



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ANÁLISIS MORFÓLOGICO DEL AIRE INCORPORADO EN
MATRACES AGITADOS ORBITALMENTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO MECÁNICO

PRESENTA:

LUIS FERNANDO RAMOS MIRANDA

Dirección de Tesis

DRA. MARÍASOLEDA CÓRDOVA AGUILAR



MÉXICO, D.F.

2014



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.

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico (CCADET) en el laboratorio de Ingeniería de Proceso bajo la asesoría de los Dres. María Soledad Córdova Aguilar y Enrique Soto Castruita.

Así mismo, se agradece el soporte técnico y discusión de resultados de Ernesto Mancilla y Luz Deisy Marín Palacio. Se agradece el apoyo en la construcción del diseño experimental a Juan Carlos Morán.

Índice

Resumen.....	4
1. Introducción.....	5
1.1 Objetivo	7
1.2 Objetivos Particulares.....	7
2. Antecedentes.....	8
2.1Transferencia de oxígeno	9
2.2Distribución y diámetro Sauter de burbujas.....	11
2.3Matraces.....	12
2. 4Análisis de imágenes	14
2.4.1 Filtrado de imágenes	18
3. Metodología	20
3.1 Material	20
3.2 Arreglo experimental.....	23
3.3Diseño experimental	25
3.4 Determinación de distribución y diámetros de burbujas.....	26
4. Resultados	35
4.1 Caracterización morfológica	35
4.1.1 Matraz liso.....	35
4.1.2 Matraz bafleado	40
4.1.3 Matraz con resorte	42
4.2 Distribución de tamaños.....	43
4.3 Tamaño mínimo de burbuja y presión de Laplace	48
4.4 Factor de forma de burbujas	51
4.5Dispersion de biomasa	53
5. Conclusiones.....	57
Bibliografía	59

Resumen

El uso de matraces agitados es ampliamente utilizado en investigaciones sobre el cultivo de microorganismos y los productos que sintetizan, incluso, son utilizados a nivel industrial para modificar condiciones de operación y probar materias primas. Entre los factores de mayor relevancia en el cultivo de bacterias, se encuentran la aireación, el comportamiento reológico del fluido, la velocidad de agitación, la configuración geométrica de los matraces y el volumen agitado. Existen numerosos reportes sobre el tema, sin embargo todavía hay mucho por explicar sobre los fenómenos de mezclado que suceden en el interior de los matraces, en particular desde un punto de vista hidrodinámico.

El objetivo de este trabajo es caracterizar por medio de técnicas de visualización la incorporación de aire y la dispersión de biomasa para tres diferentes configuraciones de matraces. Se encontró que los matraces lisos no incorporan aire durante la agitación, mientras que los matraces con resortes incorporan aire y lo retienen, y los matraces con baffles incorporan aire de manera continua y producen corrientes internas capaces de fracturar las burbujas de aire. También se describe un tamaño mínimo de burbuja en el sistema. Así mismo también se encontró que la dispersión de la biomasa está estrechamente relacionada con la configuración de los matraces.

1. Introducción

Los matraces en agitación orbital han sido utilizados desde hace mucho tiempo para el cultivo de diversos microorganismos como bacterias, levaduras y hongos. Debido a su versatilidad y volumen de trabajo, se utilizan en investigación y proyectos de desarrollo de bioprocesos para realizar diversas tareas como: selección de cepas silvestres, o mejoramiento de cepas por mutación y biología molecular, desarrollo de medios de cultivo, implementación de protocolos analíticos, modificación de las condiciones de operación de los procesos como: pH y temperatura, duración del cultivo, etc. [Büchs, 2001].

Su éxito se le atribuye al diseño simple y funcional, que permite realizar un gran número de experimentos de manera simultánea a un costo accesible y eficiente [Klößner, Büchs, 2012].

Los cultivos en matraces pueden realizarse en dos tipos de agitadoras: las de movimiento rotatorio u orbital y las de movimiento oscilante lineal [Büchs, 2001].

No obstante que más del 90% de todos los experimentos de cultivos en biotecnología se han desarrollado en matraces agitados, muy pocas de las publicaciones hacen referencia a los aspectos hidrodinámicos [Büchs, 2001].

Un factor importante a entender en los matraces agitados, es el mezclado y su influencia en la productividad del proceso [Lee, 2001]. Algunos trabajos se han enfocado en el tiempo de mezclado, lo que determina la eficiencia del proceso al regular la transferencia de masa, momento y calor [Tan, et al, 2011]. Otro factor a considerar es el desfase del flujo del fluido con respecto a las paredes del matraz [Büchs, 2001].

La aireación es un requerimiento fundamental para los cultivos de microorganismos aerobios. La demanda de oxígeno puede llegar a ser un parámetro limitante del crecimiento y producción, cuando se excede o se limita la capacidad de transferencia del mismo [Maier and Büchs, 2001]. Una forma de evitar la limitación por oxígeno, es ajustar las condiciones de agitación, ya que la velocidad de agitación tiene un papel muy importante en la

transferencia de masa, determinada a su vez por el tamaño y cantidad de burbujas [Büchs, 2001; Maier and Büchs, 2001].

Una de las medidas más comunes para lograr altas transferencias de oxígeno en matraces agitados, es la introducción de baffles lo que provoca una mayor agitación del fluido y la generación de una gran cantidad de pequeñas burbujas. Otra configuración es la incorporación de resortes, fundamentalmente en el caso del cultivo de microorganismos micelares como el caso de *Streptomyces*. La finalidad es favorecer la dispersión de la biomasa micelar aunque también ha sido muy eficiente para la producción de ciertos metabolitos.

En este trabajo se utilizaron técnicas de visualización y análisis de imágenes para evaluar la distribución de tamaños de burbujas a diferentes velocidades de agitación y en tres configuraciones de matraz. Conjuntamente y con un experimento sencillo, se analizó la dispersión de una concentración baja de biomasa en función de la configuración de los matraces.

1.1 Objetivo

Caracterizar la distribución de tamaños de burbujas y morfología en función de la velocidad de agitación para las tres configuraciones de matraces utilizadas en cultivos de aplicación biotecnológica.

1.2 Objetivos Particulares

- 1.- Diseño e implementación de un arreglo experimental para la obtención de imágenes de tres diferentes configuraciones: matraz liso, matraz con baffles y matraz con resorte.
- 2.- Desarrollo de una metodología en base al análisis de imágenes para determinar la distribución de tamaños de burbujas.
- 3.- Caracterización morfológica de la distribución de tamaños de burbujas, en función de la velocidad de agitación
- 4.- Observar el efecto de la configuración de los matraces sobre la dispersión de biomasa.

2. Antecedentes

2.1 Agitación y mezclado

La agitación es el movimiento inducido en forma específica dentro de un tipo de contenedor y se encuentra presente en casi todos los procesos industriales. Por lo general, este movimiento es circulatorio y su finalidad es homogenizar los componentes adicionados. Entre los sistemas que comúnmente requieren de agitación, se encuentran: suspensiones, el mezclado de líquidos miscibles, la dispersión de un gas en un líquido o la de un líquido inmisible en otro, así como la formación de emulsiones. Por otra parte, el concepto de mezclado implica la distribución al azar de dos o más fases separadas inicialmente, tal como se ejemplifica en la Figura 1.

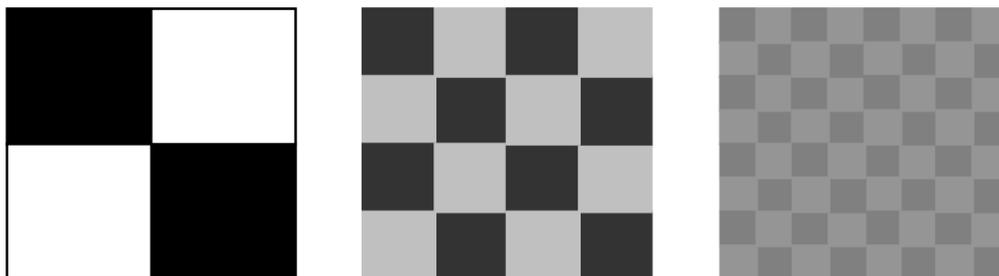


Figura 1: *Diagrama esquemático del proceso de mezclado, [Paul et al., 2003]*

El contenedor donde se lleva a cabo el proceso de transformación de una materia prima en un producto de interés, se denomina reactor y cuando se involucra material biológico, entonces se le llama bioreactor o fermentador. Este tipo de contenedor puede ser de diferente escala (laboratorio, piloto, industrial); cada uno con sus propias características y objetivos, es decir: tamaño, forma de operar y configuración geométrica.

Por otra parte, en los sistemas aerobios, se requiere dispersar el aire que transporta el oxígeno dentro del medio de cultivo. Debido a la baja solubilidad del oxígeno en agua, el suministro y dispersión del mismo debe realizarse de manera continua y con flujo

turbulento. De esta forma, la dispersión del aire en el líquido tiene como finalidad incrementar el área y por consiguiente, la velocidad de transferencia de masa, lo que evita que las limitaciones de transferencia de masa gas-líquido creen un efecto negativo en la productividad [Cents, et al., 2004].

En el caso de contenedores agitados como los matraces o los tanques agitados mecánicamente, el esfuerzo de corte es el responsable de llevar a cabo el proceso de mezclado global, la dispersión del gas y producir el mezclado a escala microscópica.

Para evaluar el desempeño del sistema de agitación se determina el tamaño de elementos dispersos. El rendimiento de un proceso de mezclado puede ser caracterizado por el tiempo de mezclado [Tan, et al, 2011], además de la medición de la potencia (P), es decir, la cantidad de energía necesaria, en un período de tiempo, para generar el movimiento del fluido dentro del contenedor. La calidad de las dispersiones se puede cuantificar a través de diversas técnicas como lo es la Imagen digital. La información que se obtiene es el diámetro promedio Sauter (d_{32}), que relaciona el área de la fase dispersa con su volumen [Pacek et al., 1998].

Debe señalarse que existe un tamaño óptimo de burbuja dependiendo de las necesidades del proceso. Por ejemplo, si las burbujas son muy grandes el área es menor y entonces la velocidad de transferencia de oxígeno también es menor. Por otro lado, si las burbujas son muy pequeñas el área es mayor, pero estas difícilmente saldrán del fluido, agotando su oxígeno e impidiendo que se incorporen nuevas burbujas, por eso, debe existir un tamaño donde el área de intercambio sea buena y el tiempo de residencia sea el adecuado para el suministro de oxígeno y la incorporación de nuevas burbujas.

2.1 Transferencia de oxígeno

La transferencia de oxígeno es un parámetro importante en los procesos aerobios, donde se requiere transferir a los microorganismos el oxígeno que necesitan para la generación de energía, crecimiento y producción. El gas – casi siempre aire - debe ser dispersado en un líquido (solución acuosa o suspensión) y el oxígeno debe disolverse, al ser el único que los

microorganismos pueden tomar. Un suministro de oxígeno suficiente para el crecimiento de las células es crítico [Vardar-Sukan, 1990]. La baja solubilidad del O_2 en agua (alrededor de 10 ppm) empleando aire a 1 atm y a temperatura ambiente, de acuerdo a Atkinson y Mavituna, 1991, implica suministrar aire de modo permanente al medio de cultivo, de manera que las células puedan aprovechar en forma adecuada el oxígeno disuelto. Es importante considerar que la tasa de transferencia está en función del diseño del reactor, condiciones de operación (aireación y agitación) y de las propiedades reológicas y tensión superficial del medio de cultivo, así como de la concentración de oxígeno en la corriente de aire, la morfología del microorganismo y el área superficial que proveen las burbujas.

Niveles limitados de oxígeno pueden ralentizar el metabolismo de los microorganismos o pueden provocar un cambio parcial a un metabolismo anaeróbico, lo que se refleja en la producción de alcoholes o ácidos que modifican el pH o la producción de metabolitos secundarios tóxicos [Büchs, 2001].

La capacidad de transferencia de oxígeno en sistemas agitados se caracteriza por el coeficiente de transferencia volumétrica de oxígeno (kLa), en el cual están integrados el efecto de resistencia a la transferencia de masa en la fase líquida (etapa controlante), así como el área disponible para la transferencia de masa [Cents, 2001]. La transferencia de oxígeno, tanto en matraces agitados como en reactores, ocurre por aireación superficial y por suministro de aire, siendo la segunda la de mayor contribución al proceso [Doran, 1998]. Entonces, la capacidad de transferencia es función de las concentraciones de oxígeno, tanto en la fase líquida en equilibrio con la concentración de oxígeno de la fase gaseosa en la interfase, como en el seno del líquido y del coeficiente de transferencia de masa. Por tanto, en el proceso de transferencia de oxígeno se busca que no haya limitaciones para no modificar el metabolismo y la producción, para lo cual se trabaja con los efectos combinados de la velocidad del fluido, la geometría del sistema de transferencia del material y las propiedades del fluido como viscosidad y difusividad.

Se han desarrollado correlaciones empíricas que permiten hacer aproximaciones de la velocidad de transferencia de masa a partir de las condiciones de operación. De acuerdo con estas correlaciones, se sabe que existe una relación directa del kLa , tanto con la

potencia volumétrica suministrada al sistema, como con la velocidad superficial de la fase gaseosa.

Por otra parte, la teoría más ampliamente usada para describir la transferencia de masa gas-líquido, es la teoría de la película, [Whitman, 1923]. Este modelo propone que a ambos lados de la interfase gas-líquido, se establece una película, en donde se concentra toda la resistencia a la transferencia. Un aumento en la agitación ocasiona una disminución en el espesor de la película, se favorece una mayor área interfacial y por tanto la transferencia mejora. De ahí que el aumento de área de transferencia interfacial sea una estrategia muy común para el incremento en la transferencia de oxígeno en diversos procesos.

2.2 Distribución y diámetro Sauter de burbujas

A partir de mediciones del diámetro de burbujas del sistema (tamaño) y considerando el número de objetos que forman el conjunto de datos, se obtiene un valor promedio o diámetro Sauter. Este valor depende de la forma de la distribución de tamaño de burbujas [Zhou y Kresta, 1998b] aunque por definición, es mayor que el diámetro aritmético y más dependiente de las burbujas de mayor tamaño [Machonet *al*, 1997]. Así mismo, relaciona el área interfacial (a) por unidad de volumen y el área para la transferencia de masa [Zhou y Kresta, 1998b]. Por tanto, además del diámetro promedio, también se cuantifica la distribución de tamaños, representada con un histograma de frecuencias. Para cualquier distribución de valores discretos, como:

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

Donde d_i , es el diámetro de cada burbuja o gota y n , el número de burbujas o gotas, al relacionar el área interfacial por unidad de volumen, a , y el área para la transferencia de masa. Por consiguiente, determina la tasa de transferencia de energía, masa y/o reacción química en dispersiones [Pacek *et al*, 1999]. Sin embargo, el diámetro Sauter por sí solo no puede caracterizar una dispersión, en vista de que es posible obtener un mismo valor del diámetro promedio para distribuciones de tamaños diferentes [Zhou y Kresta, 1998]. Por lo tanto, para un mejor entendimiento de las dispersiones, además de medir el diámetro promedio Sauter, se cuantifica la distribución de tamaños. El área interfacial depende del

tamaño de la burbuja y la fase gaseosa total retenida [Dumont y Delmas, 2003], de acuerdo con la ecuación:

$$a = \frac{6\varepsilon}{d_{32}}$$

Donde, ε es el volumen total de la fase gaseosa retenida en el sistema (conocido como *hold-up*, en lengua inglesa).

2.3 Matraces

Los matraces son herramientas generalmente utilizadas en los laboratorios de física, química y microbiología. Existen diferentes tipos de matraces como:

Matraz aforado: se trata de un matraz con un cuello alargado, su aplicación es la de medir volúmenes con exactitud.

