenidos por el método dinámico por intercambio de gases, que a partir de esa viscosidad casi no presenta cambios en el orden de magnitud.

**Tabla 5.3**Comparación entre los valores de  $k_L a$  obtenidos por el MDVP y el MDIG

Sustancia	Viscosidad (mPa*s)	Velocidad de agitación (rpm)	$k_L a$ ( $s^{-1}$ )		% variación relativa
			MDVP	MDIG	
Agua	1	100	$1.95 \times 10^{-2}$	$1.28 \times 10^{-2}$	34.19
		200	$2.43 \times 10^{-2}$	$1.52 \times 10^{-2}$	37.46
		300	$4.92 \times 10^{-2}$	$3.41 \times 10^{-2}$	30.72
GL81	76	100	ND	ND	
		200	$4.51 \times 10^{-3}$	$8.00 \times 10^{-4}$	82.26
		300	$4.55 \times 10^{-3}$	$6.00 \times 10^{-4}$	86.81
GL86	85	100	ND	$1.00 \times 10^{-4}$	
		200	$3.65 \times 10^{-3}$	$3.00 \times 10^{-4}$	91.78
		300	$3.97 \times 10^{-3}$	$6.00 \times 10^{-4}$	84.89
GS76	222	100	$3.11 \times 10^{-3}$	$4.00 \times 10^{-4}$	87.14
		200	$3.43 \times 10^{-3}$	$8.00 \times 10^{-4}$	76.68
		300	$3.64 \times 10^{-3}$	$9.00 \times 10^{-4}$	75.27
GS78	279	100	$2.21 \times 10^{-3}$	ND	
		200	$2.42 \times 10^{-3}$	ND	
		300	$2.51 \times 10^{-3}$	$1.00 \times 10^{-4}$	96.01

ND = No determinado, MDVP = Método por variación de presión, MDIG = Método por intercambio de gases, GL81 solución de glicerol al 81%, GL86 solución de glicerol al 86%, GS76 jarabe de glucosa al 76%, GS78 jarabe de glucosa al 78%.

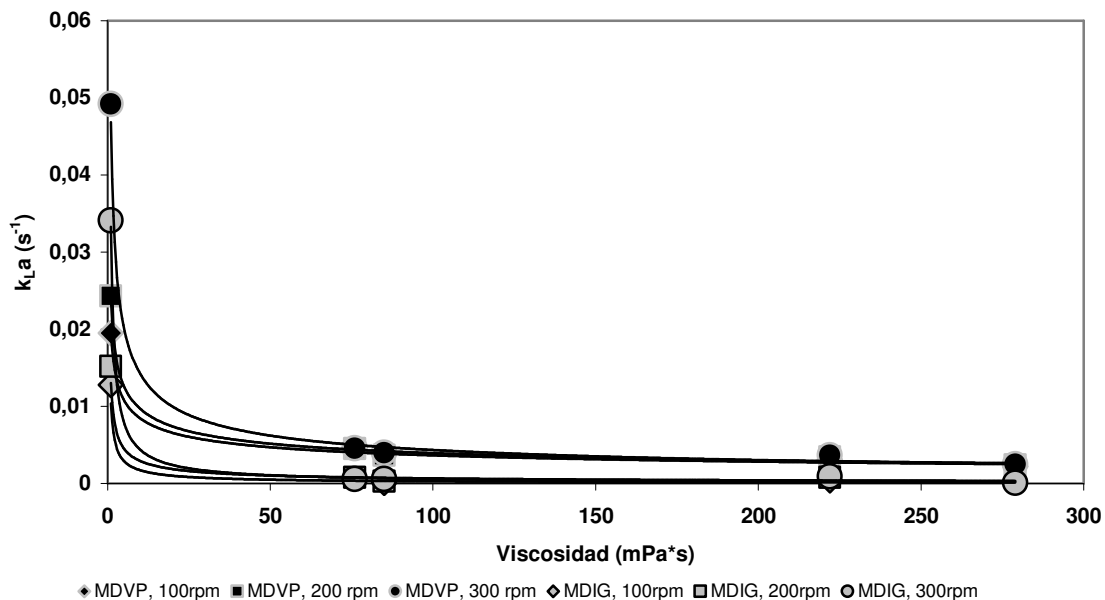
Comparando los valores de  $k_L a$  obtenidos mediante los dos métodos, se tiene que aunque la magnitud del valor de  $k_L a$  calculado es diferente, la tendencia de comportamiento se mantiene y los datos obtenidos por los dos métodos presentan correlación entre sí (figura 5.4).

**Figura 5.4.-** Correlación entre los valores de  $k_L a$  obtenidos por MDVP y MDIG

Los dos métodos presentan un comportamiento similar con respecto al incremento de la viscosidad. El  $k_L a$  en fluidos newtonianos fue disminuyendo, en forma exponencial, con el incremento de la viscosidad como puede observarse en la figura 5.5. Esta disminución es congruente con lo reportado sobre el comportamiento de otros métodos dinámicos (Ozbek y Gayik, 2001; Rainer, 1990; Herbst *et al*, 1987), donde se establece la proporcionalidad:

$$k_L a \propto \eta^{-a} \quad (5.7)$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad aparente del fluido.



**Figura 5.5.-** Comportamiento del  $k_L a$  al incrementarse la viscosidad

### V.2.1.1.- Análisis de sensibilidad entre MDVP y MDIG, mediante el método de las diferencias absolutas

La diferencia en la magnitud del valor de  $k_L a$  ocasionada por la retención de las burbujas se reflejaría en una posible diferencia en la sensibilidad de los métodos MDVP y MDIG.

Para determinar la sensibilidad de los métodos MDVP y MDIG, se realizó un análisis por el método de las diferencias absolutas de Andrews, junto con una comparación del intervalo de viscosidad en que los valores de  $k_L a$  se vuelven asintóticos, se utilizó como criterio el uso del punto de curvatura de la tendencia mostrada en la figura 5.5, por el método de la aproximación de la derivada a cero.

La diferencia absoluta entre el valor de  $k_L a$  obtenido en cada fluido, por el método dinámico por variación de presión (MDVP) y dinámico por intercambio de gases (MDIG), se muestra en la tabla 5.4.

**Tabla 5.4**  
Diferencias absolutas entre  $k_{L,a}$  por MDVP y MDIG

Sustancia	Viscosidad (mPa*s)	Velocidad de agitación (rpm)	$k_{L,a}$ ( $s^{-1}$ )		Diferencia absoluta
			MDVP	MDIG	
Agua	1	100	$1.95 \times 10^{-2}$	$1.28 \times 10^{-2}$	0.00670
		200	$2.43 \times 10^{-2}$	$1.52 \times 10^{-2}$	0.00910
		300	$4.92 \times 10^{-2}$	$3.41 \times 10^{-2}$	0.01510
GL81	76	100	ND	ND	ND
		200	$4.51 \times 10^{-3}$	$8.00 \times 10^{-4}$	0.00371
		300	$4.55 \times 10^{-3}$	$6.00 \times 10^{-4}$	0.00395
GL86	85	100	ND	$1.00 \times 10^{-4}$	ND
		200	$3.65 \times 10^{-3}$	$3.00 \times 10^{-4}$	0.00335
		300	$3.97 \times 10^{-3}$	$6.00 \times 10^{-4}$	0.00337
GS76	222	100	$3.11 \times 10^{-3}$	$4.00 \times 10^{-4}$	0.00271
		200	$3.43 \times 10^{-3}$	$8.00 \times 10^{-4}$	0.00263
		300	$3.64 \times 10^{-3}$	$9.00 \times 10^{-4}$	0.00274
GS78	279	100	$2.21 \times 10^{-3}$	ND	ND
		200	$2.42 \times 10^{-3}$	ND	ND
		300	$2.51 \times 10^{-3}$	$1.00 \times 10^{-4}$	0.00241

ND = No determinado, MDVP = Método por variación de presión, MDIG = Método por intercambio de gases, GL81 solución de glicerol al 81%, GL86 solución de glicerol al 86%, GS76 jarabe de glucosa al 76%, GS78 jarabe de glucosa al 78%.

La tabla 5.5 muestra las diferencias en orden creciente

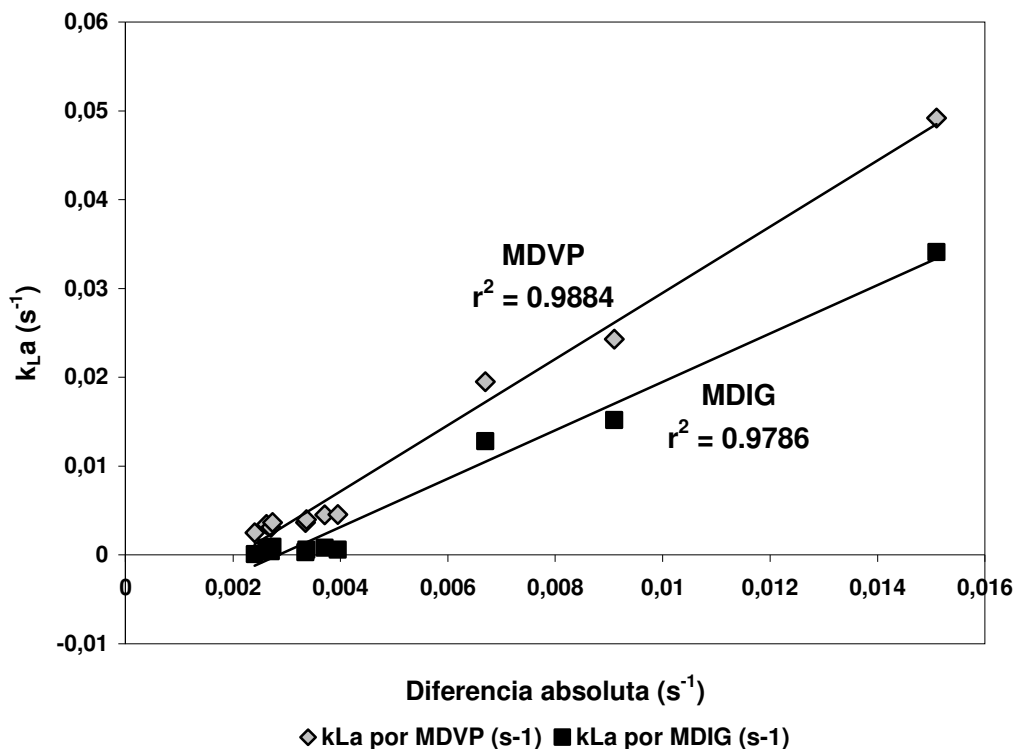
**Tabla 5.5**  
Condiciones de agitación y viscosidad de las diferencias absolutas entre  $k_{L,a}$  por el MDVP y el MDIG

Diferencia	MDVP	MDIG	Velocidad de agitación rpm	Viscosidad (mPa*s)
0.00241	0.00251	0.0001	300	279
0.00263	0.00343	0.0008	200	222
0.00271	0.00311	0.0004	100	222
0.00274	0.00364	0.0009	300	222
0.00335	0.00365	0.0003	200	85
0.00337	0.00397	0.0006	300	85
0.00371	0.00451	0.0008	200	76
0.00395	0.00455	0.0006	300	76
0.0067	0.0195	0.0128	100	1
0.0091	0.0243	0.0152	200	1
0.0151	0.0492	0.0341	300	1

MDVP = Método por variación de presión, MDIG = Método por intercambio de gases

Las diferencias absolutas presentan un comportamiento inverso al porcentaje de variación relativa mostrado en la tabla 5.3.

La figura 5.6 muestra la relación entre el  $k_{L,a}$  obtenido por cada método y las diferencias absolutas.



**Figura 5.6.-** Dependencia de  $k_{L,a}$  con la diferencia absoluta para el MDVP y el MDIG

Tanto el MDVP como el MDIG conservan la tendencia lineal en el intervalo de las viscosidades consideradas.

En la zona de alta viscosidad el comportamiento de la detección es prácticamente paralelo, lo que indica que un factor constante es la diferencia entre los dos métodos; este factor probablemente sea el incremento en el tiempo de retención de las burbujas de gas causado por el aumento de viscosidad.

Cuando la viscosidad disminuye el comportamiento de los métodos diverge. A bajas viscosidades el desplazamiento de las burbujas es similar por lo que las diferencias entre los métodos MDVP y MDIG serían atribuibles a los otros dos factores que el cálculo del MDIG no considera en el cálculo del  $k_{L,a}$ : La respuesta electrónica del sensor y el espesor de la película de líquido adherida. El efecto es considerable, los valores experimentales de  $k_{L,a}$  (ver tablas 5.3 y 5.4) presentan una diferencia promedio del 34.12% en las soluciones de baja viscosidad.

En la figura 5.5 se observa que el comportamiento del valor del  $k_{L,a}$  obtenido por los dos métodos sigue una tendencia de decremento de tipo exponencial, congruente con lo reportado en la caracterización de otros métodos dinámicos (Ozbek y Gayik, 2001; Vashitz *et al.*, 1989).

En el deceso exponencial del  $k_L a$  mostrado en la figura 5.5, después de un intervalo de viscosidad, el valor del  $k_L a$  tiende a un mismo valor para ambos métodos. Este límite correspondería al intervalo en el cual el método puede proporcionar un mismo valor de  $k_L a$  y corresponde al intervalo de viscosidad para el que estaría recomendado.

Ajustando la curva de decremento del  $k_L a$  (ver figura 5.5) a una ecuación del tipo  $y = AX^B$ , donde  $y = k_L a$ , y  $X = \text{viscosidad}$ , se obtiene la siguiente familia de curvas definidas por los valores de las constantes A y B indicados en la tabla 5.6

**Tabla 5.6**

Constantes de la ecuación de decremento del  $k_L a$  con respecto a la viscosidad

Método	Velocidad de agitación (rpm)	A	B
MDVP	100	0.0196	-0.3652
	200	0.0239	-0.3922
	300	0.0469	-0.5167
MDIG	100	0.0104	-0.7814
	200	0.0130	-0.6488
	300	0.0333	-0.8799

Los valores de las constantes A y B se emplean para obtener la derivada de la ecuación de decrecimiento del  $k_L a$ , de acuerdo con la expresión:

$$\frac{dy}{dx} = AX^{(B-1)} \quad (5.8)$$

La ecuación de la derivada se puede evaluar a intervalos de viscosidad de 1 mPa\*s, con un criterio de error  $\Delta = 0.0001$ , para obtener el intervalo de viscosidad donde el método puede indicar cambios en el  $k_L a$ , mismo que se muestra, para cada velocidad considerada, en la tabla 5.7.

**Tabla 5.7**

Intervalo de viscosidad donde se detectan cambios en el valor de  $k_L a$

Método	Velocidad (rpm)	$\mu_{\min}$ (mPa*s)	$\mu_{\max}$ (mPa*s)
MDVP	100	0.85	47
	200	0.85	50
	300	0.85	56
MDIG	100	0.85	14
	200	0.85	19
	300	0.85	22

Se observa que el intervalo de viscosidad recomendado para el MDIG es menor que el obtenido con el MDVP.

Al dividir el intervalo de viscosidad en el que el método MDVP detecta cambios en el valor de  $k_{1a}$ , entre el obtenido para el MDIG, se tiene el factor de aumento en el intervalo de detección recomendado. Los factores obtenidos para cada velocidad considerada, se muestran en la tabla 5.8.

**Tabla 5.8**  
Factor MDVP/MDIG con respecto a la viscosidad

Velocidad (rpm)	Factor MDVP/MDIG
100	3.35
200	2.63
300	2.55

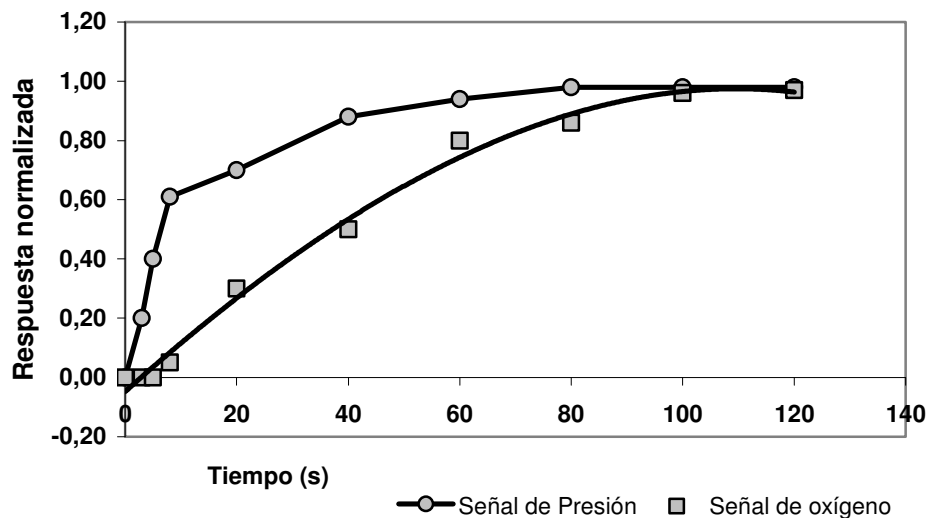
### V.2.2.- Efecto de la viscosidad

El tiempo para alcanzar el estado estable de la señal transitoria del sensor de oxígeno, se incrementó con el aumento de la viscosidad, como puede observarse en la tabla 5.9. Esto por el aumento en la resistencia al desplazamiento del oxígeno, que es inversamente proporcional a la viscosidad (Geankoplis, 1988), tanto en el medio líquido como a través de la película de líquido adherida a la superficie del sensor.

**Tabla 5.9**  
Incremento del tiempo para alcanzar el estado estable de la señal del sensor de oxígeno, con el incremento de la viscosidad (N = 200 rpm).

Fluido	Viscosidad (mPa*s)	Tiempo (s)
Agua	0.85	270
GL81	76.00	990
GL86	85.00	990
GS76	222.00	1460
GS78	279.00	1530

En fluidos newtonianos de baja viscosidad (agua) el comportamiento del MDVP fue similar al reportado por Linek *et al.* (1989a, 1989b) para agua y soluciones de electrolitos; con tiempos de estabilización de la señal transitoria menores de 5 minutos (ver figura 5.7).

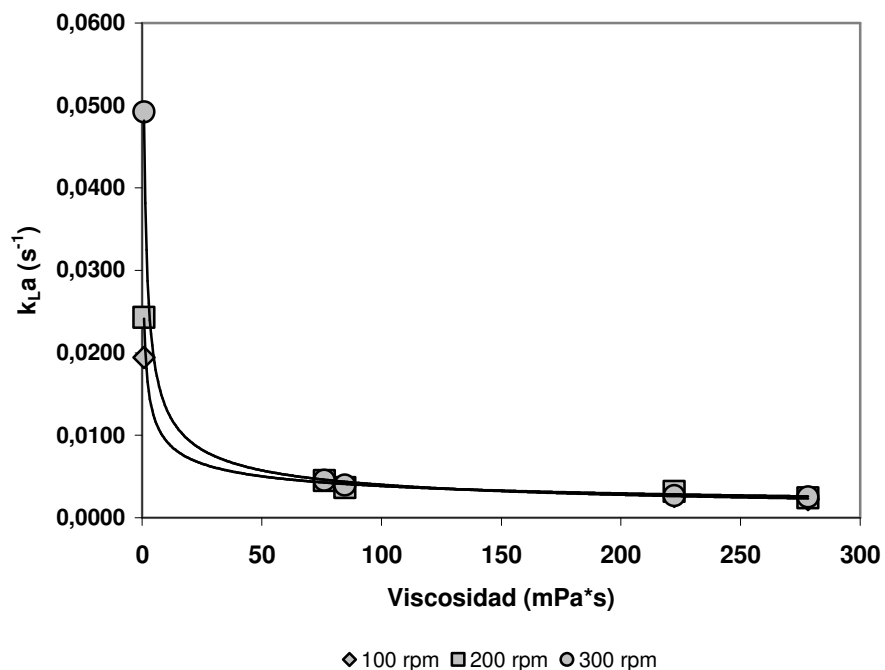


**Figura 5.7.-** Respuestas de los sensores durante la determinación de  $k_L a$  por MDVP. Agua, 100 rpm

El  $k_L a$  en fluidos newtonianos fue disminuyendo con el incremento de la viscosidad como puede observarse en la figura 5.8. Esta disminución es congruente con lo reportado sobre el comportamiento de otros métodos dinámicos para la medición del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (Ozbek y Gayik, 2001; Rainer, 1990), donde se establece la proporcionalidad:

$$k_L a \propto \eta^{-a} \quad (5.9)$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad del fluido.



**Figura 5.8.-** Comportamiento del  $k_L a$  al incrementarse la viscosidad en fluidos newtonianos

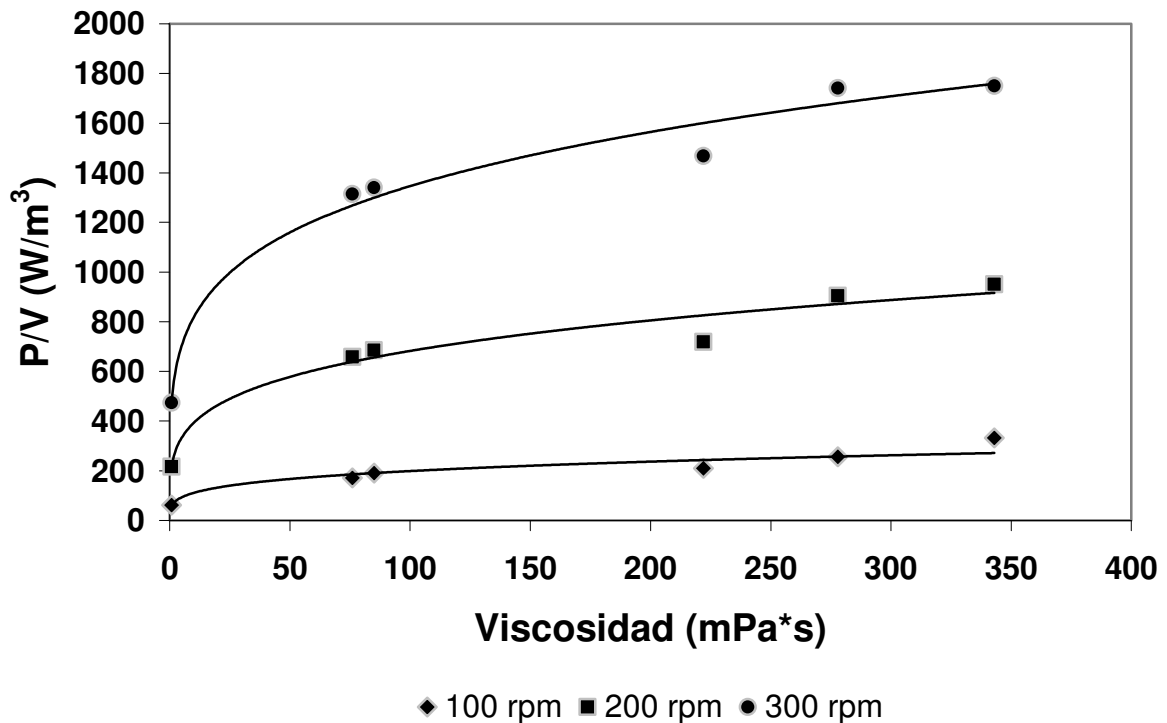


En similitud con otros métodos dinámicos, se presenta un incremento en la potencia por unidad de volumen consumida con el incremento de la viscosidad, como puede observarse en la figura 5.9, y un aumento del  $k_L a$  al incrementarse la velocidad de agitación, ver tabla 5.10, de acuerdo con las proporcionalidades:

$$\frac{P_g}{V_L} \propto \eta^a \quad (5.10)$$

$$k_L a \propto \eta^{-a} \quad (5.11)$$

Se pudo obtener  $k_L a$  hasta viscosidades de 279 mPa\*s, para viscosidades superiores el fluido forma una espuma estable en donde la señal transitoria del oxígeno ya no se estabiliza.



**Figura 5.9.-** Efecto de la viscosidad sobre el consumo de potencia en fluidos newtonianos

Al incrementarse la viscosidad del medio, aumenta el espesor de la película de líquido adherida al sensor, indicado por el aumento del valor del parámetro L, como puede observarse en la tabla 5.11. El comportamiento de L fue similar para las tres velocidades de agitación probadas (100, 200 y 300 rpm). El incremento de L es congruente con el incremento en el tiempo de estabilización de la señal transitoria mostrado en la tabla 5.9, ya que al ser más grande la película de líquido, el oxígeno tardará más tiempo en llegar al electrolito del sensor.

**Tabla 5.10**Variación de  $k_L a$  con el incremento de la viscosidad

Sustancia	Viscosidad (mPa*s)	Velocidad de agitación (rpm)	$k_L a$ ( $s^{-1}$ )
Agua	1	100	$1.95 \times 10^{-2}$
		200	$2.43 \times 10^{-2}$
		300	$4.92 \times 10^{-2}$
GL1	76	100	ND
		200	$4.51 \times 10^{-3}$
		300	$4.55 \times 10^{-3}$
GL2	85	100	ND
		200	$3.65 \times 10^{-3}$
		300	$3.97 \times 10^{-3}$
GS76	222	100	$3.11 \times 10^{-3}$
		200	$3.43 \times 10^{-3}$
		300	$3.64 \times 10^{-3}$
GS78	279	100	$2.21 \times 10^{-3}$
		200	$2.42 \times 10^{-3}$
		300	$2.51 \times 10^{-3}$

ND = No determinado, GL81 solución de glicerol al 81%, GL86 solución de glicerol al 86%, GS76 jarabe de glucosa al 76%, GS78 jarabe de glucosa al 78%.

Cuando aumenta la velocidad de agitación, para un mismo fluido, se produce una disminución del espesor de película, indicado por los menores valores del parámetro L. El menor espesor de película es congruente con el aumento de  $k_L a$  observado en la tabla 5.10.

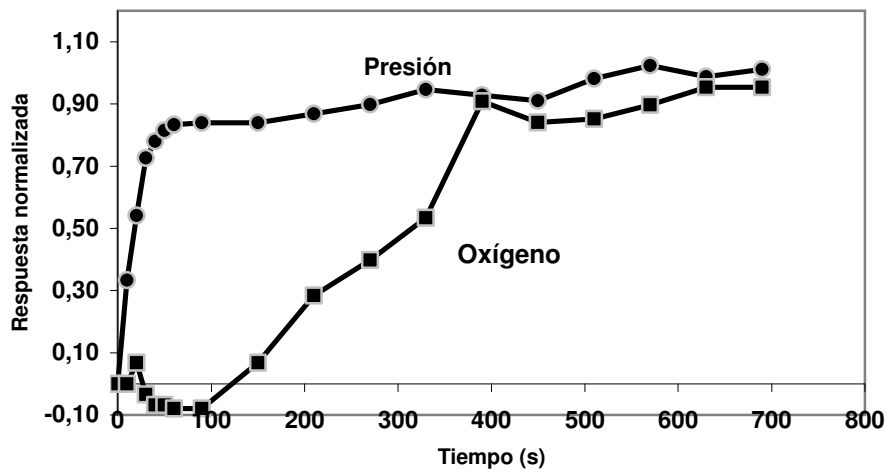
**Tabla 5.11**

Incremento de L con el incremento de la viscosidad

Fluido	Viscosidad (mPa*s)	L		
		100 rpm	200 rpm	300 rpm
Agua	0.85	0.0417	0.0373	0.0277
GL81	76	0.2953	0.2330	0.2369
GL86	85	0.3038	0.2660	0.2642
GS76	222	0.3870	0.3110	0.2674
GS78	279	0.3850	0.3120	0.2937

### V.2.3.- Efecto de la espuma

Cuando el fluido de prueba forma espuma, la determinación de  $k_L a$  por el MDVP ya no es posible. Esto porque el principio en que está basado el MDVP, indica que a un cambio de la presión total en el tanque se producirá un incremento en la presión parcial de oxígeno y por lo tanto se incrementará la fracción de oxígeno soluble. Esto funciona cuando se tiene una burbuja viajando a través de un líquido, pero cuando se forma espuma el gas queda atrapado en el líquido, y el conjunto pasa a un estado de agregación diferente, por lo que el principio de disolución del oxígeno ya no aplica. Al incrementar la presión en el interior del tanque, en los sensores se detecta una señal oscilante, dependiendo del tamaño del agregado de espuma líquido-gas que choque con el sensor. Esta señal no se estabiliza, como puede observarse en la figura 5.10

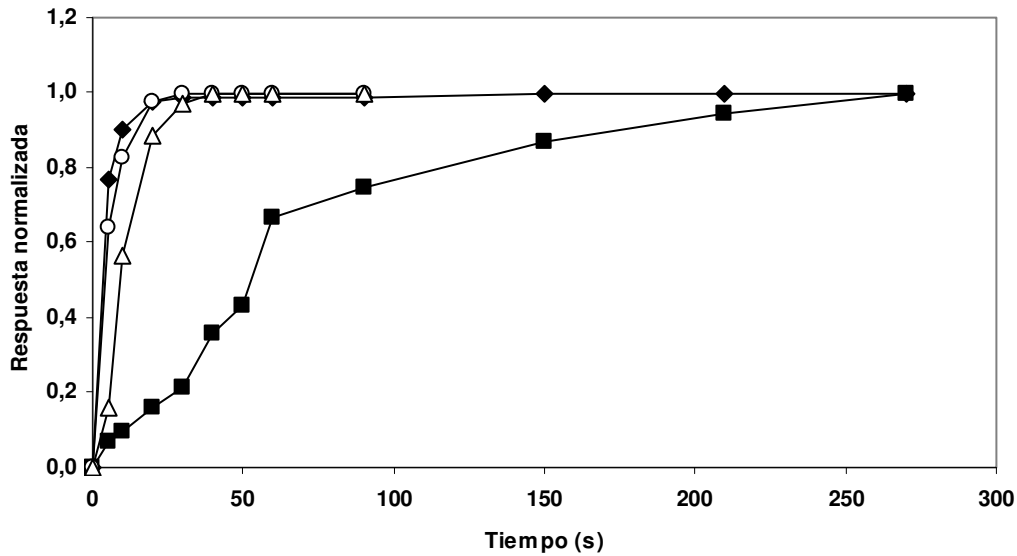


**Figura 5.10.-** Inestabilidad de la señal de los sensores durante la determinación de  $k_L a$  por MDVP, en presencia de espuma, GS80, viscosidad 342 mPa\*s, N = 200 rpm

La determinación es funcional mientras se tenga una mezcla gas-líquido y la espuma forme un estado de agregación diferente al referido, en el que un incremento en la presión parcial del oxígeno contenido en las burbujas de gas no sea proporcional a un incremento en la solubilidad del oxígeno en el líquido, principalmente por la variación del área de la interfase. En una dispersión gas-líquido el área de la interfase para transferencia está concentrada en burbujas individuales, mientras que en una espuma, las burbujas están unidas entre sí, rodeadas de una gruesa película de líquido adyacente y formando conglomerados que cambian de tamaño con rapidez.

### V.2.4.- Efecto de las condiciones hidrodinámicas

En las soluciones de glicerol a 100 rpm se observó un efecto indirecto del patrón de mezclado sobre el  $k_L a$ , consistente en que se obtenían respuestas muy rápidas, ver figura 5.11, del sensor de oxígeno. La respuesta rápida del sensor, hace que el valor del área entre las curvas sea menor al del momento del sensor con la película de líquido ( $b_H$ ), como puede observarse en la tabla 5.12.



