

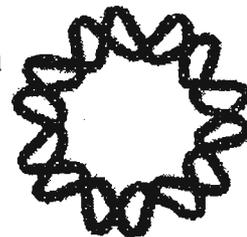
2005

ROCHA VALADEZ, JOSÉ ANTONIO

00591



Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma
de México



**Producción de la 6-pentil- α -pirona por
Trichoderma harzianum: efecto de las condiciones
hidrodinámicas sobre la fisiología de un cultivo
miceliar**

T E S I S

que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Bioquímicas

presenta

José Antonio Rocha Valadez

Cuernavaca, Mor., 2005

m. 345668



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: José Antonio Roca
Valdez

FECHA: 17-Junio-2005

FIRMA: [Firma]

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Enrique Galindo, del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la asesoría del **Dr. Leobardo Serrano Carreón**. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del CONACyT (39906), IFS (E/2548-2) y DGAPA (IN-226202), así como con la beca 93823 del CONACyT. ..

INDICE

	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	3
2.1 ALACRANISMO	3
2.1.2 Alacranes	3
2.1.2 Veneno del alacrán	5
2.2 INMUNIZACION PASIVA	6
2.3 REPERTORIO DE ANTICUERPOS HUMANOS	7
2.3.1 Anticuerpos	7
2.3.2 Fragmento variable de cadena sencilla (scFv)	9
2.3.3 Bancos de anticuerpos	9
2.3.3.1 Recuperación de la información genética	9
2.3.3.2 Fuente de inmunoglobulinas	10
2.4 TECNOLOGIA DE DESPLIEGUE EN FAGOS	12
2.4.1 Fagos filamentosos	13
2.4.2 Tamizado de bancos de anticuerpos – <i>Phage Display</i>	14
2.5 EVOLUCION DIRIGIDA	15
2.5.1 PCR mutagénica	15
2.6 ANTECEDENTES	16
2.6.2 Toxina Cn2	18
2.6.3 Anticuerpo monoclonal BCF2	19
3. HIPOTESIS	21
4. OBJETIVOS	21

Índice general

	Página
Índice de figuras	iii
Índice de tablas	vi
Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
2. Antecedentes	8
Cultivos miceliares	8
Crecimiento filamentoso: complejidad y problemática	9
Interacción morfología-hidrodinámica-productividad	12
Estrés hidrodinámico y mecánica de fluidos: generalidades	14
Estrés hidrodinámico en biorreactores	17
Estrés hidrodinámico en cultivos miceliares	20
Velocidad de disipación de energía (<i>EDCF</i>)	22
Efecto de la energía suministrada en cultivos de <i>Trichoderma</i> sp.	25
Producción de 6-pentil- α -pirona por <i>Trichoderma</i> sp.	29
3. Objetivos	32
Objetivo general	32
Objetivos específicos	32
4. Materiales y métodos	33
Microorganismo	33
Preparación de inóculo	33
Medio de producción	33
Cultivos en biorreactor	34
Evaluación del crecimiento micelial (biomasa)	37
Determinación de glucosa	37
Caracterización morfológica	38

Determinación del diámetro crítico de los agregados miceliars	39
Extracción y cuantificación de la 6-pentil- α -pirona (6PP)	40
Determinación de la viabilidad de <i>T. harzianum</i>	42
Caracterización reológica de los caldos de fermentación	43
Cálculo de los parámetros cinéticos	45
Validación estadística	48
5. Estrategia experimental	49
6. Resultados y discusión	51
Evaluación del sistema de fermentación	51
Comportamiento de la <i>EDCF</i> en cultivos de <i>T. harzianum</i>	53
Efecto de la <i>EDCF</i> sobre el diámetro promedio de los agregados miceliars	57
Efecto de la velocidad de disipación de energía sobre el crecimiento miceliar	62
Efecto de la <i>EDCF</i> sobre el metabolismo y diferenciación celular	64
Efecto de la <i>EDCF</i> sobre la producción de 6-pentil- α -pirona	69
Efecto global de la <i>EDCF</i> en cultivos de <i>T. harzianum</i>	74
7. Conclusiones	75
8. Perspectivas	76
9. Bibliografía	77
Anexos	87
1. Determinación de la energía específica de disipación en la zona de barrido del impulsor y de la frecuencia de circulación en cultivos de <i>T. harzianum</i>	87
2. Cultivos de <i>T. harzianum</i> desarrollados a energía de disipación constante	91
3. Determinación del tamaño de <i>eddie</i> (microescala de Kolmogorov)	97
4. Estimación de los parámetros cinéticos y ajuste de los datos experimentales al modelo logístico y de Luedeking-Piret	98
5. Determinación del diámetro crítico de los agregados de <i>T. harzianum</i>	107
6. Artículo en <i>Biotechnology and Bioengineering</i>	109