Matraz de lavado: es un recipiente para solventes para limpiar o lavar instrumentos.

Matraz de destilación: es un matraz alargado, diseñado para someterse a calentamiento.

Matraz Erlenmeyer: tiene forma cónica con un cuello estrecho, utilizado generalmente para mezclar sustancias. Tiene marcas para saber el volumen en su interior. Son los más utilizados para cultivos microbianos. Los matraces están hechos de vidrio (hidrofílico) o plástico (hidrofóbico), pueden tener o no bafles y diferentes volúmenes. Son utilizados en la investigación por su diseño funcional y costo accesible. En bioingeniería, en particular, permiten realizar un gran número de experimentos para aplicaciones como selección y mejoramiento de cepas, desarrollo de medios de cultivo, implementación de técnicas analíticas o la modificación de condiciones de operación de los procesos [Büchs, 2001; Klöckner and Büchs, 2012; Kennedy, 1994].

Aunque más del 90% de los experimentos de cultivos en biotecnología se han desarrollado en matraces agitados, algunos autores consideran que los cultivos en matraces agitados, son “sistemas deficientes” en términos de transferencia, eficiencia de mezclado y monitoreo

[Archambault, 1996].No obstante, siguen siendo la herramienta que por excelencia se utiliza para la realización de experimentos de optimización de bioprocesos. Para ello se han desarrollado diversas metodologías que permiten cuantificar los parámetros de relevancia en hidrodinámica como la potencia volumétrica y la transferencia de masa [Maier and Buchs, 2001].

Así mismo, se han propuesto algunas modificaciones como la introducción de baffles y resortes en el interior de los matraces con la finalidad de mejorar la transferencia de oxígeno y la agitación. Los baffles son indentaciones hechas manualmente, por lo que pueden variar de un matraz a otro, sin embargo, los matraces bafleados son comúnmente utilizados para simular los baffles de los tanques agitados[Jiménez, 2011].

Por otra parte, se colocan resortes de acero inoxidable en el fondo del matraz para incorporar burbujas de aire a los cultivos, fundamentalmente en cultivos miceliares, pero se generan altos esfuerzos cortantes y un efecto importante en la morfología y productividad de los cultivos.

2.3 Técnicas de visualización

En tiempos recientes, se han desarrollado técnicas de visualización que permiten obtener información experimental con la cual es posible documentar algunos fenómenos hidrodinámicos, calcular velocidades y tiempos de mezclado y en su caso, validar las soluciones halladas por métodos numéricos. Entre las técnicas de visualización más comúnmente utilizadas en Mecánica de Fluidos, destacan:

- a) **Colorimetría:** se introducen tintas o colorantes en una corriente de fluido, lo cual permite observar líneas de flujo o determinar tiempos de mezclado
- b) **Shadow graph:** esta técnica aprovecha que perturbaciones ocasionadas, por ejemplo, por un gradiente de temperatura, provocan otro tipo de perturbaciones como el cambio de densidad en el aire, y estos gradientes de densidad ocasionan un cambio de refracción en la luz, el fenómeno se observa en una pantalla donde se proyecta la sombra del movimiento del fluido.

-
- c) **Velocimetría por imágenes de partículas, PIV:** permite obtener campos de velocidades. Se introducen partículas como esferas de vidrio, poliamida, etc. en un fluido y se “dispara” un láser pulsado por un periodo de tiempo, las partículas tienen la peculiaridad de reflejar la luz del láser volviéndose visibles a las cámaras y al mismo tiempo, se efectúa una grabación. Las imágenes grabadas se analizan con ayuda de correlación cruzada. Este método se basa en que los grupos de partículas forman ciertos patrones, y entonces, a través de algoritmos y software de computadora, se buscan los mismos patrones entre dos imágenes, ya que se conoce el tiempo entre imágenes y el desplazamiento del patrón entre dichas imágenes, es posible determinar la velocidad a que se desplazan distintos patrones, lo que equivale a determinar el campo de velocidades. Generalmente, las cámaras utilizadas para este método son cámaras rápidas y con una buena resolución, lo que permite que se obtenga una gran cantidad de información. Pueden obtenerse campos en 2 o 3 dimensiones, sin embargo, determinarlo en tres dimensiones requiere de dos cámaras para obtener imágenes estereoscópicas, y un montaje bastante meticuloso del experimento, además de un mayor poder de procesamiento y almacenamiento por parte de las computadoras.
- d) **Video de alta velocidad:** se pueden grabar miles de imágenes por segundo, permitiendo registrar eventos imperceptibles al ojo humano. Algunas limitaciones tecnológicas son: la resolución de las imágenes, el tiempo de exposición y las condiciones de iluminación. Se requiere de una luz intensa y enfocar correctamente el plano deseado, así como una correcta manipulación de la cámara.

2. 4Análisis de imágenes

Una forma de caracterizar las dispersiones gas-líquido es midiendo la distribución de los tamaños de burbujas de aire, permitiendo el cálculo de parámetros como el área interfacial. Este análisis se puede llevar a cabo a través del análisis digital de imágenes [Pacek *et al*, 1994]. La fotografía directa ha sido, durante años, el método más usado para determinar la distribución de tamaños de burbujas. El procedimiento es simple, fácil y exacto, aunque tedioso, por las mediciones manuales de los objetos [Weibel, 1979]. Un ejemplo es la

utilización de las fotografías tomadas en la pared de un tanque [Chen, Middleman, 1967] o matraz, en las que se dimensionan manualmente las burbujas y se determina la dispersión. Estas mediciones, que en un principio son subjetivas, ya que dependen del criterio del observador, pueden sistematizarse y aumentar así su reproducibilidad si se utiliza una computadora.

Una imagen es la representación visual de un objeto o un grupo de objetos. El análisis cuantitativo de las imágenes se inició con mediciones manuales de los objetos, que luego se sistematizaron mediante el uso de una computadora. Actualmente, el análisis de dispersiones se hace por un procedimiento digital para obtener las imágenes, el cual consiste en una combinación de video y técnicas computacionales, facilitando así la cuantificación de las burbujas [Machon et al, 1997] y al mismo tiempo, su caracterización en cuanto a tamaño y distribución.

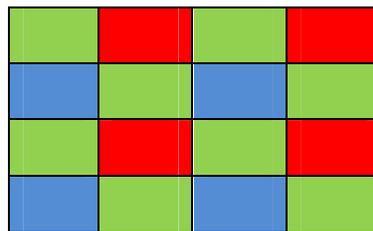


Figura 2.1. Se muestra el tramado utilizado en los sensores digitales correspondiente a 16 fotositos o cuatro pixeles.

Para que una imagen pueda ser procesada con una computadora, necesita ser digitalizada, es decir, convertida en una forma numérica. Para ello, se divide en una cuadrícula bidimensional, donde a cada pequeña región se le llama pixel, como se presenta en la Figura 2.1. Cada pixel se reconoce por su posición en la cuadrícula y contiene la información correspondiente a ese punto de la imagen en *bits* (la menor cantidad de información reconocida por una computadora), dependiendo de la resolución de la imagen es el número de *bits* que la representan. De esta forma el análisis de imágenes implica realizar las operaciones de captura, almacenamiento, corrección de defectos (igualación de colores, substracción de fondos, corrección y aplanamiento de campos), perfeccionamiento (retoque de color, brillo y contraste), segmentación de objetos (selección y separación de

objetos de interés del resto de la imagen) y mediciones (conteo y dimensionamiento de objetos) de forma sistemática[Russ, 1992].

El equipo básico que se requiere consiste en: un sistema apropiado de iluminación, con lo que se aseguren imágenes de alta calidad de los experimentos, una cámara de video y una computadora para digitalizar, procesar y analizar las imágenes.

Las cámaras modernas para fotografía y captura de video ofrecen, cada vez, una mayor resolución y avances tecnológicos, sin embargo, es necesario un conocimiento básico de fotografía para lograr imágenes de calidad. Los objetos no tienen color pero absorben una parte de la luz que incide sobre ellos y reflejan la restante, la segunda es captada por el ojo humano y/o el objetivo de la cámara. Esta luz se proyecta en el interior de la cámara en un plano sobre una película o un sensor que capta la información y se genera la imagen.

Entre los parámetros a considerar en la adquisición de imágenes nítidas y de alta resolución están:

Tiempo de exposición: se refiere al tiempo en que el obturador está abierto y permite el paso de luz hacia el sensor. El tiempo de apertura dependerá de la velocidad del fenómeno que se desee caracterizar. Para fenómenos muy rápidos, se requieren tiempos de exposición muy cortos, sin embargo como esto permite el paso de poca luz, debe contarse con una fuente de iluminación intensa.

Plano focal: sobre el que se proyecta la imagen. Este deberá coincidir con el sensor, ajustando la lente de la cámara para evitar imágenes desenfocadas.

Velocidad de grabación. Para fenómenos que suceden en corto tiempo, utilizar altas velocidades de grabación, no obstante que la resolución de las imágenes disminuye y el almacenamiento de las imágenes requiere más tiempo y memoria.

Procesamiento. En el análisis de imágenes se utilizan distintos programas de procesamiento y lenguajes de programación. El procesamiento de imágenes, ofrece la alternativa de detectar figuras, cuerpos, posiciones, etc., y entonces, determinar otras

propiedades como volúmenes, áreas, velocidades, centroides, etc., lo que convierte el análisis de imágenes en una herramienta de suma utilidad en el campo de la investigación.

Las imágenes o mapas de bits, son un conjunto de píxeles. A mayor número de píxeles mejor resolución y se representan como matrices con un arreglo similar al siguiente:

$$I = \begin{pmatrix} x_{11} & x_{12} & \cdots & x_{1n} \\ x_{21} & x_{22} & \cdots & x_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{m1} & x_{m2} & \cdots & x_{mn} \end{pmatrix}$$

Para almacenar una imagen en un disco duro se han desarrollado una gran cantidad de formatos, mínimamente se guarda el ancho, alto, profundidad de bits y la matriz de píxeles. Cada píxel está coloreado uniformemente y existe un concepto llamado profundidad de color que determina cuanta información puede contener un píxel. Una profundidad de color de 1 significa que se le asigna un bit a ese píxel, cómo el bit solo puede tomar los valores 1 y 0, se le pueden asignar como máximo dos colores a ese píxel, como sería el caso de una imagen binaria. En la tabla siguiente se muestra el equivalente en colores para las profundidades más comunes.

Profundidad	Colores
1 bit	2
4 bit	16
8 bit	256
16 bit	65536
32 bit	4294967296

Tabla 2.1: Número de colores según la profundidad de píxel

Si una imagen tiene una profundidad de píxel de 8 bit, significa que a cada píxel se le puede asignar un color de 256 posibles, desde 0 hasta 255. Cuando la profundidad es igual a 16 bit o mayor, se asignan capas, una capa para cada color básico: verde, rojo y azul, y otra capa para la luminosidad. Cada capa corresponde a una matriz. Cualquier color se puede expresar como una combinación lineal de los tres colores básicos:

$$C = rR + gG + bB$$

Por ejemplo, suponiendo una profundidad de 8 bit y tres capas para cada pixel:

$$\text{rojo} = (12, 0, 0) \text{ verde} = (0, 98, 0) \text{ azul} = (0, 0, 43)$$

$$C_{RGB} = (12, 98, 43)$$

$$I_R = \begin{pmatrix} R_{11} & R_{12} & \cdots & R_{1n} \\ R_{21} & R_{22} & \cdots & R_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ R_{m1} & R_{m2} & \cdots & R_{mn} \end{pmatrix} I_G = \begin{pmatrix} G_{11} & G_{12} & \cdots & G_{1n} \\ G_{21} & G_{22} & \cdots & G_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ G_{m1} & G_{m2} & \cdots & G_{mn} \end{pmatrix}$$

$$I_B = \begin{pmatrix} B_{11} & B_{12} & \cdots & B_{1n} \\ B_{21} & B_{22} & \cdots & B_{2n} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ B_{m1} & B_{m2} & \cdots & B_{mn} \end{pmatrix}$$

En las imágenes RGB, con profundidad de 8 bit por cada capa, el valor 0 significa sin saturación de color y el valor 255 significa la máxima saturación de dicho color.

2.4.1 Filtrado de imágenes

Uno de los métodos tradicionalmente usado para el filtraje de imágenes es la llamada matriz de convolución. El método consiste en que a cada pixel y sus circundantes, se les multiplica por otros valores de una matriz llamada kernel, generando así un nuevo valor para dicho pixel.

A continuación un ejemplo de lo mencionado anteriormente:

$x_{i-2,j-2}$	$x_{i-1,j-2}$	$x_{i,j-2}$	$x_{i+1,j-2}$	$x_{i+2,j-2}$
$x_{i-2,j-1}$	$x_{i-1,j-1}$	$x_{i,j-1}$	$x_{i+1,j-1}$	$x_{i+2,j-1}$
$x_{i-2,j}$	$x_{i-1,j}$	$x_{i,j}$	$x_{i+1,j}$	$x_{i+2,j}$
$x_{i-2,j+1}$	$x_{i-1,j+1}$	$x_{i,j+1}$	$x_{i+1,j+1}$	$x_{i+2,j+1}$
$x_{i-2,j+2}$	$x_{i-1,j+2}$	$x_{i,j+2}$	$x_{i+1,j+2}$	$x_{i+2,j+2}$

Figura 2.2: Imagen original a filtrar.

	0	1	0	
	0	0	0	
	0	0	0	

Figura 2.3: *Kernel.*

		$x_{i,j-1}$		

Figura 2.4: *Nuevo valor del pixel.*

En la figura 2.2 se observa la matriz de una imagen, al centro el pixel $x_{i,j}$, en verde se observan sus primeros 8 pixeles vecinos, muchas operaciones o transformaciones consideran solo estos pixeles, pero se pueden considerar más.

Los valores de la matriz verde de la figura 2.2 se multiplican uno a uno por los valores del kernel mostrado en la figura 2.3, asignando así un nuevo valor al pixel $x_{i,j}$:

$$\begin{aligned} & (x_{i-1,j-1})(0) + (x_{i,j-1})(1) + (x_{i+1,j-1})(0) + (x_{i-1,j})(0) + (x_{i,j})(0) + (x_{i+1,j})(0) \\ & + (x_{i-1,j+1})(0) + (x_{i,j+1})(0) + (x_{i+1,j+1})(0) = x_{i,j-1} \end{aligned}$$

Como resultado de la multiplicación se observa que los pixeles se desplazan un espacio hacia abajo, esto se ejemplifica en la figura 2.4. Los efectos que se pueden conseguir son muy variados, ya que la forma de un kernel puede variar bastante, lo que permite obtener diversos ajustes.

Matemáticamente, la convolución de matrices se puede expresar de la siguiente forma:

$$A \otimes B = a_{ij}b_{ij} = z, \quad | \quad z \in \mathbb{R}$$

Bien sean dos matrices A y B con elementos a_{ij} y b_{ij} respectivamente.

3. Metodología

3.1 Material

Los matraces utilizados para los experimentos fueron matraces Erlenmeyer de 250 ml con las siguientes configuraciones: matraz liso, matraz bafleado y matraz con resorte de acero inoxidable de 30 cm de longitud con un diámetro de 1.3 cm [Gamboa et al, 2011]. Se recortaron las partes superiores de los matraces para permitir la iluminación completa del fondo.



Figura 3.1: Configuraciones matraz con resorte y matraz bafleado.