◆ Presión agua ■ Oxígeno agua ○ Presión GL81 △ Oxígeno GL81

**Figura 5.11.-** Comparación del tiempo para alcanzar el estado estable entre agua (0.85 mPa\*s) y solución de glicerol al 81% (GL81), 76 mPa\*s

**Tabla 5.12**

Comparación entre  $b_H$  y área entre las curvas en la determinación de  $k_L a$  por MDVP. Soluciones de glicerol, 100 rpm

Fluido	$b_H$	Área entre las curvas de respuesta de los sensores de presión y oxígeno
GL81	13.1623	10.28
GL86	13.2554	9.23

En fluidos newtonianos de 76 y 85 mPa\*s (soluciones de glicerol), a bajas velocidades de agitación se observó una influencia indirecta del patrón de mezclado sobre la determinación del  $k_L a$ , específicamente sobre la magnitud del valor de  $k_L a$ , no sobre el comportamiento de las señales analizadas en el MDVP.

Este efecto en el sensor, es ocasionado por la presencia de una zona enriquecida de burbujas creada por el efecto de la viscosidad del fluido que desvía el chorro de burbujas del difusor y que hace que éstas choquen con el sensor de oxígeno. A velocidades mayores el mayor movimiento del líquido permite que esta zona de burbujas se disperse, y al eliminar el choque de las burbujas con el sensor, la determinación de  $k_L a$  puede llevarse a cabo. En los fluidos con viscosidades mayores a las del glicerol, este efecto ya no se presentó, puesto que el desplazamiento de las burbujas de aire es más lento y pueden ser dispersadas antes de llegar al sensor.

### V.2.5.- Efecto de los índices de consistencia (K) y comportamiento de flujo (n)

En los fluidos no newtonianos existe una fuerte influencia de la formación de espuma sobre la determinación de  $k_L a$  por MDVP. La formación de espuma está relacionada con la proporción entre el índice de consistencia y el índice de comportamiento de flujo. De acuerdo con las observaciones visuales realizadas en el tanque, a mayor índice de consistencia es más lento el desplazamiento de las burbujas, y como se muestra en la tabla 5.13 a mayor índice de consistencia también aumenta el espesor de la película adherida a la membrana del sensor (mayor valor de L). Los fluidos no newtonianos con bajo índice de comportamiento de flujo (n) y bajo índice de consistencia (K), como GU1 y LBG1, producen sistemas que fácilmente atrapan aire, formando espuma. Estos fluidos tienen espesores de película (reflejados en valores altos del parámetro L), y bajo estas condiciones sólo fue posible determinar  $k_L a$  a valores de L menores de 0.20, como en LBG1 a 300 rpm, ver tabla 5.14. Los fluidos con comportamiento reológico más cercano al newtoniano, n cercano a 1, y bajo índice de consistencia, como GU2 y LBG2, atrapan aire en una proporción menor a la de GU1 y LBG1, y en cuanto a la determinación de  $k_L a$  se comportaron en forma similar a los fluidos newtonianos, donde el valor del  $k_L a$  disminuye con el aumento del espesor de película. Los valores de  $k_L a$  obtenidos tienen el orden de magnitud de los obtenidos en agua, ver tabla 5.15. Dawson (1992) reporta un efecto similar para la determinación de  $k_L a$  en soluciones de carboximetilcelulosa. No se detectó una relación directa entre el valor del  $k_L a$  y los valores de los índices de consistencia y comportamiento de flujo.

**Tabla 5.13**  
Valores de L en fluidos no newtonianos

Fluido	K (mPa*s <sup>n</sup> )	n	Velocidad de agitación (rpm)	L
KAR	4.4100	0.42	100	0.3387
			200	0.3280
			300	ND
GU1	0.6060	0.58	100	0.5171
			200	0.3621
			300	0.2461
LBG1	0.3470	0.70	100	0.2606
			200	0.2158
			300	0.1881
GU2	0.1450	0.80	100	0.2315
			200	0.1310
			300	0.0499
LBG2	0.0662	0.85	100	0.0593
			200	0.0277
			300	0.0091

ND = No determinado

**Tabla 5.14**  
Valores de  $k_L a$  en fluidos no newtonianos

Fluido	K (mPa*s <sup>n</sup> )	n	Velocidad de agitación (rpm)	$k_L a$ (s <sup>-1</sup> )
KAR	4.4100	0.42	100	2.52x10 <sup>-3</sup>
			200	3.89x10 <sup>-3</sup>
			300	ND
GU1	0.6060	0.58	100	2.43x10 <sup>-1</sup>
			200	ND
			300	ND
LBG1	0.3470	0.70	100	ND
			200	ND
			300	4.83x10 <sup>-3</sup>
GU2	0.1450	0.80	100	ND
			200	6.89x10 <sup>-3</sup>
			300	1.37x10 <sup>-2</sup>
LBG2	0.0662	0.85	100	3.36x10 <sup>-3</sup>
			200	1.04x10 <sup>-2</sup>
			300	4.67x10 <sup>-2</sup>

ND = No determinado

**Tabla 5.15**  
Comparación entre los valores de L y  $k_L a$  de agua y fluidos  
no newtonianos de bajo K y alto n (similares a fluidos newtonianos)

Fluido	N (rpm)					
	100		200		300	
	L	$k_L a$ (s <sup>-1</sup> )	L	$k_L a$ (s <sup>-1</sup> )	L	$k_L a$ (s <sup>-1</sup> )
Agua	0.0417	1.95x10 <sup>-2</sup>	0.0373	2.43x10 <sup>-2</sup>	0.0277	4.92x10 <sup>-2</sup>
LBG2	0.0593	3.36x10 <sup>-3</sup>	0.0277	1.04x10 <sup>-2</sup>	0.0091	4.67x10 <sup>-2</sup>
GU2	0.2315	ND	0.1310	6.89x10 <sup>-3</sup>	0.0499	1.37x10 <sup>-2</sup>

ND = No determinado

En el fluido con mayores propiedades fluidificadas por cizalla, como la goma karaya, la cual tiene bajo n y alto K, no se formó espuma porque las burbujas se desplazaban lentamente dentro del fluido. Los valores de  $k_L a$  determinados fueron superiores a los del agua a las mismas velocidades a pesar del alto valor de L (superior a 0.3), porque al desplazarse lentamente las burbujas permanecen más tiempo cerca de los sensores, formando una zona rica en oxígeno soluble en las cercanías del sensor. Este efecto es diferente al observado en los

fluidos newtonianos donde el efecto de enriquecimiento en oxígeno soluble en las vecindades del sensor es una consecuencia del patrón de mezclado; en este fluido los valores altos del  $k_L a$  son una consecuencia del alto índice de consistencia, que permite que las burbujas sean estables alrededor del sensor, por este mismo efecto no fue posible determinar el  $k_L a$  a 300 rpm ya que al haber mayor movimiento del líquido las burbujas chocaban con el sensor y se adherían sobre él, formando una cámara de aire sobre la membrana del sensor lo que producía que la señal de oxígeno fuera disminuyendo, ya que la película alrededor de la burbuja servía de aislante del resto del medio y el electrolito del sensor reaccionaba únicamente con el oxígeno contenido dentro de la burbuja.

En fluidos no newtonianos existe una fuerte influencia de la formación de espuma sobre la determinación de  $k_L a$  por MDVP: La formación de espuma en los fluidos no newtonianos utilizados, esta en función de la relación entre el índice de consistencia y el índice de comportamiento de flujo. En los fluidos no newtonianos con bajo índice de comportamiento de flujo ( $n$ ) y bajo índice de consistencia ( $K$ ), como GU1 y LBG1, se producen sistemas que fácilmente atrapan aire, formando espuma bajo estas condiciones por lo que solo fue posible determinar  $k_L a$  en LBG1 a 300 rpm. Los fluidos con comportamiento reológico más cercano al newtoniano,  $n$  cercano a 1, y bajo índice de consistencia, como GU2 y LBG2, atrapan aire en una proporción menor a la de GU1 y LBG1, y en cuanto a la determinación de  $k_L a$  se comportaron en forma similar a los fluidos newtonianos. En la solución de goma karaya, el fluido con mayores propiedades fluidificadas por cizalla (bajo  $n$  y alto  $K$ ), no se formó espuma porque las burbujas se desplazaban lentamente dentro del fluido.

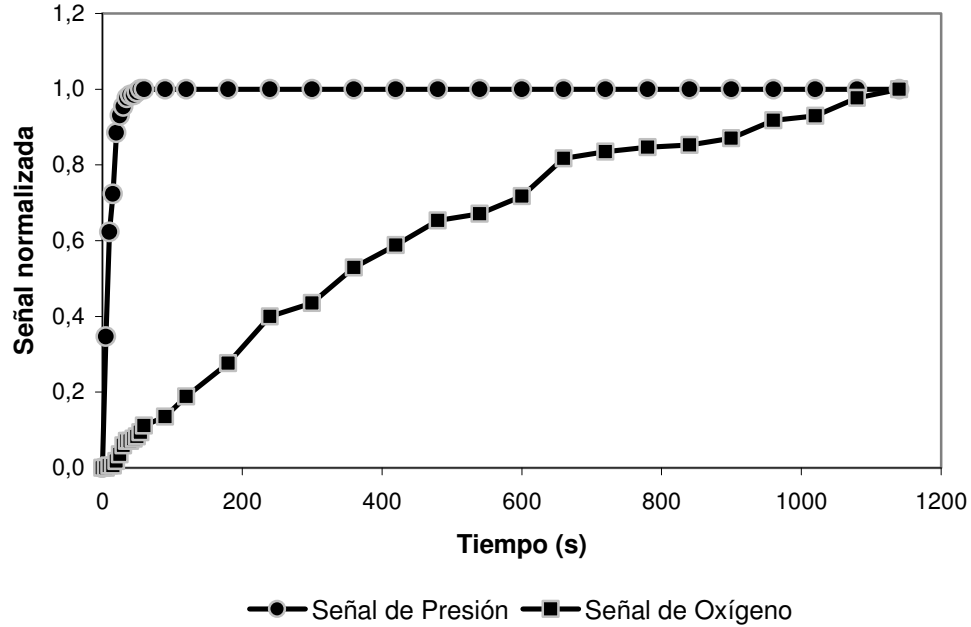
#### V.2.6.- Efecto de la composición del medio de cultivo

Para la caracterización del MDVP se utilizaron los medios de cultivo para producción de polisacáridos, S, Silman-Bagley y cazu (café-azúcar), esterilizados y saturados con aire, a dos velocidades de agitación, 100 y 200 rpm. Las concentraciones de equilibrio para la disolución del oxígeno en estos medios, calculadas utilizando los coeficientes de Bunsen (ver capítulo Metodología), se muestran en la tabla 5.16.

**Tabla 5.16**  
Concentraciones de equilibrio para oxígeno en medios de cultivo para producción de polisacáridos

Medio	$C^*$ (mg $O_2$ /mL)
S	5.2392
Silman-Bagley	6.3551
cazu	6.0800

En los medios de cultivo se detectó un fuerte efecto de la composición, pues si bien presentaron baja viscosidad (13 mPa\*s) y valores de  $L$  (12 % mayores) similares a los del agua, el tiempo necesario para la estabilización de la señal transitoria se incrementó significativamente (a 100 rpm 270 s para agua, 750 s para el medio S y 1180 s para el medio Silman-Bagley), compárese la figura 5.12 con la figura 5.1.



**Figura 5.12.-** Tiempos para alcanzar el estado estable en medio de cultivo Silman-Bagley, 100 rpm

El efecto de la composición, del medio de cultivo sobre el valor del  $k_L a$  determinado usando el MDVP, no es directo, ya que el medio Silman-Bagley permite una mayor disolución del oxígeno ( $C^* = 6.18 \text{ mgO}_2/\text{l}$  por  $5.15 \text{ mgO}_2/\text{l}$  del medio S), y sin embargo los valores de  $k_L a$  en el medio S fueron mayores que en el Silman-Bagley, como puede observarse en la tabla 5.17.

**Tabla 5.17**  
 $k_L a$  en medios de cultivo

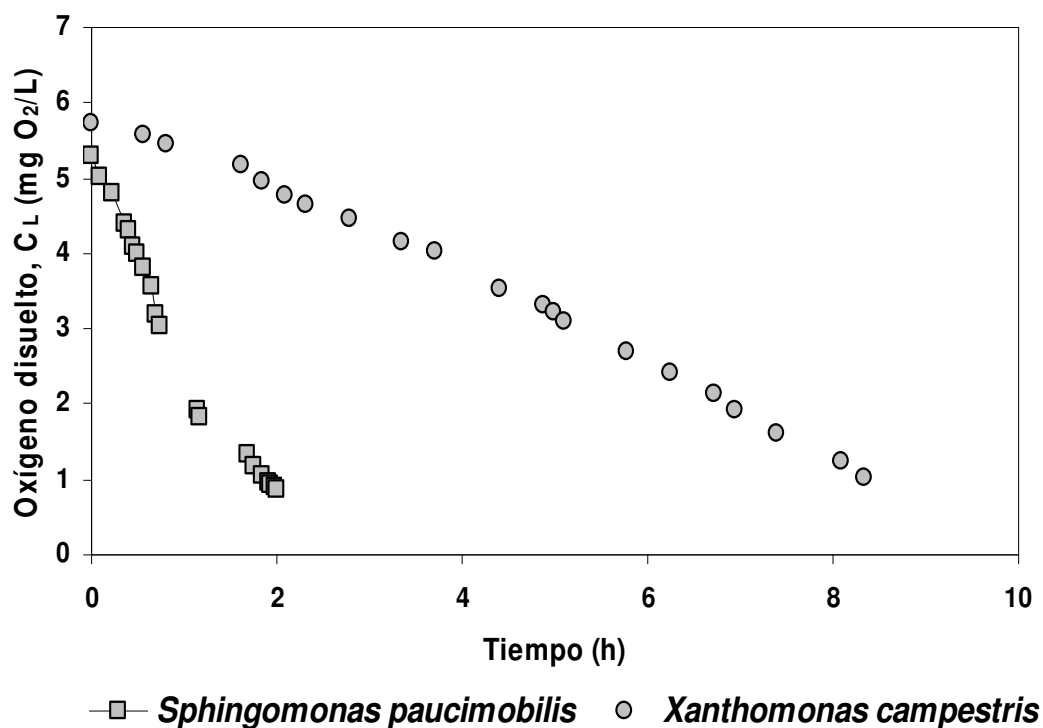
Medio	N (rpm)	$k_L a$ ( $\text{s}^{-1}$ )
S	100	$5.96 \times 10^{-3}$
	200	$7.95 \times 10^{-3}$
Silman-Bagley	100	$1.38 \times 10^{-3}$
	200	$2.73 \times 10^{-3}$
cazu	100	$4.51 \times 10^{-3}$
	200	$9.54 \times 10^{-3}$

### V.2.7.- Efecto de la presencia de células vivas

En la evaluación del MDVP en caldos con células bacterianas vivas se utilizó una variante de la cepa de *S. paucimobilis* de alta tasa de consumo de oxígeno que alcanzó el 20% de TOD en sólo 2 horas, con una velocidad de consumo de oxígeno ( $dC_1/dt$ ) de  $2.53 \text{ mgO}_2/\text{lh}$ , y una cepa de *Xanthomonas campestris* de consumo más lento ( $dC_1/dt = 0.582 \text{ mgO}_2/\text{lh}$ ), ambas

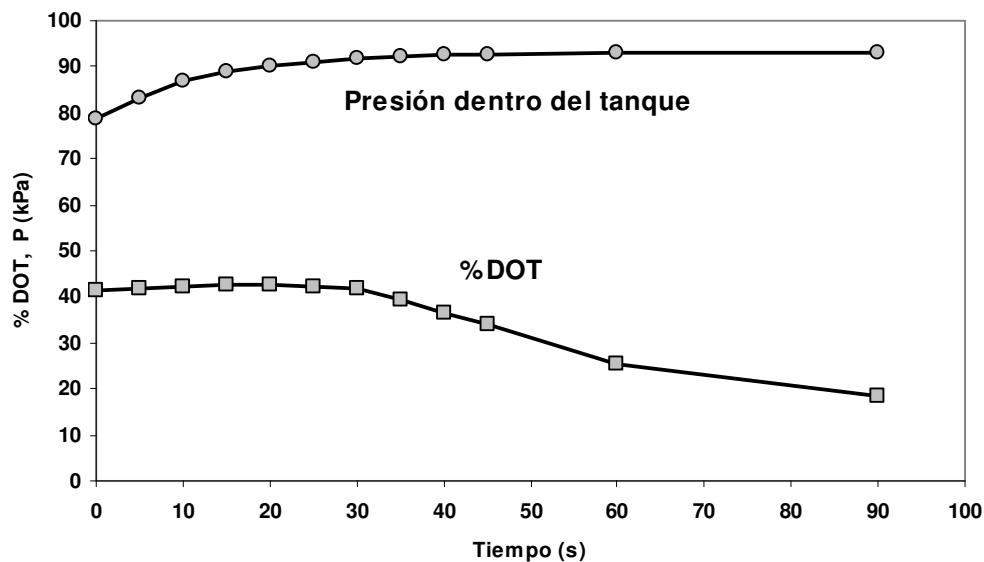


inoculadas en medio S, con un caldo semilla de absorbancia = 0.5 a 540 nm. Para el cálculo de las velocidades de consumo de oxígeno se utilizaron los datos de oxígeno disuelto con un %TOD superior a 20% para evitar los efectos de entrar en la zona de cambios metabólicos provocados por concentraciones de oxígeno inferiores a la crítica, ver figura 5.13.



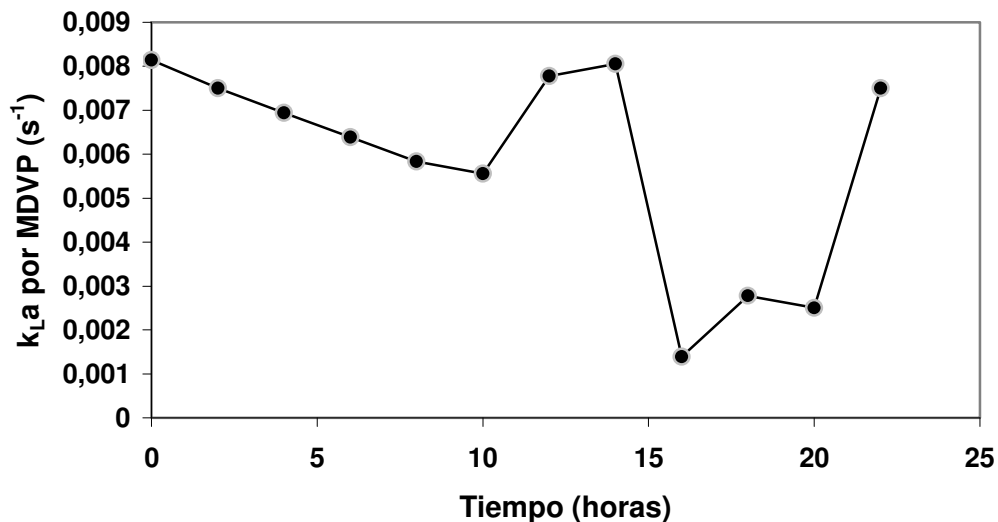
**Figura 5.13.-** Consumo de oxígeno en fermentaciones para prueba del MDVP

En los caldos de *Xanthomonas campestris* se pudo determinar el  $k_L a$ , donde la señal presentó características similares a las presentadas por el medio de cultivo, con tiempos largos para alcanzar el estado estable de la señal de oxígeno, de alrededor de 10 minutos (600 segundos). En los caldos de fermentación con *Sphingomonas paucimobilis* no se pudo determinar  $k_L a$  como consecuencia de la velocidad de consumo alta, ya que al realizar la prueba de  $k_L a$  y presurizar el tanque, la señal de presión en el tanque se incrementó y alcanzó el estado estacionario como en el resto de los fluidos, mientras que la señal de oxígeno empezó a incrementarse en respuesta al aumento de la presión, pero después cayó por efecto del consumo del microorganismo, como puede observarse en la figura 5.14. Para que el MDVP sea aplicable en caldos de fermentación, la velocidad de consumo microbiano debe permitir el mantenimiento del estado estable durante la determinación del  $k_L a$ . En el caso de *Sphingomonas paucimobilis*, la velocidad de consumo de oxígeno es tan alta, que el incremento en la concentración de oxígeno causado por el incremento de presión, no alcanza a compensar la desaparición de oxígeno provocada por el consumo. Durante la determinación del  $k_L a$  en los caldos, el parámetro  $L$  se mantuvo constante.



**Figura 5.14.-** Comportamiento de los sensores en caldos de fermentación con microorganismo con alta velocidad de consumo de oxígeno, *S. paucimobilis*, medio S, 12 l

En los caldos examinados aquí, el valor del  $k_{L,a}$  se encuentra dentro del mismo orden de magnitud del  $k_{L,a}$  en el medio de cultivo. El valor máximo de  $k_{L,a}$ , es el del medio de cultivo saturado con aire, correspondiente al valor del  $k_{L,a}$  al momento de la inoculación. El  $k_{L,a}$  determinado a lo largo de la fermentación, muestra un patrón de variación oscilatorio (figura 5.15), en lugar de una tendencia en donde el valor de  $k_{L,a}$  se estabilizó como se reporta en algunas fermentaciones (Dreveton *et al.*, 1994).



**Figura 5.15.-** Evolución del  $k_{L,a}$  determinado por MDVP, fermentación para producción de xantana.

### **V.2.7.1.- Retención de gas en caldos de fermentación**

En los caldos de fermentación de prueba, a tiempos largos de la fermentación, después de alcanzada la fase estacionaria del microorganismo, se observa que el caldo cambia los tiempos de retención de las burbujas de aire, efecto notado en la cantidad de burbujas que se acumulan en las muestras de caldo, dándole un aspecto esponjoso. Dado que los caldos no presentaron incrementos significativos de viscosidad, no se tiene formación abundante de espuma, y la aparición de las burbujas se detecta por un descenso en la presión interna de la cabeza de aire retenida en el tanque; el efecto se explica si una mayor proporción del aire que entra al tanque es retenida en el líquido en vez de salir al espacio libre sobre la columna de líquido.

Cuando se determinó el  $k_L a$  por el MDVP en un caldo en estas condiciones, se observó que al incrementar la presión dentro del tanque no se produjo un cambio en la señal del sensor de oxígeno. Este efecto fue diferente al observado en los líquidos que forman espuma en los cuales la señal de los sensores cambió y no se estabilizó. Al eliminar estas burbujas del caldo de fermentación (ver el procedimiento descrito en el punto IV.17 del capítulo IV Metodología) y realizar nuevamente la determinación de  $k_L a$ , se pudo llevar a cabo la medición, lo que indica que la presencia de las burbujas retenidas es una limitante para la determinación de  $k_L a$  por el MDVP.

### **V.2.7.2.- Efecto de la determinación de $k_L a$ en la velocidad de consumo de oxígeno**

Al determinar el  $k_L a$  por el MDVP, se cambian temporalmente las concentraciones de oxígeno disuelto, lo cual ocurre en todos los métodos dinámicos. Este cambio puede causar una alteración en las velocidades de consumo de oxígeno del microorganismo, sobre todo si se considera que el tiempo de la determinación es largo en comparación de otros métodos dinámicos, como el método por degaseado. Para comprobar el efecto del método sobre la velocidad de consumo, se realizaron determinaciones sucesivas de  $k_L a$  en el caldo de fermentación. La determinación produce una alteración de la velocidad de consumo de oxígeno, reflejado en el cambio de la pendiente de la tendencia de disminución del %TOD. Este cambio es temporal, y la velocidad de consumo tiende a recuperarse después de alrededor de 30 minutos. Así en el caldo es recomendable que las determinaciones de  $k_L a$  no se realicen en intervalos de menos de una hora, para evitar que la determinación coincida con la etapa de transición.

### **V.3.- Determinación de $k_L a$ en caldos de fermentación**

Se realizaron 9 fermentaciones en el reactor de 12 L, de acuerdo con el arreglo experimental indicado en la tabla 4. 5 del capítulo IV Metodología. Tres de estas fermentaciones (F3, F5 y F8) no presentaron crecimiento del microorganismo

Adicionalmente se realizó un control de producción en un reactor de 3.5 L, con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* a 200 rpm y flujo de aire de 3.5 L/min equivalente a 1 vvm, indicada como F10.

### V.3.1.- Condición de limitación de oxígeno y estrés

En las fermentaciones realizadas, en el reactor de 12 L, no se obtuvieron cambios significativos en las condiciones reológicas del medio, siendo las fermentaciones para producción de dextrana las únicas que mostraron un incremento moderado de viscosidad; sin embargo esto no modificó el espesor de película sobre la membrana del sensor, por lo que el parámetro L se mantuvo constante durante las fermentaciones y con un valor similar al del medio de cultivo correspondiente al microorganismo empleado (ver tabla 5.9), a la velocidad de agitación correspondiente.

En las fermentaciones realizadas en el reactor de 12 L no se observaron cambios en las características reológicas de los caldos de fermentación, en contraposición a lo que sucedió en el reactor semilla de 2 L, donde sí se produjeron cambios en la reología del medio. Por ejemplo para *S. paucimobilis* en el reactor de 12 L no se observaron cambios en el comportamiento reológico del caldo bajo ninguna de las condiciones usadas, mismas que en el tanque semilla de 2 L produjeron los cambios en la reología del caldo reportados en la tabla 5.18.

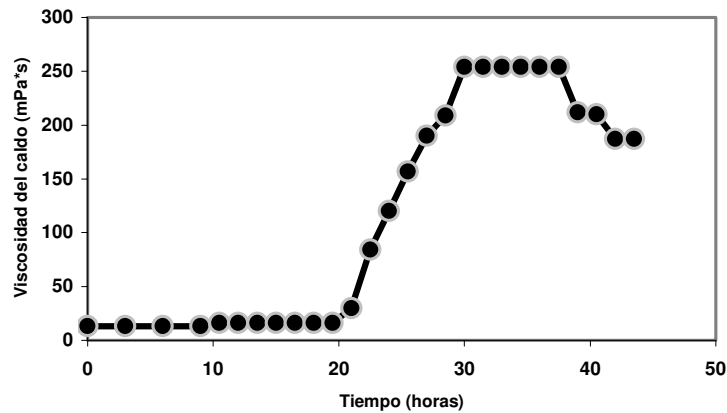
**Tabla 5.18**  
Parámetros reológicos en el caldo de fermentación para *S. paucimobilis*,  
reactor semilla de 2 L

Tiempo de fermentación (h)	Tipo de comportamiento reológico	Viscosidad (mPa*s)	K (Pa <sup>1-n</sup> )	n (adimensional)
0	Newtoniano	13.0		
2	Newtoniano	12.3		
4	Newtoniano	13.5		
6	Newtoniano	14.3		
8	Pseudoplástico		0.0160	0.9526
10	Pseudoplástico		0.0348	0.8832
12	Pseudoplástico		0.0852	0.7376

A fin de conocer si una baja transferencia de oxígeno en el reactor de 12 L era lo que ocasionaba la baja producción de las cepas, se tomó al mejor productor disponible (*Leuconostoc mesenteroides*) y se realizó una fermentación control, en un reactor de laboratorio (Bioflo, con 3 impulsores Rusthon) de 5 litros de volumen nominal, con 3.5 litros de medio. Se obtuvo un caldo con viscosidad cercana a los 250 mPa\*s, manteniéndose el comportamiento newtoniano del caldo. La evolución de la viscosidad se presenta en la figura 5.16.

La baja producción de polisacárido en las fermentaciones es atribuible a:

- Una limitación en el oxígeno disuelto disponible
- Estrés por ondas de choque



**Figura 5.16.-** Fermentación control, reactor de 3.5 L *Leuconostoc mesenteroides*, 30 °C, medio cazu, 200 rpm, 3.5 L aire/min (1vvm)

### V.3.1.1.- Limitación en la cantidad de oxígeno disuelto

En las fermentaciones en el reactor de 12 L se observó la condición de limitación en la cantidad de oxígeno disuelto disponible, expresada en el valor de la velocidad de acumulación de oxígeno disuelto ( $dC_1/dt$ ), el cual en todas las fermentaciones es pequeño, con valores tendientes a cero (ver tabla 5.17), lo cual indica que casi todo el oxígeno disuelto a partir de las burbujas de gas, es consumido por las células.

**Tabla 5.19**

Velocidad de acumulación de oxígeno disuelto ( $dC_1/dt$ ) en fermentación con *Xanthomonas campestris*,  $F_a = 12$  L/min

Tiempo (horas)	$dC_1/dt$ (mgO <sub>2</sub> /Lh)
13	0.0808
16	0.0041
19	0.0271
23	0.0967
26	0.0246

Como causas de la limitación de oxígeno se pueden citar:

a) La baja solubilidad inicial del oxígeno en el medio de cultivo, la cual en comparación con el agua a la misma velocidad de agitación y el mismo reactor de 12 L tiene valores de  $k_L a$ , cerca de 3 veces menores (ver tablas 5.3 y 5.17).

b) La geometría del fermentador que combina el uso de placas deflectoras con el impulsor de listón helicoidal genera un patrón de flujo que forma remolinos, los cuales permanecen estáticos al lado de las placas deflectoras. La presencia de las placas rompe la

componente axial de las corrientes generadas por el impulsor helicoidal, y crea trayectorias secundarias inestables.

La influencia de las corrientes inestables se puede observar en el valor de  $k_L a$  obtenido durante las fermentaciones con *Leuconostoc mesenteroides*, para las mismas condiciones de operación, donde el  $k_L a$  en el reactor de 3.5 L en el cual las corrientes de líquido siguen una trayectoria regular es al menos diez veces mayor que el  $k_L a$  obtenido en el tanque de 12 L.

**Tabla 5.18**

$k_L a$  para la fermentación con *Leuconostoc mesenteroides* 30 °C, 200 rpm, medio cazu, 1 vvm aireación, reactores de 3.5 L y 12 L

Tiempo de fermentación	$k_L a$ ( $h^{-1}$ )		$k_L a_{3.5L}/k_L a_{12L}$
	Reactor 12 L	Reactor 3.5 L	
0	34.67	372.49	10.74
3	31.45	364.99	11.60
6	28.76	360.00	12.51
9	32.75	349.99	10.68
12	14.56	342.13	23.49
15	18.56	300.00	16.16
18	12.62	289.28	22.92
21	10.23	267.95	26.14
24	15.76	250.00	15.86
27	09.56	185.71	19.42
30	12.56	157.14	12.51

### V.3.2.- Estrés por ondas de choque

El impulsor de listón helicoidal utilizado en las fermentaciones, produce un flujo axial asociado a la vibración del tanque y del sistema mecánico. La vibración se ve incrementada por el uso de placas deflectoras.

En su estudio sobre el comportamiento de tanques aireados usando diferentes sistemas de agitación Nienow *et al.* (1996) encontraron que en tanques aireados a 1 vvm la vibración aumenta de 2.5 a 3 veces más cuando hay un flujo axial de burbujas. La presencia de exopolisacárido también afecta a los niveles de vibración del tanque; en caldos con 1.7% de xantana el fermentador vibraba con una amplitud del 75 al 100% superior a la obtenida cuando el fermentador contiene agua.

La vibración produce un tipo de pulso sónico llamado onda de choque.

A diferencia de las ondas de sonido convencionales, las ondas de choque son un pulso sónico de generación y transmisión individual, y tienen como características una elevación de la presión en pocos nanosegundos, para después caer con un breve período de presión negativa.

Las ondas de choque tienen frecuencias bajas y no causan calor tisular, por lo demás se someten a todas las propiedades físicas del sonido, pueden ser reflejadas, absorbidas,

refractadas o difractadas de acuerdo con la magnitud de la energía que las origine, las características de impedancia del objeto; pero su efecto sobre materiales biológicos tiene características especiales (Leal *et al.*, 2006).

Se han descrito dos efectos diferentes de las ondas de choque sobre los materiales biológicos. Por una parte están los efectos directos de la onda sobre las células, y los efectos generados por efectos secundarios llamados cavitación.