Índice de figuras

Figura		Página
2.1	Diagrama esquemático de las regiones de crecimiento y diferenciación celular del hongo <i>Penicillium chrysogenum</i> .	8
2.2	Representación global de las interrelaciones entre morfología, crecimiento, reología, hidrodinámica y fenómenos de transferencia de masa y calor, y sus implicaciones sobre la productividad en cultivos miceliares.	12
2.3	Efecto de la potencia volumétrica suministrada sobre el área proyectada promedio y la velocidad de producción de penicilina en cultivos de <i>P. chrysogenum</i> desarrollados a diferentes escalas de trabajo.	22
2.4	Efecto de la velocidad de disipación de energía sobre el área proyectada promedio y la velocidad de producción de penicilina en cultivos de <i>P. chrysogenum</i> desarrollados a diferentes escalas de trabajo.	24
4.1	Diagrama esquemático del biorreactor y turbinas Rushton empleadas.	34
4.2	Sistema de fermentación desarrollado para evaluar, de manera independiente, los efectos hidrodinámicos y los de oxígeno disuelto.	36
4.3	Aparato de destilación-extracción empleado para la extracción de la 6PP.	40
6.1	Cultivo de <i>T. harzianum</i> utilizando un medio rico.	51
6.2	Control de la potencia volumétrica y evolución de la energía específica de disipación durante los cultivos de <i>T. harzianum</i> desarrollados en un medio de fermentación extractiva.	53
6.3	Evolución del tiempo de circulación durante los cultivos de <i>T. harzianum</i> desarrollados a $P/k \cdot D^3$ constante en un medio de fermentación extractiva.	54
6.4	Caída de potencia en función del índice de consistencia durante los cultivos de <i>T. harzianum</i> .	55
6.5	Comportamiento de la velocidad de disipación de energía durante los cultivos de <i>T. harzianum</i> desarrollados a $P/k \cdot D^3$ constante en un medio de fermentación extractiva.	56
6.6	Evolución del diámetro promedio de <i>T. harzianum</i> como función de la velocidad de disipación de energía.	57
6.7	Efecto del tiempo de circulación y de la energía específica de disipación sobre el diámetro promedio máximo de los agregados de <i>T. harzianum</i> .	58

6.8	Evolución del diámetro promedio de los agregados miceliarios y diámetro de equilibrio de <i>T. harzianum</i> como función del tiempo y de la velocidad de disipación de energía.	59
6.9	Evolución de la porosidad de los agregados miceliarios de <i>T. harzianum</i> como función del tiempo y de la velocidad de disipación de energía.	60
6.10	Diámetro promedio de los agregados miceliarios en función del tamaño de <i>eddie</i> (microescala de Kolmogorov) en cultivos de <i>T. harzianum</i> .	61
6.11	Evolución de la concentración de biomasa en función de la velocidad de disipación de energía.	62
6.12	Efecto del tiempo de circulación y de la energía específica de disipación sobre la velocidad específica de crecimiento de <i>T. harzianum</i> .	63
6.13	Efecto de la velocidad de disipación de energía sobre la velocidad específica de crecimiento, el consumo específico de glucosa y la producción específica de CO ₂ en cultivos de <i>T. harzianum</i> .	64
6.14	Producción de la 6-pentil- α -pirona por <i>T. harzianum</i> como función de la la velocidad de disipación de energía.	70
6.15	Efecto de la velocidad de disipación de energía sobre la productividad específica máxima de 6-pentil- α -pirona en cultivos de <i>T. harzianum</i> .	71
6.16	Evolución de la concentración de 6-pentil- α -pirona, adicionada de forma exógena, en un sistema modelo desarrollado a 3.2 kW/m ³ -s.	73
6.17	Diagrama esquemático del efecto global de la velocidad de disipación de energía sobre la fisiología de <i>T. harzianum</i> .	74
A.1.1	Número de flujo vs. número de Reynolds para turbinas Rushton utilizando diferentes tipos de fluidos.	88
A.1.2	Medición de la potencia suministrada y velocidad de agitación a las 0 y 73 h en el cultivo desarrollado a una potencia volumétrica constante de 0.3 W/L.	89
A.2.1	Cultivos de <i>T. harzianum</i> desarrollados a 11.4 kW/m ³ utilizando tres turbinas Rushton con una relación D/T = 1/3.	92
A.2.2	Cultivo de <i>T. harzianum</i> desarrollado a 11.2 kW/m ³ utilizando tres turbinas Rushton con una relación D/T = 1/2.	93
A.2.3	Cultivos de <i>T. harzianum</i> desarrollados a 22.3 kW/m ³ utilizando tres turbinas Rushton con una relación D/T = 1/3.	94
A.2.4	Cultivo de <i>T. harzianum</i> desarrollado a 22.2 kW/m ³ utilizando tres turbinas Rushton con una relación D/T = 1/2.	95

A.2.5	Cultivos de <i>T. harzianum</i> desarrollados a 149.5 kW/m ³ utilizando tres turbinas Rushton con una relación D/T = 1/3.	96
A.4.1	Estimación de la velocidad específica de crecimiento de acuerdo al modelo logístico.	101
A.4.2	Ajuste de los datos experimentales de biomasa al modelo logístico utilizando los valores de velocidad específica de crecimiento.	102
A.4.3	Estimación del rendimiento de biomasa en base a glucosa de acuerdo al modelo de Luedeking-Piret.	103
A.4.4	Ajuste de los datos experimentales de glucosa al modelo de Luedeking-Piret utilizando los rendimientos de biomasa, en base a glucosa.	104
A.4.5	Estimación de la constante de producción de CO ₂ de acuerdo al modelo de Luedeking-Piret.	105
A.4.6	Ajuste de los datos experimentales de CO ₂ al modelo de Luedeking-Piret utilizando las constantes de producción de CO ₂ .	106