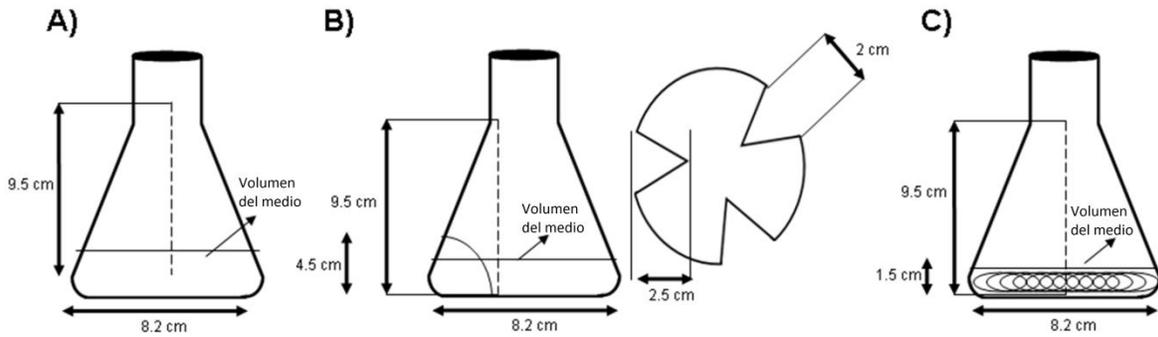


Figura 3.2: Dimensiones y configuraciones de los matraces. Liso, bafileado y con resorte.

Para la producción de cultivos es necesario utilizar un medio con propiedades específicas, en este caso, se trabajó con el Medio de Luria-Bertani adicionado con 34 % en peso volumen de sacarosa [Gamboa et al, 2011]. La densidad ($\rho = 1300 \text{ kg m}^{-3}$) se midió por medio de desplazamiento de volumen en una balanza analítica. La viscosidad ($\eta = 3.5 \text{ m Pa s}$) se determinó en un reómetro de esfuerzo controlado modelo MCR 101 de AntonPaar, con la geometría de platos paralelos de 50 mm. La tensión superficial del fluido ($\sigma = 62 \text{ mN m}^{-1}$) se obtuvo con un plato de Wilhelmy. Estas mediciones se evaluaron a 23°C .

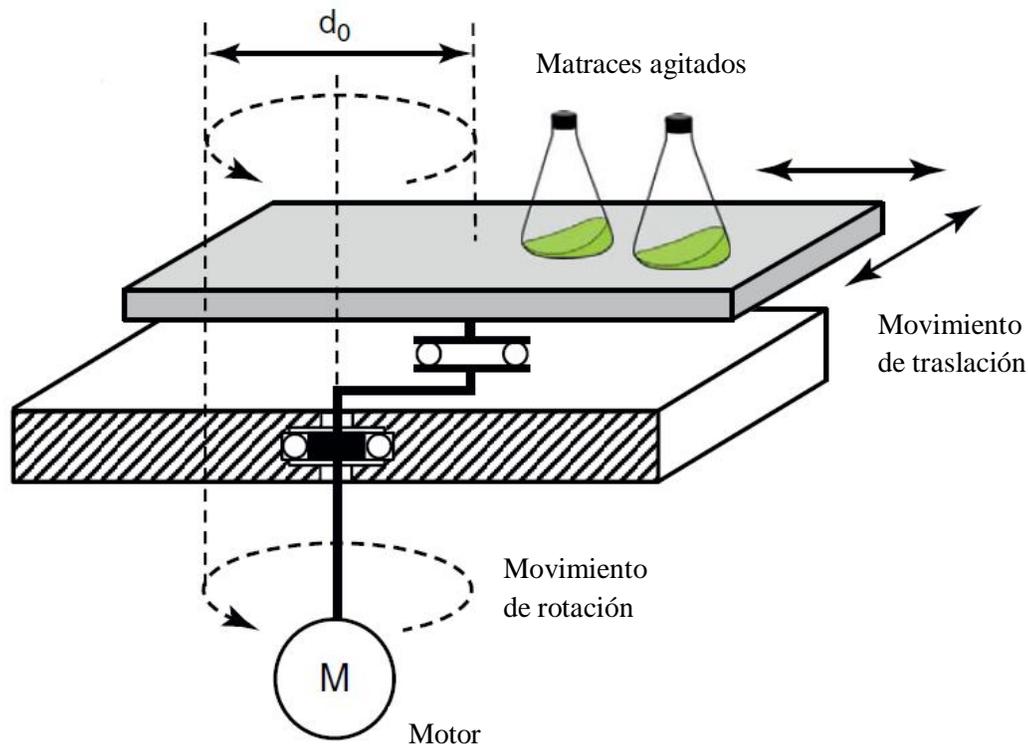


Figura 3.3: *Diagrama de una agitadora orbital que muestra los movimientos de rotación y traslación.* [Klockner, Büchs, 2012]

En la figura 3.3 se presenta de manera esquemática, el arreglo de una agitadora orbital, su funcionamiento se basa en acoplar un motor al soporte de los matraces, por medio de un brazo excéntrico. De esta manera, el movimiento de los matraces combina traslación con rotación generando agitación dentro de los matraces. Se cuenta con la versatilidad de montar varios matraces en la plataforma superior, característica que permite probar diferentes condiciones en cada matraz, asegurando que la agitación se lleve a cabo de manera homogénea, siempre y cuando se conserven las propiedades del fluido. Para los experimentos se utilizó una agitadora orbital modelo DS-500 de la marca VWR, con un mecanismo contrabalanceado con una excentricidad de 19 mm (movimiento de traslación) y velocidad rotacional variable entre 25 y 500 rpm.

3.2 Arreglo experimental



Figura 3.4: *Imagen que muestra el montaje del matraz y el espejo sobre la maquina agitadora.*

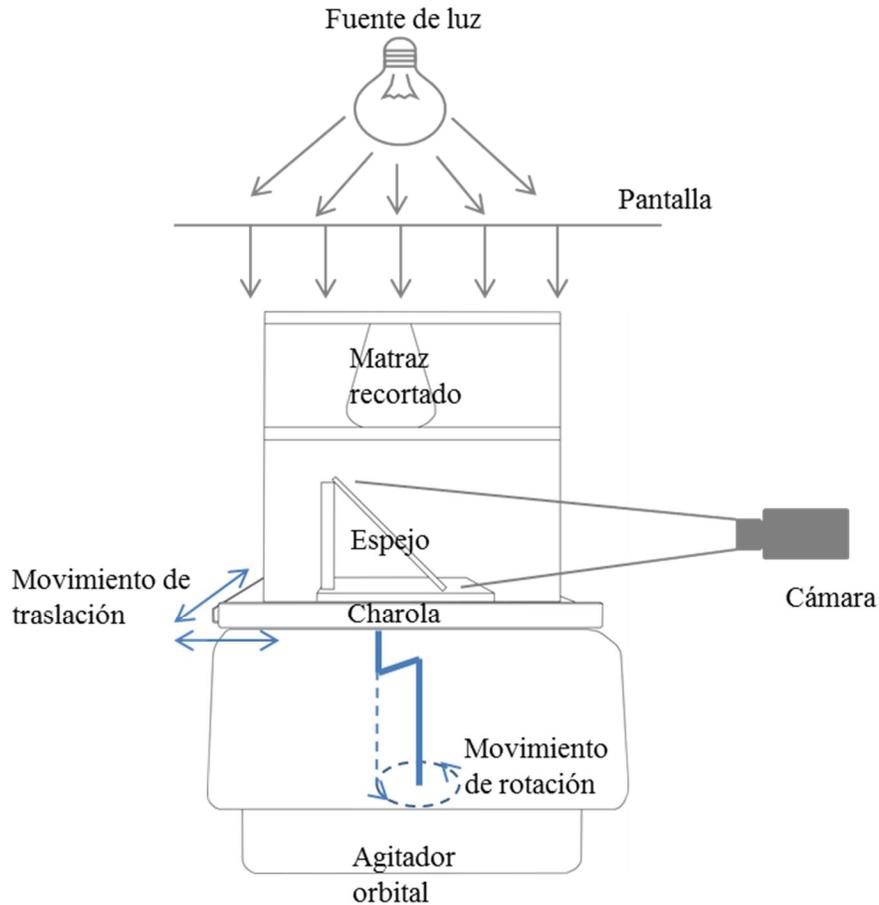


Figura 3.5: Diagrama que muestra de frente el montaje del matraz sobre la máquina agitadora.

En la figura 3.5 se muestra el esquema del arreglo experimental utilizado para la adquisición de imágenes. Debido a la combinación de movimientos de traslación y rotación en el plano horizontal y a que se utiliza un volumen pequeño de fluido, el flujo principal en los matraces se genera, justamente en esta dirección. Para permitir la visualización del flujo se fabricó una estructura de acrílico para colocar y fijar los matraces, la estructura se montó sobre la base del mezclador orbital y se colocó un espejo en un ángulo de 45° para reflejar la imagen del fondo del matraz hacia la cámara de alta velocidad. En la parte superior de la estructura se colocó la fuente de luz y una pantalla difusora para homogenizar la luz sobre el experimento.

3.3Diseño experimental

La caracterización hidrodinámica llevada a cabo en esta investigación consistió de dos partes, una caracterización morfológica (inspección visual), con la cual se tiene una descripción cualitativa de lo que sucede en el interior de los matraces y un análisis de imágenes para la cuantificación del tamaño de burbuja a diferentes velocidades de agitación. El volumen de líquido en los matraces para todos los experimentos corresponde a 50 ml, el tirante de líquido con este volumen para el matraz bafleado resulto de 18 mm y para el matraz con resorte de 17 mm.

En la tabla 3.1 se muestran las velocidades de agitación a las que se grabaron las imágenes con las tres configuraciones. Los videos se adquirieron a 100 cuadros por segundo, las imágenes se obtuvieron con una resolución de 512×512 pixeles, por medio de una cámara de alta velocidad MotionPro X4 (Redlake, Inc) y un lente tipo Nikon de 50 mm. El área de medición típica es de 141550 pixeles aproximadamente.

Velocidad [rpm]	Matraz liso	Matraz con resorte	Matraz bafleado
100	✓	✓	✓
110		✓	✓
120		✓	✓
130		✓	✓
140		✓	✓
150	✓	✓	✓
160		✓	✓
170		✓	✓
180		✓	✓
190		✓	✓
200	✓	✓	✓
210		✓	✓
220		✓	✓
230		✓	✓
240		✓	✓
250	✓	✓	✓

Tabla 3.1: Grabaciones realizadas para los diferentes experimentos.

En el caso de los matraces bafleados, se determinó el número de burbujas para las velocidades mostradas en la tabla, cabe mencionar que por debajo de las 100 rpm no se observó incorporación de aire.

3.4 Determinación de distribución y diámetros de burbujas

Parte central de esta investigación ha sido determinar la distribución de tamaños de burbuja, como ya se explicó antes, una forma de incrementar la transferencia de oxígeno es a través de la incorporación de burbujas, el tamaño de las burbujas juega un papel crítico:

$$V = \frac{4}{3}\pi r^3$$

$$A = 4\pi r^2$$

Donde

V : volumen de una esfera

A : área de una esfera

r : radio de una esfera

El cociente del área entre volumen se obtiene con:

$$\frac{A}{V} = \frac{3}{r}$$

Lo que implica que si el radio tiende a cero el resultado del cociente tiende a infinito, en otras palabras, si disminuimos el radio de una burbuja, aumentamos el área por unidad de volumen, incrementando el área de transferencia.

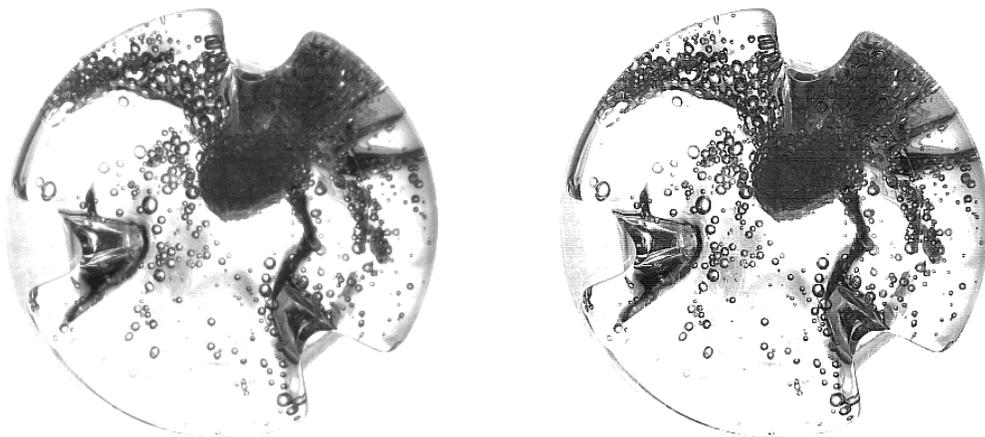
En conclusión a lo anterior, es deseable generar burbujas pequeñas, para lo cual es necesario observar las distribuciones de tamaño de burbujas y si las burbujas pequeñas son las predominantes en las distribuciones, se espera que la transferencia de oxígeno sea

mejor, por tanto, se busca saber cómo son las distribuciones de tamaño en función de las velocidades de agitación y geometría de los matraces.

Para determinar dichas distribuciones se usaron las grabaciones antes descritas, las cuales fueron realizadas para diferentes velocidades de agitación en las tres diferentes geometrías. Posteriormente, las imágenes fueron analizadas con ayuda del software *ImageJ*.

El procedimiento de análisis de imágenes consiste en identificar las burbujas en una sucesión de fotos, determinar su diámetro y generar las distribuciones correspondientes. Como se puede observar en la figura 3.4, resulta imposible contar exactamente el número de burbujas, ya que se forman cúmulos de ellas. En adición, el programa no alcanza a detectar otras, por lo que en resumen, lo que se hizo fue detectar la mayor cantidad posible de burbujas en un gran número de imágenes diferentes, obteniendo así una muestra representativa. A continuación se describe con mayor detalle el proceso.

- a) Se extrajo una secuencia de 50 imágenes en *ImageJ* con la siguiente instrucción:
File ▷ Import ▷ ImageSequence
- b) Se aplicó el filtro “Sharpen” a toda la secuencia de imágenes, lo que incrementa el contraste de las imágenes, además, se acentúan los bordes de las burbujas para poder medirlas: Process ▷ Sharpen



a)

b)

Figura 3.4: La imagen a) imagen original, b) con el filtro “sharpen”. Se observan los bordes de las burbujas más definidos.

-
- c) El siguiente fue aplicar la operación “FindMaxima” a cada imagen. Esto implica programar una subrutina que permita aplicar esta operación a cada una de las imágenes de la secuencia:

```
input = getImageID();
n = nSlices();
for (i=1; i<=n; i++)
{ selectImage(input); setSlice(i); run("Find Maxima...", "noise=50
output=[Segmented Particles]"); if (i==1) { output = getImageID(); }
else { run("Select All"); run("Copy"); close(); selectImage(output);
print("addslice"); run("Add Slice"); run("Paste"); }}
```

El resultado es una secuencia de imágenes donde se detectan los bordes de las todas las burbujas contenidas en las imágenes.

- d) Después se establecieron los parámetros que se buscan evaluar, con la opción “Set Measurements”: *Analyze* ▷ *SetMeasurements*. En este trabajo se seleccionaron: Área y Fitellipse (aproximar a una elipse), proporcionando los valores de los ejes menor y mayor de la burbuja.
- e) Posteriormente se aplicó la opción “AnalyzeParticles” a la secuencia, la cual detecta los contornos de las burbujas en cada imagen, las enumera definiendo un intervalo de área, y determina el perímetro, la circularidad, los ejes mayor y menor. Se genera una tabla de datos con los cuales se grafican las distribuciones de tamaño de burbuja: *Analyze* ▷ *AnalyzeParticles*.