El efecto directo de la onda de choque se basa en la interacción entre la interfaz del líquido circundante y la célula, ya que existe una resistencia acústica, por las diferencias de impedancia entre los dos elementos. La impedancia acústica del agua es de  $1.49 \times 10^5$  g/cm<sup>2</sup>, mientras que la de las células es de 3 a 3.5 veces mayor (Leal *et al.*, 2006). Durante su transmisión por la membrana de la célula se generan importantes fuerzas de cizalla por el gradiente de presión que lleva la onda.

La cavitación se produce por la interacción de la onda de choque con burbujas de gas. Cuando una onda de choque golpea la burbuja de gas, la diferencia de presión causa una reducción del tamaño de la burbuja, un proceso en el que la burbuja absorbe parcialmente la energía de la onda. Si las fuerzas son demasiado altas, la burbuja colapsa y libera la energía absorbida al medio en forma de una nueva onda acústica. Dadas las características de desplazamiento de las ondas de choque en una sola dirección, las burbujas colapsan de manera asimétrica, siguiendo la dirección de la onda, generando un movimiento del líquido circundante que ocupa el espacio vacío, que dejan las burbujas, a alta velocidad. Este fenómeno, denominado implosión, produce un efecto “turbina” o “corriente de chorro”, representado por líquido que se desplaza a velocidades altas, de hasta 900 m/s. Si una célula es atrapada en el flujo de la corriente de chorro sufre lesiones, principalmente a nivel de membrana (Endl y Steinbach, 1996).

En experimentos con células en suspensión Endl y Steinbach (1996) y Suhr y Brummer (1994), encontraron un patrón de daño celular predecible y dependiente del número de ondas y la magnitud de la energía aplicada. Donde el daño celular se realiza a nivel de membrana.

La integridad de la membrana es uno de los factores que afectan a la producción de polisacáridos bacterianos, ya que el ensamblado de las unidades que forman el polímero está asociada a procesos de transporte a través de la membrana y requiere de enzimas ancladas en la superficie de la célula (Alves *et al.*, 1991; Sutherland, 1985).

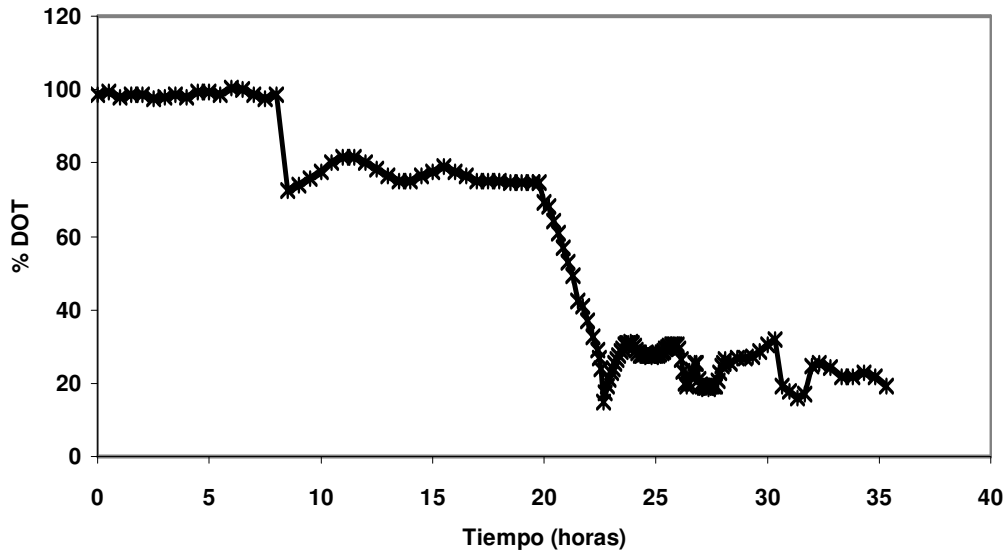
Así la exposición continua a ondas de choque suaves puede ocasionar una disminución de la productividad del polisacárido bacteriano, como se observó en las fermentaciones realizadas en el presente trabajo.

### **V.3.3.- Oxígeno disuelto durante las fermentaciones**

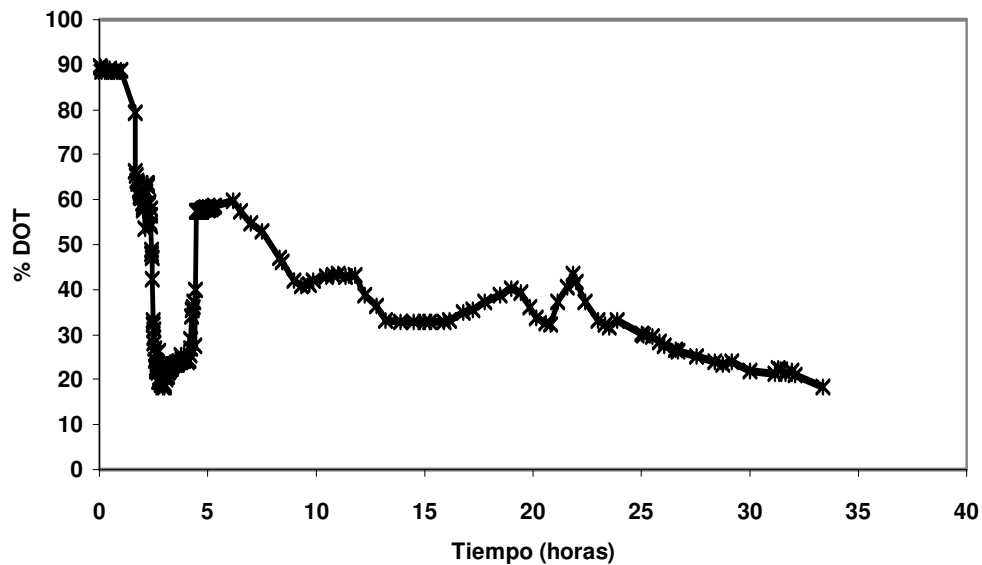
Se presentaron dos tipos de cambio del oxígeno disuelto en las fermentaciones:

a) Concentración de oxígeno disuelto constante durante la fase lag del microorganismo; con patrón oscilatorio durante la fase de crecimiento (ver figura 5.17)

b) Cambio de la concentración de oxígeno disuelto de tipo oscilatorio durante toda la fermentación (ver figura 5.18).



**Figura 5.17.-** Fermentación sin cambio en la concentración de oxígeno disuelto durante la fase lag del microorganismo. *S. paucimobilis*, 30 °C, 200 rpm, listón helicoidal, medio S, aireación 12 L/m (1 vvm)



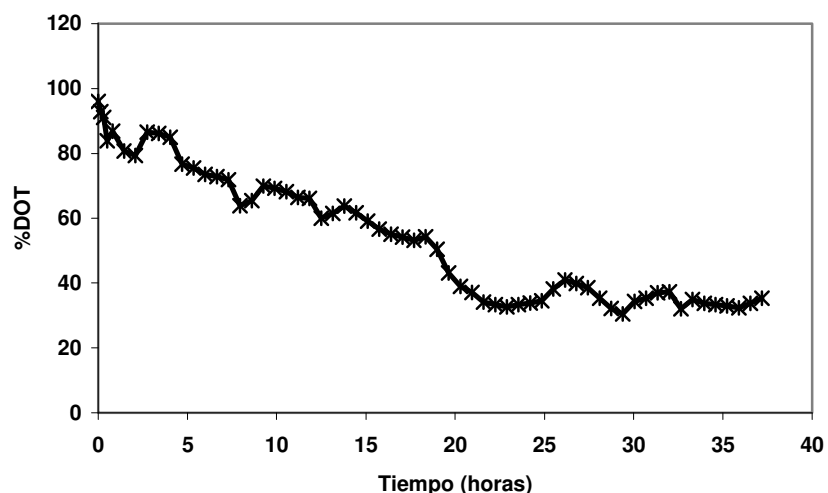
**Figura 5.18.-** Consumo de oxígeno, *Sphingomonas paucimobilis*, 30 °C, medio S, 200 rpm,  $F_a = 12$  L/min (1 vvm).

Para comprobar que las oscilaciones obtenidas en las fermentaciones no fueran inducidas por el método de determinación del  $k_{L,a}$ , que cambia temporalmente el gradiente de oxígeno disuelto, se realizó una fermentación en la que no se determinó  $k_{L,a}$ . En esta fermentación la fluctuación en el patrón de consumo del oxígeno disuelto fue producida sólo



por el microorganismo, y el patrón oscilatorio siguió presentándose; como se muestra en la figura 5.19.

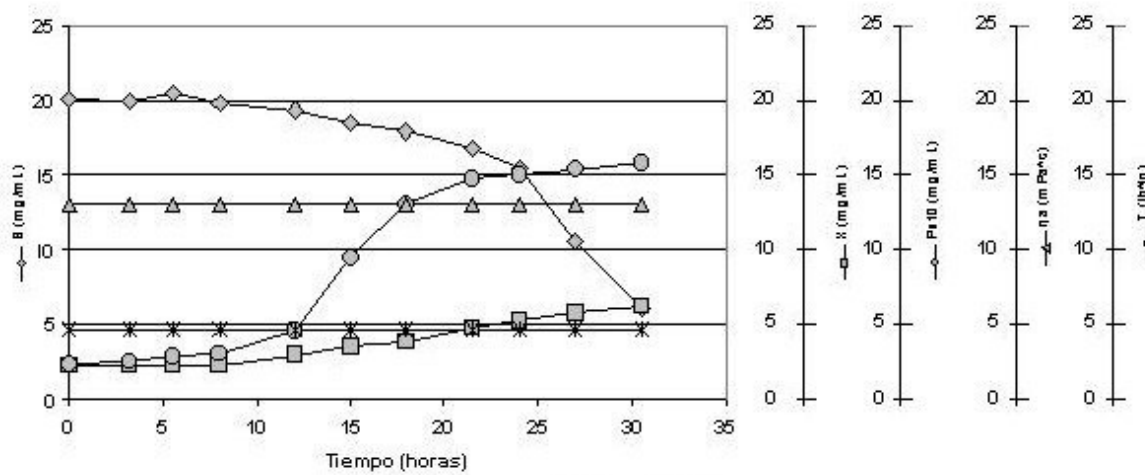
Los perfiles de cambio de la concentración de oxígeno disuelto (ver anexo 3) son consistentes con la presencia de una condición de estrés, donde se tienen oscilaciones irregulares en la concentración de oxígeno disuelto (Esgalhadó *et al.*, 2002).



**Figura 5.19.-** Variación del oxígeno disuelto en una fermentación sin determinación del  $k_L a$ , *Sphingomonas paucimobilis*, 30 °C, medio S, 100 rpm,  $F_a = 12$  L/min, tanque piloto.

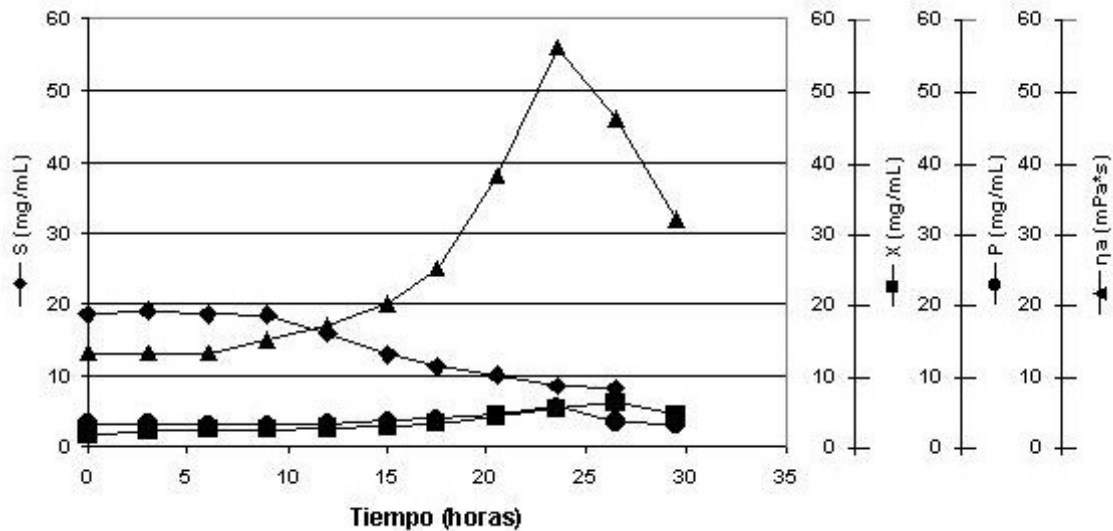
### V.3.4.- Comportamiento cinético

Las fermentaciones realizadas a 100 y 200 rpm, en el reactor de 12 L con un flujo de aire de 12 L/min de aireación (1 vvm), produjeron caldos con un crecimiento lento, baja producción de exopolisacárido y con torque y viscosidad constantes, como puede observarse en la figura 5.20.



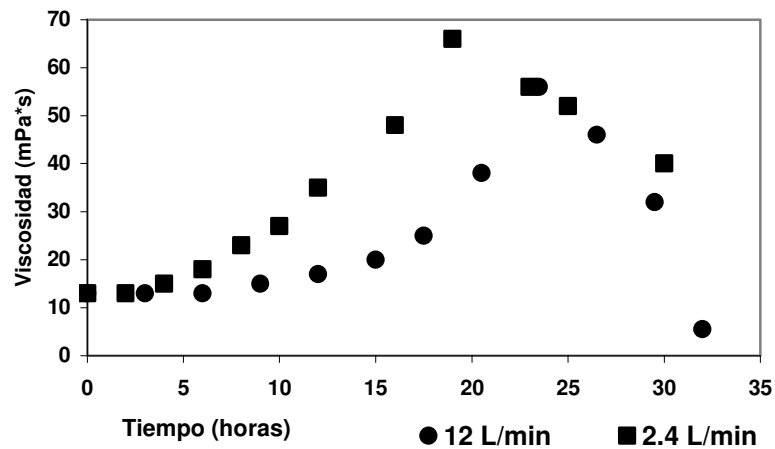
**Figura 5.20.-** Formación de biomasa y exopolisacárido, consumo de sustrato, viscosidad y torque del caldo; *Sphingomonas paucimobilis*, 30 °C, medio S, 200 rpm,  $F_a = 12$  L/min, reactor 12 L.

Ninguno de los caldos de *Xanthomonas campestris* y *S. paucimobilis* obtenidos en el reactor de 12 L presentaron cambios de viscosidad. Las fermentaciones realizadas con *Leuconostoc mesenteroides*, tuvieron un comportamiento similar, con poco crecimiento, aunque si hubo un incremento en la formación de exopolisacárido, y en la viscosidad del caldo, hasta alcanzar los 54 mPa\*s. El caldo en todos los tiempos muestreados presentó un comportamiento newtoniano, que no produjo un incremento en el torque del caldo, como se muestra en la figura 5.21.



**Figura 5.21.-** Formación de biomasa y exopolisacárido, consumo de sustrato, viscosidad y torque del caldo; *Leuconostoc mesenteroides*, 30 °C, medio cazu, 200 rpm, 1 vvm aireación.

En las fermentaciones con 2.4 L/m (0.2 vvm) de flujo de aire no se produjeron cambios en los perfiles de producción de *S. paucimobilis*, mientras que *Xanthomonas campestris* no presentó crecimiento. Con *Leuconostoc mesenteroides* se obtuvieron incrementos moderados de viscosidad. La viscosidad máxima del caldo de *Leuconostoc mesenteroides* cambiando el flujo de aire de 12 L/m a 2.4 L/m fue de sólo 12 mPa\*s, como puede observarse en la figura 5.22



**Figura 5.22.-** Viscosidad a diferentes flujos de aire, *Leuconostoc mesenteroides*, 30 °C, medio cazu 200 rpm.

El comportamiento cinético descrito anteriormente, donde la falta de cambio en las condiciones reológicas del caldo es una consecuencia de la baja producción de polisacárido, se evidencia en las bajas velocidades específicas de crecimiento y las bajas tasas de formación de producto que desarrollaron las diferentes cepas en el tanque piloto, como puede observarse en los valores reportados en la tablas 5.21 a y b (los datos a partir de los cuales se calcularon las velocidades se incluyen en el anexo 3)

**Tabla 5.21**

a) Razón de cambio en fase exponencial

Fermentación	dX/dt (mg/mL h)	dS/dt (mg/ mL h)	dP/dt (mg/mL h)
F1	0.2490	-0.6656 (*)	0.0688
F2	0.1830	-0.6751 (*)	0.1105 (*)
F4	0.1940	-0.4379	0.0161 (*)
F6	0.3055	-0.6761	0.2267
F7	0.2707	-0.9675	0.0592
F9	0.0991	-0.6156 (*)	0.1677 (*)
Control (F10)	0.1720	-0.6300	0.4093

(\*) indica que la función de la velocidad no es lineal, por lo que se presenta la velocidad promedio

b) Velocidades específicas

Fermentación	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	$q_{\text{Smáx}}$ (h <sup>-1</sup> )	$q_{\text{Pmáx}}$ (h <sup>-1</sup> )
F1	0.1005	-0.2694	0.0278
F2	0.0610	-0.2250	0.0368
F4	0.0606	-0.1368	0.0050
F6	0.1111	-0.2458	0.0824
F7	0.1893	-0.6765	0.0413
F9	0.0455	-0.3078	0.0838
Control (F10)	0.0828	-0.3043	0.1977

$q_s$  = velocidad específica de consumo de sustrato

$q_p$  = velocidad específica de formación de producto

Se observó que aunque se tienen velocidades de consumo de sustrato elevadas, la formación de biomasa es pequeña y la formación de polisacárido se encuentra muy reducida. El bajo valor de las velocidades obtenidas puede ejemplificarse con el valor de la velocidad específica de crecimiento máxima de *Xanthomonas campestris*, que Herbst *et al* (1987) reportan como 0.25 h<sup>-1</sup>, mientras que la velocidad alcanzada por la cepa en el tanque piloto utilizado fue de 0.0606 h<sup>-1</sup>.

### V.3.5.- Determinaciones de $k_L a$ en caldos de fermentación

Se logró determinar el  $k_L a$  y calcular la velocidad de transferencia de oxígeno durante la fermentación, hasta la fase estacionaria, en donde se presentó el fenómeno de atrapamiento de aire que se detectó durante las pruebas del MDVP en caldos de fermentación (ver punto V.2.7.1).

Para realizar la cuantificación de la VTO, se registró de forma continua la concentración de oxígeno disuelto en el medio líquido ( $C_L$ ), los perfiles de variación del consumo de oxígeno disuelto obtenidos se presentan en el anexo 3, y se determinó el  $k_L a$  al tiempo de muestreo del caldo.

Se encontraron diferencias en la variación del  $k_L a$  de acuerdo con el tipo de gradiente de oxígeno disuelto ( $C^* - C_L$ ) que se presentó en cada etapa de crecimiento del microorganismo.

En las fermentaciones con fase lag de crecimiento (F1, F2, F4, F6 y F10), la fase lag coincide con el mantenimiento de un gradiente de oxígeno disuelto. El  $k_L a$  en las zonas donde el gradiente de oxígeno disuelto ( $C^* - C_L$ ) se mantiene constante decrece en forma exponencial.

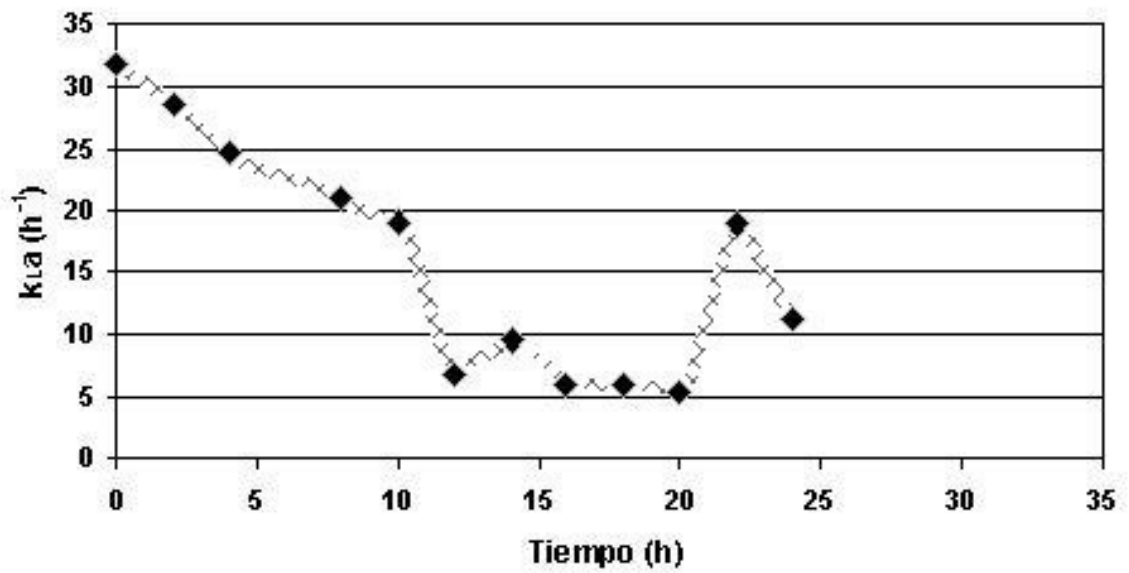
En las fermentaciones sin fase lag (F7 y F9) y en la fase exponencial de las fermentaciones con fase lag, el gradiente de oxígeno disuelto ( $C^* - C_L$ ) es oscilatorio, y los valores de  $k_L a$  siguen ese mismo patrón ondulatorio, en forma similar a lo encontrado en los caldos utilizados como fluido modelo.

Si bien el gradiente de oxígeno y el  $k_L a$  presentan variaciones ondulatorias éstas no son similares entre sí, con respecto a la amplitud y el período en el tiempo.

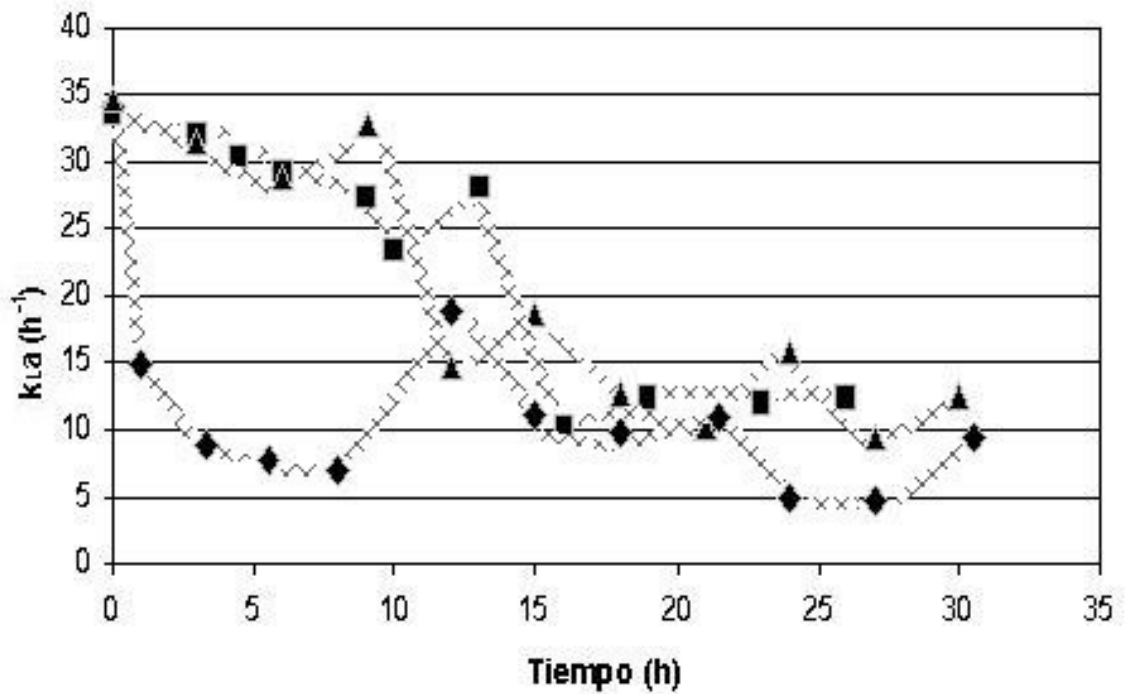
El cambio del  $k_L a$  y de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) en estas zonas se ajusta a un modelo retroalimentado entre la VTO y la velocidad de consumo específico del microorganismo. Los datos de  $k_L a$  obtenidos se muestran en las figuras 5.23 y 5.24

En la fermentación control llevada a cabo en el reactor de 3.5 L, el fenómeno de atrapamiento de gas durante la fase estacionaria, no se presentó, y se obtuvo el  $k_L a$  durante toda la fermentación.

Si bien los caldos no presentaron cambios de parámetros reológicos se encontraron cambios significativos en la velocidad de transferencia de oxígeno, oxígeno disuelto acumulado y consumo de oxígeno disuelto por los microorganismos.

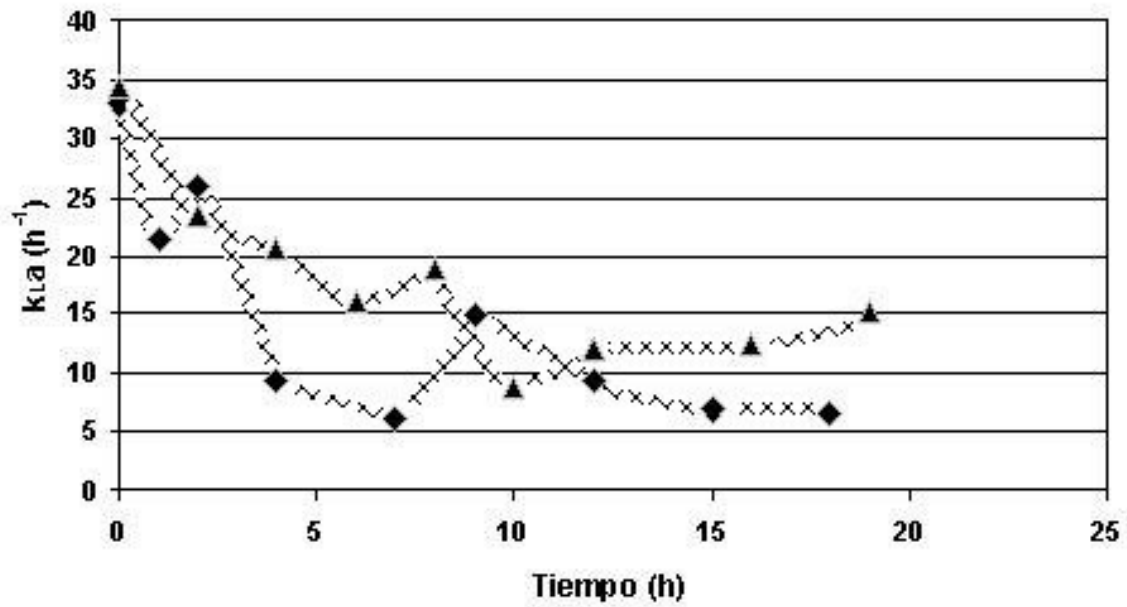


a) ♦ *Sphingomonas*, reactor 12 L

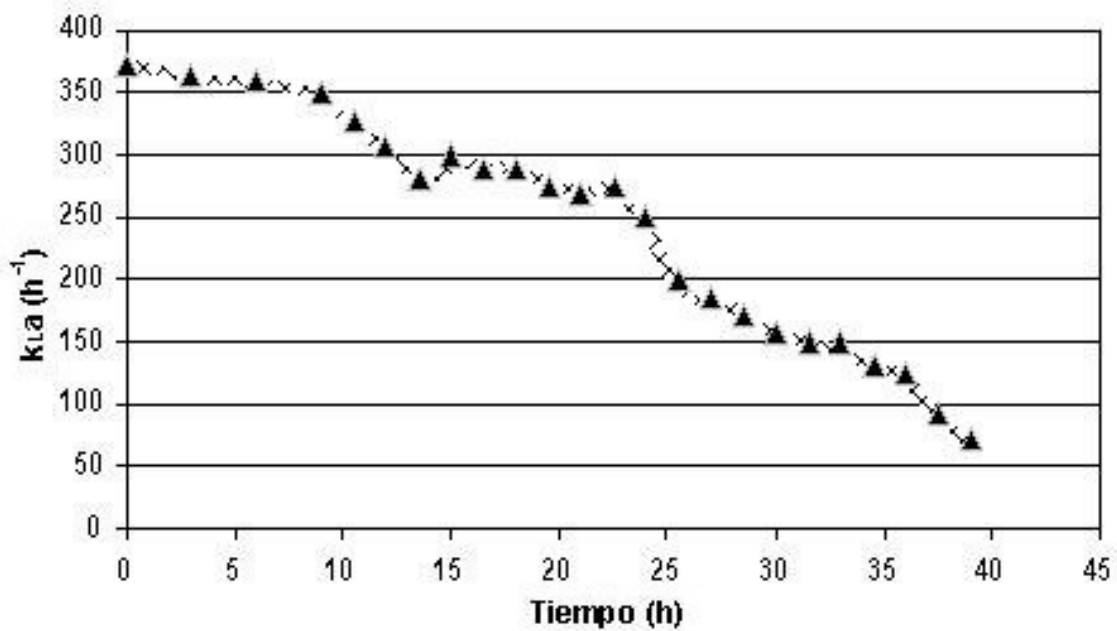


b) ♦ *Sphingomonas* ■ *Xanthomonas* ▲ *Leuconostoc*, reactor 12 L

Figura 5.23.- Variación del  $k_{La}$  en las fermentaciones, en reactor de 12 L, con un flujo de aire de 12 L/min (1 vvm), a) N = 100 rpm, b) N = 200 rpm



a)  $\blacklozenge$  *Sphingomonas*  $\blacktriangle$  *Leuconostoc*, reactor 12 L



b)  $\blacktriangle$  *Leuconostoc*, reactor 3.5 L

Figura 5.24.- Variación del  $k_{La}$  a) en las fermentaciones, reactor de 12 L, con un flujo de aire de 2.4 L/min (0.2 vvm),  $N = 200$  rpm, b) en la fermentación control, reactor de 3.5 L, flujo de aire 3.5 L/min (1vvm),  $N = 200$  rpm

### V.3.6.- $k_L a$ en la fase lag (fase de adaptación del microorganismo)

En 5 de las 7 fermentaciones analizadas (F1, F2, F4, F6 y F10) se detectó una variación en el valor del  $k_L a$  durante la fase lag, aún cuando el valor de la concentración de oxígeno disuelto, y por lo tanto del gradiente de oxígeno disuelto ( $C^* - C_L$ ), permanecían constantes.

El  $k_L a$ , en las zonas donde el gradiente de oxígeno disuelto ( $C^* - C_L$ ) se mantiene constante, decrece en forma exponencial de acuerdo con la relación (ver anexo 4):

$$VTO = VTO_0 e^{kt} \quad (5.12)$$

$$VTO = k_L a (C^* - C_L) \quad (5.13)$$

Donde  $VTO_0$  es la velocidad de transferencia de oxígeno al tiempo cero.

Al linealizar la ecuación (5.12) por semilogaritmos utilizando los valores de tiempo vs. velocidad de transferencia de oxígeno (ver anexo 4), se puede obtener la constante  $k$  que es la velocidad específica de consumo de oxígeno durante la fase lag.

Las velocidades específicas de consumo de oxígeno durante la fase lag se presentan en la tabla 5.22. Los valores más altos corresponden a *S. paucimobilis*, en concordancia con lo obtenido al estudiar el efecto de la presencia de células vivas (ver punto V.2.7), *Xanthomonas campestris* tiene una velocidad de consumo específica de aproximadamente la mitad con respecto a *S. paucimobilis*; mientras que *Leuconostoc mesenteroides* tiene los requerimientos de oxígeno más bajos de las 3 cepas consideradas.