Índice de tablas

Tabla		Página
2.1	Tamaño y sensibilidad de los microorganismos al esfuerzo de corte.	18
2.2	Comparación entre los rangos de energía utilizados, y agitación óptima, para la producción de diversos metabolitos de interés en cultivos de <i>Trichoderma</i> .	27
4.1	Condiciones de operación del cromatógrafo de gases Hewlett Packard.	41
5.1	Condiciones iniciales de operación en los cultivos de <i>T. harzianum</i> .	50
6.1	Viabilidad de <i>T. harzianum</i> como función del tiempo de cultivo y de la velocidad inicial de disipación de energía.	68
6.2	Diámetro crítico estimado y diámetro máximo experimental en cultivos de <i>T. harzianum</i> como función de la velocidad de disipación de energía.	74
A.1.1	Determinación de la energía específica de disipación.	87
A.1.2	Potencia suministrada y agitación medidos <i>in situ</i> en el cultivo a 22.3 kW/m ³ .	89
A.1.3	Determinación de la frecuencia de circulación.	90
A.3.1	Determinación del tamaño de <i>eddie</i> .	97
A.4.1	Determinación de la velocidad específica de crecimiento, rendimiento de biomasa en base a glucosa y constante de producción de CO ₂ de acuerdo al modelo logístico y de Luedeking-Piret.	98
A.5.1	Determinación del diámetro crítico de los agregados de <i>T. harzianum</i> .	108

Resumen

El cultivo de microorganismos filamentosos en biorreactores agitados mecánicamente es un proceso complejo. A diferencia de otras formas de crecimiento unicelulares (*i.e.* bacilocos, levaduras), las propiedades reológicas de los cultivos filamentosos cambian en función del tiempo debido al incremento en la masa celular y a los cambios morfológicos del organismo. De manera particular, el crecimiento disperso origina la formación de caldos altamente viscosos y no Newtonianos, donde la transferencia de oxígeno y la homogeneidad se ven drásticamente limitadas conforme avanza el proceso. En estos casos, el uso de altas velocidades de agitación para disminuir tales limitaciones es deseable. Sin embargo, el esfuerzo mecánico aplicado puede provocar daño celular, afectando así a la morfología, el crecimiento, la fisiología y la productividad del cultivo. Para el caso específico de *Trichoderma* sp., el estudio de éstos aspectos es de gran importancia ya que se ha observado un efecto importante de las condiciones hidrodinámicas sobre el crecimiento y/o producción de metabolitos. Sin embargo, resulta difícil evaluar, de manera sistemática, el efecto individual del estrés hidrodinámico sobre el resto de los parámetros del proceso (*i.e.* transferencia de oxígeno).

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la velocidad de disipación de energía (parámetro hidrodinámico empleado para cuantificar la energía entregada al fluido en la zona del impulsor por unidad de tiempo) sobre la morfología, el crecimiento, la viabilidad y la producción de 6-pentil- α -pirona en cultivos de *Trichoderma harzianum*, bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto.

Como primera etapa, se implementó un sistema de fermentación que permitió, por un lado, evitar posibles limitaciones por oxígeno disuelto (a través de manipular la composición de los gases de entrada), y por otro, mantener un suministro constante de energía al medir y, en caso de ser necesario, manipular en línea el valor del torque a través de la velocidad de agitación. Así, el sistema permitió controlar, de manera rigurosa e individual, la concentración de oxígeno disuelto y la energía suministrada, independientemente de los cambios reológicos y del consumo de oxígeno generado por el aumento gradual en la biomasa y de la morfología filamentosa desarrollada durante los cultivos.

Una vez concluida la implementación del sistema de fermentación, se desarrollaron cultivos de *T. harzianum* bajo condiciones constantes de energía suministrada (*i.e.* potencia). Los cultivos se desarrollaron en un medio de fermentación extractiva (80 % medio acuoso y 20 % *n*-hexadecano) empleando un biorreactor (14 L) y dos juegos de tres turbinas Rushton (relación diámetro impulsor/diámetro del tanque de 0.33 y 0.50) a velocidades de disipación de energía (*EDCF*) entre los márgenes de 3 y 96 kW/m³·s.

Se observó que el diámetro promedio máximo de los agregados fue función de la *EDCF*. El aumento gradual de la *EDCF* (de 3 a 96 kW/m³·s) redujo el diámetro de los agregados miceliarios de 0.39 a 0.19 mm debido a que se favoreció su fragmentación. Se propone que la fragmentación del micelio fue el resultado del estrés hidrodinámico ya que el diámetro promedio de los agregados fue función del tamaño de *eddie* (estimado de acuerdo a la microescala de Kolmogorov). El mayor grado de interacción entre partículas y *eddies* se dió

en la región de los impulsores ya que la frecuencia de circulación del micelio por dicha zona determinó el tamaño de los agregados.

El incremento en la *EDCF* originó cambios significativos en el metabolismo de *T. harzianum*. Las condiciones de mayor estrés hidrodinámico redujeron la velocidad específica de crecimiento (de 0.052 a 0.033 h⁻¹) e incrementaron la velocidad específica de CO₂ a velocidades específicas de consumo de glucosa relativamente constantes (0.052 ± 0.0086 g/g·h). Es probable que el mayor estrés mecánico haya incrementado los requerimientos energéticos del hongo (para fines de mantenimiento), ocasionando un cambio en el metabolismo de la fuente de carbono. Las condiciones hidrodinámicas también influyeron sobre la viabilidad y la diferenciación celular (*i.e.* esporulación) del microorganismo, ya que éstas disminuyeron y aumentaron, respectivamente, conforme se incrementó la *EDCF*.