La opción “Show” muestra las burbujas evaluadas. “Clear results”, borra los datos almacenados de secuencias anteriores y “Excludeonedges”, no considera las estructuras de las orillas. La circularidad se define de la siguiente manera:

$$C = 4\pi \frac{\text{Área}}{(\text{Perímetro})^2} = 4\pi \frac{\pi r^2}{(2\pi r)^2} = 1$$

Si la circularidad es 1, se trata de un círculo perfecto.

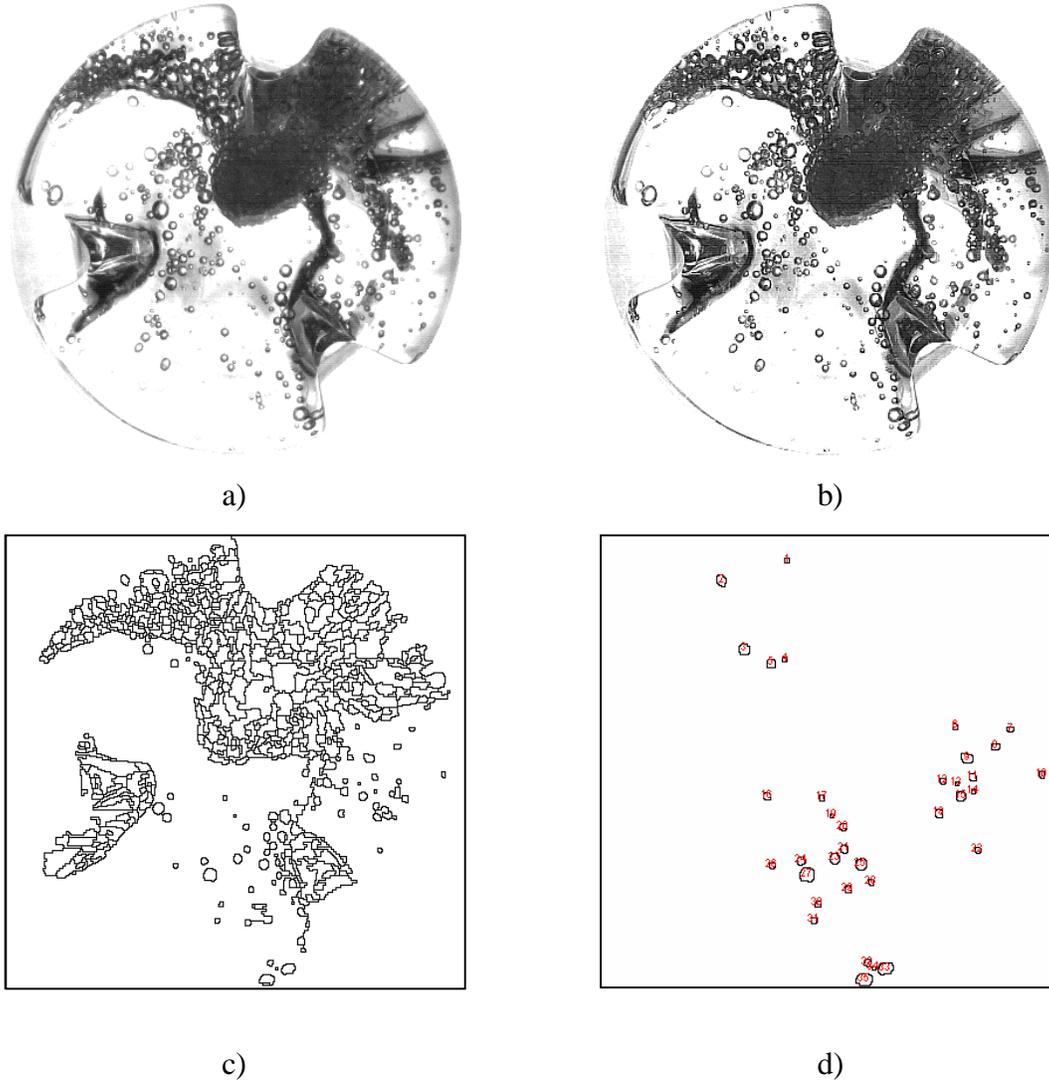


Figura 3.5: *Imágenes del proceso de identificación de burbujas. a) original b) resaltan los bordes de las burbujas, c) bordes definidos y d) estructuras evaluadas.*

En la figura 3.5 se muestra el procedimiento de análisis de imágenes y los resultados filtrados, donde se aíslan las burbujas que cumplen con los valores de circularidad seleccionados. En la figura 3.6 se presenta el despliegue típico de resultados al aplicar `AnalyzeParticles`, puede observarse que las burbujas fueron detectadas, el programa las enumera y determina su perímetro.

Como se observa en el inciso d) de la figura 3.5, es importante aclarar que las burbujas que se miden a través de este procedimiento son las que se encuentran mejor aisladas, lo que regularmente ocurre en las zonas más calmas, esto afecta directamente el resultado de la medición, ya que no se sabe cuánto miden las burbujas que se encuentran en los cúmulos y crestas, y si se consideraran dichas burbujas, seguramente el resultado sería diferente, sin embargo el método utilizado no permite considerar esas burbujas.

Label	Area	X	Y	XM	YM	Perim.	BX	BY	Width	Height	Major	Minor	Angle
1 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	1.270	37.486	5.827	37.486	5.815	3.937	36.847	5.325	1.278	1.065	1.393	1.161	0
2 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	0.408	42.704	10.969	42.704	10.969	2.057	42.384	10.649	0.639	0.639	0.721	0.721	0
3 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	0.998	26.749	13.089	26.765	13.099	3.511	26.197	12.566	1.065	1.065	1.279	0.993	130.583
4 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	1.043	41.945	15.525	41.943	15.502	3.636	41.532	14.909	0.852	1.278	1.413	0.940	83.839
5 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	0.726	78.166	33.013	78.166	33.013	2.909	77.740	32.587	0.852	0.852	0.961	0.961	0
6 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	0.862	83.900	35.698	83.896	35.718	3.210	83.491	35.143	0.852	1.065	1.182	0.928	102.821
7 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	0.998	80.848	43.788	80.864	43.804	3.386	80.296	43.236	1.065	1.065	1.183	1.074	134.999
8 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	0.907	61.127	49.306	61.127	49.306	3.335	60.701	48.774	0.852	1.065	1.202	0.961	90
9 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	0.726	31.735	57.506	31.735	57.506	2.909	31.309	57.081	0.852	0.852	0.961	0.961	0
10 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	2.041	30.990	58.891	30.990	58.891	4.966	30.244	58.145	1.491	1.491	1.612	1.612	0
11 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	1.452	30.457	65.600	30.457	65.600	4.114	29.818	64.961	1.278	1.278	1.360	1.360	0
12 medio_baffles_150_001(1) Segmented:1	0.680	23.961	66.558	23.961	66.558	2.909	23.642	66.026	0.639	1.065	1.202	0.721	90
13 medio_baffles_150_001(1) Segmented:2	1.588	58.769	62.177	58.763	62.171	4.488	58.145	61.553	1.278	1.278	1.468	1.377	45.003
14 medio_baffles_150_001(1) Segmented:2	1.270	26.745	69.365	26.760	69.419	4.114	26.197	68.582	1.065	1.491	1.547	1.045	87.422
15 medio_baffles_150_001(1) Segmented:2	1.633	29.102	72.416	29.118	72.416	4.540	28.327	71.777	1.491	1.278	1.621	1.283	29.762
16 medio_baffles_150_001(1) Segmented:2	1.996	35.225	79.260	35.214	79.278	5.017	34.504	78.379	1.491	1.704	1.782	1.426	69.834
17 medio_baffles_150_001(1) Segmented:3	0.726	32.161	21.725	32.161	21.725	2.909	31.735	21.299	0.852	0.852	0.961	0.961	0
18 medio_baffles_150_001(1) Segmented:3	4.400	29.760	29.439	29.771	29.420	7.625	28.540	28.327	2.343	2.343	2.384	2.350	58.968

Figura 3.6: Tablas de datos que arroja ImageJ.

El proceso se repite con cada imagen y se genera una base de datos para construir las distribuciones de tamaño de burbuja. Se ordenan los datos de menor a mayor área. Se

calcula el diámetro equivalente, de acuerdo con $d = \sqrt{\frac{4A}{\pi}}$.

Con la herramienta “análisis de datos”, se construyen las distribuciones (Datos ->Análisis de datos ->Histograma). Para el Rango de Entrada, se seleccionan todos los diámetros y para las marcas de clase se utilizan los límites superior e inferior de cada distribución.

Clase [mm]	Frecuencia
0.6	0
0.9	246
1.2	292
1.5	93
1.8	17
2.1	11
2.4	4
2.7	0
3	0
3.3	0
y mayor...	0

Tabla 3.2: Datos obtenidos con Excel para realizar las distribuciones.

Se calcula la frecuencia, se normalizan los datos y se grafican las frecuencias relativas comparando las distintas velocidades:

L_i [mm]	L_s [mm]	xi [mm]	f	f_a	fr
0.3	0.6	0.45	0	921	0
0.6	0.9	0.75	141		0.153
0.9	1.2	1.05	300		0.326
1.2	1.5	1.35	237		0.257
1.5	1.8	1.65	137		0.149
1.8	2.1	1.95	64		0.069
2.1	2.4	2.25	22		0.024
2.4	2.7	2.55	17		0.018
2.7	3.0	2.85	2		0.002
3.0	3.3	3.15	1		0.001
3.300	3.600	3.45	0		0.000

Tabla 3.3: Tabla con los datos para graficar distribuciones normalizadas.

La primera columna es el límite inferior de cada intervalo, la segunda columna es el límite superior de cada intervalo, la siguiente columna es el punto medio de cada marca de clase y por definición se calcula con la ecuación $xi = \frac{L_s - L_i}{2}$ y es utilizada como valor en el eje de las abscisas, la cuarta columna es la frecuencia de cada fenómeno, f_a es la frecuencia absoluta $\sum_{i=1}^{i=n} f_i = f_a$; fr es la frecuencia relativa y se define como el cociente de la frecuencia entre la frecuencia absoluta.

El resultado del proceso es una gráfica como la de la figura 3.7. También se hace la estadística descriptiva que incluye el cálculo del diámetro promedio aritmético, diámetro Sauter y desviación estándar para cada velocidad de agitación.

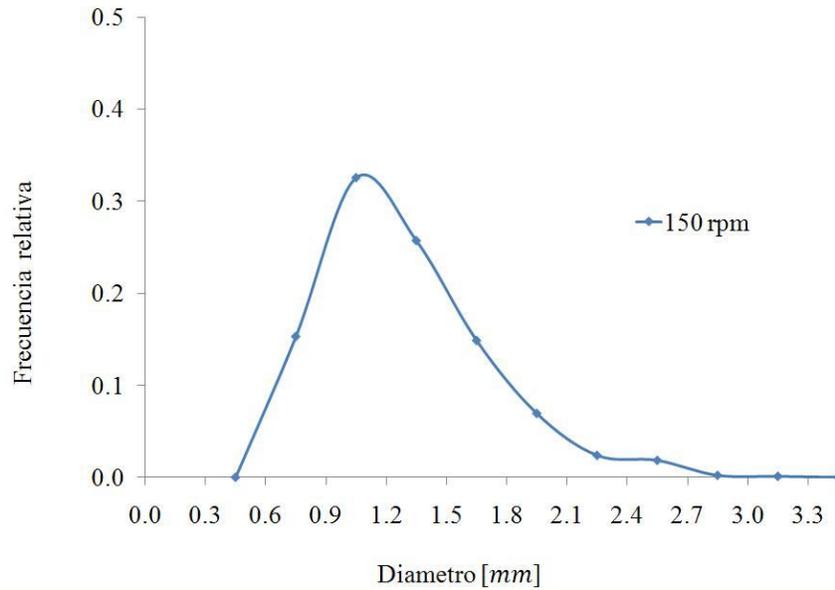


Figura 3.7: Gráfica de una distribución normalizada correspondiente a la velocidad de 150 rpm, la distribución fue suavizada con Excel.

L_i [mm]	L_s [mm]	x_i [mm]	f_i	$f_i \cdot x_i$
0.3	0.6	0.45	0	0.000
0.6	0.9	0.75	141	105.750
0.9	1.2	1.05	300	315.000
1.2	1.5	1.35	237	319.950
1.5	1.8	1.65	137	226.050
1.8	2.1	1.95	64	124.800
2.1	2.4	2.25	22	49.500
2.4	2.7	2.55	17	43.350
2.7	3.0	2.85	2	5.700
3.0	3.3	3.15	1	3.150
3.3	3.6	3.45	0	0.000
Total			921	1193.250

Tabla 3.4: Datos para calcular el diámetro promedio.

Para determinar el diámetro promedio se usó la siguiente ecuación de la media para datos agrupados $\bar{D} = \frac{\sum_{i=1}^n f_i \cdot x_i}{n}$ y el procedimiento que se describe a continuación:

$$\bar{D} = \frac{1193.250}{921} = 1.296 \text{ [mm]}$$

Para calcular la desviación estándar se usó la ecuación para datos agrupados:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{D})^2 f_i}{n - 1}}$$

L_i [mm]	L_s [mm]	x_i [mm]	f_i	$(x_i - \bar{D})^2 f_i$
0.3	0.6	0.45	0	0.000
0.6	0.9	0.75	141	41.973
0.9	1.2	1.05	300	18.096
1.2	1.5	1.35	237	0.701
1.5	1.8	1.65	137	17.207
1.8	2.1	1.95	64	27.407
2.1	2.4	2.25	22	20.039
2.4	2.7	2.55	17	26.750
2.7	3.0	2.85	2	4.832
3.0	3.3	3.15	1	3.439
3.3	3.6	3.45	0	0.000
		Total	921	160.445

Tabla 3.5: Datos para calcular la desviación estándar.

$$\sigma = \sqrt{\frac{160.445}{921 - 1}} = 0.418 \text{ [mm]}$$

El diámetro Sauter también fue calculado, esto por medio de la expresión:

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^k f_i x_i^3}{\sum_{i=1}^k f_i x_i^2}$$

$L_i[mm]$	$L_s[mm]$	$x_i[mm]$	f_i	$f_i x_i^3$	$f_i x_i^2$
0.3	0.6	0.45	0	0.000	0.000
0.6	0.9	0.75	141	59.484	79.313
0.9	1.2	1.05	300	347.288	330.750
1.2	1.5	1.35	237	583.109	431.933
1.5	1.8	1.65	137	615.421	372.983
1.8	2.1	1.95	64	474.552	243.360
2.1	2.4	2.25	22	250.594	111.375
2.4	2.7	2.55	17	281.883	110.543
2.7	3.0	2.85	2	46.298	16.245
3.0	3.3	3.15	1	31.256	9.923
3.3	3.6	3.45	0	0.000	0.000
			Total	2689.885	1706.423

Tabla 3.6: Datos necesarios para calcular el diámetro Sauter.

$$d_{32} = \frac{2689.885}{1706.43} = 1.573 [mm]$$

4. Resultados

En este capítulo se presentan los resultados en cinco secciones, la primera relativa al flujo del líquido dentro de los matraces, la segunda es el estudio del tamaño de burbujas incorporadas en matraces con baffles, la tercera trata del tamaño mínimo de burbuja y su relación con la presión de Laplace, la cuarta presenta los resultados de la deformación de burbujas como función de la velocidad de agitación y en la quinta sección, se presentan los resultados de la dispersión de biomasa.

4.1 Caracterización morfológica

En esta sección se describe, de manera cualitativa, la forma del flujo dentro de los matraces a partir de una vista horizontal, desde una toma por la base.