**Tabla 5.22**

Velocidades específicas de consumo de oxígeno durante la fase lag

Fermentación	Microorganismo	Medio	Velocidad de agitación (rpm)	Flujo de aire (L/min)	k (h <sup>-1</sup> )
F1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	100	12	0.0478
F2	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	200	12	0.0525
F4	<i>Xanthomonas campestris</i>	S	200	12	0.0256
F6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	cazu	200	12	0.0109
F10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	cazu	200	3.5	0.0070

### V.3.7.- $k_L a$ en la fase exponencial (fase de crecimiento del microorganismo)

Los valores de  $dC_L/dt$ , con respecto al valor de la velocidad específica de consumo de oxígeno y al de la velocidad de transferencia de masa, fueron muy pequeños, en la mayoría de los casos tendientes a cero, por lo que la ecuación de balance de oxígeno en la fermentación (ecuación 5.14) se puede simplificar a la ecuación 5.15

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a(C^* - C_L) - Q \quad (5.14)$$

$$k_L a(C^* - C_L) = Q \quad (5.15)$$

Sin embargo, al comparar los datos experimentales, la igualdad propuesta por la ecuación 5.15, no se cumple.

Aún incluyendo el valor de  $dC_L/dt$ , como se indica en la ecuación 5.14, no se establece una igualdad en el balance de oxígeno. En la tabla 5.23, se presentan los datos obtenidos en la fermentación con el patrón de cambio del  $k_L a$  más cercano a la linealidad (F10), la cual también tiene los valores de  $dC_L/dt$  más altos; la diferencia entre la VTO y Q es varios órdenes de magnitud superior al valor de  $dC_L/dt$ .

**Tabla 5.23**

Velocidad de transferencia de oxígeno y velocidad específica de consumo de oxígeno en caldo de fermentación.  
Fermentación control (F10)

Tiempo (horas)	$k_L a$ (h <sup>-1</sup> )	$dC_L/dt$ (mg O <sub>2</sub> /L h)	VTO (mg O <sub>2</sub> /L h)	Q (mg O <sub>2</sub> /L h)
13.5	282.14	0.1372	336.13	137.27
15.0	300.00	0.1450	424.03	145.04
16.5	289.29	0.1528	473.15	152.80
18.0	289.29	0.1606	524.60	160.58
19.5	275.00	0.1684	572.00	168.37
21.0	267.86	0.1762	605.14	176.18
22.5	275.00	0.1840	682.00	183.92
24.0	250.00	0.1918	697.84	191.76
25.5	200.00	0.1996	647.12	199.60
27.0	185.71	0.2074	658.67	207.49
28.5	171.43	0.2152	676.57	215.17
30.0	157.14	0.2230	669.08	223.15
31.5	150.00	0.2308	712.00	230.96
33.0	150.00	0.2386	745.33	238.57
34.5	132.14	0.2464	686.00	246.55
36.0	125.00	0.2542	660.00	254.26



La relación entre el  $k_L a$  y la velocidad específica de consumo de oxígeno ( $Q$ ), en estas fermentaciones, difiere de la proporcionalidad propuesta por la ecuación 5.14, pero se ajusta a un modelo de tipo retroalimentado (ver anexo 4), de la forma:

$$a_1 \frac{dQ}{dt} + a_2 Q = a_3 [k_L a (C^* - C_L)] \quad (5.16)$$

$a_1$ ,  $a_2$  y  $a_3$  son parámetros de la ecuación.  $a_1$  es una función del tiempo,  $a_2$  está relacionado con las condiciones iniciales del sistema, y para este trabajo queda definida como  $C_{L0}/C^*$ , donde  $C_{L0}$  es la concentración de oxígeno disuelto al tiempo cero, y  $a_3$  está relacionado con el amortiguamiento (disminución de la amplitud de las oscilaciones) de la señal de oxígeno disuelto, y por lo tanto representa una resistencia a la transferencia de oxígeno.

La ecuación retroalimentada 5.16 es una ecuación no homogénea que predeciría un sistema oscilatorio amortiguado, donde la amplitud de las oscilaciones va disminuyendo en forma periódica. Dichas oscilaciones no se presentaron en los datos experimentales, lo que indica que los coeficientes  $a_1$ ,  $a_2$  y  $a_3$  de la ecuación no son constantes, y por lo tanto la ecuación no tiene una solución analítica.

Para calcular el valor de  $a_1$ ,  $a_2$  y  $a_3$  se utilizaron los datos experimentales para calcular  $Q$ ,  $dQ/dt$  y  $VTO$ , y a través de iteraciones del valor de las constantes lograr que la igualdad entre los dos lados de la ecuación se cumpla con el menor porcentaje de error.

En todas las fermentaciones analizadas, los valores de  $a_1$ ,  $a_2$  y  $a_3$ , resultantes de las iteraciones, estiman valores de  $k_L a$  que no difieren en más del 5% del  $k_L a$  experimental (ver figura 5.25).

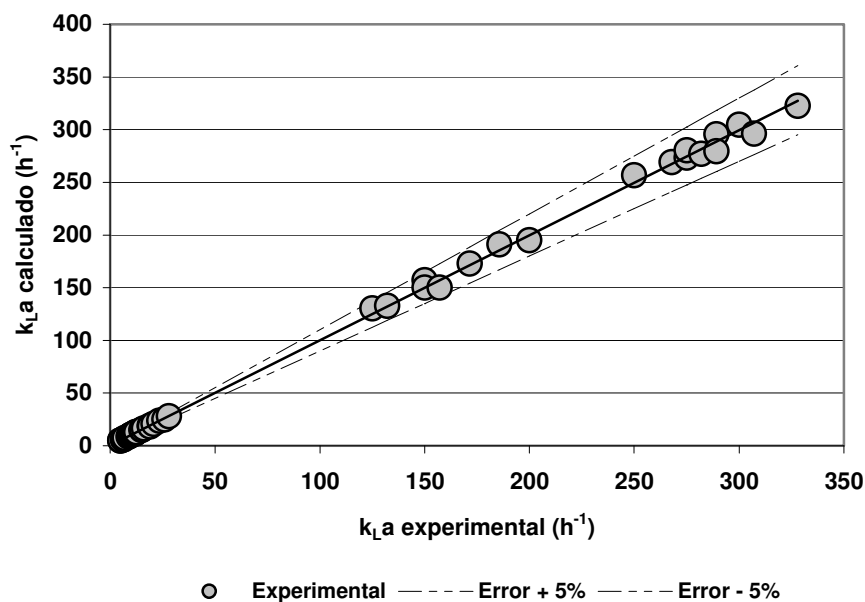


Figura 5.25.-  $k_L a$  calculado por la ecuación retroalimentada vs.  $k_L a$  experimental

En los datos analizados,  $a_1$  es una función del tiempo que adquiere la forma:

$$a_1 = K_{\text{retro}} * t \quad (5.17)$$

Donde  $K_{\text{retro}}$  es una constante de proporcionalidad. Los valores de  $K_{\text{retro}}$  utilizados en fermentaciones analizadas se presentan en la tabla 5.24

**Tabla 5.24**  
Valores de  $K_{\text{retro}}$  para el cálculo del parámetro  $a_1$

Microorganismo	Medio	Vel	Flujo de	$K_{\text{retro}}$
<i>Sphingomonas</i>	S	200	12	1
<i>Sphingomonas</i>	S	100	12	1
<i>Xanthomonas</i>	S	200	12	1
<i>Leuconostoc</i>	cazu	150	12	1
<i>Sphingomonas</i>	S	200	2.4	2
<i>Leuconostoc</i>	cazu	200	2.4	10
<i>Leuconostoc</i>	cazu	200	3.5	1

Las propiedades matemáticas de  $a_2$  indican que debe tener un valor menor de 1 y que está relacionada con las condiciones al tiempo cero del sistema en estudio. En una fermentación, al tiempo cero no se tiene consumo microbiano, pero sí se tiene oxígeno disuelto, por lo que  $a_2$  debe estar relacionada con el valor de  $C_L$  a tiempo cero, pero como tiene un valor menor de 1, debe ser una proporción entre concentraciones; dado que el mayor valor de oxígeno disuelto es  $C^*$ , en este trabajo se propone:

$$a_2 = \frac{C_{L0}}{C^*} \quad (5.18)$$

El cociente  $C_{L0}/C^*$  está relacionado con las condiciones de aireación y mezclado del tanque, que son las que determinan el valor de  $C_{L0}$ , y al estar relacionado con las condiciones iniciales de la fermentación, tiene un fuerte efecto sobre la amplitud de las oscilaciones en el consumo de oxígeno.

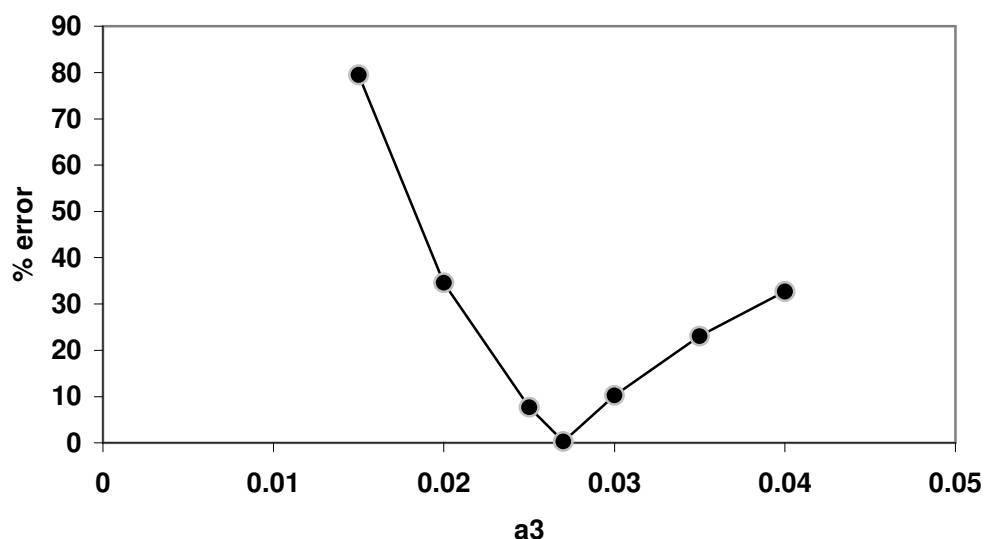
Las fermentaciones con una zona con concentración de oxígeno constante durante la fase lag del microorganismo tienen un coeficiente  $a_2$  superior a 0.89, mientras que las fermentaciones que tienen coeficientes inferiores a 0.89 no la tienen (ver tabla 5.25).

**Tabla 5.25**  
Efecto de  $a_2$

Microorganismo	Medio	Vel agitación (rpm)	Código	Flujo de aire (L/min)	Zona con concentración de oxígeno disuelto constante durante la fase lag	$a_2$
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	200	F2	12	Sí	0.9868
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	100	F1	12	Sí	0.9467
<i>Xanthomonas campestris</i>	S	200	F4	12	Sí	0.9326
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	cazu	200	F6	12	Sí	0.9243
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	S	200	F7	2.4	No	0.5908
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	cazu	200	F9	2.4	No	0.5480
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	cazu	200	F10	3.5	Sí	0.8947

Las propiedades de  $a_2$  indican que las condiciones de operación como la velocidad de agitación (N) y flujo de aire ( $F_a$ ) tienen efecto en el cambio de la VTO a través de la cantidad de oxígeno disuelto que el sistema posee en el momento de la inoculación del tanque ( $C_{i,0}$ ).

El parámetro  $a_3$  es el coeficiente relacionado con la modificación de la velocidad de transferencia de oxígeno, ya que corresponde a la fuerza de amortiguamiento. Siendo que el incremento en la viscosidad también ocasiona un amortiguamiento de la velocidad de transferencia de oxígeno, podría existir una relación entre  $a_3$  y la viscosidad; sin embargo no hay una relación aparente, así los sistemas de viscosidad constante tienen valores variables de  $a_3$ , y las fermentaciones con mayor viscosidad tienen los valores de  $a_3$  más bajos, por ejemplo en las fermentaciones de *Leuconostoc mesenteroides* que desarrollaron viscosidad, el valor de  $a_3$  tiene el mismo orden de magnitud que en las fermentaciones que no desarrollaron viscosidades altas. El parámetro  $a_3$  utilizado en la ecuación retroalimentada fue calculado a partir de los datos experimentales, iterando hasta obtener el error mínimo. El proceso de iteración no es libre, pues sólo hay un valor de  $a_3$  que permite calcular el valor exacto de  $k_L a$ , como puede observarse en la figura 5.26 en donde se muestra el porcentaje de error en la estimación del  $k_L a$ , para el tiempo  $t = 13$  horas de la fermentación con *Xanthomonas campestris* ( $k_L a$  experimental =  $28.03 \text{ h}^{-1}$ ), donde se aprecia que sólo hay un valor en el cual el porcentaje de error, entre el  $k_L a$  experimental y el  $k_L a$  calculado por la ecuación retroalimentada, es mínimo.



**Figura 5.26.-** Error durante la estimación del parámetro  $a_3$ .

La resistencia indicada por  $a_3$  es variable con el tiempo, y puesto que dentro del reactor las concentraciones cambian con respecto al tiempo por acción del microorganismo, esta resistencia debe estar relacionada con la actividad del agente biológico.

Para poder discriminar si este efecto es consecuencia de una actividad dentro del caldo de fermentación y no de la manipulación matemática de la ecuación, se utilizaron los datos experimentales de  $k_L a$ , para hacer un análisis de variables mínimas. La obtención de las variables mínimas se llevó a cabo por un proceso de linealización multivariable, que permite simplificar el sistema no lineal descrito por la ecuación retroalimentada. El consumo microbiano se expresó en términos de las variables a partir de las cuales se calculó, que son la biomasa ( $X$ ) y la concentración de oxígeno disuelto ( $C_1$ ).

Utilizando la reducción a variables mínimas, el parámetro  $a_3$  puede ser estimado a partir de los datos de biomasa en forma de una relación polinomial de segundo grado como la ecuación 5.19, donde  $a_0$ ,  $a_1$ , y  $a_2$  son los coeficientes de la ecuación y  $X$  es la biomasa en el fermentador en  $\text{mg}_{\text{cel/p. seco}}/\text{mL}$ .

$$a_3 = a_0 + a_1 X + a_2 X^2 \quad (5.19)$$

El parámetro  $a_3$  calculado con la ecuación 5.19 presentó desviaciones no mayores al 15% utilizando como referencia el valor calculado en la ecuación 5.16 (ver figura 5.27).

La relación establecida por la ecuación 5.19 indica que la resistencia  $a_3$  está relacionada con el incremento de células, aunque no indica cómo estas células están cambiando las condiciones de transferencia de oxígeno. Posiblemente este efecto sea similar al descrito por Galaction et al. (2004) quienes mencionan que la adsorción de las células vivas sobre la superficie de las burbujas disminuye el área de la interfase efectiva, y que los metabolitos

secretados por las células pueden ser la causa de alteraciones en los patrones de coalescencia de las burbujas.

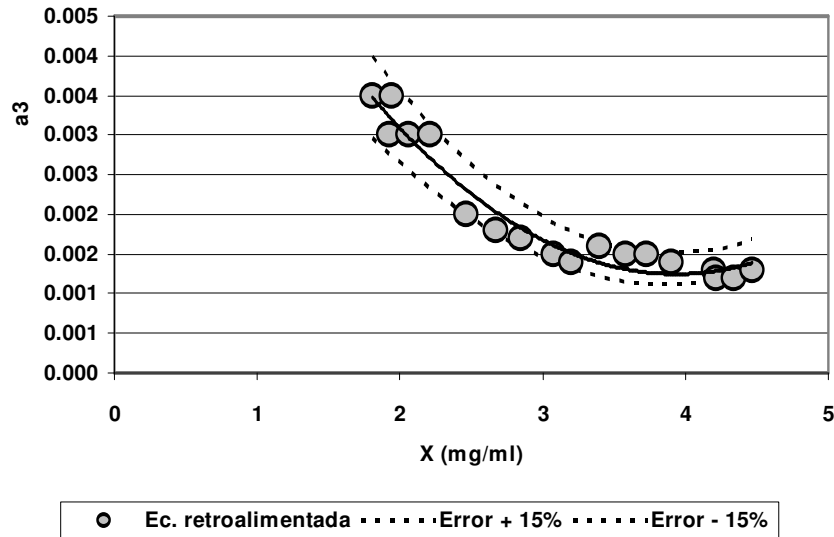


Figura 5.27.- Parámetro  $a_3$  en función de la biomasa.

### V.3.8.- $k_L a$ en la fase estacionaria

En la fase estacionaria del microorganismo se observó que el caldo empezó a retener pequeñas burbujas de aire. Este efecto es diferente a la formación de espuma y se encuentra caracterizado por un descenso en la presión interna de la cabeza de aire retenida en el tanque (de 84.7 a 78.1 KPa). La caída de presión dentro del tanque indica que una parte del aire que entra al tanque es mantenida en el líquido en vez de salir al espacio libre del tanque.

En la determinación de  $k_L a$ , el caldo se llenó de pequeñas burbujas de gas y el nivel de espuma sobre la superficie del líquido disminuyó. La presencia de estas burbujas en caldos de fermentación fue observada por Herbst *et al.* (1987) durante la producción de xantana, y por Dreveton *et al.* (1994) durante la producción de gelana. Dreveton *et al.* (1994) llamaron a este estado “microemulsión” por su semejanza con las mezclas donde hay pequeñas gotas suspendidas, en forma estable, en un líquido. A diferencia de una emulsión, estas burbujas no están incorporadas en forma estable al caldo; al detenerse la aireación y la agitación las burbujas permanecen en el caldo por unas horas, y después se separan.

En el caldo lleno de pequeñas burbujas no se logró determinar el  $k_L a$  por MDVP; al restringir la salida de aire, la presión aumenta y la señal del sensor de presión se estabiliza rápidamente como sucede en los medios de cultivo (ver figura 5.13), pero la señal del sensor de oxígeno permanece constante, indicando que no hay un cambio en la presión interna del oxígeno contenido en las burbujas, que es lo que produce el incremento en la concentración de oxígeno disuelto.

#### V.4.- Efecto de la fase gaseosa en fluidos modelo y caldos de fermentación

Durante el desarrollo del trabajo experimental, se observó la influencia del estado de agregación de la fase gaseosa en la determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ( $k_L a$ ) en los fluidos modelo por la presencia de espuma y en los caldos de fermentación por atrapamiento de gas durante la fase estacionaria.

Generalmente las limitaciones de los métodos de determinación de  $k_L a$  en caldos de fermentación se atribuyen al cambio de las condiciones de mezclado de acuerdo con el incremento de viscosidad, que afecta a los tiempos de retención de las burbujas de gas; sin embargo los caldos producidos en este trabajo tuvieron características reológicas, potencia aplicada, torque y número de Reynolds constantes, y aún así presentaron cambios en la retención de fase gaseosa que ya no permitieron calcular el  $k_L a$  en la fase estacionaria.

De acuerdo a los antecedentes teóricos presentados en el capítulo I, el método dinámico por variación de presión es aplicable en mezclas gas-líquido, donde el gas atraviesa el líquido permaneciendo como fases diferenciadas, y como fluidos incompresibles. Si la mezcla deja de comportarse como fluidos incompresibles la determinación experimental de  $k_L a$  ya no puede realizarse porque el aumento de presión no es proporcional al incremento en la solubilidad del oxígeno. Así las limitaciones encontradas por la formación de espuma y la acumulación de burbujas en la fase estacionaria, indicarían que la mezcla gas-líquido ha dejado de comportarse como fluidos incompresibles.

En el caso de los fluidos newtonianos de alta viscosidad y los fluidos no newtonianos con bajo índice de consistencia y bajo índice de comportamiento al flujo, que fueron los que presentaron abundante formación de espuma, tanto la señal del sensor de oxígeno como la señal del sensor de presión no se estabiliza. La espuma es una matriz gaseosa de burbujas que no pueden salir del líquido y que es estable por la cantidad de líquido entre las burbujas. La cantidad de líquido varía del 5 al 37% del volumen de la espuma (Durian, 2003). Pero la espuma es un sistema dinámico donde el líquido atrapado es impulsado por la gravedad de regreso al seno del mismo, y al hacerlo arrastra conglomerados de burbujas y también hace que las burbujas superficiales estallen, produciendo la inestabilidad que se observó tanto en la señal del sensor de oxígeno como en el sensor de presión. La espuma al incorporarse al líquido se convierte en burbujas individuales, fenómeno llamado inversión de fase (Durian, 2003), que desvía las trayectorias de las burbujas que salen del dispersor produciendo los cambios en la señal del sensor de oxígeno. Mientras que las burbujas que estallan al igual su presión con la presión de la cabeza de aire sobre el caldo, producen los cambios observados en la señal del sensor de presión.

En los caldos de fermentación lo que se produce es la acumulación progresiva de pequeñas burbujas de gas, probablemente estabilizadas por los componentes del medio de cultivo. Con el incremento del componente gas, el caldo deja de ser un líquido simple y pasa a un estado de transición que Herbst *et al.* (1987) y Dreveton *et al.* (1994) llamaron “microemulsión”, aunque no lo es en el sentido de que no está formada por dos líquidos, tampoco es una espuma porque el punto crítico del cambio de fase se da al tener un 63% de

gas (Durian, 2003), por sus características es más similar a una dispersión coloidal; pero su naturaleza no queda bien definida.

Durian (2003) indica que los estados de transición líquido-gas se comportan como sólidos elásticos, los cuales no responden a cambios moderados de presión, lo que es consistente con los datos experimentales obtenidos, en donde, cuando se alcanza la fase estacionaria se tiene una retención de gas, y al realizar la determinación de  $k_L a$ , el sensor de presión se comporta en forma similar a las determinaciones en las otras fases de crecimiento, pero el sensor de oxígeno no tiene cambios, puesto que las burbujas de gas de que está rodeado ya no se comportarían como una fase diferenciada, sino como un componente del estado de transición.

Hay indicativos de que este cambio en el estado de la fase gaseosa, se presenta en todas las fermentaciones para producción de polisacáridos, probablemente favorecido por la naturaleza del ensamblaje del polisacárido (Sutherland, 1985), que no siempre es completo y produce fragmentos de polímeros activos en la estabilización de interfases (McGuire y Krisdhasima, 1992).

En condiciones de obtención de altas concentraciones de polisacárido, el efecto del atrapamiento de la fase gaseosa sería menos evidente, pues sería difícil separarlo del cambio en los tiempos de retención de las burbujas producidas por el incremento de viscosidad, y del cambio en las condiciones de mezclado, además de que los otros métodos para cálculo de  $k_L a$  no registran el cambio en la presión interna que indica el cambio en el estado de agregación de la mezcla.

Sin embargo, el cambio en el estado de agregación de la mezcla afectaría a las determinaciones de  $k_L a$  que involucren el desplazamiento de la fase gaseosa, como los métodos dinámicos por intercambio de gases y el método por balance de gases.

#### **V.5.- Retroalimentación de la velocidad de transferencia de oxígeno en caldos de fermentación**

La velocidad de transferencia de oxígeno en las fermentaciones puede ser descrita, en función de una retroalimentación entre la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) y la velocidad específica de consumo microbiano (Q); lo cual no es consistente con lo esperado, ya que un incremento de la velocidad de transferencia de oxígeno debería producir un incremento del consumo, y viceversa, puesto que las células no pueden estar consumiendo más del sustrato disponible en el medio.

Sin embargo, la dinámica de la fase gaseosa (descrita en el punto V.4) donde se presenta la retención de una fracción del flujo de gas en el caldo permite el análisis del efecto de retroalimentación.

El término dominante en la ecuación 5.16 y que determina la amplitud de la retroalimentación es el factor de resistencia  $a_3$ .

Si bien no se puede especificar el origen exacto del factor de resistencia  $a_3$ , el análisis matemático realizado muestra que depende de la concentración de biomasa, posiblemente por un efecto similar al mencionado por Galation *et al.* (2004) quienes indican que la adsorción de las células vivas sobre la superficie de las burbujas, disminuye el área de la interfase efectiva, y que los metabolitos producidos por de la célula producen un cambio de los patrones de coalescencia de las burbujas de gas.

El efecto de los metabolitos es congruente con lo encontrado en este trabajo en el estudio de los fluidos modelo con caldos de cultivo, en donde variaciones en las concentraciones de solutos, que en el caso de la fermentación se producen tanto por consumo como por la secreción de sustancias al medio, provocan una alteración en los tiempos para alcanzar el estado estable del sensor de oxígeno.

Si el cambio en las condiciones de coalescencia de las burbujas se produce, el parámetro  $a_3$  también englobaría un efecto indirecto de las condiciones hidrodinámicas dentro del caldo, similar al observado en los fluidos de prueba con viscosidad creciente, en donde el valor del  $k_L a$  obtenido por el MDVP esta afectado por la cantidad de burbujas que choquen o permanezcan en las cercanías del sensor de oxígeno.

En su descripción de los procesos de absorción Hines y Maddox (1987), y Sherwood y Pigford (1952) también atribuyen la resistencia a la transferencia de masa (en este caso oxígeno) a los patrones de coalescencia y a la elasticidad de los grupos de burbujas.

Por lo tanto si el factor  $a_3$  incluye ambos fenómenos es posible relacionar a las burbujas, retenidas en el caldo, con la biomasa.

La adsorción de las células a la interfase gas-líquido reportada por Galation *et al.* (2000) para bacterias y hongos, también ha sido ampliamente documentada para otros cultivos de células, principalmente células animales. Galation *et al.* (2000) mencionan que las burbujas más pequeñas son las que son recubiertas en forma preferencial por los microorganismos. Este mismo efecto lo reportan Weber y Paddock (1993) y Andre *et al.* (1983). Chattopadhyay *et al.* (1995) reportan que usando métodos microscópicos y de video de alta velocidad se ha podido observar que las células se adhieren tanto a la superficie de la burbuja de gas como a la interfase gas-líquido. Thinh *et al.* (en Chattopadhyay *et al.*, 1995) encontraron zonas donde la concentración de células en las cercanías de la burbuja es mayor a la del medio, por la adhesión de células a la interfase.

La migración de las células hacia la interfase es el comportamiento predominante cuando los microorganismos se encuentran en vida libre, pues al ser una zona con intercambio de nutrientes de una fase a otra, también tienen la mayor concentración posible de éstos (Campbell, 1987).

La adhesión de células en caldos para producción de exopolisacáridos bacterianos no se menciona en los trabajos que sirven como antecedente a este trabajo, sólo existen indicios indirectos en los trabajos de Herbst *et al.* (1987) y Dreveton *et al.* (1994).



Sin embargo la aerotaxis (migración hacia zonas de mayor concentración de oxígeno) es un fenómeno común en fitopatógenos vegetales, como lo son la mayoría de los productores de exopolisacáridos bacterianos (GooMDIGan, 1982), y ha sido descrita por Miles *et al.* (1977) para *Xanthomonas campestris* y por Ashtaputre y Sha (1995) para *Sphingomonas paucimobilis*.

McGuire y Krisdhasima (1992) indicaron que la adhesión de células en burbujas de aire se ve favorecida por la presencia de soluciones diluidas de proteína y bajas concentraciones de células; condiciones presentes en los caldos de fermentación de este trabajo. Esto indicaría que la adhesión de células a la fracción de gas que queda retenida en el reactor estaría favorecida.

Al tener células directamente en la interfase, se tendría un consumo que no alteraría la fisiología del microorganismo, pero sí estaría alterando el flux de oxígeno disuelto que pasa al medio líquido, y que es el que se encuentra disponible para la población celular que permanece en suspensión. Considerando este efecto, es explicable la retroalimentación entre el consumo celular y la velocidad de transferencia de oxígeno.

## CONCLUSIONES

En relación con la determinación del efecto del incremento de la viscosidad, el índice de consistencia, el índice de comportamiento al flujo, la composición del medio de cultivo y el consumo celular sobre la determinación de  $k_L a$  por el método dinámico de variación de presión (MDVP), se concluye que:

- a) El comportamiento del  $k_L a$  obtenido en el reactor de 12 L, mediante el método dinámico por variación de presión (MDVP) con respecto a la viscosidad ( $\eta$ ), el índice de consistencia (K) y el índice de comportamiento de flujo ( $n$ ) es similar al reportado para otros métodos dinámicos, pero con un mayor intervalo de detección.
- b) El  $k_L a$  es calculable mediante el método dinámico por variación de presión (MDVP) en un intervalo de viscosidad (0.85 – 279 mPa\*s), índice de consistencia (0.0662 – 4.41 mPa\*sn) e índice de comportamiento de flujo (0.85 – 0.42) compatible con lo esperado en caldos de fermentación para la producción de exopolisacáridos.
- c) El  $k_L a$  se pudo calcular mediante el método dinámico por variación de presión (MDVP) en los medios de cultivo utilizados, presentándose un efecto de la composición que no está relacionado con la concentración de los componentes.
- d) El método dinámico por variación de presión (MDVP) no es aplicable cuando se tienen microorganismos que tengan alta tasa de consumo de oxígeno, ya que el consumo supera al incremento de oxígeno soluble resultante de la modificación de la presión.

En lo concerniente a la cuantificación de la velocidad de transferencia de oxígeno en fermentaciones para producción de exopolisacárido utilizando el método dinámico de variación de presión (MDVP) para la determinación de  $k_L a$ , las conclusiones son:

- a) Fue posible determinar el  $k_L a$  en todos los caldos de fermentación probados, hasta la fase estacionaria de crecimiento del microorganismo.
- b) En las fermentaciones realizadas no se pudo calcular el  $k_L a$  en la fase estacionaria, debido a un cambio en el comportamiento de la fase gaseosa.
- c) Los datos de velocidad de transferencia de oxígeno se ajustaron a un modelo no lineal retroalimentado.

La presencia de la retroalimentación y de un factor de resistencia ( $a_3$ ) asociado tanto a la coalescencia de las burbujas de gas como al incremento de la biomasa, indicaron que la velocidad de transferencia de oxígeno está afectada por un fenómeno de consumo en la interfase gas-líquido, probablemente una colonización bacteriana.

Finalmente, en lo referente a la identificación de las condiciones en fluidos modelo y durante el proceso fermentativo, con efecto sobre la determinación de  $k_La$  por el método dinámico de variación de presión (MDVP), se concluye que:

- a) La determinación de  $k_La$  mediante el método dinámico por variación de presión (MDVP) es afectada por el patrón de mezclado sólo cuando el chorro de burbujas choca directamente con el sensor de oxígeno.
- b) No fue posible determinar el  $k_La$  mediante el método dinámico por variación de presión (MDVP) ya que no se puede determinar cuándo la mezcla líquido-gas cambia de estado de dispersión, ya sea a espuma (fluidos modelo) o a una dispersión estabilizada (caldos de fermentación).
- c) El cambio en las condiciones de operación (flujo de aire y velocidad de agitación) y de microorganismo, no afecta a la determinación de  $k_La$  mediante el método dinámico por variación de presión (MDVP) en caldos de fermentación.

#### **COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS PLANTEADA**

El método dinámico por variación de presión es aplicable para el cálculo del  $k_La$  en caldos de fermentación para la producción de exopolisacáridos, y fluidos modelo de características similares a los caldos de fermentación, produciendo resultados consistentes con lo descrito en trabajos antecedentes.

#### **APORTACIÓN ADICIONAL A LOS OBJETIVOS PLANTEADOS**

El empleo de un método para la determinación del  $k_La$  en un intervalo amplio de condiciones del caldo de fermentación, permitió la identificación del efecto, de dos factores (colonización bacteriana en la interfase, y estado de agregación de la fase gaseosa) no especificados en estudios previos sobre la producción de exopolisacáridos.

## RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

El método dinámico por variación de presión (MDVP) demostró ser una herramienta útil en el estudio de la transferencia de oxígeno, tanto en fluidos modelo como en caldos de fermentación. Dada la importancia que tiene el tema para la optimización y estandarización de los procesos fermentativos aerobios, principalmente la producción de exopolisacáridos, el empleo del método puede aportar información que otros métodos de determinación del  $k_L a$  no identifican, como la referente al efecto de la dinámica de la fase gaseosa que se identificó en el presente trabajo.

En esta tesis se exploraron una cantidad limitada de condiciones de operación y los resultados indican que falta explorar un conjunto de mayor amplitud, ya que cada vez que se estudien condiciones diferentes se podrá discriminar efectos particulares de las interacciones de las fases gas-líquido y del componente biológico que están involucradas en la productividad del proceso, y que hasta ahora permanecen estrechamente enlazadas.

Algunos de los aspectos relevantes para seguir estudiando son:

- Las constantes que relacionan al método dinámico por variación de presión (MDVP) y al método dinámico por intercambio de gases (MDIG).
- Qué sucede cuando el espesor de película sobre el sensor se modifica.
- Cuáles son los límites de detección del MDVP cuando no se tiene la limitación de oxígeno.
- Cómo se comporta la velocidad de transferencia de masa cuando hay un cambio significativo en las condiciones reológicas del líquido.
- Cómo puede ser utilizable el método cuando se tienen altas velocidades de consumo microbiano de oxígeno.

## REFERENCIAS

- Amanullah A., Christensen L., Hansen K., Nienow A., (2002) Dependence of Morphology on Agitation Intensity in Fed-Batch Cultures of *Aspergillus oryzae* and Its Implications for Recombinant Protein Production, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 77, No. 7, pp 815-826.
- Amanullah A., Serrano-Carreón L., Castro B., Galindo E., Nienow A., (1998) The Influence of Impeller Type in Pilot Scale Xanthan Fermentations, *Biotechnol. and Bioeng.*, vol. 57, No. 1, pp 95-108.
- Andrews G., (1989) Estimating Cell and Product Yield, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 33, pp 256 – 265.
- Apha, Awwa, WPCF (1982) Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales, Ed. Diaz de Santos, España
- Atkinson B., Mavituna F., (1991) *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, Second edition, Chapter 5, Stockton Press, New York, EUA.
- Audet J., Thibault J., Le Duy A., (1996) Polysaccharide Concentration and Molecular Weight Effects on the Oxygen Mass Transfer in a Reciprocating Plate Bioreactor, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 52, pp 507 – 517.
- Badino A., Facciotti M., Schmidell W., (2001) Volumetric Oxygen Transfer Coefficients ( $k_L a$ ) in Batch Cultivations Involving Non-Newtonian Broths, *Biochem. Eng. J.*, vol. 8, pp 111-119.
- Bailey J. and Ollis D. (1986) *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw Hill, Singapore.
- Barret E., Kwan H., (1985) Bacterial Reduction of Trimethylamine Oxide, *Ann. Rev. Microbiol.*, vol 39, pp 131-49
- Bertrand J., Coudec J. and Angelino H., (1980) Power Consumption, Pumping Capacity and Turbulence Intensity in Baffled Stirred Tanks: Comparison between Several Turbines, *Chem. Eng. Sc.*, 35, 2157-2163.
- Brewster R., Vanderwerf C., McEwen W., (1978) *Curso de Química Orgánica Experimental*, 1ª. Reimp., Alhambra, España, 32, 149
- Briggs J. y Peat D., (1991) *Espejo y Reflejo, del Caos al Orden*, CONACYT-Gedisa, México
- Briggs J. y Peat D.; (1999) *Las Siete Leyes del Caos*, Grijalbo, Barcelona España.
- Brock T. y Madigan M (1991) *Microbiología*, 6ª ed., Prentice Hall Hispanoamericana, México
- Cadmus M., Rogovin S., Burton K., Pittsley J., Knutson C. and Jeanes A., (1976) Colonial Variation in *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459 and characterization of the polysaccharide from a variant strains, *Can. J. Microbiol.*, vol. 22, pp942-948

- Calik P., Calik G., Ozdamar T., (2000) Oxygen-Transfer Strategy and Its Regulation Effect in Serine Alkaline Protease Production by *Bacillus licheniformis*, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 69, No. 3, pp 301 – 311.
- Calik P., Calik G., Takac S., Ozdamar T., (1999) Metabolic Flux Analysis for Serine Alkaline Protease Fermentation by *Bacillus licheniformis* in a Defined Medium: Effect of the Oxygen Transfer Rate, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 64, No. 2, pp 151 – 167.
- Calmet J., García Monjo J., (1979) *Manual Práctico del Laboratorio Químico y Farmacéutico*, Alhambra, Barcelona España
- Campbell R., (1987) *Ecología Microbiana*, Limusa , México
- Capra F., (1998) *La Trama de la Vida. Una nueva Perspectiva de los Sistemas Vivos*. Anagrama, Barcelona España.
- Carbajal R. Tecante A., Gonzalez I., Bello T., (2002) Purificación del Exopolisacárido Gelana por Extracción Etanólica de Células, en *Memorias del Tercer Encuentro Internacional de Biotecnología*, UPIBI-IPN
- Carbajal R., Tecante A., Aguilar G., Trejo B., (1999) Efecto de las Condiciones de Conservación sobre la Viabilidad y Producción de Exopolisacárido en *Sphingomonas paucimobilis*, en *Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería*, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería,
- Castro Figueroa A. (1997) *Ecuaciones en Derivadas Parciales*, Addison-Wesley Iberoamericana, E.U.A.
- Chapra S., y Canale R. (1998) *Métodos Numéricos para Ingenieros*, McGraw Hill Interamericana, 4ª ed., México
- Chattopadhyay D., Rathman J. and Chalmers J., (1995) Thermodynamic Approach to Explain Cell Adhesion to Air-Medium Interfaces, *Biotech. and Bioeng.*, 48, 649-658.
- Dawson M., (1992) The influence of agitator type on fluid dynamics in oxygen mass transfer in a pilot scale mixing vessel, Ph.D. thesis, University of Birmingham
- Demain A., Solomon N. (1986) *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, American Society for Microbiology, Washington, USA.
- Drevetton E., Monot F., Ballerini D., Lecourtier J., Choplin L., (1994) Effect of Mixing and Mass Transfer Conditions on Gellan Production by *Aeromonas elodea*, *J. Ferm. Bioeng.*, vol. 77., No. 6, pp 642-649.
- Durian D.,(2003) *The Strange Foam*, NASA Divulgarion Articles
- Esener A., Roels J., Kossen W., (1983) Theory and Applications of Unstructured Growth Models: Kinetic and Energetic Aspects, *Biotech. and Bioeng.*, vol. XXV, pp 2803 – 2841

- Esgalhado M., Caldeira A., Roseiro J., Emery N. (2002) Sublethal Acid Stress and Uncoupling Effects on Cell Growth and Product Formation in *Xanthomonas campestris* Cultures, *Biochem. Eng. J.*, vol. 12, pp 181 – 192.
- Galaction A., Cascaval D., Oniscu C., Turnea M., (2004) Prediction of Oxygen Mass Transfer Coefficients in Stirred Bioreactors for Bacteria, Yeast and Fungus Broths, *Biochem. Eng. J.*, vol. 20, pp 85-94.
- Gao F., Jeevarajan A., Anderson M., (2004) Long-Term Continuous Monitoring of Dissolved Oxygen in Cell Culture Medium for Perfused Bioreactors Using Optical Oxygen Sensors, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 86, No. 4, pp 425 – 433.
- Geankoplis C. (1994) *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias*, 3<sup>a</sup> ed, Compañía Editorial Continental, México.
- Gogate P., Pandit A., (1999) Survey of Measurement Techniques for Gas-Liquid Mass Transfer Coefficient in Bioreactor, *Biochem. Eng. J.*, vol. 4, pp 7 – 15.
- Goodman R. (1982) The Infection Process, Chapter 3 in *Phytopathogenic Prokaryotes*, vol. I, Academic Press, UK.
- Goudar C., Ellis T., (2001) Explicit Oxygen Concentration Expresión for Estimating Extant Biodegradation Kinetics From Respirometric Experiments, *Biotech. and Bioeng.* Vol. 75, No. 1, pp 74-81.
- Hardjomidjojo H., Wolf E., Corrieu G., Coefficient de Transfert D'Oxygene D'Un Bioreacteur Traitant Des Fluides Non-Newtoniens. (1997) *Problemes Methodologiques Et Comparaison De Differents Systemes D'Agitation*
- Harper H., Rodwell V, (1978) *Manual de Química Fisiológica* , 6<sup>a</sup>. Ed., El Manual Moderno, México, pp 151-153
- Herbst H., Peters H., Suh I., Schumpe A., Deckwer W., (1987) Oxygen Transfer During Xanthan Fermentation, Annual Meeting and Conference on Biotechnology, AIChE, New York, paper 175a.
- Hernández R. (1979) *Bioquímica Experimental*, Limusa, México
- Hines A., y Maddox R. (1987) *Transferencia de Masa, Fundamentos y Aplicaciones*, Prentice Hall Hispanoamericana, México.
- Hirose T., Moo-Young M. (1969) Mass Transfers in Fermentation Broths and Pulp Suspensions, *Can. J. Chem. Eng.*, vol. 47, pp 265-278.
- Hou C., Ahlgren., Brown W., Nicholson J., (1996) Production of an Extracellular Polysaccharide by *Agrobacterium sp* DS3 NRRL B-14297 Isolated from Soil, *J. Ind. Microb.*, 16, 129-133.

- Ince E., (1988) Integration of Ordinary Differential Equations, 6<sup>a</sup> ed., Interscience Publishers Inc., New York, E.U.A.
- Johnson D. (1998) Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos, Internacional Thomson Editores, México.
- Kurane R., Mita H., (1996) Simple and Cost-Effective Procedure for Purification of Biopolymer from Highly Viscous *Alcaligenes lactus* Culture Broth, J. Ferm. and Bioeng., 81, 90-92.
- Linek V., Moucha T., Dousova M., Sinkule J., (1994) Measurement of  $k_La$  by Dynamic Pressure Method in Pilot-Plant Fermentor, Biotech. and Bioeng., vol. 43, pp 447 - 482
- Linek V., Benes V., Sinkule J., Moucha T., (1993) Non-Ideal Pressure Step Method for  $k_La$  Measurement, Chem. Eng. Sci., vol. 48, No. 9, pp 1593 – 1599.
- Linek V., Benes P., Sinkule J., (1991) Critical Assessment of the steady-State  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  Feeding Method for  $k_La$  Measurement in Fermentors, Biotech. and Bioeng., vol. 35, pp 766 – 770.
- Linek V., Vacek V., Benes P., Sinkule J. (1989a) Transient Characteristics of Oxygen Probes With Significant Liquid Film Effects, Biotech. and Bioeng., vol. 33, pp 39 - 48.
- Linek V., Benes P., Vacek V., (1989b) Dynamic Pressure Method for  $k_La$  Measurement in Large-Scale Bioreactors, Biotech. and Bioeng., vol. 33, pp 1406 – 1412.
- Linek V., Vacek V., Benes P., (1987) A Critical Review and Experimental Verification of the Correct Use of the Dynamic Method for the Determination of Oxygen Transfer in Aerated Agitated Vessel to Water, Electrolyte Solutions and Viscous Liquids, The Chem. Eng. J., vol. 34, pp 11 – 34
- Lobo R. Transferencia de Masa (1996) Editorial Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- McGuire J., Krisdhasima V., (1992) Surface Thermodynamic, Protein Adsorption and Biofil Development. Chapter 4 in Physical Chemistry of Foods, Schartzberg H. and Hartel R. (ed.), Marcel Dekker, USA, 223-262
- Manjula Rao Y., Sureshkumar (2001) Improvement in Birreactor Productivities Using Free Radicals: HOCl-Induced Overproduction of Xanthan Gum from *Xanthomonas campestris* and Its Mechanism, Biotech. and Bioeng., vol. 72, No. 1, pp 62 – 68.
- Margaritis A., Zajic J., (1978) Mixing, Mass Transfer, and Scale-Up of Polysaccharide Fermentations, Biotech. and Bioeng., vol XX, pp 939-1001.
- Martins L., Sá-Correia I., (1991) Gellan Gum Biosynthetic Enzymes in Producing and Non-Producing variants of *Pseudomonas elodea*, Biotechnol. Appl. Biochem., vol. 14, pp 357 – 364.



- Merchuk J., Yona S., Siegel M., Ben Zvi A., On the First-Order Approximation to the Response of Dissolved Oxygen Electrodes for Dynamic  $k_L a$  Estimation, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 35, pp 1161 – 1163.
- Meyer H., Kappeli O., Fiechter A. (1985) Growth Control in Microbial Cultures, *Ann. Rev. Microbiol.*, vol. 39, pp 299-319
- Miles W., Daines R. and Rue J., (1977) The infection Process by *Xanthomonas campestris* var *pruni*, *Phytopathology*, 67, 895-897.
- Montes de Oca F. (2001) Problemas Resueltos de Ecuaciones Diferenciales, Skorpio, México
- Moresi M., Patete M.. (1988) Prediction of  $k_L a$  in convencional stirred fermenters, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol 42, pp 197-210
- Morris V., (1987) New and Modified Polysaccharides. In *Food Biotechnology* (King R., Cheetham P., ed.), vol. I, Elsevier, England
- Nelson G., Robinson G., Boolootian R., (1987) *Fundamental Concepts of Biology*, John Wiley and Sons, New Cork, E.U.A.
- Ozbek B., Gayik S., (2001) The Studies on the Oxygen Mass Transfer Coefficient in a Bioreactor, *Proc. Biochem.*, vol. 36, pp 729-741.
- Pace G., Righelato R., (1980) Production of Extracellular Microbial Polysaccharides, *Adv. Biochem. Eng.*, vol. 15, pp 41 - 70
- Pilón F., Taillandier P., Strehaiano P., (1996) Oxygen Effect on Lactose Catabolism by a *Leuconostoc mesenteroides* Strain: Modeling of General  $O_2$  Dependent Stoichiometry, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 49, No. 1, pp 63-69.
- Pita C., (1994) *Ecuaciones Diferenciales, Una Introducción con Aplicaciones*, Ed. Limusa, México.
- Pons A., Dussap G., Gros J., (1990) Xanthan Batch Fermentations : Compared Performances of a Bubble Column and Stirred Tank Fermentor, *Bioproc. Eng.*, vol. 5, pp 107-114
- Ozbek B., Gayik S., (2001) Determination Methods of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient  $k_L a$  in Bioreactors, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, vol. 4, No. 4, pp 185 – 196.
- Ruchti G., Dunn I., Bourne J. (1981) Comparison of Dynamic Oxygen Electrode Methods for the Measurement of  $k_L a$ , *Biotech. and Bioeng.*, vol. XXIII, pp 277 – 290.
- Ryu D., Humphrey A., (1972) A Reassessment of Oxygen Transfer Rates in Antibiotics Fermentations, *J. Ferm. Technol.*, vol. 50, pp 424-431.
- Salle A., (1988) *Fundamental Principles of Bacteriology*, McGraw-Hill, New Delhi, India

- Sahoo S., Rao K., Suresh A., Suraishkumar G., (2004) Intracellular Reactive Oxygen Species Mediate Suppression of Sporulation in *Bacillus subtilis* Under Shear Stress, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 87, No. 1, pp 81-89.
- Sahoo D., Agarwal G., (2002) Effect of Oxygen Transfer on Glycerol Biosynthesis by an Osmophilic Yeast *Candida magnoliae* I<sub>2</sub>B, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 78, No. 5, pp 545 – 555.
- Salgado E., (1994) Simulación de Fermentaciones y de Biorreactores Tipo Tanque Agitado, Tesis, UPIBI-IPN, pp 45- 48.
- Schumpe A., Quicker G., (1982) Gas Solubilities in Microbial Culture Media, *Adv. Biochem. Eng.*, vol. 24, pp 1 – 38.
- Schugerl K., (1981) Oxygen Transfer Into Highly Viscous Media, *Adv. Biochem. Eng.*, vol. 19, pp 71 – 174
- Sherwood D., Pigford E., (1952) Adsorption and Extraction, McGraw Hill, USA
- Serrano-Carreón L., Corona R., Sánchez A., Galindo E., (1998) Prediction of Xanthan Fermentation Development by a Model Linking Kinetics, Power Drawn and Mixing, *Process Biochemistry*, vol. 33, No. 2, pp 133-146.
- Sahoo S., Krishnamurthy Rao K., Suresh A., Suraishkumar G., (2004) Intracellular Reactive Oxygen Species Mediate Suppression of Sporulation in *Bacillus subtilis* Under Shear Stress, *Biotechnol. and Bioeng.*, vol. 87 No. 1, pp 81 – 89.
- Shiao T., Ellis M., Dolferus R., Dennis E., Doran P., (2002) Overexpression of Alcohol Dehydrogenase or Pyruvate Decarboxylase Improves Growth of Hairy Roots at Reduced Oxygen Concentrations, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 77, No. 4, pp 455-461.
- Shu C., Liao C., (2002) Optimization of L-Phenylalanine Production of *Corynebacterium glutamicum* Under Product Feedback Inhibition by Elevated Oxygen Transfer Rate, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 77, No. 2, pp 131 – 141.
- Stanbury P. and Whitaker A., (1994) Principles of Fermentation Technology, Pergamon Press, Oxford UK.
- Taguchi H., Miyamoto S. (1966) Power Requirement in No-Newtonian Fermentation Broth, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 8, pp 43 – 54.
- Takeda M., Ishigami M., Shimada A., Matsuoka H., Nakamura I., (1994) Separation and Preliminary Characterization of Acidic Polysaccharides Produced by *Enterobacter sp.*, *Ferment. Bioeng. J.*, 78, 140-144.
- Takeuchi Y., Ramírez A., Ruiz C., (1984) Ecuaciones Diferenciales, 4ª reimpresión, Limusa, México

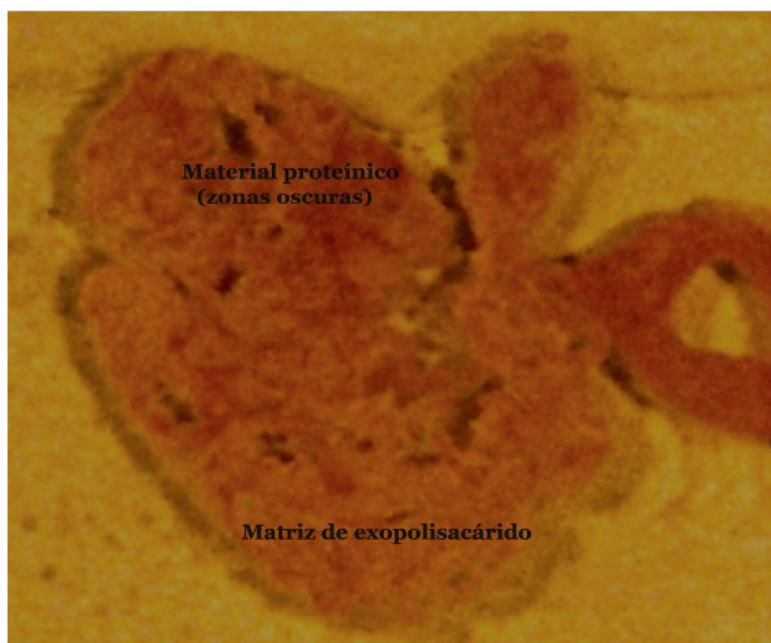
- Tecante A., Brito de la Fuente E., Chopin L., Tangy P., Oxygen Transfer in Non-Newtonian Fluid Stirred With a Helical Ribbon Screw Impeller.
- Thomson N., Ollis D., (1980) Extracellular Microbial Polysaccharides. II. Evolution of Broth Power-Law Parameters for Xanthan and Pullulan Batch Fermentation, *Biotechnol. and Bioeng.*, vol. XXII, pp 875 – 883.
- Treybal R. (1980) *Operaciones de Transferencia de Masa*, 2<sup>a</sup> ed., Mc Graw Hill, México.
- Vanrolleghem P., Sin G., Gernaey K., (2004) Transient Response of Aerobic and Anoxic Activated Sludge Activities to Sudden Substrate Concentration Changes, *Biotech. and Bioeng.* Vol 86, No. 3, pp 277-290.
- Vashitz O., Sheintuch M., Ulitzur (1989) Mass Transfer Studies Using Cloned-Luminous Strain of *Xanthomonas campestris*, vol. 34, pp 671-680.
- Wang D., Fewkes R., (1977) Effect of Operating Parameters on the Behaviour of Non Newtonian Mycelial Antibiotic Fermentations, *Dev. Ind. Microbiol.*, vol. 18, pp 39 – 56.
- Wang S., Zhong J., (1996) A Novel Centrifugal Impeller Bioreactor II. Oxygen Transfer and Power Consumption, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 51, pp 520 - 527
- Whiffin V., Cooney M., Cord-Ruwisch (2004) Online Detection of Feed Demand in High Cell Density Cultures of *Escherichia coli* by Measurement of Changes in Dissolved Oxygen Transients in Complex Media, *Biotech. and Bioeng.*, vol. 85, No. 4, pp 422 – 433.
- Williams G., Doran P., (1999) Investigation of Liquid-Solid Hydrodynamic Boundary Layers and Oxygen Requirements in Hairy Root Culture, *Biotech. and Bioeng.* Vol. 64, No. 6, pp 729-740.
- Winkler M., (1990) Problems in Fermenter Design and Operation. In *Chemical Problems in Biotechnology* (Winkler M., ed.), Elsevier, England.
- Yagi H., Yoshida F. (1975) Gas absorption by Newtonian and Non-Newtonian Fluids in Sparged Agitated Vessels, *Ind. Eng. Chem. Proc. Des. Dev.*, vol. 14, No. 4, pp 488-493
- Zlokarnik M. (1978) Sorption Characteristics for Gas-Liquid Contacting in Mixing Vessels, *Adv. Biochem. Eng.*, vol. 8, pp 133-151

# ANEXOS

## ANEXO 1

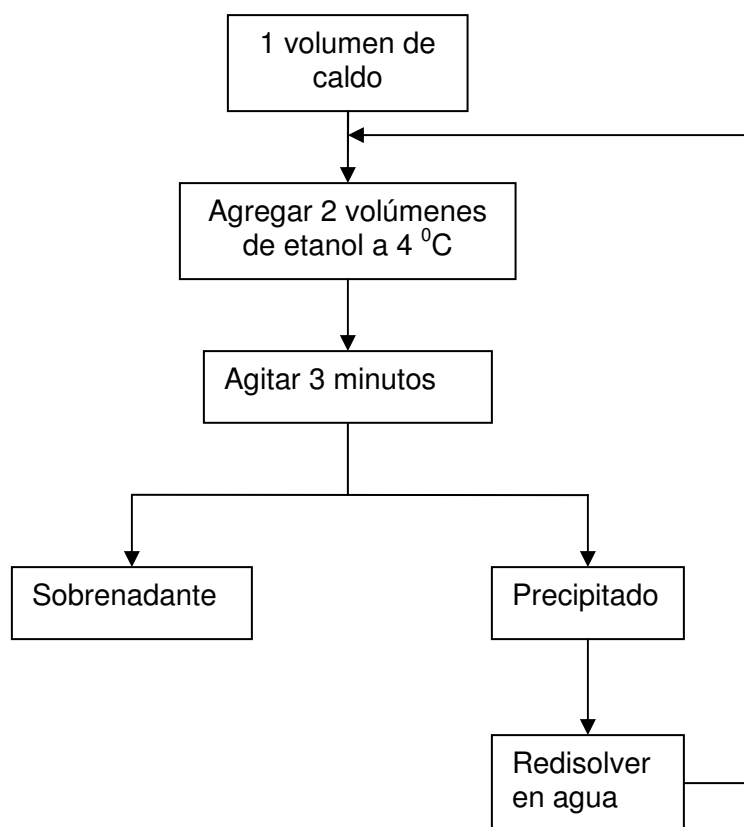
### VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA SEMIPURIFICACIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS BACTERIANOS, A PARTIR DE CALDOS DE FERMENTACIÓN (TÉCNICA PFP)

Durante el desarrollo del presente trabajo se observó que utilizando las técnicas convencionales de purificación de exopolisacáridos bacterianos, las concentraciones obtenidas en las repeticiones de una muestra no eran similares entre sí, con diferencias incluso superiores al 100%. En la mayoría de las técnicas reportadas (Hou *et al.*, 1996; Kurane y Mita, 1996; Takeda *et al.*, 1994), el exopolisacárido se recupera del caldo por una precipitación con disolventes; el precipitado atrapa a otros componentes del caldo, principalmente células, y los arrastra consigo. Posteriormente el precipitado se disuelve en grandes volúmenes de agua para evitar modificar la viscosidad, y se somete a ultracentrifugación para separar las células del exopolisacárido disuelto; sin embargo la diferencia de densidades entre las células bacterianas y el agua es muy pequeña y la mayoría de las muestras quedan contaminadas con células. Las muestras de exopolisacárido recuperado se tiñeron con reactivo de Millon (Harper *et al.*, 1978) que reacciona con proteínas dando una coloración roja, y se observó una matriz de polisacárido ligeramente coloreado en rosa (indicando una unión del exopolisacárido con el material proteínico soluble), con inclusiones rojas correspondientes al material proteínico de las células (ver figura A1.1). Durante la cuantificación del exopolisacárido estas células se rompen liberando azúcares, por lo que se propuso retirar las células de la matriz de exopolisacárido por un proceso de extracción, en donde las células se pudiera retirar íntegras para evitar la contaminación con su contenido de azúcares. Se realizaron pruebas con diferentes disolventes, temperaturas y patrones de flujo; encontrándose que en volúmenes pequeños de caldo sometidos a un patrón ciclónico de flujo es posible extraer las células con etanol a 4 °C.



**Figura A1.1.-** Material proteínico contaminante en exopolisacáridos bacterianos.

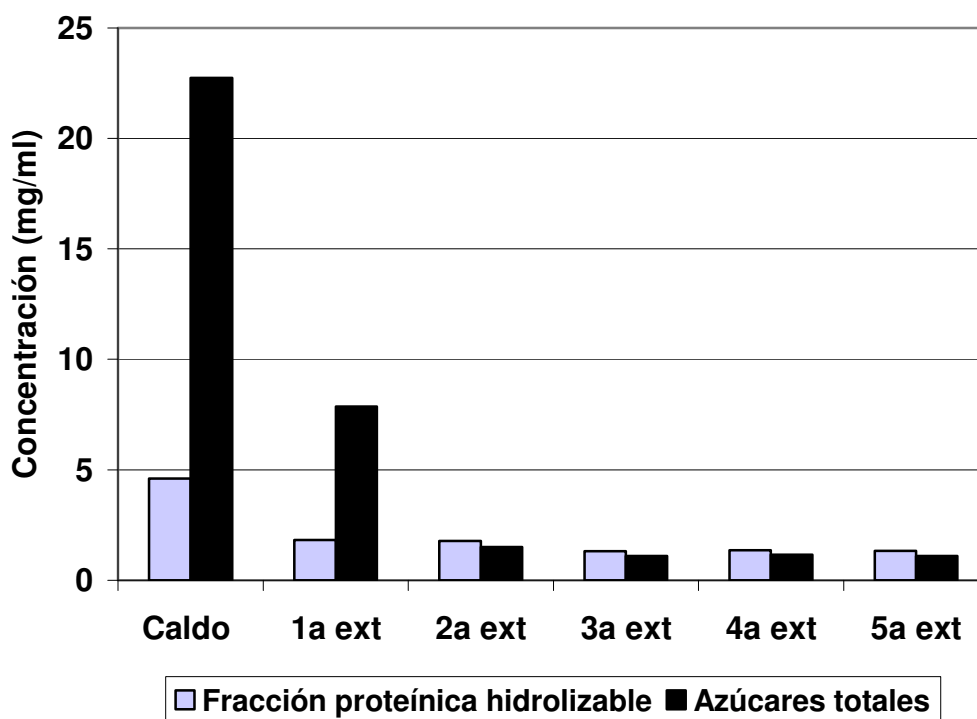
El proceso de extracción etanólica de las células es una purificación parcial del exopolisacárido, que elimina completamente la fuente de azúcares que no permite estandarizar la cuantificación del exopolisacárido, al mismo tiempo que elimina parcialmente el material proteínico asociado con el polisacárido, y no elimina los iones presentes. La extracción se realiza en multietapas de acuerdo con el siguiente diagrama



**Figura A1.2.-** Diagrama de semi-purificación del polisacárido

Las pruebas de caracterización de la técnica se realizaron con caldos de fermentación para producción de gelana, obtenidos en las condiciones descritas para la obtención de caldos semilla (ver Metodología), condiciones para las que Lobas *et al.* (1992) reportaron concentraciones de exopolisacárido entre 1 y 1.5 mg/mL. Al precipitado de cada etapa de extracción se le cuantificó la cantidad de azúcares totales y células presentes. La concentración de células se expresó como fracción proteínica hidrolizable (Hernández, 1979), con cuantificación de la concentración de aminoácidos libre por la técnica de la ninhidrina (Brewster *et al.*, 1978). Para obtener la fracción proteínica hidrolizable, a las muestras se les dio un pretratamiento de hidrólisis ácida en caliente, de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se tomó 1 volumen de caldo, se precipitó con 2 volúmenes de etanol a 4 °C, se redisolvió el precipitado en 1 volumen de agua, se agregó 1 volumen de ácido clorhídrico concentrado y se colocó en baño maría en ebullición durante 1 hora, se enfrió y agregó 1 volumen de hidróxido de sodio 10 N, se ajustó el pH a 7; se tomó 0.5 mL de la muestra hidrolizada, se completó a 1 mL con agua desionizada, se agregó 1 mL de reactivo de ninhidrina, y se colocó en baño maría

a ebullición 5 minutos, se enfrió y agregó 5 mL de agua desionizada, para después leer absorbancia a 570 nm. La concentración de aminoácidos libres se obtuvo por interpolación en una curva estándar obtenida con una solución patrón de albúmina bovina 800 µg/mL hidrolizada en las mismas condiciones que la muestra. Se utilizó un testigo de gelatina grado alimenticio (CP Kelco, San Diego EUA) sometido a hidrólisis en las mismas condiciones que la muestra. El testigo no dio reacción positiva a la ninhidrina. En un proceso de 5 etapas se obtuvieron los resultados mostrados en las figuras A1.2 y A1.3. En la figura A1.2 se observa que a partir de la tercera etapa de extracción los valores de las concentraciones de polisacárido y fracción proteínica hidrolizable ya no se modifican. La concentración de azúcares totales cuantificada es 1.1 mg/mL que se encuentra dentro del intervalo de producción esperado para la cepa (Lobas *et al.*, 1994), como se observa, la cantidad de azúcares asociados con las células es incluso mayor que la presente en el medio de cultivo.



**Figura A1.3.-** Concentración de azúcares totales y fracción proteínica hidrolizable durante la extracción etanólica de células.

En la figura A1.3 se muestra la eficiencia de extracción, tomando como valor de referencia, la concentración de la fracción proteínica hidrolizable presente en el precipitado obtenido del caldo de fermentación, en donde a partir de la tercera etapa de extracción también se estabiliza el valor, indicando que por este tratamiento se elimina el 70% de la fracción proteínica hidrolizable inicial, restando un 30% residual que permanece asociado con el exopolisacárido pero que ya no afecta la cuantificación del mismo.