La producción de 6-pentil- α -pirona (6PP, aroma a coco) se estimuló entre los 7 y 10 kW/m³·s, por lo que la productividad específica máxima mostró una relación en forma de campana respecto a la *EDCF*. La reducción en la biosíntesis de 6PP (después de los 20 kW/m³·s) se debió al estrés hidrodinámico impuesto, el cual generó el mayor daño miceliar (fragmentación) y la diferenciación celular (esporulación) del hongo. Por otro lado, se propone que la biosíntesis de 6PP aumentó debido a los cambios metabólicos observados al incrementar la *EDCF* entre los 3 y 10 kW/m³·s ya que posibles limitaciones nutricionales (oxígeno y/o glucosa) fueron descartadas.

Abstract

Submerged filamentous fungal fermentations in stirred tank bioreactors are complex processes. Unlike unicellular cultures (like bacteria or yeast), the rheological properties of the culture broths varies as a function of time due to changes in the biomass concentration and on its morphological characteristics. Particularly, dispersed mycelium yields highly viscous broths with non-Newtonian characteristics, causing a notorious decrease in oxygen mass transfer and stagnant zone formation as the process proceeds. In such cases, an increase in agitation rate should reduce the after mentioned limitations and, hence, might be useful. However, agitation also creates shear forces that can cause cell damage, affecting fungal morphology, growth, physiology and, ultimately, culture productivity. For *Trichoderma* sp. the study of these aspects is important, as it has been shown that the hydrodynamic conditions strongly influence fungal growth and metabolite production. Nonetheless, and as in other filamentous cultures, it is rather difficult to study the individual effects of hydrodynamic stress over oxygen mass transfer.

The objective of this work was to study the effect of the “energy dissipation/circulation” function (hydrodynamic parameter used to quantify the energy drawn to the fluid in the impeller region in a given time) over morphology, growth, viability and 6-pentyl- α -pyrone production in *Trichoderma harzianum* cultures, under non-limiting oxygen conditions.

In order to accomplish this, a fermentation system, where non-limiting oxygen concentrations in the culture broth (through oxygen gas enrichment) and constant power inputs (through *on-line* torque measurements) were maintained, was developed. The system, therefore, allowed a rigorous control of the oxygen concentration and power drawn, independently of the rheological changes and oxygen consumption rate generated by the gradual increase in biomass concentration and the disperse morphology developed throughout the fermentation.

Once the fermentation system was implemented, *T. harzianum* cultures were developed under constant power drawn conditions. The fermentations were developed using an extractive culture medium (80 % aqueous media and 20 % *n*-hexadecane) in a 14 L bioreactor fitted with two sets of three Rushton turbines (impeller diameter/tank diameter ratio of 0.33 and 0.50) at an “energy dissipation/circulation” function (*EDCF*) in the range between 3 and 96 kW/m³·s.

Maximum clump diameter was a function of *EDCF*. A gradual increase in *EDCF* (from 3 to 96 kW/m³·s) reduced mycelial mean clump diameter from 0.39 to 0.19 mm as fragmentation was enhanced. It is proposed that mycelial fragmentation was the result of hydrodynamic stress as mean clump diameter was a function of the *eddy* size (estimated through the Kolmogorov microscale). The highest interaction between particles and *eddies* occurred in the impeller region as the circulation frequency of the mycelium through this zone determined clump size.

Increases in *EDCF* yielded significant changes in *T. harzianum* metabolism. Higher *EDCF* reduced the specific growth rates (from 0.052 to 0.033 h⁻¹) and increased the specific CO₂ production rates at relatively constant specific glucose consumption rates (0.052 ± 0.0086 g/g·h). It is suggested that higher mechanical stress increased the fungi energetic requirements

(for maintenance), leading to a carbon metabolic shift. The hydrodynamic conditions also influenced fungal viability and cellular differentiation (*i.e.* sporulation) as the former decreased and the latter increased at higher *EDCF*.

6-pentyl- α -pyrone production (6PP, coconut-like aroma) was enhanced between 7 and 10 $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$, yielding a bell-shaped relationship between the maximum specific 6PP productivity and the *EDCF*. The decrease in 6PP biosynthesis (after 20 $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$) was the result of hydrodynamic stress since higher mycelial damage (fragmentation) and cellular differentiation (sporulation) were observed. On the other hand, it is proposed that 6PP biosynthesis was enhanced as a direct consequence of the metabolic changes observed as *EDCF* increased (in between the 3 and 10 $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$ range) since nutritional (oxygen and glucose) limitations were discarded.

1. Introducción

La 6-pentil- α -pirona (6PP) es una lactona (monoéster cíclico) con aroma característico a coco, comercialmente atractiva como aditivo alimenticio no tóxico. Dado que puede ser producida por métodos biológicos (*i.e.* fermentación), la 6PP tiene gran demanda en la industria alimentaria como saborizante “natural”. Adicionalmente, estudios recientes destacan la actividad fungicida de la 6PP hacia ciertas especies de hongos, patógenos de algunos cultivos agrícolas (Schirmböck et al., 1994; Scarselletti y Faull, 1994).