4.1.1 Matraz liso

Para el matraz liso se realizaron grabaciones a velocidades de agitación entre 100y 250 rpm con 50 ml del medio de cultivo mencionado en la metodología.

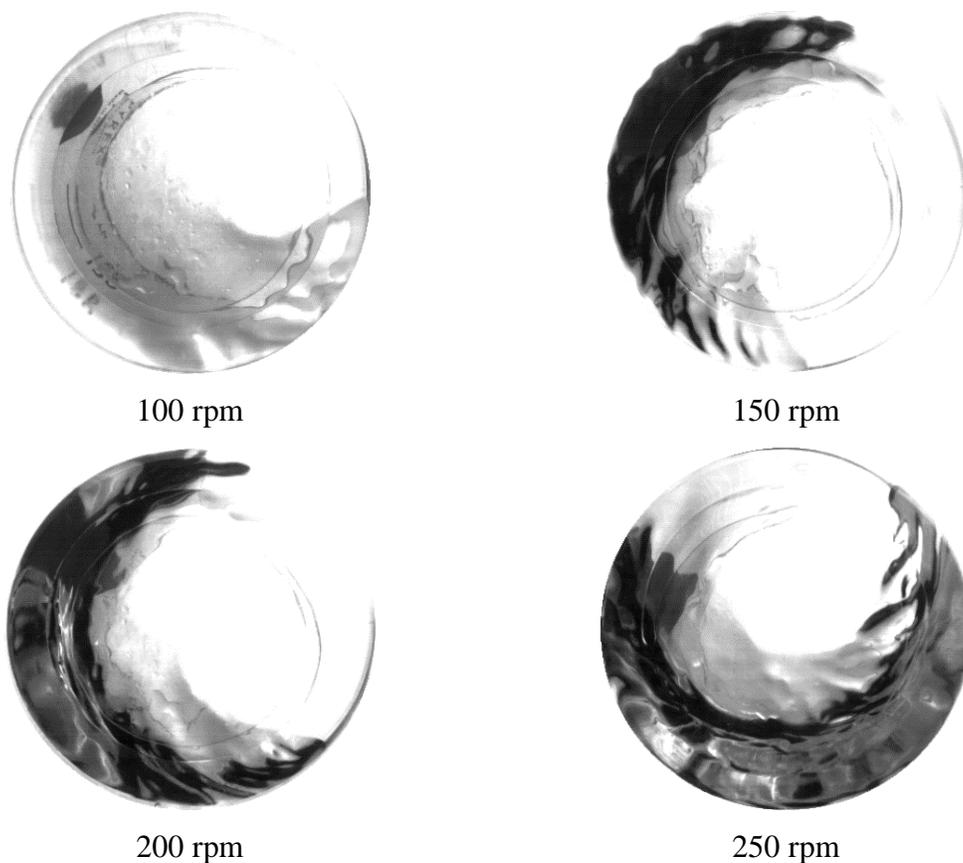


Figura 4.1.: *Vista inferior del matraz liso agitado a las velocidades indicadas en la imagen.*

En la figura 4.1 se presentan las fotografías para las velocidades de 100, 150, 200 y 250 rpm. Las zonas oscuras resaltan la formación de una cresta en el flujo del líquido. A 100 rpm el flujo presenta pequeñas perturbaciones, mientras que para 250 rpm el fluido se concentra en un lado del matraz y se presenta la formación de ondas en la superficie. En todo el rango de velocidades estudiado, no se observa incorporación de aire para esta geometría.

Este comportamiento ha sido observado anteriormente en matraces y se explica en base al acoplamiento del frente de flujo con la velocidad de la pared del matraz [Büchs *et al.*, 2001*b*]. Cuando el fluido sigue el movimiento del matraz se dice que el flujo está en “fase” y en caso contrario se dice que el flujo se encuentra “fuera de fase”, lo que implica que el líquido no se encuentra sincronizado con el movimiento de agitación [Büchs *et al.*, 2007].

Büchs et al, desarrollaron un número adimensional que es conocido como Número de Fase, Ph ,

y que está definido como:

$$Ph = \frac{d_0}{d} \left(1 + 3 \text{Log} \left[\frac{\rho(2\pi n) d^2}{\mu} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V_L^{1/3}}{d} \right)^2} \right) \right] \right) > 1.26$$

Dónde:

- d Diámetro interior máximo del matraz [m]
- d_0 Diámetro de agitado [m]
- n Frecuencia de agitado [s^{-1}]
- V_L Volumen de líquido en el interior del matraz [m^3]
- ρ Densidad [$kg\ m^{-3}$]
- η Viscosidad dinámica [$m\ Pa\ s$]

El Reynolds se para el matraz se define de la siguiente manera:

$$Re = \frac{\rho n d}{\mu}$$

En base a este criterio se dice que el cambio de “fase” a “fuera de fase” se presenta para valores del número de fase mayores a 1.26.

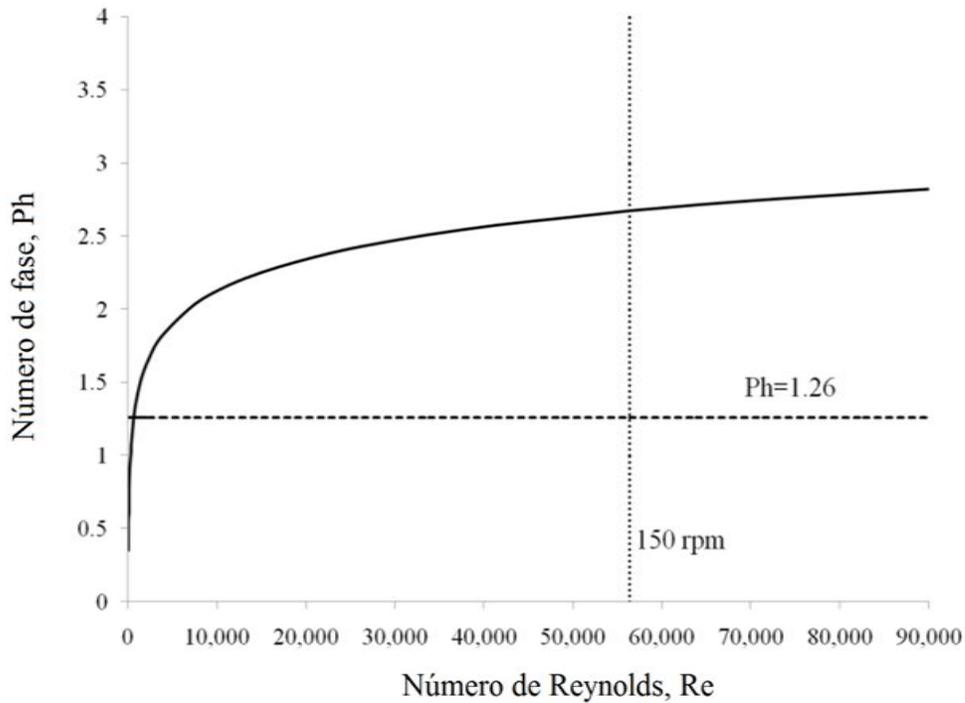


Figura 4.2: *Número de fase en función del número de Reynolds para matraz liso. Se utilizaron las propiedades del medio para este análisis.*

Nuestras mediciones se realizaron a números de Reynolds por arriba de 5000, por lo que de acuerdo al criterio del Número de Fase, el sistema se encuentra en la zona “fuera de fase”, ya que el Ph resulta mayor a 1.26. Para cuantificar este efecto, se midió la posición del frente de flujo con referencia a las paredes del matraz. El matraz se mueve como un cuerpo rígido, mientras que en teoría, si se cumple la condición de adherencia el fluido cercano a la pared debería moverse junto con el matraz, sin embargo, esto no se observa experimentalmente.

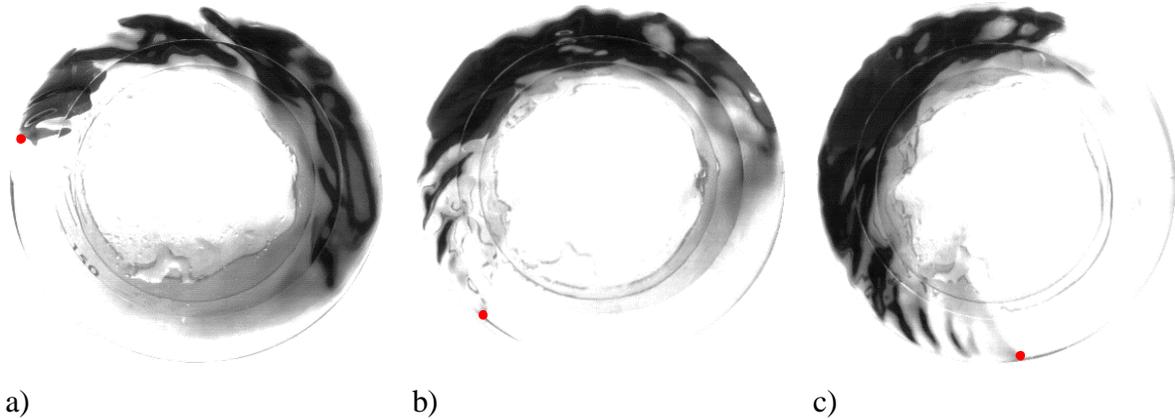


Figura 4.3: En a), b) y c) se muestra el frente de flujo con un punto rojo en diferentes momentos de la misma vuelta.

En la figura 4.3 puede observarse como avanza el frente de flujo, se usó un punto rojo para denotar la posición de dicho frente, midiendo el ángulo de la línea que se forma del centro del matraz al punto rojo, para cada imagen, es posible construir la gráfica de la figura 4.4.

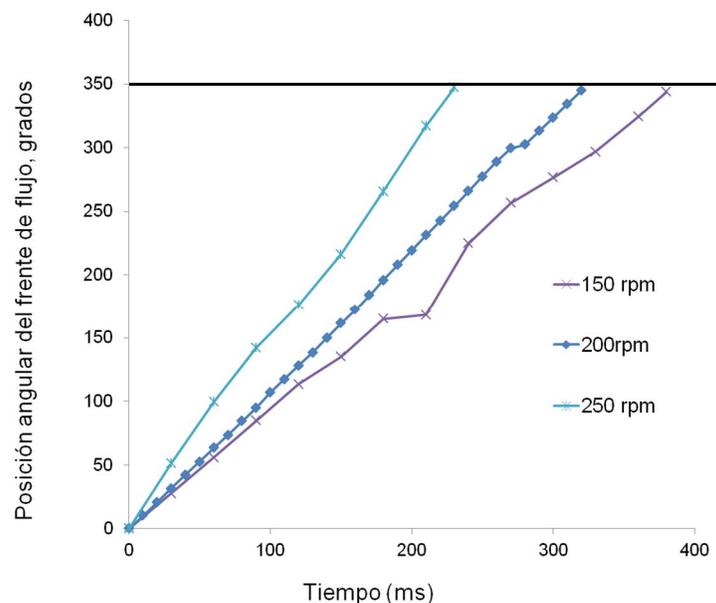


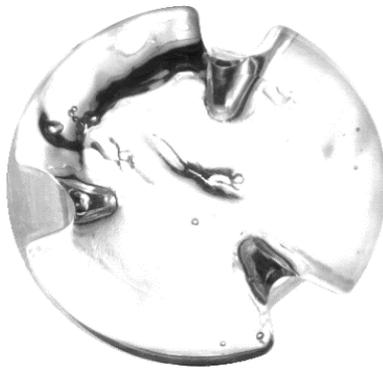
Figura 4.4: Posición angular del frente de flujo para 150, 200 y 250 rpm

En la figura 4.4 se presenta la posición en grado del frente de flujo, para las velocidades de 150, 200 y 250 rpm. La pendiente de las curvas está relacionada directamente con la

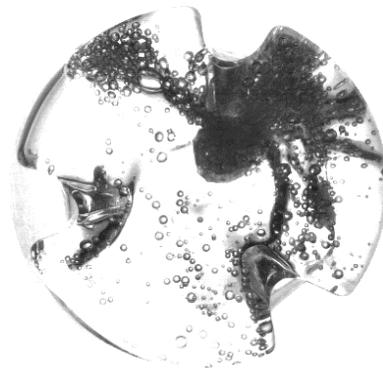
duración de un ciclo y la posición angular del matraz y al final del ciclo es de 360 grados. Como se observa, la posición del frente de flujo se encuentra “fuera de fase”, dado que el fluido se retrasa en relación a la pared del matraz. Es relevante observar que el retraso no se ve significativamente modificado por la velocidad de agitación, lo que corresponde con la forma de la curva observada para el Número de Fase en función del Número de Reynolds.

4.1.2 Matraz bafleado

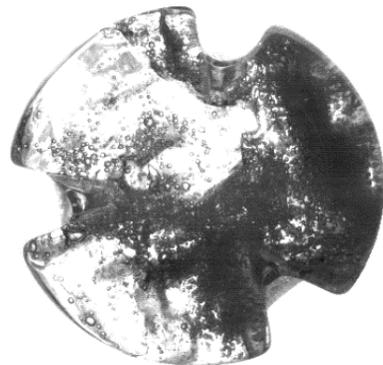
Para el matraz bafleado, en cambio, se realizó un mayor número de grabaciones, la primera grabación se realizó desde 110 RPM, incrementando sucesivamente la velocidad en 10 RPM para las siguientes grabaciones que se realizaron así, hasta la velocidad máxima del equipo de 250 RPM.



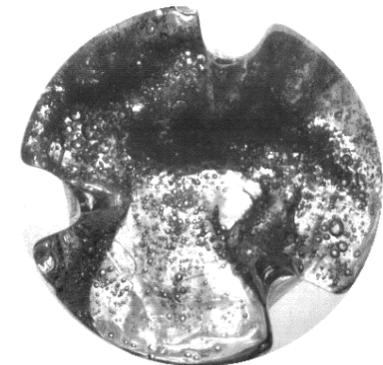
110 rpm



150 rpm



200 rpm



250 rpm

Figura 4.5: *Vista inferior del matraz bafleado a las velocidades de agitación indicadas en la figura.*

Como se mencionó en la metodología, las tomas se realizaron por la parte inferior de los matraces y con luz difusa, por lo que las zonas oscuras representan deformaciones en la superficie, permitiendo observar la forma general del flujo. En la figura 4.5 se presentan las imágenes correspondientes a diferentes velocidades de agitación. Para 110 rpm, se observa que la interfaz se deforma y que el frente de flujo interactúa con el baffle, sin embargo, la incorporación de burbujas es muy baja e incluso inexistente a velocidades menores. La incorporación de aire es clara para el caso de 150 rpm, donde se empieza a incorporar un mayor número de burbujas, proceso que aumenta con el incremento en la velocidad de agitación. De manera cualitativa se observó que cuando el frente de flujo choca con los baffles, se incorporan burbujas grandes que son arrastradas y elongadas para dar origen a las burbujas de menor tamaño.