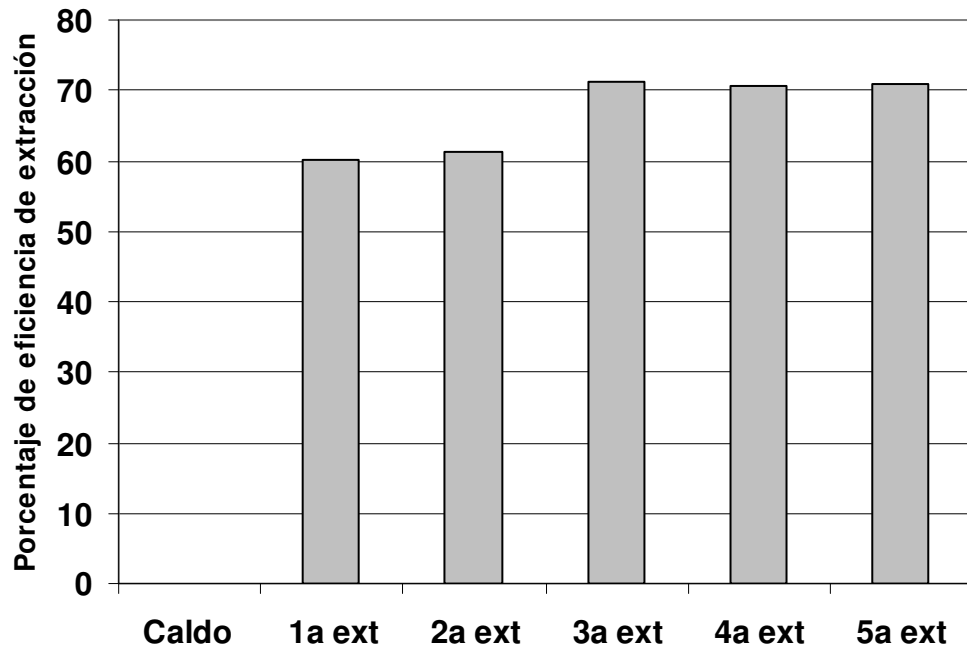


Figura A1.4.- Eficiencia de extracción de la fracción proteínica hidrolizable



## ANEXO 2

### VARIANTES PRODUCTORAS Y SOBREPDUCTORAS DE EXOPOLISACÁRIDOS. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE FLUIDOS MODELO

Los géneros bacterianos *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Sphingomonas* y *Aeromonas*, se encuentran cercanos taxonómicamente y comparten la característica de mutar rápidamente en respuesta a factores ambientales (Brock y Madigan, 1991).

En el caso de las bacterias productoras de polisacáridos pertenecientes a estos géneros, como *Xanthomonas campestris* y *Sphingomonas paucimobilis*, está ampliamente documentada la aparición de variantes de la cepa que pierden la capacidad de producir polisacárido (variantes no productoras) como las que incrementan la cantidad de polisacárido producido (Cadmus *et al.*, 1976; Martins y Sá-Correia, 1991; Lobas *et al.*, 1992).

Las variantes sobreproductoras son preferidas ampliamente para los estudios de producción de polisacáridos, aunque son inestables y pierden rápidamente su capacidad productora durante el almacenamiento (Cadmus *et al.*, 1976; Carbajal *et al.*, 1999).

Los caldos de las variantes sobreproductoras incrementan su viscosidad aparente como resultado de un incremento en el índice de consistencia de los caldos (K) que puede llegar a ser hasta 10 veces más grande que en la cepa estándar, mientras que el índice de comportamiento de flujo se mantiene cercano a los intervalos reportados para las cepas estándar.

Lobas *et al.* (1992) en la fermentación para producción de gelana en un tanque con un agitador tipo Intermig, utilizando una variante sobreproductora de *S. paucimobilis* (E2) reporta caldos con  $n = 0.11$  y  $K = 21.9$ , en comparación con  $n = 0.57$  y  $K = 2.76$  de los caldos con la cepa estándar.

Dreveton *et al.* (1994), durante la producción de gelana en tanque agitado con un impulsor tipo listón helicoidal, utilizando condiciones de sobreproducción reportaron los cambios en el índice de consistencia mostrados en la tabla A2.1.

**Tabla A2.1**

Valores de K y n encontrados durante la producción de gelana, usando cepas sobreproductoras

Agitador	Velocidad (rpm)	Condición de sobreproducción	n (adimensional)	K (mPa*s <sup>n</sup> )
Listón helicoidal	250	Regulación de la fuente de nitrógeno	0.53	7.0
Listón helicoidal	250	Aireación enriquecida en oxígeno	0.40	16.4

Para la xantana, Cadmus *et al.* (1976) reportaron, para la variante sobreproductora, caldos con una viscosidad aparente de 7,000 mPa\*s (4,000 en la cepa estándar) equivalentes a  $n = 0.34$  ( $n = 0.34$  en la cepa estándar) y  $K = 16.75 \text{ Pa*s}^n$  ( $2.04 \text{ Pa*s}^n$  en la cepa estándar).

Thomson y Ollis (1980) reportan la siguiente evolución de los parámetros reológicos de un caldo para la producción de xantana, con variante sobre productora.

**Tabla A2.2**

Cambio de K y n con respecto al tiempo durante la producción de xantana utilizando variantes sobreproductoras

Tiempo (horas)	K (Pa*s <sup>n</sup> )	n (adimensional)
0	0.0111	1.010
6	0.0132	1.005
10	0.0350	0.929
17	0.1464	0.693
23	2.1960	0.556
29	8.4760	0.380
34	19.430	0.301

Amanullah *et al.* (1998) reportan la reología de caldos de xantana, utilizando una variante sobre productora (E2) en tanque agitado probando 4 tipos diferentes de impulsores (turbina Rusthon, turbina Rusthon alargada, Maxfo T y Scaba), encontrando un comportamiento similar reológicamente con n variando de 1 a 0.16, mientras que K tiene un valor final en el caldo (promedio) de 12.5 Pa\*s<sup>n</sup>

En este estudio no se utilizaron variantes sobreproductoras.

En las cepas no sobreproductoras, la referencia para este trabajo es la gelana cuyas soluciones tienen mayores limitantes a la transferencia de oxígeno por sus características gelificantes y posible esfuerzo inicial de corte (Dreveton *et al.*, 1994).

Para un tanque de 14 L agitado por un impulsor helicoidal, utilizando el mismo microorganismo de este estudio, la misma temperatura y un tiempo de fermentación de 32 horas, Dreveton *et al.* (1994) reporta los siguientes datos:

**Tabla A2.3**

Valores de K y n encontrados durante la producción de gelana

Agitador	Velocidad (rpm)	n (adimensional)	K (mPa*s <sup>n</sup> )	$\eta_{\text{apar}}$ (mPa*s)
Listón helicoidal	125	0.33	1.2	60
Listón helicoidal	250	0.32	4.0	190

Los valores de K, n y viscosidad aparente, son muy similares a los que tienen los fluidos empleados en este estudio.

**Anexo 3**  
**DATOS CINÉTICOS Y GRÁFICAS DE OXÍGENO DISUELTO**  
**DE LAS FERMENTACIONES REALIZADAS**

**A3.1.- Fermentaciones consideradas**

Se realizaron 9 fermentaciones en el reactor de 12 L, de acuerdo con el arreglo experimental indicado en la tabla A3.1. Adicionalmente se realizó un control de producción en un reactor de 3.5 L con la cepa *Leuconostoc mesenteroides*, a 200 rpm y flujo de aire de 3.5 L/min equivalente a 1 vvm, indicada en este anexo como F10.

**Tabla A3.1** Condiciones de operación de las fermentaciones realizadas

Microorganismo	N (rpm) ( $F_a = 12 \text{ L./min}$ )		Flujo de aire (L./min) ( $N = 200 \text{ rpm}$ )	
	100	200	12	2.4
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	F1	F2	-	F7
<i>Xanthomonas campestris</i>	F3	F4	-	F8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	F5	F6	-	F9

Los datos obtenidos en las fermentaciones F3, F5 y F6 no fueron incluidos en el análisis de datos, ya que en F3 se obtuvieron datos de oxígeno disuelto con zonas con un %TOD entre 10 y 20 (ver figura A2.3). Para cepas productoras de polisacáridos se considera que la concentración crítica se encuentra en ese intervalo, por lo que no sería posible discriminar si la variación en la VTO es debida a las propiedades del caldo o a cambios metabólicos asociados a la disminución de la concentración crítica. En F5 y F8 se presentaron variaciones en el patrón de oxígeno disuelto (ver figuras A3.5 y A3.8), acompañados de una lenta disminución de la concentración de biomasa, en estos casos no es posible distinguir si la variación en el oxígeno disuelto es debida al consumo por las células o al proceso de muerte celular. Las velocidades de consumo de sustrato y de formación de biomasa y producto en fase exponencial de las fermentaciones consideradas se presentan en la tabla A3.2; mientras que las velocidades específicas se presentan en la tabla A3.3.

**Tabla A3.2.-** Parámetros cinéticos de las fermentaciones analizadas

Fermentación	dX/dt (mg/mL h)	dS/dt (mg/ mL h)	dP/dt (mg/mL h)
F1	0.2490	-0.6656 (*)	0.0688
F2	0.1830	-0.6751 (*)	0.1105 (*)
F4	0.1940	-0.4379	0.0161 (*)
F6	0.3055	-0.6761	0.2267
F7	0.2707	-0.9675	0.0592
F9	0.0991	-0.6156 (*)	0.1677 (*)
Control (F10)	0.1720	-0.6300	0.4093

(\*) indica que la función de la velocidad no es lineal, por lo que se presenta la velocidad promedio

**Tabla A3.3.-** Velocidades específicas de las fermentaciones analizadas

Fermentación	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	$q_{\text{Smáx}}$ (h <sup>-1</sup> )	$q_{\text{Pmáx}}$ (h <sup>-1</sup> )
F1	0.1005	-0.2694	0.0278
F2	0.0610	-0.2250	0.0368
F4	0.0606	-0.1368	0.0050
F6	0.1111	-0.2458	0.0824
F7	0.1893	-0.6765	0.0413
F9	0.0455	-0.3078	0.0838
Control (F10)	0.0828	-0.3043	0.1977

$q_s$  = velocidad específica de consumo de sustrato

$q_p$  = velocidad específica de formación de producto

### A3.2.- Datos cinéticos y de consumo de oxígeno

Las fermentaciones F1 a F9 se realizaron en el reactor de 12 L, mientras que la fermentación F10 se llevo a cabo en el reactor de 3.5 L.

**Tabla A3.4.-** Datos cinéticos de F1 (*Sphingomonas paucimobilis*, N = 100 rpm, Fa = 12 L/min)

Tiempo (horas)	$\square$ iomasa (mg/mL)	Sustrato (mg/mL)	Gelana (mg/mL)	$\eta$ (mPa*s)
0	2.4761	18.6700	0.3033	13
3	3.0203	14.3100	0.4567	13
6	4.0378	10.9274	0.6547	13
9	4.8756	8.3400	0.8421	13
12	5.6782	6.4109	1.2456	13
15	6.7281	5.3670	1.3216	13
18	6.9947	4.5670	1.4567	13
21	7.3322	4.3450	1.4650	13
24	7.0303	4.2350	1.4876	13
27	7.1367	3.8700	1.4656	13
30	7.1222	3.6100	1.4567	13
33	6.9303	3.3892	1.4945	13

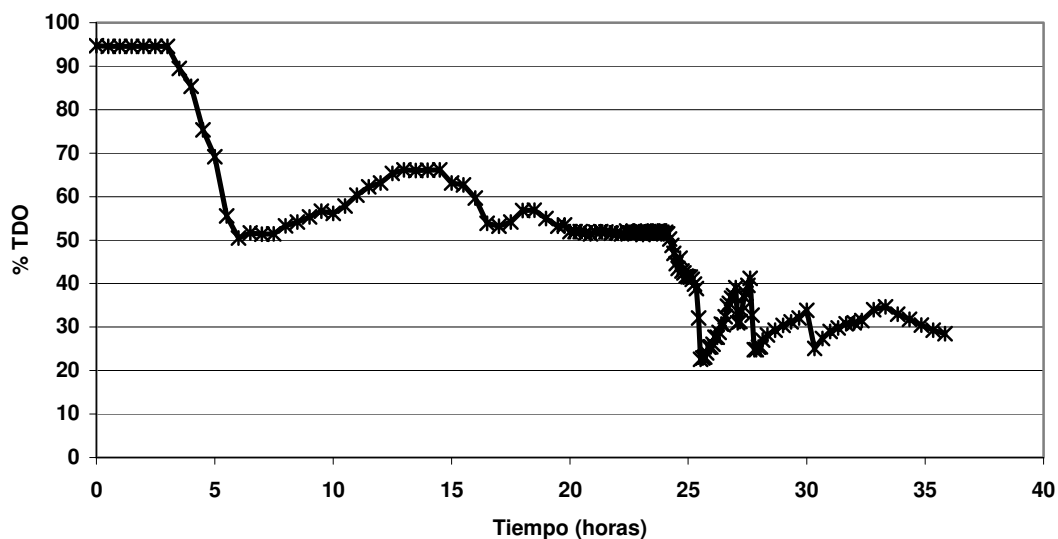


Figura A3.1.- Oxígeno disuelto en F1

**Tabla A3.5.-** Datos cinéticos de F2  
 (*Sphingomonas paucimobilis*, N = 200 rpm, Fa = 12 L/min)

Tiempo (horas)	Sustrato (mg/mL)	□iomasa (mg/mL)	Gelana (mg/mL)	$\eta$ (mPa*s)	Torque (lb*in)
0.00	20.0404	2.2500	0.2370	13	4.7
3.25	20.0000	2.2500	0.2528	13	4.7
5.50	20.4738	2.2500	0.2844	13	4.7
8.00	19.8283	2.2500	0.3092	13	4.7
12.00	19.3450	3.0000	0.4587	13	4.7
15.00	18.4531	3.5000	0.9450	13	4.7
18.00	17.8743	3.8500	1.3000	13	4.7
21.50	16.7404	4.7500	1.4717	13	4.7
24.00	15.4905	5.2500	1.5000	13	4.7
27.00	10.6155	5.7500	1.5416	13	4.7
30.50	6.0119	6.2500	1.5845	13	4.7
46.50	1.1780	6.5000	1.6000	13	4.7
51.50	0.5037	6.5000	1.6000	13	4.7
53.50	0.5199	6.5000	1.6184	13	4.7

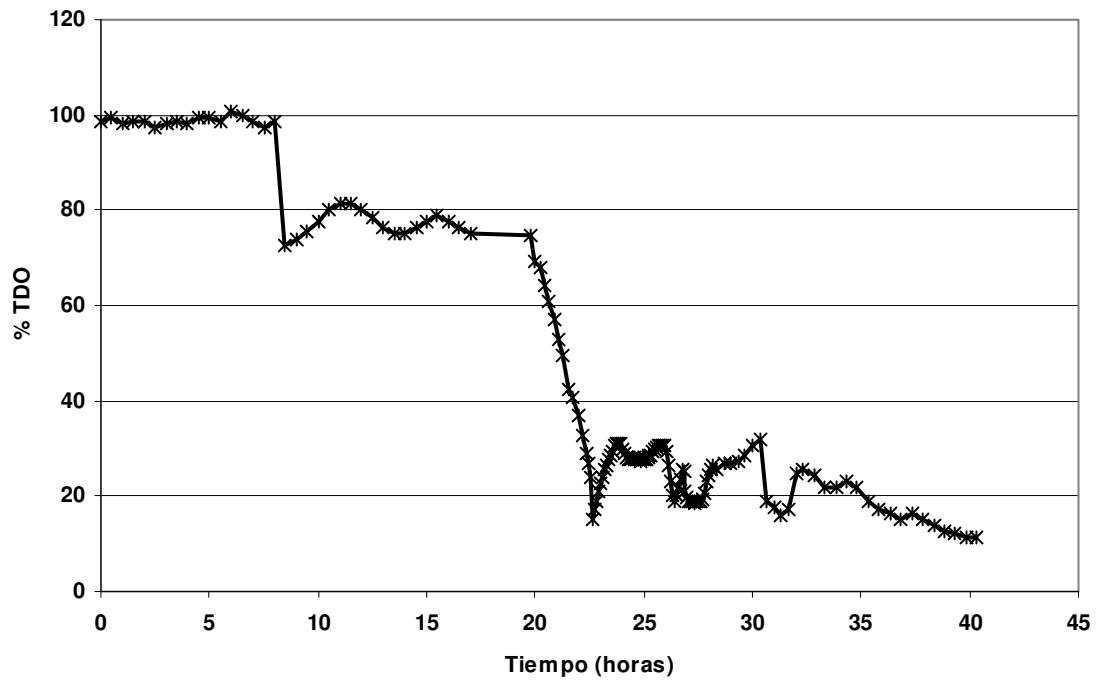


Figura A3.2.- Oxígeno disuelto en F2

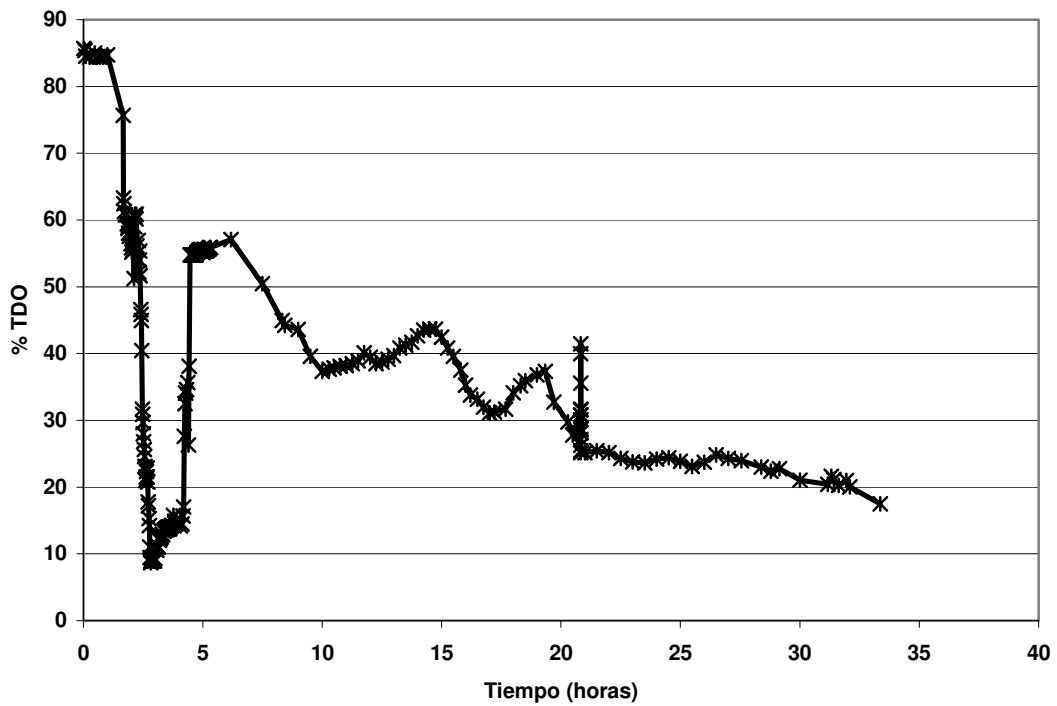
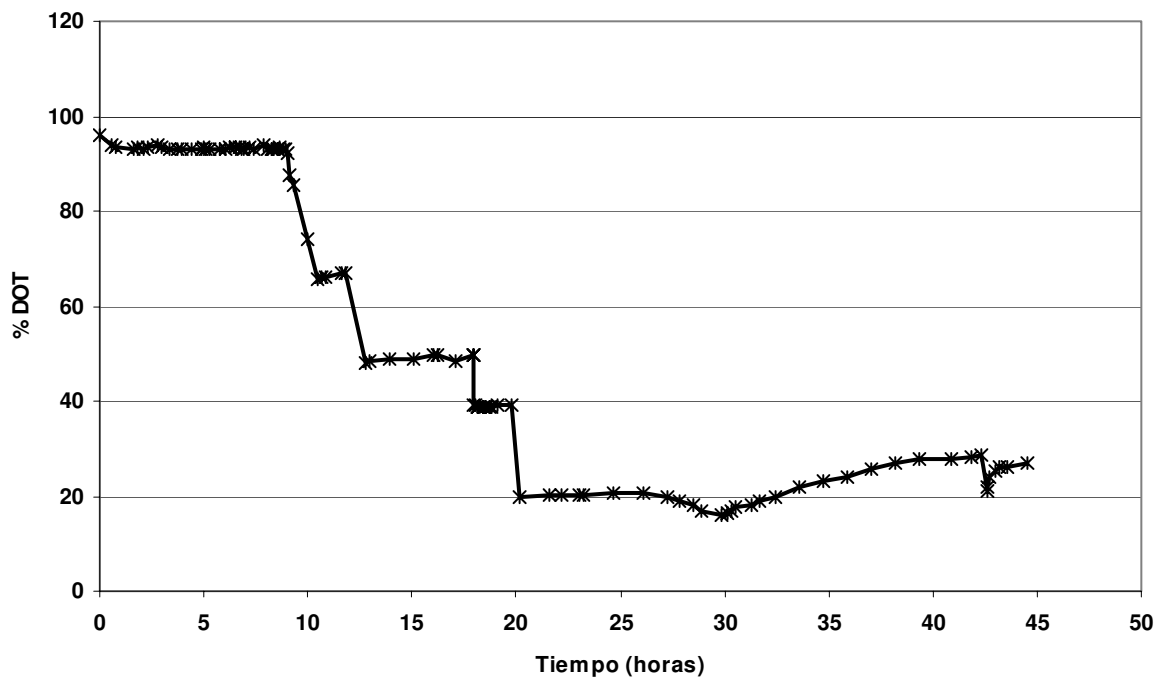


Figura A3.3.- Oxígeno disuelto en F3

**Tabla A3.6.-** Datos cinéticos de F4  
 (*Xanthomonas campestris*, N = 200 rpm, Fa = 12 L/min)

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Sustrato (mg/mL)	Xantana (mg/mL)	$\eta$ (mPa*s)	Torque (lb*in)
0.0	2.50	18.85	0.1986	13	4.85
3.0	2.50	18.85	0.1987	13	4.85
6.0	2.50	18.50	0.1967	13	4.85
9.0	2.50	18.85	0.1965	13	4.85
10.0	2.50	18.90	0.1967	13	4.85
13.0	3.20	19.10	0.2080	13	4.85
16.0	3.70	16.08	0.2140	13	4.85
19.0	4.25	14.78	0.2870	13	4.85
23.0	5.00	14.00	0.3256	13	4.85
26.0	5.75	12.83	0.3623	13	4.85
30.5	5.80	11.40	0.3745	13	4.85
35.0	6.00	8.50	0.3793	13	4.85
42.0	5.50	5.58	0.3860	13	4.85
45.5	5.75	3.69	0.3920	13	4.85
47.0	5.75	3.37	0.3920	13	4.85



**Figura A3.4.-** Oxígeno disuelto en F4

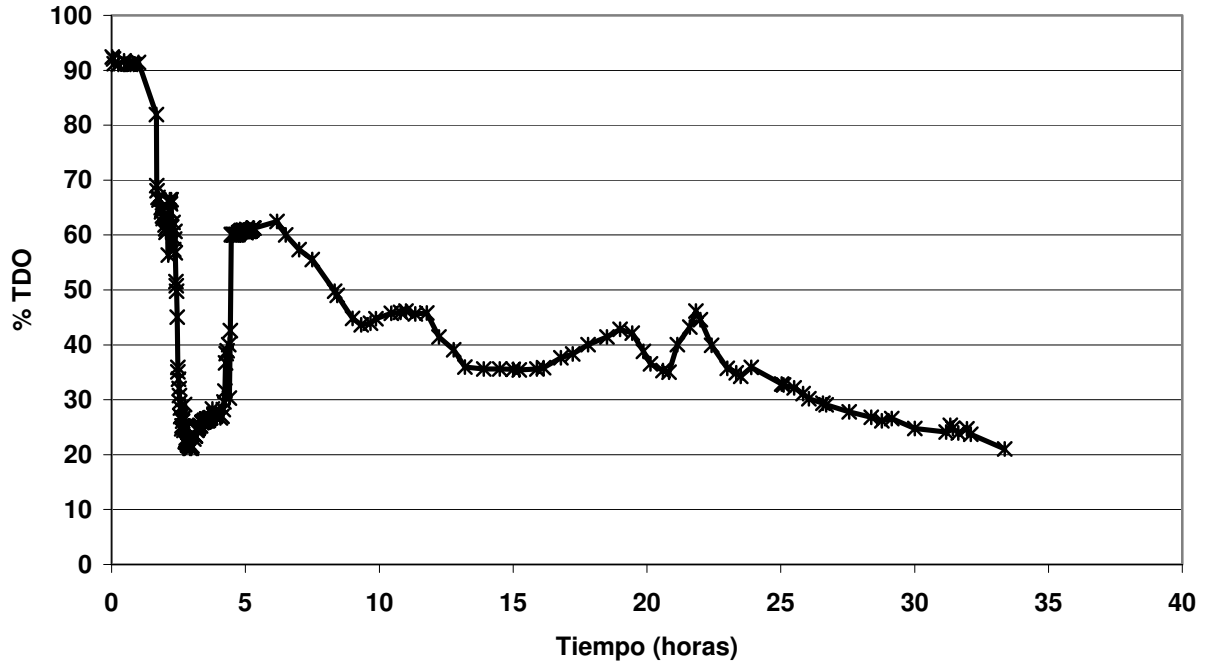


Figura A3.5.- Oxígeno disuelto en F5

**Tabla A3.7.-** Datos cinéticos de F6  
(*Leuconostoc mesenteroides*, N = 200 rpm, Fa = 12 L/min)

Tiempo (horas)	□iomasa (mg/mL)	Sustrato (mg/mL)	Dextrana (mg/mL)	$\eta$ (mPa*s)	Torque (lb*in)
0.0	1.58	18.60	3.10	13	5
3.0	2.08	18.60	3.10	13	5
6.0	2.33	19.10	3.00	13	5
9.0	2.40	18.60	3.00	15	5
12.0	2.55	18.30	3.20	17	5
15.0	2.75	15.90	3.50	20	5
17.5	3.08	12.90	3.70	25	5
20.5	4.25	11.30	4.40	38	5
23.5	5.25	9.90	5.40	56	5
26.5	6.08	8.50	3.40	46	5
29.5	4.42	8.00	2.90	32	5



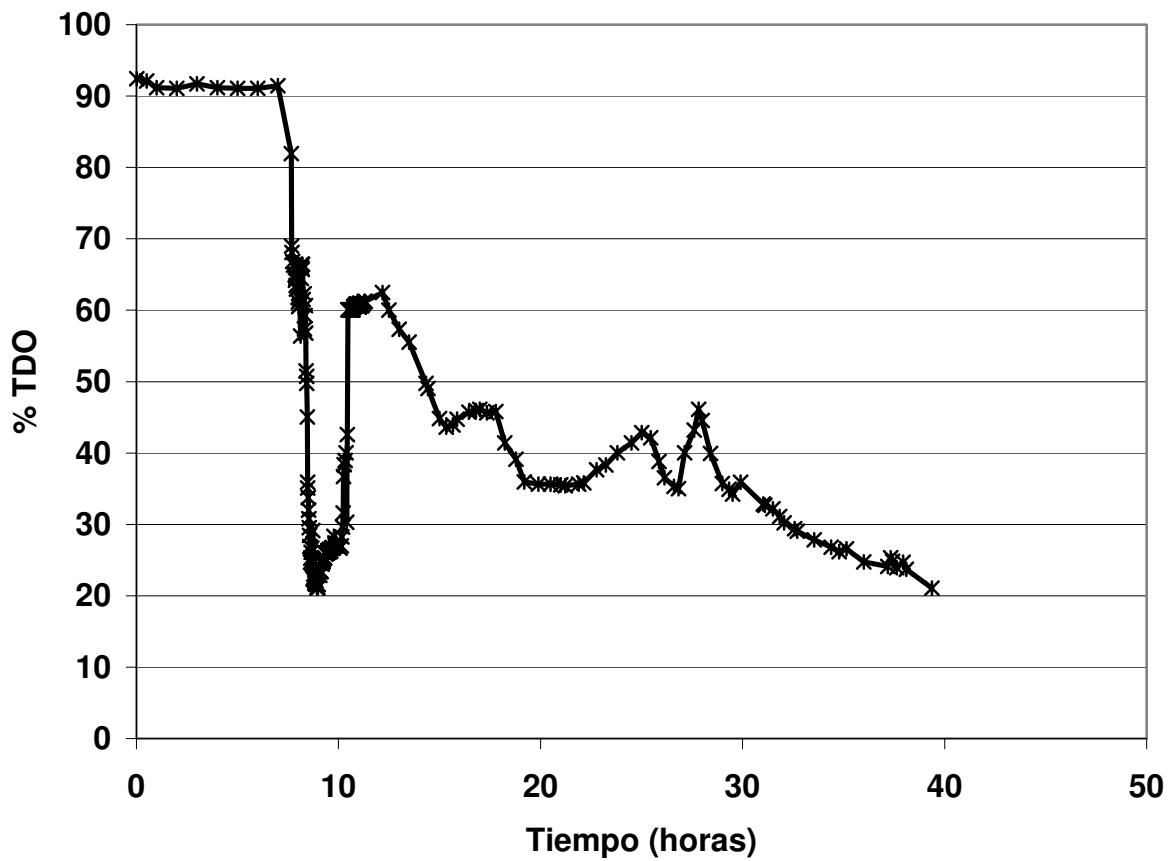


Figura A3.6.- Oxígeno disuelto en F6

**Tabla A3.8.-** Datos cinéticos de F7  
 (*Sphingomonas paucimobilis*, N = 100 rpm, 2.4 L/min)

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Sustrato (mg/mL)	Gelana (mg/mL)
0.00	1.33	19.34	0.2156
2.00	1.43	17.45	0.3470
4.00	1.69	16.67	0.3890
7.00	2.30	12.34	0.5260
9.00	3.00	9.45	0.8790
12.00	4.00	6.71	0.9340
15.00	4.80	4.49	1.0896
18.00	5.54	3.12	1.2360
21.00	5.54	5.43	1.3400
25.00	5.54	3.00	1.6700
29.00	5.54	2.90	2.0400
32.00	5.54	2.30	1.9800