La 6PP ha sido reportada como uno de los principales compuestos volátiles biosintetizados por hongos del género *Trichoderma* cuando actúan como antagonistas de hongos patógenos (Scarselletti y Faull, 1994; Cooney y Lauren, 1998). De hecho, se ha demostrado que la biosíntesis de 6PP por *T. harzianum* puede ser “elicitada” (inducida) como respuesta a la presencia de los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Cooney y Lauren, 1998; Serrano-Carreón et al., 2004).

Sin embargo, la producción de 6PP por *Trichoderma* sp. se ha visto limitada debido, principalmente, a la inhibición (toxicidad) que la molécula produce sobre el propio hongo productor a concentraciones relativamente bajas (100 mg/L). En este caso, el uso de la fermentación extractiva representa una alternativa ya que permite, además de evitar altas concentraciones del metabolito en la fase acuosa, recuperar *in situ* el producto (en el solvente orgánico) conforme es sintetizado. Como resultado, diversos autores, utilizando técnicas de recuperación *in situ* (fermentación extractiva), han reportado incrementos en los rendimientos y en las productividades de 6PP en bioprocesos con *T. viride*, *T. reesei* y *T. harzianum* (Prapulla et al., 1992; Tekin et al., 1995; Serrano-Carreón et al., 2002).

A pesar de que la fermentación extractiva ha permitido incrementar la productividad de la 6PP en diversos procesos, la producción de éste y otros metabolitos en cultivos miceliares depende en gran medida de las condiciones ambientales presentes en el biorreactor. Para el caso específico de *Trichoderma*, el estudio de estos aspectos es de gran importancia ya que se ha demostrado la presencia de condiciones hidrodinámicas óptimas para el crecimiento y/o la producción de un metabolito dado, evidenciado por una relación en forma de campana entre la productividad y la energía suministrada (Galindo et al., 2004).

Los aspectos hidrodinámicos y de transferencia de oxígeno son particularmente importantes en cultivos de *Trichoderma* sp. ya que tanto el crecimiento celular y su morfología, como la producción de diversos metabolitos, dependen de dichos factores (Mukataka et al., 1988; Lejeune y Baron, 1995). No obstante, a la fecha, ninguno de los reportes ha demostrado, de manera concluyente, el efecto individual del estrés hidrodinámico ya que en todos los casos se asume la existencia de limitaciones por oxígeno –al interior de los agregados- en cultivos desarrollados bajo las condiciones más pobres de energía suministrada.

En este sentido y dado los cambios reológicos presentes en los cultivos miceliares, resulta complejo evaluar el efecto individual del estrés hidrodinámico sobre el resto de los parámetros del proceso (*i.e.* transferencia de oxígeno). Por un lado, las características hidrodinámicas marcan las condiciones microambientales a las que está expuesto el micelio, además de influir, en conjunto con las propiedades reológicas, sobre los patrones de mezclado y la transferencia de masa (Cui et al., 1998; Riley et al., 2000). Por otro lado, debido a su baja solubilidad en agua (7 – 10 mg/L), el oxígeno es generalmente el sustrato limitante en cultivos aerobios, por lo que su disponibilidad depende, principalmente, de la capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor ($k_L a$). No obstante, la transferencia de oxígeno y la homogeneidad se ven drásticamente limitadas conforme avanza el proceso, debido al incremento en la viscosidad de los caldos (producto del crecimiento y de la interacción entre las delgadas, largas y ramificadas hifas). Para favorecer la transferencia de masa en estos casos, generalmente se incrementa la velocidad de agitación y, por lo tanto, la energía suministrada al cultivo. Sin embargo, esto implica que además de afectar la transferencia de oxígeno, las características morfológicas se modifiquen debido al cambio en las condiciones hidrodinámicas (van Suijdam y Metz, 1981; Ayazi-Shamlou et al., 1994; Cui et al., 1997).

El efecto del estrés hidrodinámico sobre la morfología miceliar es de gran importancia debido a la marcada interdependencia entre la morfología, fisiología y productividad (Paul y Thomas, 1996). Así, y dado que la morfología es el resultado final del equilibrio entre la fragmentación (producto del estrés hidrodinámico) y el crecimiento apical del hongo, se presume que sus características -y de manera indirecta la productividad- pueda ser manipulada en función de las condiciones operacionales del biorreactor (Makagiansar et al., 1993).

Diversos parámetros han sido empleados para correlacionar las características morfológicas de los agregados miceliares (longitud ó diámetro promedio, área proyectada, consistencia), con las variables de operación de un biorreactor. Sin duda alguna, el parámetro más utilizado es la potencia volumétrica (P/V). No obstante, su uso es limitado ya que se ha demostrado que la relación obtenida entre morfología y P/V sólo será válida en la escala de trabajo estudiada (Jüsten et al., 1996). En vista de lo anterior, diversos reportes sugieren el uso de la velocidad de disipación de energía ó *EDCF* (energy dissipation/circulation function) para correlacionar la morfología miceliar con las variables de operación de un biorreactor (Amanullah et al., 1999, 2000; Li et al., 2000). El principio de la *EDCF* radica en que la fragmentación (y por lo tanto el tamaño de los agregados) no sólo depende de la energía suministrada, sino también de la frecuencia a la que el micelio está expuesto a un alto nivel de estrés mecánico. Por lo tanto, la *EDCF* puede definirse como un parámetro hidrodinámico empleado para cuantificar la energía entregada al fluido en la zona de los impulsores por unidad de tiempo. Además de las características morfológicas, se ha demostrado que la *EDCF* es capaz de correlacionar otros parámetros biológicos en cultivos sumergidos de *P. chrysogenum*, tales como la velocidad específica de crecimiento (μ) y la productividad específica de penicilina (Smith et al., 1990; Makagiansar et al., 1993; Jüsten et al., 1998).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la velocidad de disipación de energía, y de sus componentes individuales (energía específica de disipación y frecuencia de circulación), sobre el crecimiento, la morfología, la viabilidad y la producción de 6-pentil- α -pirona en cultivos de *T. harzianum*, bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto.