4.1.3 Matraz con resorte

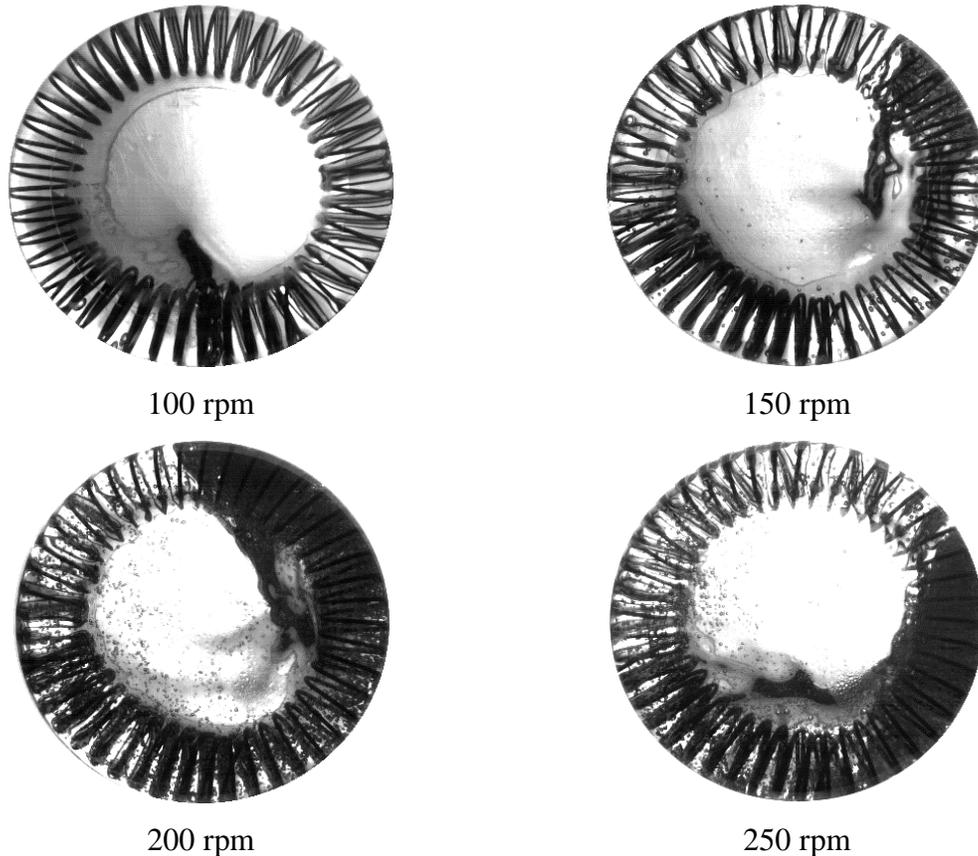


Figura 4.6: Vista inferior del matraz bafleado a las velocidades de agitación indicadas en la figura.

Al igual que en las otras configuraciones, para velocidades de agitación bajas, el líquido se mueve de un lado a otro, sin presentar un flujo en el matraz, hasta que se alcanza una velocidad crítica en la que se forma un frente de flujo, que para el caso de 100 rpm no incorpora aire al sistema. Para la velocidad de 150 rpm el frente de flujo interactúa con el resorte y en parte, se incorpora aire en la zona del resorte, el aire se fragmenta en el resorte y se generan burbujas pequeñas pero de tamaño uniforme. Este comportamiento se repite al incrementarse la velocidad y la cantidad de burbujas en el medio aumenta. Cualitativamente, se observó que las burbujas incorporadas forman un paquete que se queda atrapado en el interior del resorte, lo que puede limitar la transferencia de masa.

Adicionalmente, como se mencionó anteriormente, las burbujas con un diámetro pequeño pueden quedar atrapadas en el fluido y reducir la transferencia efectiva de oxígeno, lo que puede estar relacionado con algunos procesos observados en el cultivo de microorganismos.

4.2 Distribución de tamaños

En el matraz liso no existe incorporación de burbujas, por lo que hablar de distribución de tamaño de burbuja en matraz liso, no tiene sentido. En cuanto al matraz con resorte, resultó que la mayoría de las burbujas viajan formando un gran paquete y unas pocas se quedan atrapadas dentro del resorte. Debido a estas dos características, es imposible determinar las distribuciones de tamaño de burbuja. En primera instancia, debido a las limitaciones del método utilizado, las burbujas que viajan en paquetes no fueron utilizadas para obtener las distribuciones; en segunda instancia, las burbujas que quedan atrapadas en el resorte también son imposibles de utilizar para determinar distribuciones, ya que de igual manera, debido al resorte, es imposible aislar las burbujas con el programa y luego procesarlas para obtener los datos deseados. En vista de lo anterior, las distribuciones fueron limitadas solo a los matraces bafleados. Una vez procesadas las imágenes de los matraces bafleados, la información recolectada se manipuló de la siguiente manera.

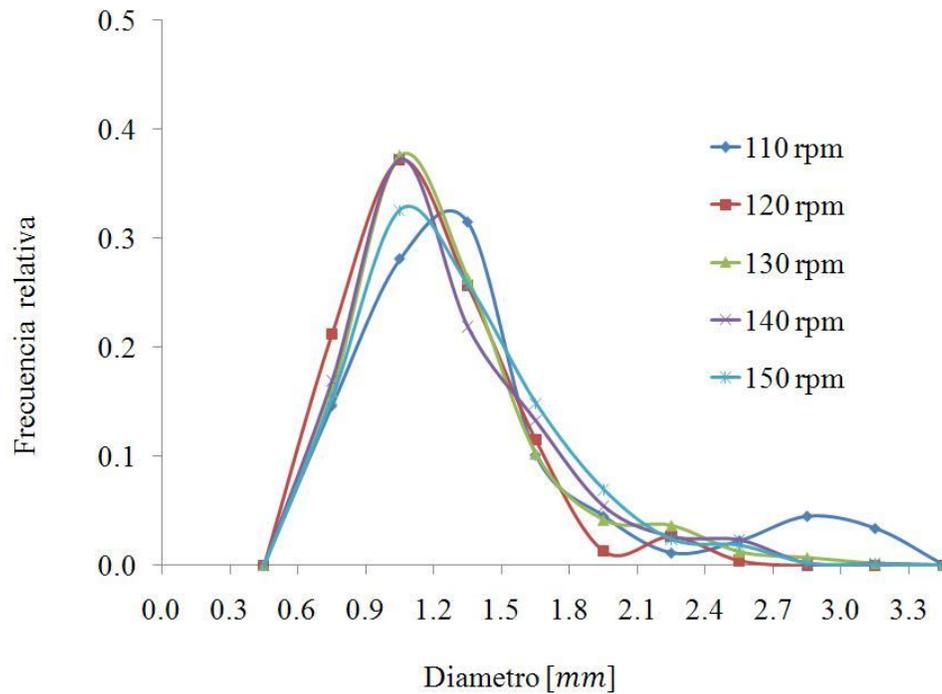


Figura 4.7: Gráfica para la comparación de distribuciones normalizadas de diámetro desde 110 hasta 150 rpm para el matraz bafleado. Las distribuciones fueron suavizadas con Excel.

La gráfica de la figura 4.7 muestra las distribuciones obtenidas para velocidades de agitación desde 110 hasta 150 rpm. Se observa primero, que la distribución de 110 rpm está desplazada a la derecha con respecto a las restantes, lo que indica que el diámetro promedio debe ser mayor, luego se observa, que las distribuciones de 120, 130 y 140 rpm alcanzan una frecuencia relativa más alta y que la de 150, tiene un pico menor y está ensanchada, lo que implica que las tres primeras tienen una moda mayor en el intervalo que va de 0.9 a 1.2. En otras palabras, tienen más burbujas en ese intervalo.

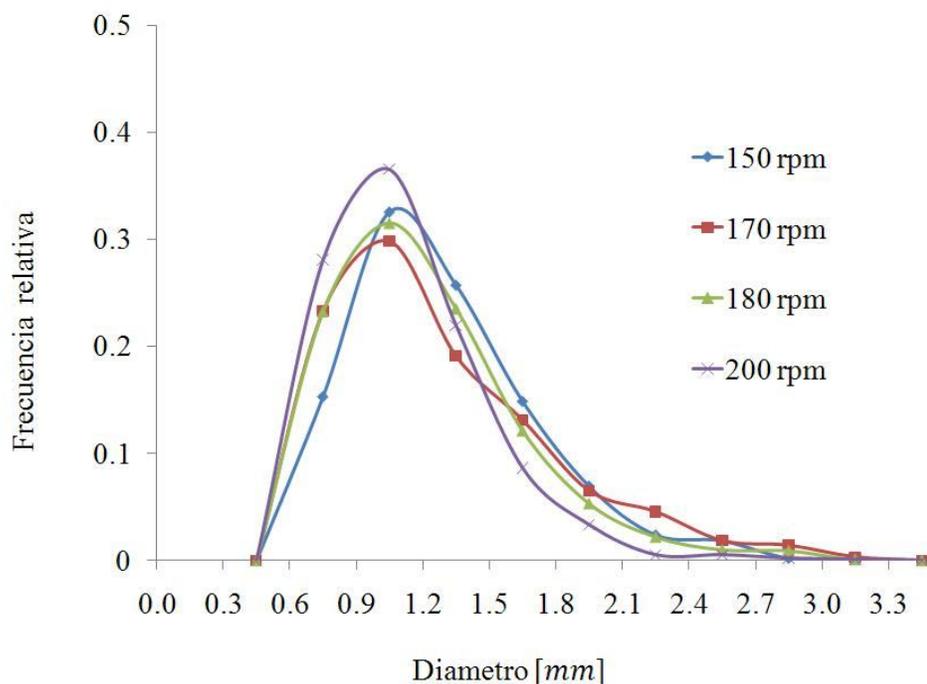


Figura 4.8. Gráfica para la comparación de distribuciones normalizadas de diámetro desde 150 rpm hasta 200 rpm para el matraz bafleado. Las distribuciones fueron suavizadas con Excel.

La gráfica de la figura 4.8 muestra las distribuciones obtenidas desde 150 hasta 200 rpm. Puede observarse que las distribuciones para velocidades mayores a 150 rpm comienzan a desplazarse a la izquierda, lo que indica que el diámetro disminuye al incrementar la velocidad de agitación, también puede observarse que la curva de 200 rpm esta adelgazada con respecto a las demás, lo que indica que el tamaño predominante de las burbujas comienza a concentrarse en un intervalo cada vez menor a medida que se incrementan las velocidades.

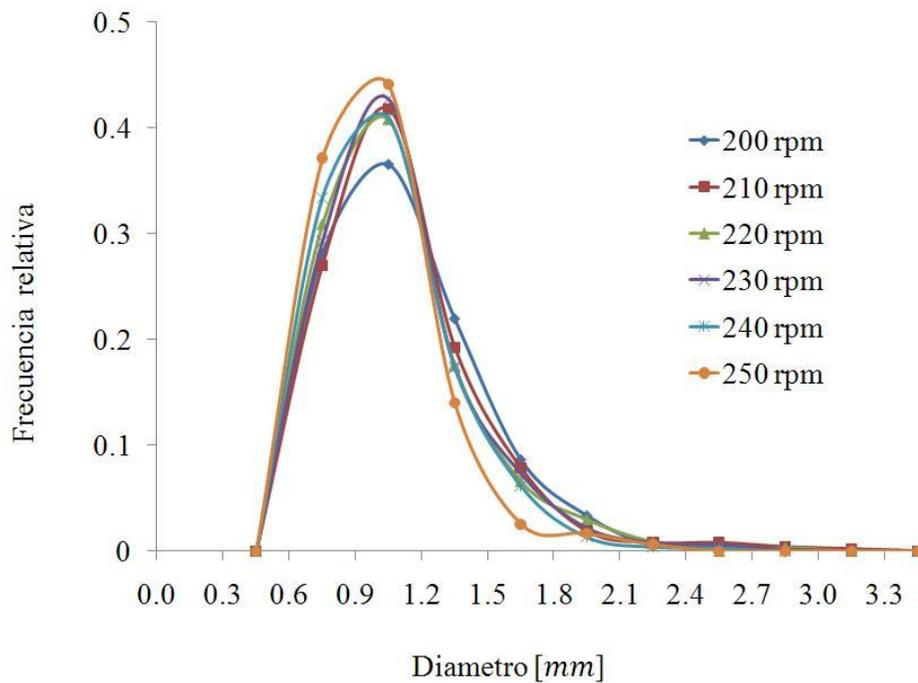


Figura 4.9: Gráfica para la comparación de distribuciones normalizadas de diámetro desde 110 hasta 150 rpm para el matraz bafleado. Las distribuciones fueron suavizadas con Excel.

La gráfica de la figura 4.9 muestra las distribuciones obtenidas desde 200 hasta 250 rpm. Se observa en la gráfica anterior, que para diámetros mayores a aproximadamente 1.1 mm la población disminuye, este comportamiento es más claro en la curva de 250 rpm.

En la figura 4.9 también puede observarse que existe una tendencia de adelgazamiento, pero que muy probablemente, también exista un límite, y que después de cierta velocidad, las distribuciones serán iguales para cualquier otra, porque se habrá llegado al límite del sistema.

La siguiente tabla muestra otros datos estadísticos obtenidos:

Velocidad [rpm]	\bar{D} [mm]	σ [mm]	d_{32} [mm]
110	1.401	0.597	1.963
120	1.183	0.354	1.406
130	1.258	0.419	1.564
140	1.265	0.427	1.573
150	1.296	0.418	1.576
170	1.289	0.498	1.695
180	1.232	0.429	1.553
200	1.133	0.356	1.378
210	1.123	0.361	1.391
220	1.092	0.335	1.320
230	1.096	0.331	1.317
240	1.061	0.303	1.248
250	1.018	0.277	1.184

Tabla 4.1: Datos obtenidos para las velocidades de agitación: diámetro promedio, desviación estándar y diámetro sauter.

Como resultado de la tabla 4.1 pueden graficarse las velocidades de agitación contra diámetros y desviación estándar:

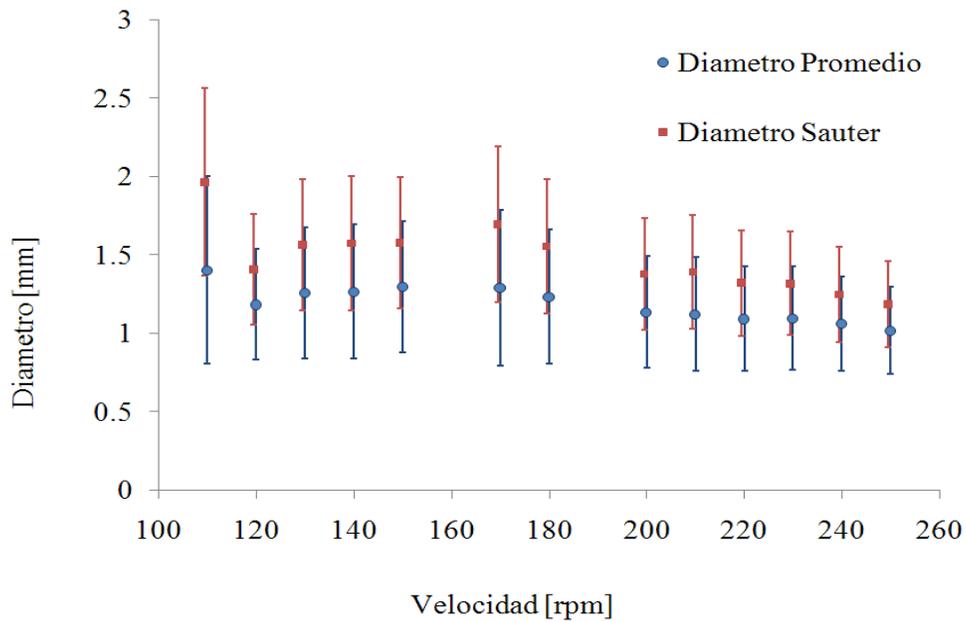


Figura 4.10: Gráfica de velocidad contra diámetro Sauter.

En la figura 4.10 se muestran: el diámetro promedio, el diámetro Sauter y la desviación estándar para las diferentes velocidades de agitación. A 110 rpm se observa el diámetro mayor y la mayor desviación estándar, lo que indica que se requiere mayor agitación para disminuir el tamaño de burbuja. Para las velocidades de agitación entre 120 y 150 rpm, se observa un ligero incremento, tanto en el diámetro promedio como en el Sauter, esto puede estar asociado a la dispersión que se tiene en las mediciones. Después de 150 rpm se tiene una ligera tendencia a disminuir el diámetro, sin embargo, la tendencia general es que el diámetro promedio no depende fuertemente de la velocidad de agitación, lo que concuerda con que se tienen mecanismos de formación de burbujas más relacionados con la configuración de los matraces, que con la velocidad de agitación dentro de un rango.