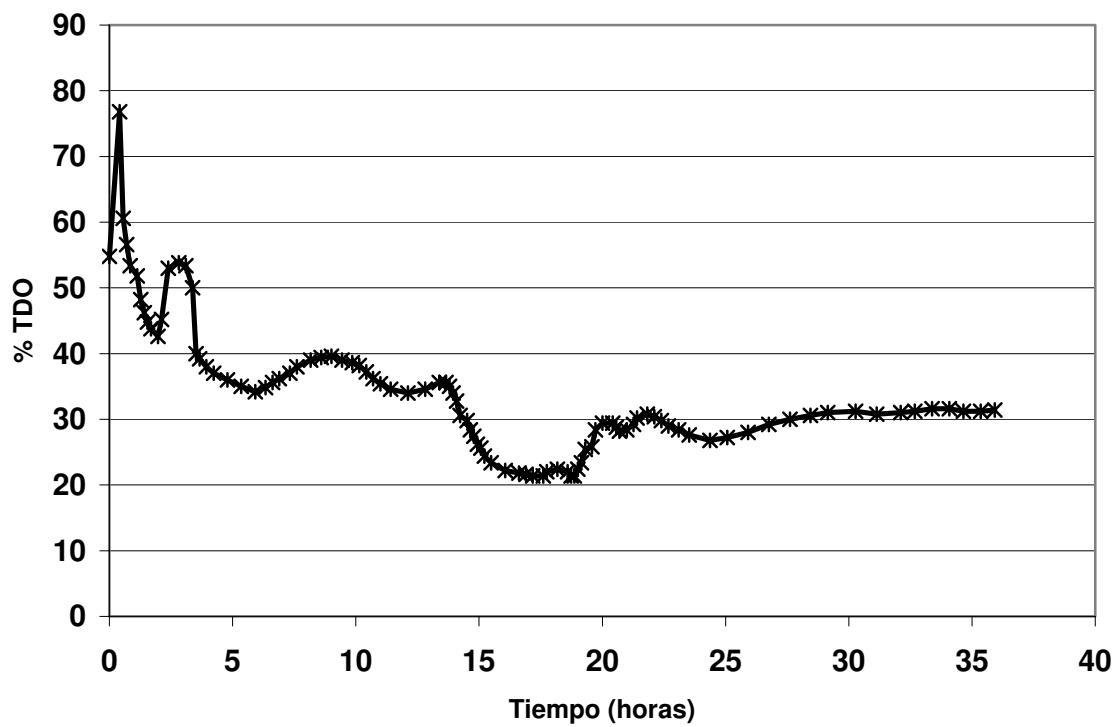


Figura A3.7.- Oxígeno disuelto en F7

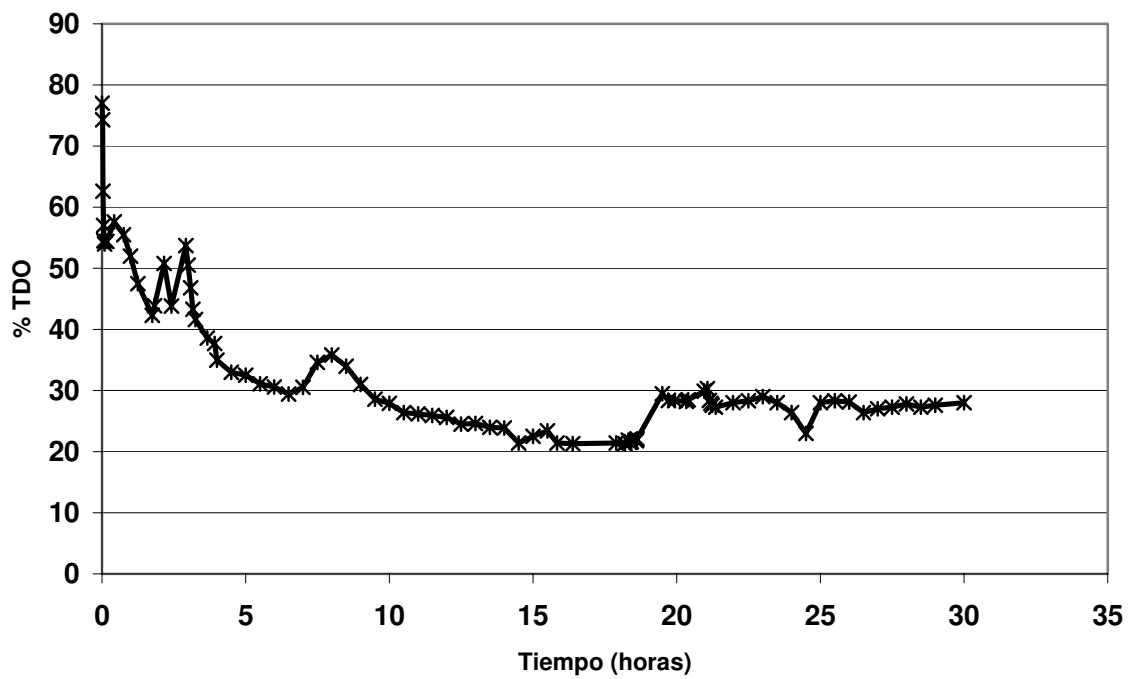
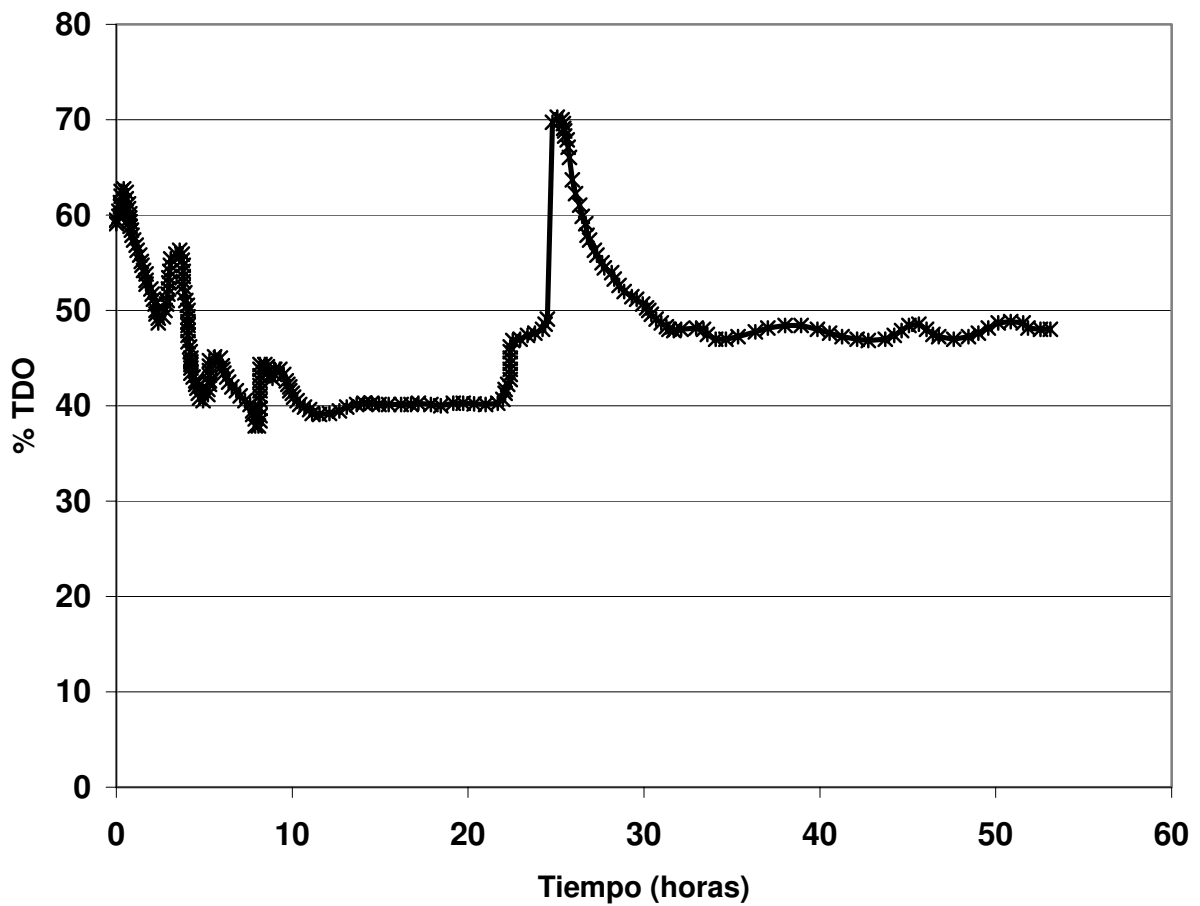


Figura A3.8.- Oxígeno disuelto en F8

**Tabla A3.9.-** Datos cinéticos de F9  
 (*Leuconostoc mesenteroides*, N = 200, Fa = 2.4 L./min)

Tiempo (horas)	□iomasa (mg/mL)	Sustrato (mg/mL)	Dextrana (mg/mL)	$\eta$ (mPa*s)	Torque (lb*in)
0.0	1.80	19.60	2.90	13	5
2.0	2.00	19.60	2.90	13	5
4.0	2.25	19.10	3.20	15	5
6.0	2.55	18.60	3.40	18	5
8.0	2.70	18.30	4.20	23	5
10.0	2.85	15.90	4.50	27	5
12.0	3.10	12.90	4.70	35	5
16.0	3.40	11.30	4.90	48	5
19.0	3.40	9.90	5.40	66	5
23.0	3.30	8.50	4.90	56	5
25.0	3.40	6.50	4.40	52	5
30.0	3.20	6.20	4.10	40	5



**Figura A3.9.-** Oxígeno disuelto en F9

**Tabla A2.9.-** Datos cinéticos F10, fermentación control  
(*Leuconostoc mesenteroides*, fermentador laboratorio, N = 200 rpm, 3.5 L/min)

Tiempo (horas)	□iomasa (mg/mL)	Sustrato (mg/mL)	Dextrana (mg/mL)	$\eta$ (mPa*s )
0	1.7431	19.70	0.3445	13
3	1.7456	18.90	0.3540	13
6	1.7447	19.34	0.3567	13
9	1.7503	19.45	0.3389	13
10.5	1.8097	17.01	0.3498	16
12.0	1.8234	16.20	0.3567	16
13.5	1.8401	15.07	0.5678	16
15.0	1.8571	14.34	0.9845	16
16.5	1.9100	13.45	1.2345	16
18.0	1.8629	12.78	1.3451	16
19.5	1.9739	11.23	1.5487	16
21.0	2.0439	10.67	2.0576	30
22.5	2.0758	9.45	2.8791	84
24.0	2.2965	8.33	3.3756	120
25.5	2.4950	7.80	4.1672	157
27.0	2.7777	5.56	4.7534	190
28.5	3.0263	3.42	5.0523	209
30.0	3.3010	2.80	5.2300	254
31.5	3.4165	2.56	5.2100	254
33.0	3.8355	2.41	5.3500	254
34.5	4.2001	2.39	5.3200	254
36.0	4.4686	2.32	5.3400	254
37.5	4.4686	2.29	5.1400	254
39.0	4.6686	2.20	4.9812	212
40.5	4.4686	2.06	5.0545	210
42.0	4.3591	2.16	4.6780	187
43.5	4.4681	2.04	4.7834	187

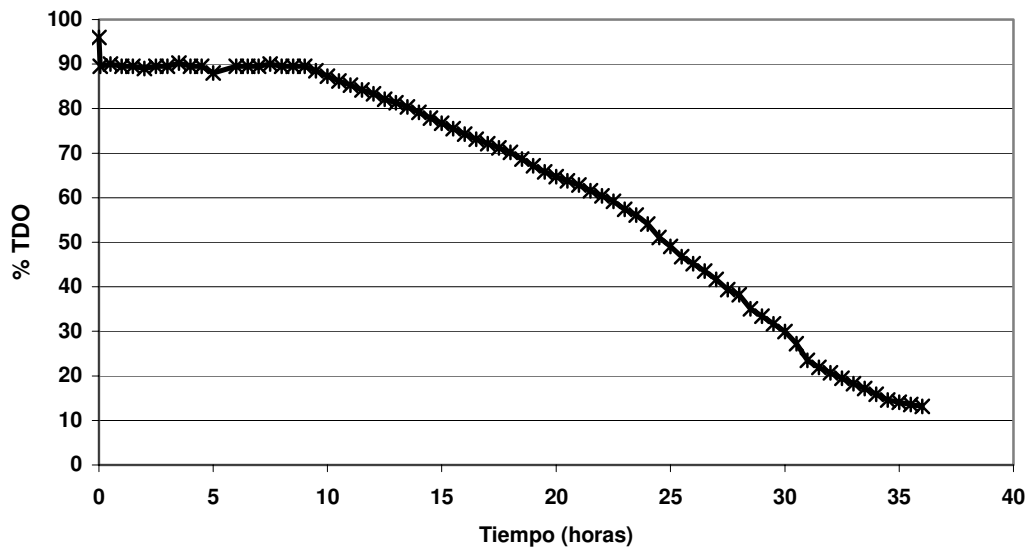


Figura A3.10.- Oxígeno disuelto en F10 (control)

#### A4.5.1.- Secuencia de cálculos

a) Transformar los datos de % TOD a  $C_L$ .

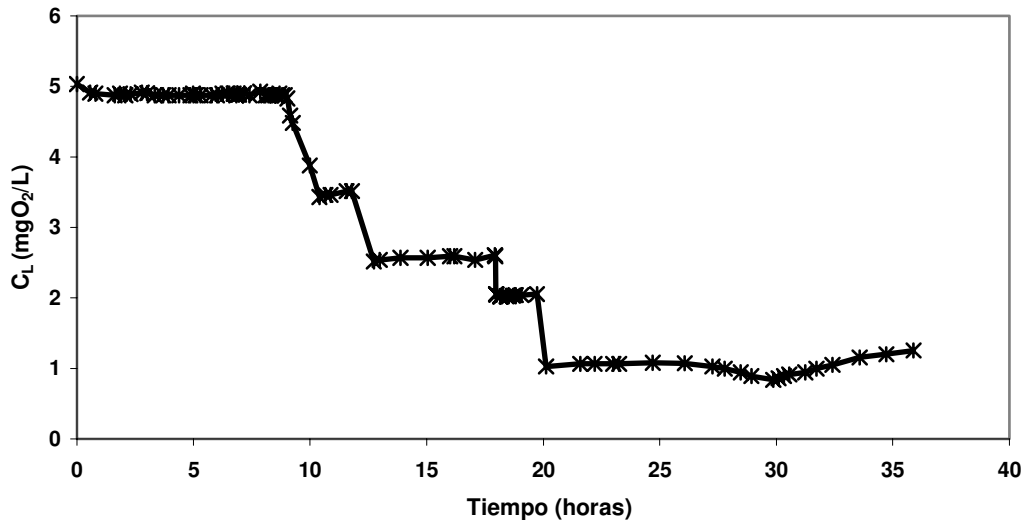


Figura A4.3.- Oxígeno disuelto en fermentación

b) Analizar la zona donde la concentración de oxígeno disuelto no se modifica, y donde esta zona coincide con la fase lag de desarrollo del microorganismo.

La ecuación descriptiva es:

$$VTO = VTO_0 e^{kt} \quad (A4.11)$$

Con:

$$VTO = k_L a (C^* - C_L) \quad (A4.12)$$

Los datos obtenidos en la zona donde no cambia la concentración de oxígeno son:

**Tabla A4.2**  
Oxígeno disuelto en fase lag

Tiempo (horas)	$k_L a$ (s <sup>-1</sup> )	$C^*$ (mgO <sub>2</sub> /L)	$C_L$ (mgO <sub>2</sub> /L)	VTO (mgO <sub>2</sub> /L h)
0.0	33.48	5.2392	4.886	11.8251
3.0	32.04	5.2392	4.886	11.3165
4.5	30.24	5.2392	4.886	10.6807
6.0	29.16	5.2392	4.886	10.2993
9.0	27.36	5.2392	4.886	9.6635

□ sando la forma lineal de la ecuación A4.12:

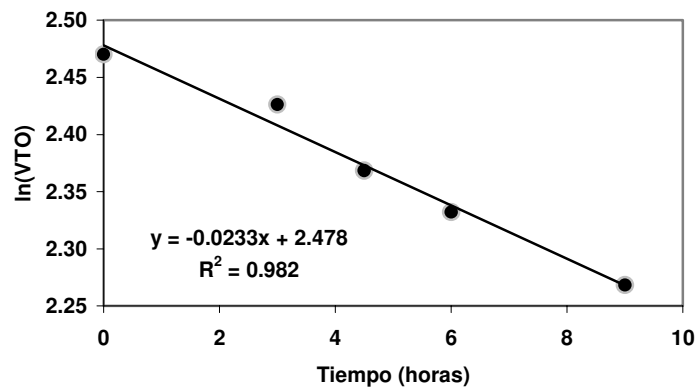
$$\ln(VTO) = \ln(VTO_0) + kt \quad (5.12)$$

**Tabla A4.3**

Logaritmos de la velocidad de transferencia de oxígeno

Tiempo (horas)	ln(VTO)
0.0	2.4702
3.0	2.4263
4.5	2.3684
6.0	2.3321
9.0	2.2684

Realizando la regresión de los datos



**Figura A4.4.-** Obtención del coeficiente de consumo en fase lag

La pendiente es -0.0233 y corresponde al valor de k (velocidad específica de consumo de oxígeno).

**c) Analizar la zona donde se presenta un patrón oscilatorio del consumo de oxígeno.**

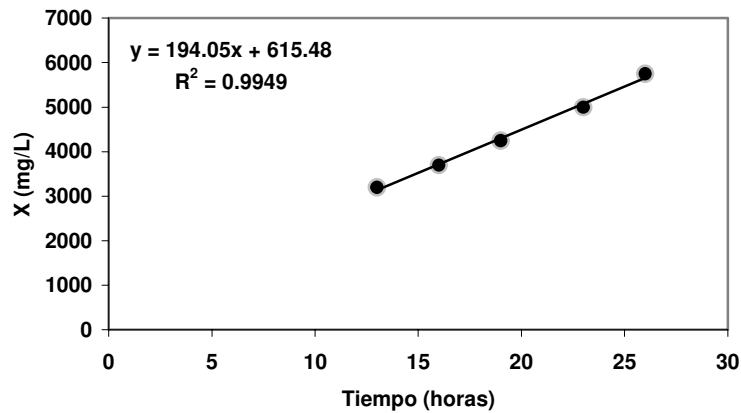
Se utilizan preferentemente los datos de la zona exponencial de la bacteria, que es la zona donde se determinó el  $k_L a$  experimental.

c.1) Calcular de la velocidad de crecimiento

**Tabla A4.4**

Datos de biomasa en la producción de xantana

Tiempo (horas)	X ( $mg_{cel}/L$ )
13	3200
16	3700
19	4250
23	5000
26	5750



**Figura A4.5.-** Obtención de la velocidad de crecimiento

La velocidad de formación de células ( $dX/dt$ ) es igual a la pendiente:  $194.05 \text{ mg}_{\text{cel}}/\text{Lh}$

**c.2) Cálculo del consumo microbiano**

□ tilizando las expresiones (Andrews, 1989; Esener, 1983):

$$Q = \frac{\mu X}{Y_{x/o}} \quad (\text{A4.14})$$

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{A4.15})$$

$$Y_{x/o} = \frac{X - X_0}{C_L - C_{L0}} \quad (\text{A4.16})$$

Con los datos experimentales:

$$X_0 = 2500 \text{ mg}_{\text{cel}}/\text{L}$$

$$C_{L0} = 4.886 \text{ mgO}_2/\text{L}$$

**Tabla A4.5**

Calculo del consumo microbiano de oxígeno durante la producción de xantana

Tiempo (horas)	X ( $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{L}$ )	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$C_L$ ( $\text{mgO}_2/\text{L}$ )	$Y_{x/o}$ ( $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{mgO}_2$ )	Q ( $\text{mgO}_2/\text{Lh}$ )
13	3200	0.0606	2.5410	298.5075	0.6501
16	3700	0.0524	2.5934	523.4232	0.3707
19	4250	0.0457	2.0433	615.6119	0.3152
23	5000	0.0388	1.0688	654.9303	0.2963
26	5750	0.0337	1.0740	852.5708	0.2276



c.3) Calcular la derivada del consumo microbiano

El consumo tiene la forma

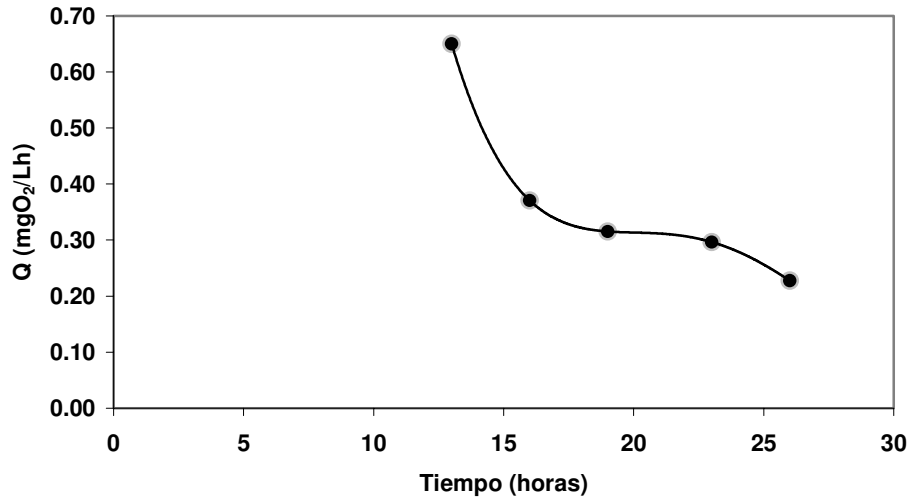


Figura A4.6.- Consumo microbiano de oxígeno durante la producción de xantana

Calcular la diferencial del consumo es la parte más difícil de la secuencia, porque el sistema que se describe es no lineal, y el ajuste de datos a una función matemática definida es una aproximación lineal; entonces los ajustes de este tipo de curvas se desvían mucho del comportamiento real, como puede observarse en la siguiente figura, donde los puntos ajustan perfectamente a un polinomio de 4 grado, pero los valores predichos por la ecuación difieren del comportamiento real.

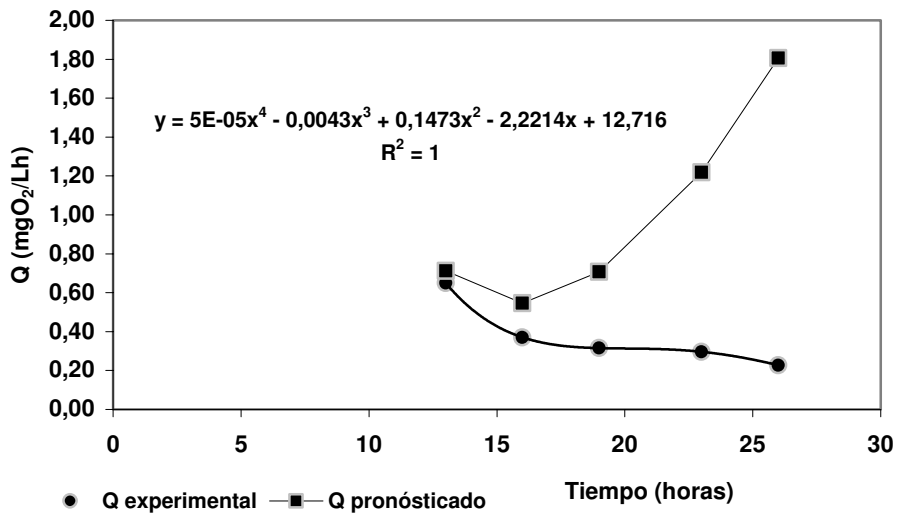
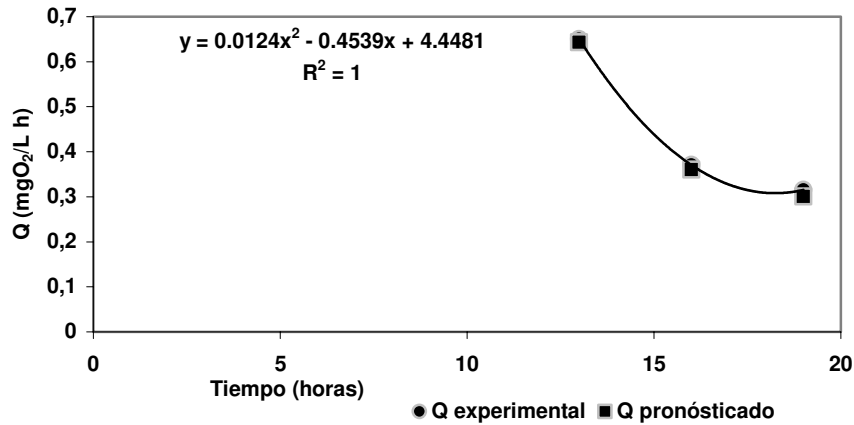


Figura A4.7.- Aproximación a la derivada del consumo microbiano de oxígeno

La opción más viable para el cálculo es emplear un método gráfico (como el método del espejo).

Cuando las curvas tienen un comportamiento regular, como en este caso, se pueden hacer ajustes parciales, para encontrar funciones que al pasar por nuestros puntos de interés, den una aproximación a la derivada.

Para comprobar que la función encontrada se adapta a los puntos seleccionados, se calculan los valores de Q que predice dicha ecuación, si estos no se desvían de la función verdadera, entonces la función sirve como una aproximación.



**Figura A4.8.-** Función para el cálculo de la derivada del consumo microbiano de oxígeno

Con la función

$$Q = 4.4481 - 0.4539(t) + 0.0124(t^2) \quad \text{válida en el intervalo 13 a 19 horas}$$

La derivada de la ecuación de ajuste (en el intervalo 13 a 19 horas) es:

$$\frac{dQ}{dt} = -0.4539 + 0.0248(t) \quad (\text{A4.17})$$

Aplicando un procedimiento similar al resto de los puntos:

**Tabla A4.6**

Derivada del consumo microbiano de oxígeno

Tiempo	dQ/dt
13	-0.1743
16	-0.0567
19	0.0173
23	-0.0153
26	0.0309

□ utilizando estos datos para resolver la ecuación:

$$k_L a = \frac{a_1}{a_3(C^* - C_L)} \frac{dQ}{dt} + \frac{a_2}{a_3(C^* - C_L)} Q \quad (\text{A4. 8})$$

Donde:

$$C^* \text{ (para medio S)} = 5.2392 \text{ mgO}_2/\text{L}$$

$$C_{L0} = 4.886 \text{ mgO}_2/\text{L}$$

$$a_1 = f(t), \text{ proponiendo } a_1 = t$$

$$a_2 = C_{L0}/C^* = 4.886/5.2392 = 0.93258513$$

**Tabla A4.7**

Parámetros para el cálculo de la ecuación con retroalimentación para balance de oxígeno disuelto

Tiempo (horas)	$C_L$ (mgO <sub>2</sub> /L)	Q (mgO <sub>2</sub> /Lh)	dQ/dt (mgO <sub>2</sub> /Lh <sup>2</sup> )	a1 (h)	a2 (adim)
13	2.5410	0.3501	0.1315	13	0.9326
16	2.5934	0.3770	0.0571	16	0.9326
19	2.0433	0.3152	0.0173	19	0.9326
23	1.0688	0.2963	0.0153	23	0.9326
26	1.0740	0.2276	0.0309	26	0.9326

Tiempo (horas)	a3 (Adim.)	(C* - C <sub>L</sub> ) (mgO <sub>2</sub> /L)	k <sub>L</sub> a <sub>pred</sub> (h <sup>-1</sup> )	k <sub>L</sub> a <sub>experimental</sub> (h <sup>-1</sup> )	% error
13	0.027	2.6982	27.95	28.03	0.30
16	0.045	2.6458	10.63	10.23	3.87
19	0.015	3.1959	12.99	12.36	5.09
23	0.013	4.1704	11.59	11.87	2.38
26	0.020	4.1652	12.19	12.29	0.80

Los datos mostrados en la tabla anterior son los datos finales, en donde el valor de a3 se ha iterado hasta encontrar el menor porcentaje de error con respecto al k<sub>L</sub>a determinado experimentalmente.

El efecto del valor de a3 en la predicción del valor del k<sub>L</sub>a, puede observarse en la siguiente figura, que muestra el porcentaje de error en la estimación del k<sub>L</sub>a, para el tiempo t = 13 horas (k<sub>L</sub>a experimental = 28.03 h<sup>-1</sup>), donde se aprecia que solo hay un valor en el cual el porcentaje de error es mínimo.

## ANEXO 4

### DESARROLLO DE LAS ECUACIONES DE TRANSFERENCIA DE OXÍGENO

#### A4.1.- Introducción

Los perfiles de consumo de oxígeno obtenidos durante las fermentaciones presentan una variación de tipo oscilatorio (ver figuras 5.17 y 5.18). El término de acumulación de oxígeno  $dC_L/dt$  tiende a cero, y se incluye dentro de las ecuaciones de transferencia dentro del término del gradiente de oxígeno disuelto ( $C^* - C_L$ ) utilizado para el cálculo de la VTO, ya que la dependencia del tiempo de  $C_L$  indicada por la diferencia, va implícita en el cambio del valor de  $C_L$  pues se utilizan las concentraciones instantáneas.

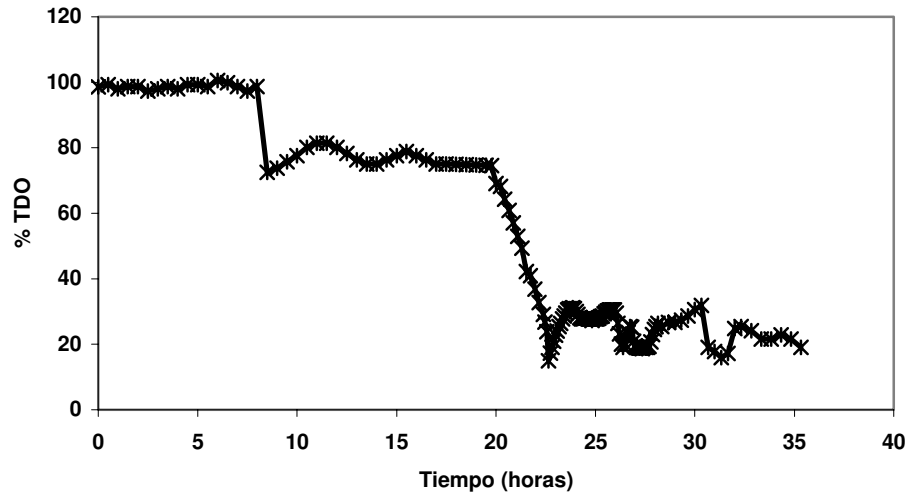
Las oscilaciones en la concentración de oxígeno disuelto no son errores experimentales. La presencia de oscilaciones se atribuye a la coalescencia de burbujas, a la influencia de las condiciones hidrodinámicas en el fermentador, a los cambios en la trayectoria del chorro de burbujas de acuerdo con las propiedades del caldo, y en el caso de la configuración geométrica del impulsor utilizado en este trabajo (un impulsor de listón helicoidal combinado con placas deflectoras), a la distribución de corrientes generadas por el impulsor helicoidal que se descompone en trayectorias secundarias y que chocan con las paredes generando una vibración continua.

Generalmente se considera que la participación del oxígeno dentro del metabolismo es como aceptor de protones dentro de las rutas de degradación de azúcares; sin embargo la molécula de oxígeno disuelto (que es básicamente neutra por las características de su capa externa de electrones que se encuentran desapareados, para ser reactiva debe ser activada), también participa como reactivo normal (Brock y Madigan, 1991) en otra serie de reacciones dentro de la célula, por lo que una parte de su consumo puede considerarse como la de un nutriente adicional. En las células las diferencias en el destino de los nutrientes, se manifiestan en diferentes velocidades de procesamiento, como demostraron (Pilón *et al.*, 1996) con el carbono, y Williams y Doran (1999) con el oxígeno, quienes encontraron que existen diferentes requerimientos de oxígeno de acuerdo con la actividad metabólica predominante. Durante la fermentación, coexisten una gran cantidad de actividades metabólicas fuertes (Barret y Kwan, 1985); actividades que pueden ser diferentes a las que se manifiestan en pruebas de laboratorio, puesto que los organismos sintetizan diferentes químicos cuando se encuentran aisladas a cuando se encuentran reunidas en grupo, aún cuando las otras células sean de su propia especie (Campbell, 1987; Briggs y Peat, 1999).

Tratar de explicar las variaciones en la velocidad de transferencia de oxígeno, considerando cada actividad individual, requeriría de amplios estudios metabólicos y moleculares, sin que se tuviera la seguridad de cual sería el impacto verdadero de las relaciones entre ellos.