Para lograr el objetivo anterior fue necesario desarrollar un sistema de fermentación (14 L) que permitió evaluar, de manera rigurosa e independiente, los efectos hidrodinámicos de los de oxígeno disuelto, a través de manipular en línea la velocidad de agitación (y por lo tanto el torque) y la composición de los gases (aire y oxígeno) de entrada, respectivamente.

2. Antecedentes

Cultivos miceliares

Los microorganismos miceliares desempeñan un papel de gran importancia en la industria de los bioprocesos para la producción de diversos metabolitos primarios y secundarios como enzimas, antibióticos, ácidos orgánicos, proteínas extracelulares y compuestos de aroma, entre otros (Braun y Vecht-Lifshitz, 1991; Janssens et al., 1992; Papagianni, 2004).

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariotes inferiores, heterótrofos (dependen de fuentes externas de carbono), con reproducción sexual y asexual. De manera general, el micelio está compuesto por filamentos vegetativos ramificados (hifas) de pared celular rígida y gruesa, compuesta a su vez de polisacáridos fibrosos (quitina y β -glucano) y de algunas glicoproteínas que determinan su estructura fibrilar. El crecimiento de las hifas se lleva a cabo en la región apical (puntas). Cuando una nueva punta se forma, ésta crece hasta alcanzar una cierta longitud, produciéndose un septo con poro bloqueado en la parte posterior de la punta, dando origen a una célula sin crecimiento. El resultado neto de la extensión apical es entonces la formación de células no propagativas, las cuales, a su vez, producen vacuolas (incrementándose el tamaño de éstas en función de la distancia con la región apical). Dada su estructura miceliar compleja, de naturaleza pluricelular, existe una amplia distribución de edades celulares respecto a los microorganismos unicelulares. Así, las hifas pueden encontrarse en diferentes estados fisiológicos y mostrar diversas características estructurales, tales como células apicales en crecimiento, regiones vacuolizadas y células metabólicamente inactivas o lisadas (figura 2.1).

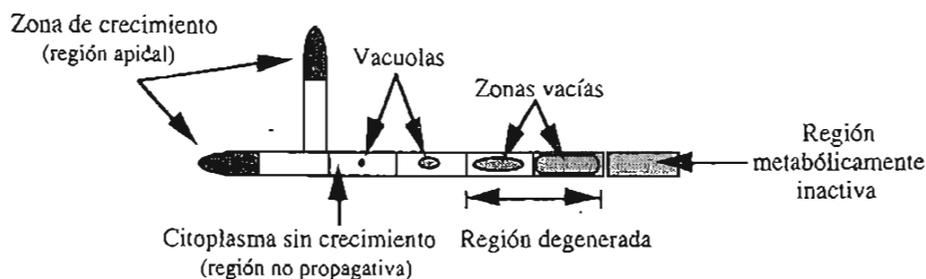


Figura 2.1. Diagrama esquemático de las regiones de crecimiento y diferenciación celular del hongo *Penicillium chrysogenum* (adaptado de Paul y Thomas, 1996).

Las características físicas que presentan los cultivos miceliares son diferentes a las obtenidas por otras formas de crecimiento unicelulares (bacilococos ó levaduras) debido, principalmente, a la gran diversidad morfológica y fisiológica que desarrollan durante su crecimiento. En cultivo sumergido, a nivel macroscópico, los hongos desarrollan dos tipos de morfología extrema: *pellets* o agregados de hifas compactos semiesféricos (en donde las limitaciones difusionales hacia el centro del *pellet* representan la restricción principal de crecimiento) y aquella filamentosa o de micelio disperso.

Crecimiento filamentoso: complejidad y problemática

Los caldos de fermentación son generalmente suspensiones heterogéneas de microorganismos, componentes del medio y diversos metabolitos y/o productos dispersos en un medio de cultivo. A diferencia de otros caldos, las propiedades reológicas de los cultivos filamentosos cambian en función del tiempo debido principalmente al incremento en la masa celular, a los cambios morfológicos de la hifas y a las interacciones entre éstas (Olsvik y Kristiansen, 1994; Riley et al., 2000).

Las hifas, usualmente largas, delgadas y ramificadas, se entrelazan debido a su elevada relación longitud/diámetro, formando así una red tridimensional. El hecho de que estos microorganismos crezcan en forma tan dispersa genera suspensiones altamente viscosas y reológicamente complejas. La mayoría de los caldos miceliares son fluidos pseudo-plásticos (la viscosidad decrece al aumentar el gradiente de deformación), por lo que sus características de flujo cambian en función de la posición que guarden respecto a la zona de los impulsores (región de alta velocidad de deformación). Esto implica que el fluido tendrá una baja viscosidad en las zonas aledañas a los impulsores, producto del esfuerzo y movimiento que éstos ejercen sobre el medio. Por el contrario, en las zona alejadas de éstos (cerca de las paredes del biorreactor), la velocidad de deformación aplicada al fluido será menor, originando un aumento notable en la viscosidad. Lo anterior origina graves problemas de mezclado en el medio, ocasionando la generación de zonas “muertas” o mal mezcladas, la reducción de la transferencia de masa y la formación de gradientes en las concentraciones de nutrientes y de oxígeno disuelto, los cuales se agudizan conforme avanza el proceso (Smith et al., 1990; Nijenow, 1990; Olsvik y Kristiansen, 1994; Cui et al., 1998; Li et al., 2000).