4.3 Tamaño mínimo de burbuja y presión de Laplace

Como resultado de los datos obtenidos del procesamiento de imágenes, se obtuvo que el radio mínimo a distintas velocidades de agitación es constante y es de aproximadamente 0.36 [mm], sin embargo, debe aclararse que seguramente existen burbujas más pequeñas y que este valor es igual en todas las velocidades de agitación debido al método de medición utilizado.

Es posible determinar la presión que debe aplicarse a una burbuja para lograr que se deforme o fracture, para ello se tomó como referencia la ecuación de Laplace, que se refiere a la presión que se genera en la superficie de la burbuja, dependiendo de la curvatura y se expresa en la siguiente ecuación.

$$\Delta P = \frac{4\alpha}{R}$$

ΔP : Salto de presión entre superficies

α : Tensión superficial del fluido

R : Radio de burbuja

Observando la ecuación, resulta claro que el radio es inversamente proporcional a la presión, lo que significa que a menor radio de curvatura, mayor presión, en otras palabras, mientras más pequeña sea una burbuja, mayor será la presión necesaria para romperla.

Considerando que el valor de la tensión superficial del fluido utilizado es $\sigma = 62 \text{ mN m}^{-1}$, se tiene que la ecuación de Laplace queda de la siguiente forma:

$$\Delta P = \frac{0.248}{R}$$

Entonces, la mayor presión medida en el sistema es de:

$$\Delta P = \frac{0.248 [N m^{-1}]}{0.00036 [m]} = 757.525 [Pa]$$

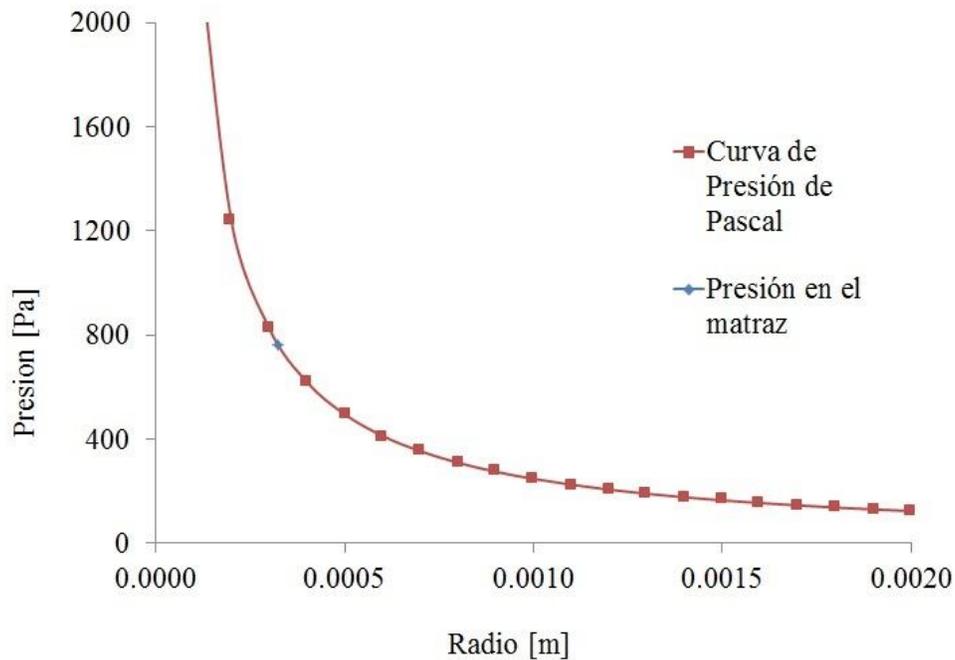


Figura 4.11: Gráfica de la presión en función del radio, que incluye el punto para el radio mínimo encontrado en los experimentos.

En la figura 4.11 se muestra la línea correspondiente a la ecuación de Laplace y el punto en azul muestra donde se encuentra la presión máxima alcanzada en el matraz bafleado. La gráfica es asintótica en ambos ejes, al ser asintótica en el eje de las abscisas, significa que para valores muy grandes de radio, la presión necesaria para romper una burbuja es muy pequeña y para el eje de las ordenadas, suponiendo tendencia al infinito, resulta que para radios muy pequeños se necesitan enormes saltos de presión entre superficies.

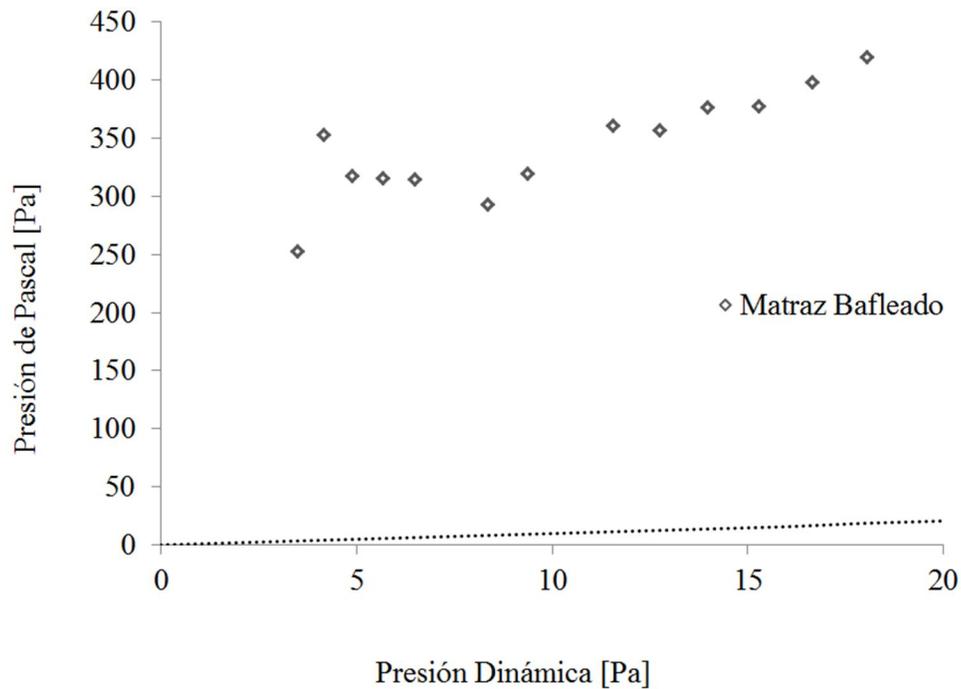


Figura 4.12: Gráfica de la presión Dinámica contra la presión de Pascal con una recta donde ambas presiones son iguales.

La figura 4.12 muestra la presión Dinámica debida a la velocidad del fluido contra la Presión de Pascal, esta última determinada a través de los promedios de tamaño de burbuja para las distintas velocidades. Se observa que las mediciones para matraz bafleado están muy por encima de la recta donde se supone que ambas presiones son iguales, esta diferencia es la contribución de los baffles en cuanto a la presión en el sistema.

La Presión Dinámica se calculó con la ecuación:

$$\Delta P_{din} = \frac{1}{2} \rho V_{tip}^2 = \frac{1}{2} \rho (nr)^2$$

4.4 Factor de forma de burbujas

Para determinar qué tan elongadas están las burbujas se definió un factor de forma que relaciona el eje mayor entre el eje menor de las burbujas, un factor de forma igual a uno indica que se trata de una circunferencia, si este valor es mayor a uno se trata de una elipse, y mientras más se aleje de uno, significa que la burbuja está más elongada.

$$f = \frac{\text{Eje mayor}}{\text{Eje menor}}$$

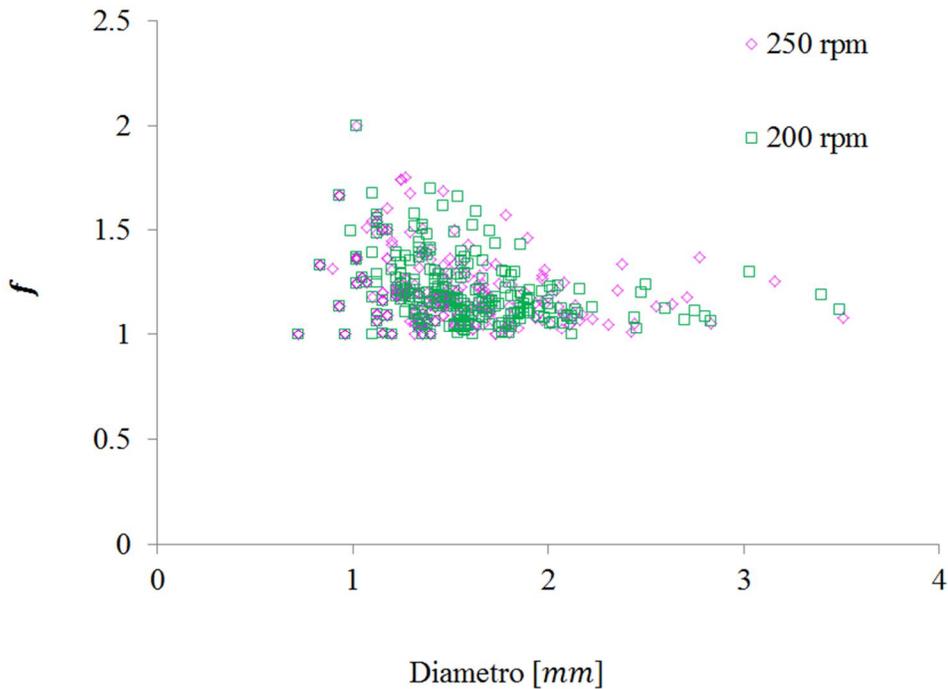


Figura 4.13. Se muestran las gráficas de factor de forma contra diámetro para las velocidades de 250 y 200 rpm para matraz bafleado.

En la figura 4.13 se observa que el comportamiento para las velocidades de 250 y 200 rpm es muy similar, aproximadamente para diámetros mayores a 2 mm se observa que difícilmente las burbujas alcanzan un factor de forma mayor a 1.5, por otra parte, cerca del diámetro de 1 mm se observa que el máximo factor de forma que alcanza una burbuja es de 2 mm.

A través de las observaciones hechas en la figura 4.13, se corrobora el hecho de que es más fácil fracturar burbujas grandes que pequeñas, esto se concluye, debido a que no se observan burbujas de 2 mm con un factor de forma mayor a 1.5, por otro lado, sí se observan burbujas con diámetro menor a 2mm que tienen un factor de forma mayor a 1.5.

Cualitativamente, se observó que las burbujas con factor de forma diferente a 1 pueden romperse o volver a adquirir su forma esferoidal. También, se observa que la mayoría de las burbujas quedan entre los valores de diámetro definidos por el intervalo que va de 1 mm hasta 2 mm, lo que en cierta forma, es también la distribución de burbujas.

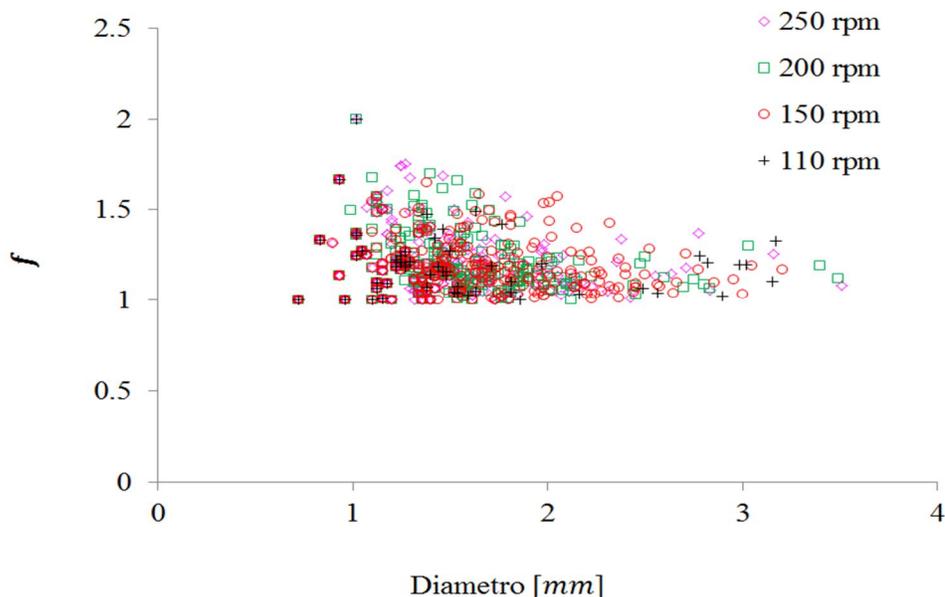


Figura 4.14: Se muestran las gráficas de factor de forma contra diámetro para las velocidades de 250, 200, 150 y 110 rpm para matraz bafleado.

En la figura 4.14 están los valores obtenidos para cuatro velocidades: 110, 150, 200 y 250 rpm; como se dijo anteriormente, el comportamiento de 200 y 250 rpm es similar, sin embargo, se observa que el comportamiento para 150 rpm muestra algunas burbujas cerca de 2 mm de diámetro que si alcanzan 1.5 en cuanto al factor de forma. Se concluye que la velocidad está jugando un papel importante, ya que al tener menor velocidad, dichas burbujas no alcanzan a fracturarse, a pesar de que alcanzan un factor de forma un poco mayor a 1.5. Para la velocidad de agitación de 110 rpm, se observan pocos valores que superen un factor de forma mayor a 1.5, esto puede deberse a que, como la velocidad de agitación es la menor, las burbujas están sometidas a menores fuerzas y entonces no se elongan, como en casos a mayores velocidades de agitación.

De las figuras 4.13 y 4.14 se observa que existe un diámetro máximo de burbuja, el cual se encuentra cerca de 3.5 mm, burbujas mayores a ese diámetro siempre se fracturan debido a que siendo muy grandes, es más fácil que se fracturen sin importar la velocidad de agitación.

4.5 Dispersión de biomasa

Gamboa *et al*, (2011) reportaron recientemente que la morfología de la biomasa de *Streptomyces lividans* juega un papel relevante en la producción y la calidad de la proteína recombinante APA. Encontraron que los *pellets* más redondos de hasta 1.0 mm de diámetro se obtuvieron en matraces convencionales pero con una disminución significativa tanto en la producción como de la calidad de la proteína, mientras que los *pellets* más pequeños, con diámetros por debajo de 0.25 mm, se obtuvieron en los matraces con resorte y la producción de la proteína fue mayor alrededor de 3 veces con respecto a la obtenida en los matraces convencionales, como se observa en la figura 4.15. Estos autores consideran que estas diferencias se deben a la transferencia de masa en el interior de los *pellets* y a las características hidrodinámicas de cada configuración.