Desde el punto de vista de la desaparición del oxígeno del medio, experimentalmente se obtuvieron dos tipos de comportamiento en las fermentaciones:

- 1) El comportamiento oscilatorio de la concentración de oxígeno disuelto (referido como % de presión parcial) que se muestra en las figuras 5.17 y 5.18
- 2) Presencia de zonas donde la concentración de oxígeno disuelto (referido como % TOD) no se modifica, y que coincide con la fase lag de desarrollo del microorganismo. Este comportamiento puede observarse en la figura A4.1



**Figura A4.1.-** Fermentación sin cambio en la concentración de oxígeno disuelto durante la fase lag del microorganismo. *Spingomonas paucimobilis*, 30 °C, N= 200 rpm, listón helicoidal, medio S, Fa = 12 L/min (1 vvm), reactor 12 L

#### A4.2.- Fase lag

Durante la fase lag del microorganismo, la concentración de oxígeno disuelto no se modifica, y por lo tanto tampoco el gradiente de concentración ( $C^* - C_L$ ); sin embargo hay un cambio en la velocidad de transferencia de oxígeno, indicado por el descenso del valor del  $k_L a$  obtenido experimentalmente.

Al respecto, Deindoerfer y Gaden (1971) (en Margaritis y Zajic, 1978) describen un experimento en el cual separan células de un caldo de fermentación y las colocan en una solución saturada con oxígeno, observándose una disminución de la concentración de oxígeno disuelto resultado de la actividad celular para mantener el estado basal. A la velocidad de disminución del oxígeno disuelto le llamaron “coeficiente de consumo de oxígeno”.

Lo descrito por Deindoerfer y Garden, sería el equivalente a lo que sucede en la fase lag de un microorganismo. En la fase lag el microorganismo se “adapta” a su medio, tomándose como adaptación la síntesis de enzimas necesarias para procesar los nutrientes del medio, y la acumulación intracelular de materiales (Bailey y Ollis, 1986; Demian *et al.* 1986). Salle (1988) menciona a esta etapa como particularmente activa a nivel fisiológico, con una reducción en la velocidad de reproducción y un aumento de volumen celular asociado a cambios morfológicos; estos cambios no son detectables a nivel macroscópico porque los consumos se hacen con el mismo número de células.

Considérese el ejemplo del aumento de volumen de las células; un aumento de unas pocas micras en el diámetro de cada célula, compuestas predominantemente por agua, no se detectaría en una determinación de biomasa por peso seco. Y aunque los consumos no se detecten macroscópicamente, el intercambio de materiales con el medio existe, y esto es detectable en el cambio del  $k_L a$ .

El efecto experimental de los cambios fisiológicos durante la fase lag, es la disminución del  $k_L a$  y por lo tanto de la velocidad de transferencia; entonces se puede establecer una ecuación que describa el descenso de la velocidad de transferencia, en términos de las ecuaciones que describen los procesos de desaparición o creación de una sustancia, que son descritos matemáticamente por ecuaciones diferenciales de primer orden, del tipo (Pita, 1994; Montes de Oca, 2001):

$$\frac{dY}{dz} = kY \quad (\text{A4.1})$$

donde  $k < 0$  para pérdidas y  $k > 0$  para generación

La ecuación A4.1 es la forma general para la ley de enfriamiento de Newton que describe como se pierde temperatura, la ley de desintegración radiactiva que describe como se pierde masa de los núcleos radiactivos y de la ley de Malthus que describe como se acumulan células en la fase exponencial de un cultivo. Y donde la constante  $k$  es una velocidad específica; en este caso velocidad específica de consumo de oxígeno disuelto.

Así la variación de la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) con respecto al tiempo ( $t$ ) se expresa como:

$$\frac{d(\text{VTO})}{dt} = k\text{VTO} \quad (\text{A4.2})$$

Resolviendo la ecuación A4.2 por variables separables, y utilizando la condición inicial a  $t = 0$ ,  $\text{VTO} = \text{VTO}_0$  :

$$\text{VTO} = \text{VTO}_0 e^{kt} \quad (\text{A4.3})$$

Donde  $k$  puede obtenerse de la linearización, por medio de logaritmos, de la ecuación A4.3.

$$\ln(\text{VTO}) = \ln(\text{VTO}_0) + kt \quad (\text{A4.4})$$

La ecuación A4.4 es la ecuación de una línea recta, donde  $k$  es la pendiente

### A4.3.- Consumo de oxígeno disuelto tipo movimiento oscilatorio

Cuando el cambio en la concentración de oxígeno disuelto, durante la fermentación, adquiere la forma de un movimiento ondulatorio, la velocidad de transferencia de oxígeno (VTO) seguirá esta tendencia, presentando incrementos y descensos periódicos en su valor.

Los cambios en la VTO pueden relacionarse con los cambios en el consumo microbiano de oxígeno, de acuerdo a lo encontrado por Wang y Fewkes (1977) quienes en fermentaciones no newtonianas para antibióticos con *Streptomyces niveus*, encontraron que la velocidad de respiración ( $Q_{O_2}$ ) se relacionaba directamente con la concentración de oxígeno disuelto en el medio, en independencia de las condiciones de potencia aplicada.

Este comportamiento representa una analogía con lo que ocurre en el llamado control químico que algunas hormonas tienen sobre conjuntos de células de mamíferos, en donde al cambiar la concentración de la hormona en los alrededores de la célula, cambia la velocidad de consumo de la misma. La concentración del químico que controla a la célula es a su vez controlada por la célula que lo consume. Este mecanismo es llamado feedback (retroalimentación) (Nelson *et al.*, 1987). Las ecuaciones que describen a un sistema retroalimentado son ecuaciones diferenciales no lineales (Capra, 1998; Briggs y Peat, 1999).

En fermentaciones, las ecuaciones no lineales retroalimentadas se utilizan para describir el crecimiento bacteriano cuando hay dos diferentes fuentes de carbono en el medio (crecimiento diáuxico), donde una es de difícil asimilación (como las combinaciones glucosa-lactosa). La ecuación que describe este tipo de crecimiento es llamada ecuación logística; la cual es una simplificación de una ecuación diferencial de segundo grado (Briggs y Peat, 1991; Pita, 1994).

Por similitud se esperaría que la ecuación que describa la velocidad de transferencia de oxígeno en nuestro caso de estudio, también sea una ecuación diferencial de segundo grado, ya que las oscilaciones son producidas por aceleraciones y frenos en la velocidad de consumo de oxígeno del microorganismo (en este trabajo  $Q$ ); los cambios de velocidad son llamados aceleración, y la aceleración es la derivada de la velocidad (o segunda derivada).

Estableciendo la relación:

$$\frac{dQ}{dt}, Q \propto VTO \quad (A4.5)$$

Siendo  $Q$  una velocidad de consumo,  $dQ/dt$  es una segunda derivada.

$$\frac{dQ}{dt}, Q \propto k_L a(C^* - C_L) \quad (A4.6)$$

Si bien las ecuaciones diferenciales de segundo grado producen patrones oscilatorios, y sus soluciones particulares pueden expresarse en funciones de senos y cósenos (Takeuchi *et al.*, 1984; Ince, 1988; Pita, 1994; Castro Figueroa, 1997; Montes de Oca, 2001), existe un gran número de familias de ecuaciones, que puede dar comportamientos similares a la figura A4.1.

De entre ellas, las más similares al patrón oscilatorio experimental son aquellas que describen los movimientos oscilatorios (también llamados movimientos vibratorios). Ince (1988) y Pita (1994) presentan una variación de las ecuaciones que describen el movimiento oscilatorio amortiguado que tiene la forma:

$$a_1 \frac{d^2y}{dx^2} + a_2 \frac{dy}{dx} = a_3 P(z) \quad (A4.7)$$

Sustituyendo los términos de la transferencia de oxígeno en la ecuación A4.7

$$a_1 \frac{dQ}{dt} + a_2 Q = a_3 [k_L a (C^* - C_L)] \quad (A4.8)$$

La ecuación A4.8 es una ecuación no homogénea que predeciría un sistema oscilatorio amortiguado, es decir uno donde la amplitud de las oscilaciones va disminuyendo en forma periódica. Estas disminuciones no se presentan en los datos experimentales, lo que indica que los coeficientes  $a_1$ ,  $a_2$  y  $a_3$  de la ecuación no son constantes; lo cual es consistente con lo expresado anteriormente, en donde un intercambio de productos de la célula con el caldo afecta a la velocidad de transferencia de oxígeno. La ecuación A4.8, con sus coeficientes variables, no tiene una solución analítica. En este trabajo, el enfoque, es que si se tienen los datos experimentales para calcular  $Q$ ,  $dQ/dt$  y  $VTO$ , se puede iterar el valor de las constantes hasta lograr que la igualdad entre los dos lados de la ecuación se cumpla.

El interés por obtener conjuntos de valores de  $a_1$ ,  $a_2$  y  $a_3$  es porque estos pueden mostrar tendencias de comportamiento que ayuden a describir el efecto de las condiciones del medio sobre la VTO. Particularmente por las propiedades matemáticas de  $a_2$  y  $a_3$ .

En el análisis que Pita (1994) presenta de la ecuación A4.7 aplicada a un sistema de circuitos eléctricos, se muestra que  $a_2$  debe tener un valor menor de 1 y que esta relacionada con las condiciones al tiempo cero del sistema en estudio. En una fermentación, al tiempo cero no se tiene consumo microbiano, pero si se tiene oxígeno disuelto, por lo que  $a_2$  debe estar relacionada con el valor de  $C_L$  a tiempo cero, pero como tiene un valor menor de 1, debe ser un cociente entre concentraciones; como la referencia para el oxígeno disuelto es  $C^*$ , en este trabajo se propone:

$$a_2 = \frac{C_{L0}}{C^*} \quad (A4.9)$$

El cociente  $C_{L0}/C^*$  esta relacionado con las condiciones de aireación y mezclado del tanque. Mientras que en los sistemas oscilatorios amortiguados,  $a_3$  esta relacionada con los efectos que frenan a la fuerza impulsora del movimiento. En este trabajo,  $a_3$  es un indicativo del efecto de las resistencias no consideradas en el modelo del cálculo del  $k_L a$ , como el efecto de las propiedades del caldo y las condiciones hidrodinámicas en el tanque. El análisis dimensional de la ecuación A4.8, indica que  $a_1$  es una función del tiempo.

Para encontrar el conjunto de  $a_1$ ,  $a_2$  y  $a_3$  que mejor se ajuste a la igualdad de la ecuación A4.8, se seleccionan aquellas que, mediante un proceso de iteración, puedan cumplir



una igualdad con el parámetro experimental determinado con mayor precisión, que es el  $k_L a$ , con el menor porcentaje de error. Así la ecuación a iterar es:

$$k_L a = \frac{a1}{a3(C^* - C_L)} \frac{dQ}{dt} + \frac{a2}{a3(C^* - C_L)} Q \quad (A4.10)$$

#### A4.4.- Análisis de unidades

Para la ecuación (5.3):

$$VTO = VTO_0 e^{kt}$$

VTO	$\left[ \frac{mgO_2}{Lh} \right]$	Velocidad de transferencia de oxígeno
VTO <sub>0</sub>	$\left[ \frac{mgO_2}{Lh} \right]$	Velocidad de transferencia de oxígeno a tiempo cero
k	[h <sup>-1</sup> ]	Velocidad específica de consumo de oxígeno en fase lag
t	[h]	Tiempo

Para la ecuación (A4.8):

$$a1 \frac{dQ}{dt} + a2Q = a3[k_L a(C^* - C_L)]$$

Con:

$$Q = \frac{\mu X}{Y_{x/o}}$$

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

$$Y_{x/o} = \frac{X - X_0}{C_L - C_{L0}}$$

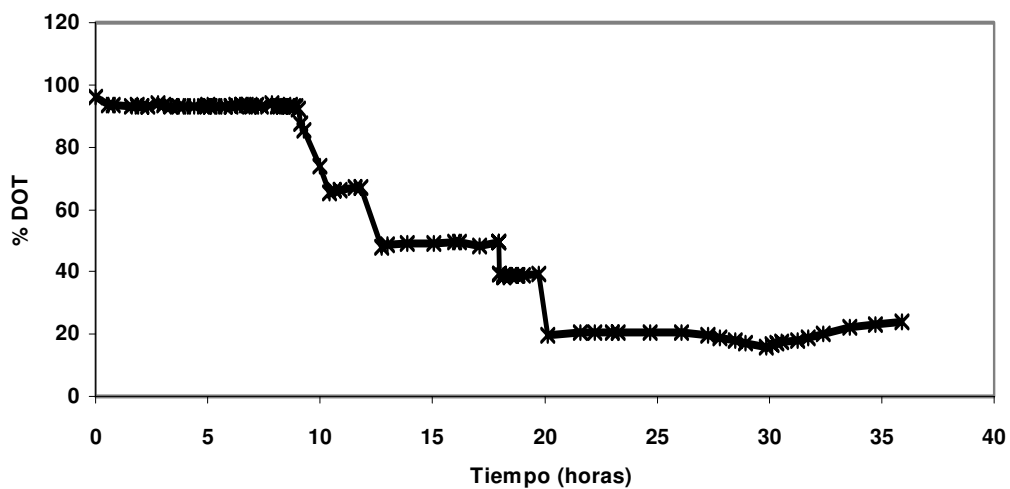
X	$\left[ \frac{mg_{cel}}{L} \right]$	Concentración de biomasa en el caldo
X <sub>0</sub>	$\left[ \frac{mg_{cel}}{L} \right]$	Concentración de biomasa en el caldo al tiempo cero
C <sub>L</sub>	$\left[ \frac{mgO_2}{L} \right]$	Concentración de oxígeno disuelto

$C_{L,0}$	$\left[ \frac{mgO_2}{L} \right]$	Concentración de oxígeno disuelto al tiempo cero
$C^*$	$\left[ \frac{mgO_2}{L} \right]$	Concentración de oxígeno disuelto en el equilibrio
$k_{L,a}$	$[h^{-1}]$	Coficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
$Y_{X/O}$	$\left[ \frac{mg_{cel}}{mgO_2} \right]$	Rendimiento de biomasa por unidad de oxígeno
$dX/dt$	$\left[ \frac{mg_{cel}}{Lh} \right]$	Velocidad de aumento de la biomasa
$\mu$	$[h^{-1}]$	Velocidad específica de crecimiento
$Q$	$\left[ \frac{mgO_2}{Lh} \right]$	Velocidad de consumo de oxígeno
$dQ/dt$	$\left[ \frac{mgO_2}{Lh^2} \right]$	Derivada de la velocidad de consumo de oxígeno
$a_1$	$[h]$	Constante de la ecuación retroalimentada (factor de tiempo)
$a_2$	$[adimensional]$	Constante de la ecuación retroalimentada (factor de condiciones iniciales)
$a_3$	$[adimensional]$	Constante de la ecuación retroalimentada (factor de amortiguamiento)

#### A4.5.- Cálculo de las constantes

□ sando los datos experimentales, de la fermentación con *Xanthomonas campestris*, 30 °C, medio S, 200 rpm, 12 L de medio, listón helicoidal, aireación 12 L/min (1 vvm).

El patrón de variación de oxígeno disuelto (expresado como % TOD) es



**Figura A4.2.-** Oxígeno disuelto para ejemplo de cálculo

En esta fermentación, están presentes los dos tipos de comportamiento, el mantenimiento de una concentración de oxígeno disuelto constante durante la fase lag del microorganismo, y el patrón de consumo oscilatorio.

**Tabla A4.1**  
Datos de producción de xantana

Tiempo (horas)	Biomasa (mg/mL)	Sustrato residual (mg/mL)	Xantana (mg/mL)	$k_L a$ ( $h^{-1}$ )
0.0	2.50	18.85	0.1986	33.48
3.0	2.50	18.85	0.1987	32.04
4.5	2.50	18.60	0.1975	30.24
6.0	2.50	18.50	0.1967	29.16
9.0	2.50	18.85	0.1965	27.36
10.0	2.50	18.90	0.1967	23.41
13.0	3.20	19.10	0.2080	28.03
16.0	3.70	16.08	0.2140	10.23
19.0	4.25	14.78	0.2870	12.36
23.0	5.00	14.00	0.3256	11.87
26.0	5.75	12.83	0.3623	12.29
30.5	5.80	11.40	0.3745	10.42
35.0	6.00	8.50	0.3793	11.67

#### A4.5.1.- Secuencia de cálculos

a) Transformar los datos de % TOD a  $C_L$ .

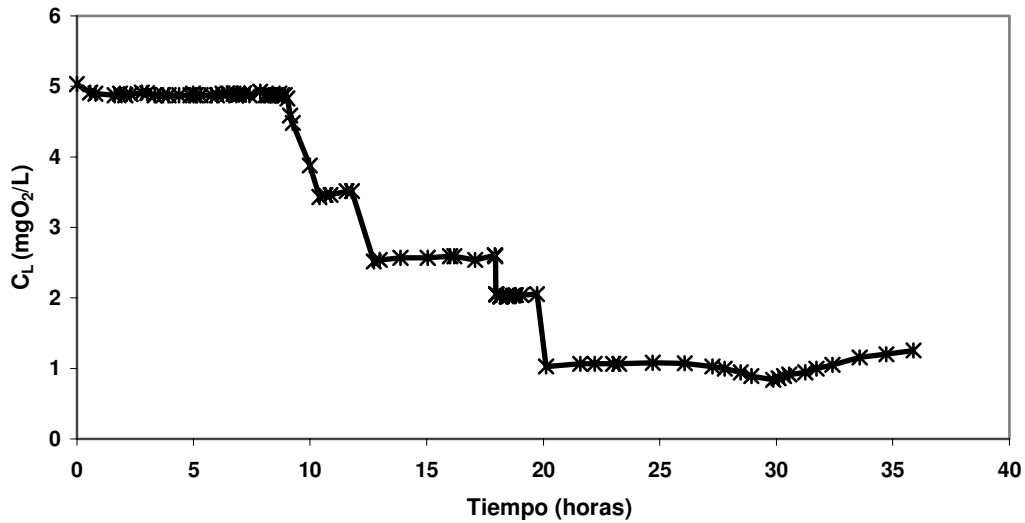


Figura A4.3.- Oxígeno disuelto en fermentación

b) Analizar la zona donde la concentración de oxígeno disuelto no se modifica, y donde esta zona coincide con la fase lag de desarrollo del microorganismo.

La ecuación descriptiva es:

$$VTO = VTO_0 e^{kt} \quad (A4.11)$$

Con:

$$VTO = k_L a (C^* - C_L) \quad (A4.12)$$

Los datos obtenidos en la zona donde no cambia la concentración de oxígeno son:

**Tabla A4.2**  
Oxígeno disuelto en fase lag

Tiempo (horas)	$k_L a$ (s <sup>-1</sup> )	$C^*$ (mgO <sub>2</sub> /L)	$C_L$ (mgO <sub>2</sub> /L)	VTO (mgO <sub>2</sub> /L h)
0.0	33.48	5.2392	4.886	11.8251
3.0	32.04	5.2392	4.886	11.3165
4.5	30.24	5.2392	4.886	10.6807
6.0	29.16	5.2392	4.886	10.2993
9.0	27.36	5.2392	4.886	9.6635

□ sando la forma lineal de la ecuación A4.12:

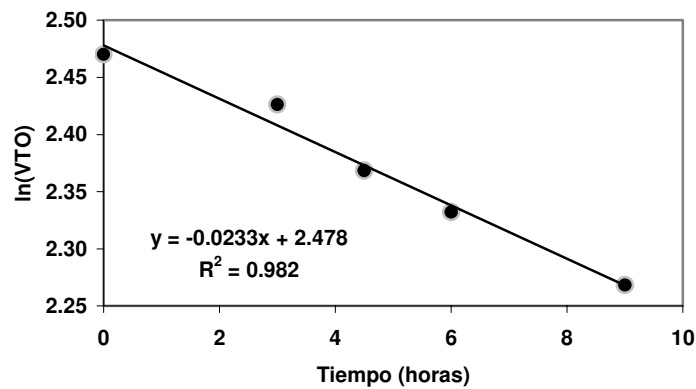
$$\ln(VTO) = \ln(VTO_0) + kt \quad (5.12)$$

**Tabla A4.3**

Logaritmos de la velocidad de transferencia de oxígeno

Tiempo (horas)	ln(VTO)
0.0	2.4702
3.0	2.4263
4.5	2.3684
6.0	2.3321
9.0	2.2684

Realizando la regresión de los datos



**Figura A4.4.-** Obtención del coeficiente de consumo en fase lag

La pendiente es -0.0233 y corresponde al valor de k (velocidad específica de consumo de oxígeno).

**c) Analizar la zona donde se presenta un patrón oscilatorio del consumo de oxígeno.**

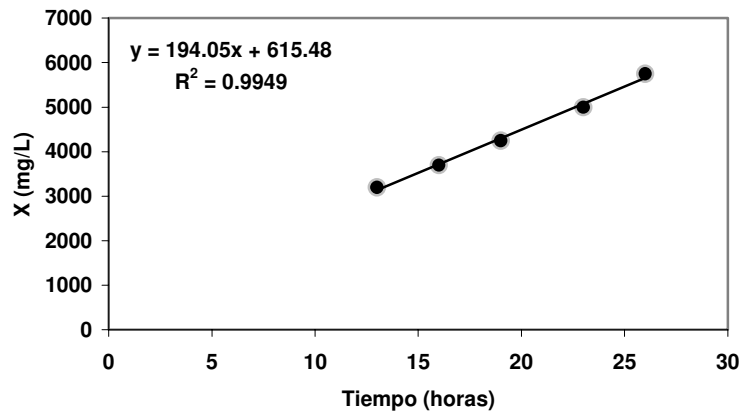
Se utilizan preferentemente los datos de la zona exponencial de la bacteria, que es la zona donde se determinó el  $k_L a$  experimental.

c.1) Calcular de la velocidad de crecimiento

**Tabla A4.4**

Datos de biomasa en la producción de xantana

Tiempo (horas)	X ( $mg_{cel}/L$ )
13	3200
16	3700
19	4250
23	5000
26	5750



**Figura A4.5.-** Obtención de la velocidad de crecimiento

La velocidad de formación de células ( $dX/dt$ ) es igual a la pendiente:  $194.05 \text{ mg}_{\text{cel}}/\text{Lh}$

**c.2) Cálculo del consumo microbiano**

□ tilizando las expresiones (Andrews, 1989; Esener, 1983):

$$Q = \frac{\mu X}{Y_{x/o}} \quad (\text{A4.14})$$

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (\text{A4.15})$$

$$Y_{x/o} = \frac{X - X_0}{C_L - C_{L0}} \quad (\text{A4.16})$$

Con los datos experimentales:

$$X_0 = 2500 \text{ mg}_{\text{cel}}/\text{L}$$

$$C_{L0} = 4.886 \text{ mgO}_2/\text{L}$$

**Tabla A4.5**

Calculo del consumo microbiano de oxígeno durante la producción de xantana

Tiempo (horas)	X ( $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{L}$ )	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$C_L$ ( $\text{mgO}_2/\text{L}$ )	$Y_{x/o}$ ( $\text{mg}_{\text{cel}}/\text{mgO}_2$ )	Q ( $\text{mgO}_2/\text{Lh}$ )
13	3200	0.0606	2.5410	298.5075	0.6501
16	3700	0.0524	2.5934	523.4232	0.3707
19	4250	0.0457	2.0433	615.6119	0.3152
23	5000	0.0388	1.0688	654.9303	0.2963
26	5750	0.0337	1.0740	852.5708	0.2276

c.3) Calcular la derivada del consumo microbiano

El consumo tiene la forma

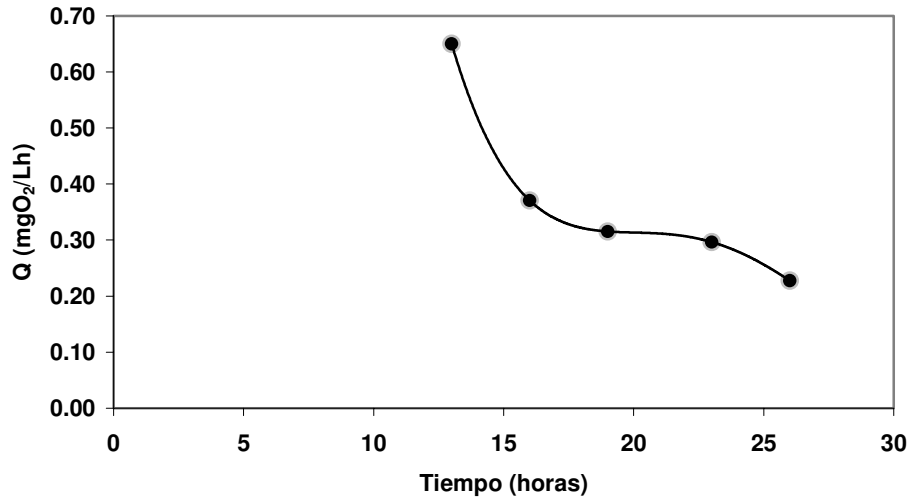


Figura A4.6.- Consumo microbiano de oxígeno durante la producción de xantana

Calcular la diferencial del consumo es la parte más difícil de la secuencia, porque el sistema que se describe es no lineal, y el ajuste de datos a una función matemática definida es una aproximación lineal; entonces los ajustes de este tipo de curvas se desvían mucho del comportamiento real, como puede observarse en la siguiente figura, donde los puntos ajustan perfectamente a un polinomio de 4 grado, pero los valores predichos por la ecuación difieren del comportamiento real.

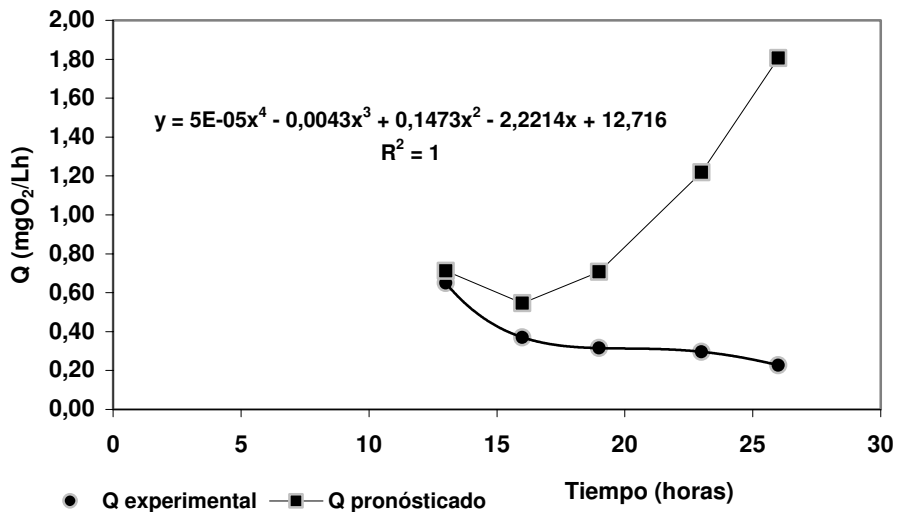
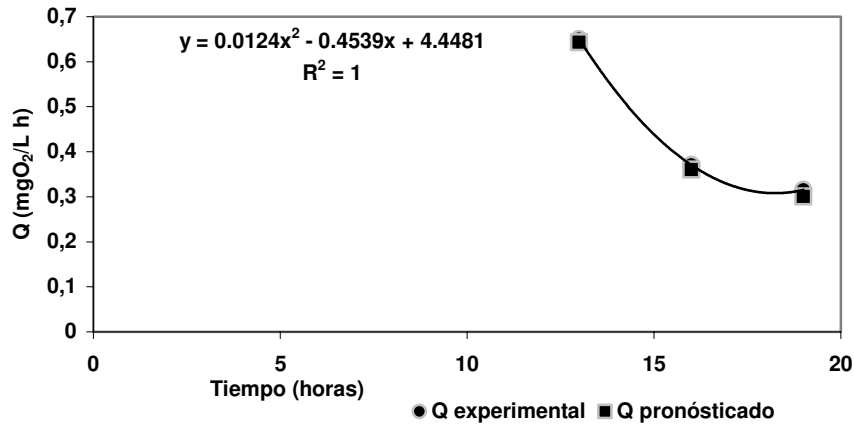


Figura A4.7.- Aproximación a la derivada del consumo microbiano de oxígeno

La opción más viable para el cálculo es emplear un método gráfico (como el método del espejo).

Cuando las curvas tienen un comportamiento regular, como en este caso, se pueden hacer ajustes parciales, para encontrar funciones que al pasar por nuestros puntos de interés, den una aproximación a la derivada.

Para comprobar que la función encontrada se adapta a los puntos seleccionados, se calculan los valores de Q que predice dicha ecuación, si estos no se desvían de la función verdadera, entonces la función sirve como una aproximación.



**Figura A4.8.-** Función para el cálculo de la derivada del consumo microbiano de oxígeno

Con la función

$$Q = 4.4481 - 0.4539(t) + 0.0124(t^2) \quad \text{válida en el intervalo 13 a 19 horas}$$

La derivada de la ecuación de ajuste (en el intervalo 13 a 19 horas) es:

$$\frac{dQ}{dt} = -0.4539 + 0.0248(t) \quad (\text{A4.17})$$

Aplicando un procedimiento similar al resto de los puntos:

**Tabla A4.6**  
Derivada del consumo microbiano de oxígeno

Tiempo	dQ/dt
13	-0.1743
16	-0.0567
19	0.0173
23	-0.0153
26	0.0309



□ utilizando estos datos para resolver la ecuación:

$$k_L a = \frac{a_1}{a_3(C^* - C_L)} \frac{dQ}{dt} + \frac{a_2}{a_3(C^* - C_L)} Q \quad (\text{A4. 8})$$

Donde:

$$C^* (\text{para medio S}) = 5.2392 \text{ mgO}_2/\text{L}$$

$$C_{L0} = 4.886 \text{ mgO}_2/\text{L}$$

$$a_1 = f(t), \text{ proponiendo } a_1 = t$$

$$a_2 = C_{L0}/C^* = 4.886/5.2392 = 0.93258513$$

**Tabla A4.7**

Parámetros para el cálculo de la ecuación con retroalimentación para balance de oxígeno disuelto

Tiempo (horas)	$C_L$ (mgO <sub>2</sub> /L)	Q (mgO <sub>2</sub> /Lh)	dQ/dt (mgO <sub>2</sub> /Lh <sup>2</sup> )	a1 (h)	a2 (adim)
13	2.5410	0.3501	0.1315	13	0.9326
16	2.5934	0.3770	0.0571	16	0.9326
19	2.0433	0.3152	0.0173	19	0.9326
23	1.0688	0.2963	0.0153	23	0.9326
26	1.0740	0.2276	0.0309	26	0.9326

Tiempo (horas)	a3 (Adim.)	(C* - C <sub>L</sub> ) (mgO <sub>2</sub> /L)	k <sub>L</sub> a <sub>pred</sub> (h <sup>-1</sup> )	k <sub>L</sub> a <sub>experimental</sub> (h <sup>-1</sup> )	% error
13	0.027	2.6982	27.95	28.03	0.30
16	0.045	2.6458	10.63	10.23	3.87
19	0.015	3.1959	12.99	12.36	5.09
23	0.013	4.1704	11.59	11.87	2.38
26	0.020	4.1652	12.19	12.29	0.80

Los datos mostrados en la tabla anterior son los datos finales, en donde el valor de a3 se ha iterado hasta encontrar el menor porcentaje de error con respecto al k<sub>L</sub>a determinado experimentalmente.

El efecto del valor de a3 en la predicción del valor del k<sub>L</sub>a, puede observarse en la siguiente figura, que muestra el porcentaje de error en la estimación del k<sub>L</sub>a, para el tiempo t = 13 horas (k<sub>L</sub>a experimental = 28.03 h<sup>-1</sup>), donde se aprecia que solo hay un valor en el cual el porcentaje de error es mínimo.