Diversos estudios han demostrado que las propiedades de los caldos miceliarios pueden ser descritas mediante la “Ley de la potencia”:

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (2.1)$$

donde τ es el esfuerzo de corte [Pa], K es el índice de consistencia [Pa·sⁿ], $\dot{\gamma}$ es el gradiente o velocidad de deformación [s⁻¹] y n es el índice de flujo [-]. La característica reológica del fluido puede ser deducida a partir del índice de flujo [pseudoplástico ($n < 1$) o dilatante ($n > 1$)], mientras que la viscosidad aparente del caldo (η_a) puede ser calculada a través de:

$$\eta_a = K\dot{\gamma}_{av}^{n-1} \quad (2.2)$$

donde $\dot{\gamma}_{av}$ es el gradiente de deformación promedio [s⁻¹]. En cultivos miceliarios, y a medida que la concentración de biomasa aumenta, ocurren cambios significativos en los parámetros reológicos K y n . Existen casos extremos donde la concentración celular es tal, que el fluido presenta punto de cedencia (el caldo anexo a la pared del tanque no presenta movimiento alguno). Adicionalmente, las características morfológicas de las hifas y/o agregados también deben ser consideradas en el cálculo de K , ya que se ha observado la influencia de éstas sobre la reología de los caldos (Olsvik y Kristiansen, 1994; Serrano-Carreón et al., 1997; Riley et al., 2000). La siguiente ecuación, propuesta por Riley et al. (2000) utilizando cultivos de *P. chrysogenum*, ejemplifica lo anterior:

$$K = C_m^2 \cdot \left[(D \cdot 5 \times 10^{-3}) - 10^{-3} \right] \quad (2.3)$$

donde C_m es la concentración de biomasa [g/L] y D es la longitud máxima promedio de las hifas ó agregados [μm]. Así, conforme se incrementa la concentración de biomasa, o bien el tamaño del micelio, mayor será K . Por consecuencia, la viscosidad aparente del caldo aumentará (ec. 2.2), favoreciendo la formación de gradientes, la generación de zonas mal mezcladas y la reducción en la transferencia de oxígeno.

Dada la naturaleza aerobia de los hongos filamentosos, la reducción en la transferencia de oxígeno se vuelve un problema complejo y de gran importancia en este tipo de cultivos. Se sabe que a medida que aumenta la viscosidad, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) decrece exponencialmente. En este sentido, Nienow (1984), empleando soluciones de CMC, reporta que el $k_L a$ disminuye en forma proporcional a la raíz cuadrada de la viscosidad y propone la siguiente relación entre el $k_L a$ y las variables de operación:

$$k_L a \propto \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.66} (Q_G)^{0.34} (\eta_o)^{-0.45} \quad (2.4)$$

donde P_g/V es la potencia volumétrica suministrada [kW/m^3] y Q_G es la aireación [vvm]. De acuerdo a lo anterior, un ligero incremento en la viscosidad de los caldos puede originar cambios significativos en el $k_L a$. Por un lado, el $k_L a$ disminuye debido a que el tamaño de burbuja en el medio tiende a incrementarse (la viscosidad favorece la coalescencia entre éstas), además de que la velocidad de ascenso de las burbujas aumenta (debido a un mayor “acanalamiento” en el medio), reduciendo así el área interfacial gas-líquido y el tiempo de contacto entre fases, respectivamente (Vardar-Sukan, 1986). Por otro lado, la aireación provoca mayores caídas de potencia (y por lo tanto un menor suministro de energía) en los fluidos viscosos, respecto a los de baja viscosidad, debido a la formación de cavidades de aire más grandes y estables detrás de las paletas del impulsor (regiones de baja presión).

Nienow y Ulbretch (1985), empleando turbinas Rushton en fluidos viscosos, reportan la formación de cavidades aireadas detrás de las paletas del impulsor, cuya forma y magnitud dependió de las características reológicas y de la hidrodinámica del proceso. Las mayores cavidades se observaron en fluidos pseudoplásticos con punto de cedencia (*i.e.* Carbopol y goma xantana), por lo que la capacidad de bombeo de las turbinas disminuyó a medida que se incrementaron dichas propiedades reológicas. De igual manera, Özcan et al. (1990) observaron que la potencia en fluidos Newtonianos viscosos, bajo condiciones aireadas y utilizando turbinas Rushton, disminuyó hasta alcanzar un valor mínimo. Esta caída coincidió con la formación de cavidades de aire “estables” detrás de las paletas y dependió de las condiciones de operación del sistema (aireación y velocidad de agitación).

En conjunto, todas estas evidencias resaltan las múltiples y complejas relaciones presentes en los cultivos miceliares. Así, y conforme avanza el proceso, la concentración de biomasa y su morfología ejercen un marcado efecto sobre la reología de los caldos. La reología, por su parte, influye significativamente en el desempeño del biorreactor, principalmente en sus características de mezclado, de suministro de energía y de transferencia de oxígeno. Como consecuencia, las condiciones hidrodinámicas y de transferencia de masa y calor cambian en función del tiempo, afectando directamente, y mediante un efecto retroalimentado, el crecimiento, la morfología, la reología y –posiblemente– la productividad. La figura 2.2 resume lo anterior y esquematiza las interacciones presentes en los cultivos filamentosos.