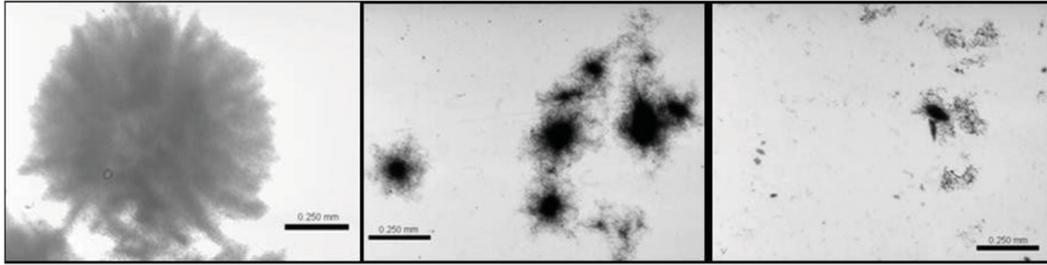
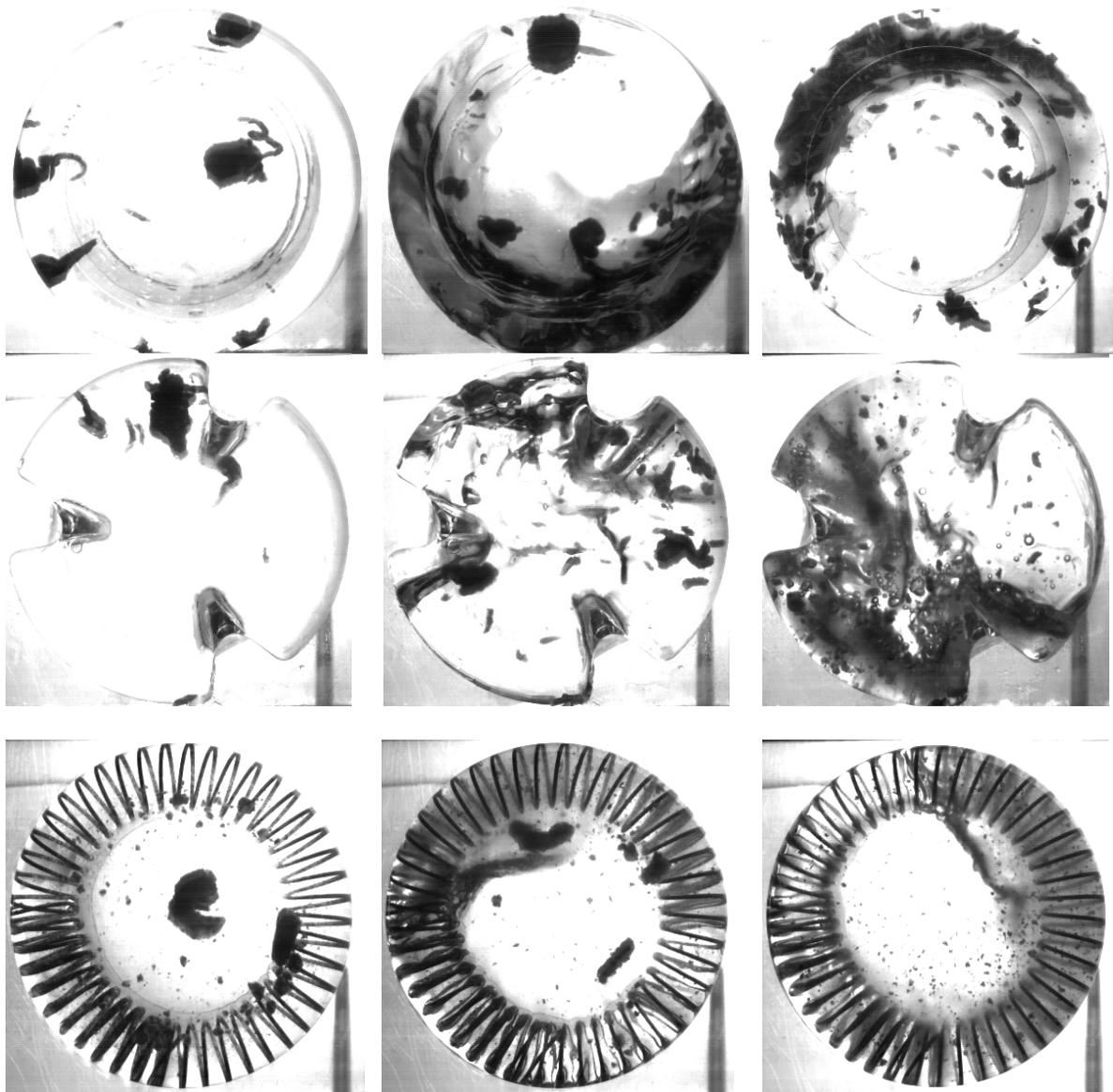


Figura 4.15. *Morfología micelial de Streptomyces lividans en matraces convencional, bafleado y con resorte. [Gamboa-Suasnavart R. A, et al, 2011*



0s

10 s

25 s

Figura 4.16: *Dispersión de la biomasa a 150 rpm por 25 seg. en las tres configuraciones.*

Con el fin de evaluar el efecto de la configuración en la dispersión de la biomasa, en este trabajo se hizo un experimento sencillo donde se adicionó 1 g de biomasa a cada uno de los matraces y con la cámara de alta velocidad se visualizó la dispersión de la biomasa a 150 rpm por 25 segundos (figura 4.16). La biomasa se dispersó midiendo el diámetro medio de las partículas durante este tiempo, dichas mediciones fueron obtenidas de igual forma que con las burbujas. Los datos se presentan en la figura 4.17.

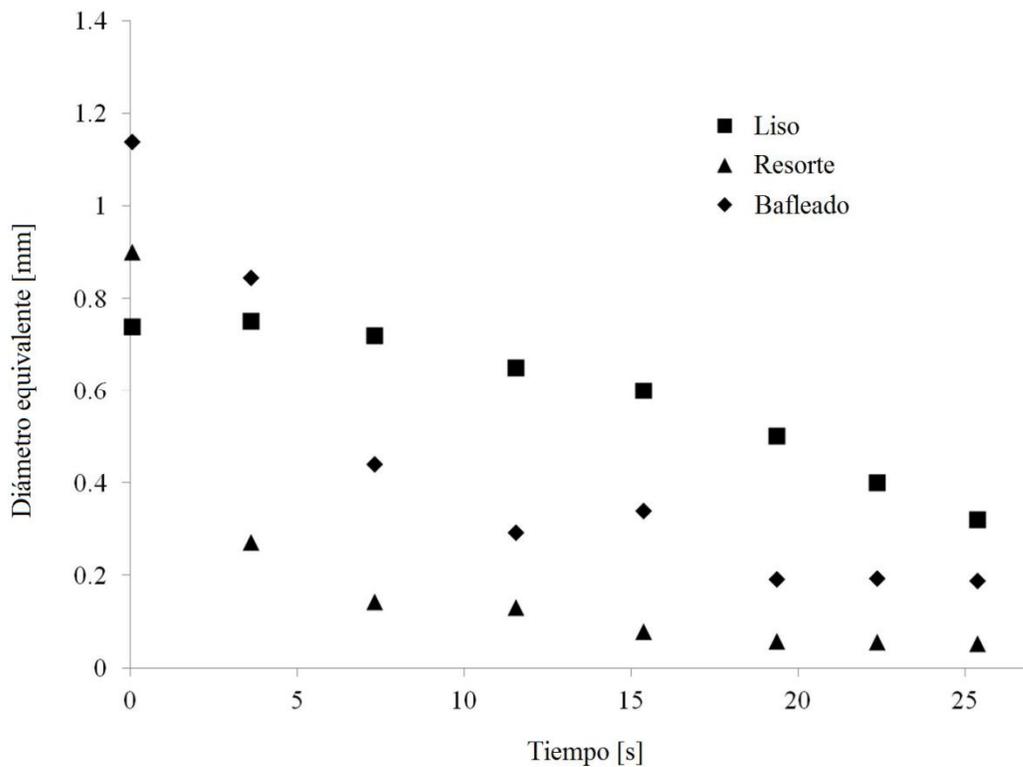


Figura 4.17: *Diámetro equivalente de los pellets de biomasa en función del tiempo de dispersión para las tres configuraciones.*

En los matraces con baffles y con resorte, la biomasa se dispersa más rápidamente que en los convencionales. Además se observan dos mecanismos diferentes: cuando una corriente golpea el baffle, se acelera y golpea la esquina del siguiente baffle, lo que genera una segunda corriente que favorece la turbulencia del sistema y por tanto, se promueve la desagregación de la biomasa.

En el caso del resorte, la biomasa se introduce en los huecos del resorte lo que causa que la biomasa se fragmente. Se puede observar una región gris que indica que la biomasa está dispersa en pequeñas partículas, mientras que en el matraz convencional no se observó esta fragmentación.

5. Conclusiones

En este trabajo estudiamos el aire incorporado en tres geometrías de matraces agitados orbitalmente: matraz liso, matraz bafleado y matraz con resorte, dicho estudio se realizó a través de visualización y análisis de imágenes.

En cuanto a la incorporación de aire, se observó que el matraz liso no incorporó aire a ninguna velocidad, el matraz bafleado comenzó a incorporar burbujas a 110 rpm, en el matraz con resorte también se observó incorporación de burbujas, sin embargo, debido al método utilizado, solo pudieron obtenerse distribuciones para el matraz bafleado. De lo anterior puede concluirse que la geometría juega un papel importante en cuanto a la incorporación de burbujas, por otra parte, considerando que los resultados para el matraz bafleado, mostraron que efectivamente el diámetro cambia en función de la velocidad y que al incrementarse esta, las distribuciones se adelgazan y desplazan hacia la izquierda, disminuyendo también su desviación estándar, se puede concluir que a mayores velocidades el diámetro (Sauter y medio) disminuye y que la mayoría de la población para una cierta velocidad se localiza en un intervalo cada vez menor.

Sobre los resultados obtenidos en cuanto a la presión, puede concluirse que el matraz bafleado tiene una gran aportación sobre la fractura de burbujas, lo cual se deduce del hecho de que la presión de Laplace resulto ser mucho mayor a la presión Dinámica, sin embargo, debido el método utilizado para las mediciones, no fue posible determinar la presión máxima alcanzada en el sistema a través de la ecuación de Laplace, porque se llegó al límite del método de medición y entonces ya no fue posible detectar burbujas con un radio menor a 0.36 mm.

De los resultados obtenidos en dispersión de biomasa, puede observarse que la geometría juega un papel determinante: para el matraz liso, permanecen pedazos grandes, para el matraz bafleado se observan trozos medianos y deformes, para el matraz con resorte, se observa que prácticamente la biomasa se pulveriza. También se observa que al paso del tiempo, el diámetro equivalente disminuye, para el matraz liso esto sucede de una manera proporcional, sin embargo, para el matraz bafleado se observa una caída rápida del tamaño, para el matraz con resorte también se observa una caída rápida, sin embargo esta es más

drástica. También puede observarse que existe una tendencia a un tamaño mínimo de biomasa, no puede afirmarse que los valores de diámetro observados en dicha figura sean los valores correctos para cada configuración, porque para hacerlo habría que diseñar un experimento repetible, lo que definitivamente si puede concluirse es que los esfuerzos son mayores casi inmediatamente en el matraz bafleado y con resorte debido a la geometría, la cual deberá ser considerada en función de las necesidades.

Bibliografía

Archambault J., Williams R.D. (1996) Production of sanguinarine by elicited plant cell culture, I. Shake flasks suspension cultures. *Journal of Biotechnology* 46: 91-105.

Atkinson B., Mavituna F.(1991) *Biochemical engineering and biotechnology handbook*, Macmillan 1983 - 1119.

Büchs J. (2001) Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal* 7: 91-98

Büchs J., Lotter S., Milbradt C. (2001) Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal* 7: 135-141

Büchs J., Maier U., Lotter S., Peter C.P. (2007) Calculating liquid distribution in shake flasks on rotary shakers at waterlike viscosities. *Biochemical Engineering Journal* 34: 200-208.

Cents A.H.G., Brillman D.W.F., Versteeg G.F.(2001) Gas absorption in an agitated gas-liquid-liquid system. *Chemical Engineering Science* 56: 1075-1083.

Chen H.T., Middleman S. (1967) Drop size distributions in agitated liquid-liquid systems. *AIChE Journal*. 13 (5): 989-998.

Doran P.M. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. ACRIBIA, S.A. Cap. 9. p 208-212.

Dumont E., Delmas H. (2003). Mass transfer enhancement of gas absorption in oil-in-water systems: a review. *Chemical Engineering and Processing*. 42: 419-438.

Gamboa-Suasnavart R.A., Valdez-Cruz N.A., Córdova-Dávalos L.E., Martínez-Sotelo J. A., Servín-Gonzalez L., Espitia C., Trujillo-Roldán M.A. (2011) The O-mannosylation and production of recombinant APA (45/47 KDa) protein from *Mycobacterium tuberculosis* in *Streptomyces lividans* is affected by culture conditions in shake flasks. *Microbial Cell Factories* 10 (1):110.

Jimenez J. et al. (2011) Influence of culture vessel characteristics and agitation rate on gaseous exchange, hydrodynamic stress, and growth of embryogenic cork oak (*Quercus suber* L.) cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 47: 355-363.

Kennedy M.J., Reader S.L. (1994) The scale up of mycelial shake flask fermentations: a case study of γ -linolenic acid production by *Mucor hiemalis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 13: 212-216.

Klockner W., Büchs J. (2012) Advances in shaking technologies. Trends in Biotechnology Vol. 30, No. 6.

Lee M.S., et al (2001). Enhancement of cephalosporin C production by cultivation of *Cephalosporium acremonium* M25 using a mixture of inocula. Letters in Applied Microbiology 32(6): 402-406.

Lovick J., Mouza A.A., Paras S.V., Lye G.J., Angeli P. (2005) Drop size distribution in highly concentrated liquid-liquid dispersions using a light back scattering method. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80: 545-552.

Machon V., Pacek A.W., Nienow A.W. (1997) Bubble sizes in electrolyte and alcohol solutions in a turbulent stirred vessel. Chemical Engineering Research and Design 75: 339

Maier U., Losen M., Büchs J. (2004) Advances in understanding and modeling the gas-liquid mass transfer in shake flasks. Biochemical Engineering Journal 17: 155-167.

Maier U., Büchs J. (2001) Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. Biochemical Engineering Journal 7: 99-106.

Middleton J.C. (1985) Gas-liquid dispersion and mixing. Mixing in the process industries. Harnby N., Edwards M.F., Nienow A.W. Butterworths. pp. 322-372.

Paul E.L. et al. (2003) Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice. John Wiley and Sons. New Jersey. pp: 145-250, 345-389, 585-635.

Pacek A.W., Moore I.P.T., Nienow A.W., Calabrese R.V. (1994) A video technique for the measurement of dynamics of liquid-liquid dispersion during phase inversion. AIChE Journal. 40: 1940-1949.

Pacek A.W., Man C.C., Nienow A.W. (1999) On the Sauter mean diameter and size distributions in turbulent liquid/liquid dispersions in a stirred vessel. Chemical Engineering Science 53 (11): 2005-2011.

Russ J.C. (1992) The Image Processing Handbook. CRC Press, Boca Raton.

Tan R.K., Eberhard W., Büchs J. (2011) Measurement and characterization of mixing in shake flasks. Chemical Engineering Science 66: 440-447.

Tattersson G.B. (1991) Gas dispersion in agitated tanks. En: Fluid Mixing and Gas Dispersion in Agitated Tanks, McGraw-Hill. USA. pp. 417-529.

Vardar-Sukan F. (1998) Foaming: consequences, prevention and destruction. Biotechnology Advances 16 (5/6): 913-948.

Weibel E.R. (1979) Stereological methods in Practical methods for biological morphometry. London. Academic Press, pp. 415 .

Whitman W.G. (1923)The Two-Film Theory of Gas Absorption. Chemical Metals Engineering 29:146-150.

Withterle K., Sverak T. (1996) Surface aeration threshold in agitated vessels. Collection of Czechoslovak Chemical Communications 61: 681-690.

Zhou G., Kresta S.M. (1998a) Correlations of mean drop size and minimum drops size with turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. Chemical Engineering Science 53 (11): 2063-2079.