Interacción morfología-hidrodinámica-productividad

Diversos reportes han propuesto que la morfología micelar influye de manera importante sobre la producción de un metabolito dado (Paul y Thomas, 1996; Johansen et al., 1998; Papagianni, 2004). Particularmente, se ha sugerido que los *pellets* favorecen la producción de metabolitos asociados al crecimiento, mientras que el crecimiento filamentososo (debido a una mayor diferenciación celular) favorece la biosíntesis de metabolitos secundarios (Paul et al., 1994; Paul y Thomas, 1996). En este sentido, el crecimiento filamentososo ha sido reportado como favorable para la producción de diversos antibióticos (penicilina), enzimas (pectinasa) y moléculas de aroma (γ -decalactona), entre otros (Makagiansar et al., 1993; Godoy-Silva et al., 1997; Papagianni, 2004). Sin embargo, la diferenciación y el estado fisiológico de las células que llevan a cabo la síntesis de tales metabolitos aún no ha sido bien comprendida.

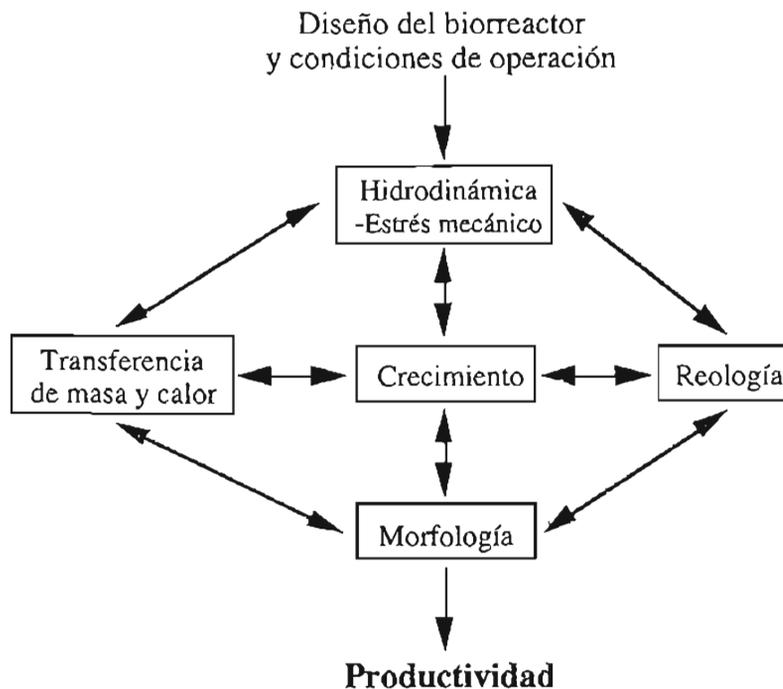


Figura 2.2. Representación global de las interrelaciones entre morfología, crecimiento, reología, hidrodinámica y fenómenos de transferencia de masa y calor, y sus implicaciones sobre la productividad en cultivos miceliales.

Dado que la morfología de los microorganismos filamentosos es el resultado final del equilibrio entre las fuerzas de cohesión y deformación (Braun y Vecht-Lifshitz, 1991), sus características (longitud ó diámetro promedio, área proyectada, consistencia, circularidad),

y en cierto grado la productividad, pueden ser modificadas en función de las condiciones hidrodinámicas aplicadas. Para el caso específico de los tanques agitados mecánicamente, la velocidad de agitación, la geometría de los impulsores y su número determinarán, en gran medida, las condiciones hidrodinámicas y los esfuerzos mecánicos en el biorreactor (Jüsten et al., 1996), influyendo notablemente sobre los bioprocesos miceliares.

Smith et al. (1990) observaron una reducción en la productividad específica de penicilina, así como un decremento en la longitud promedio de las hifas, al incrementar la energía suministrada durante cultivos sumergidos (10 y 100 L) de *P. chrysogenum* empleando tres turbinas Rushton. Un efecto similar fue reportado por Makagiansar et al. (1993) en cultivos de *P. chrysogenum* donde la productividad específica de penicilina y la longitud promedio de las hifas, disminuyeron a velocidades de agitación mayores. Por el contrario, Gómez et al. (1988) reportaron mayores rendimientos de ácido cítrico bajo las condiciones más intensas de agitación (1000 rpm), las cuales a su vez originaron pequeños y compactos *pellets* en cultivos de *A. niger*. En cultivos de *A. awamori* con una turbina Rushton, Johansen et al. (1998) demostraron que la producción de lipasas no fue influenciada por el incremento en la energía suministrada, la cual, sin embargo, redujo notoriamente la longitud promedio de las hifas y la concentración de biomasa. Amanullah et al. (1999), por su parte, no observaron ningún efecto de las condiciones de agitación (550 – 1000 rpm) sobre la producción de proteínas recombinantes (α -amilasa y amiloglucosidasa), a pesar de los evidentes cambios morfológicos durante cultivos continuos (5 L) de *A. oryzae*. En un estudio posterior, y utilizando cultivos alimentados de *A. oryzae*, Amanullah et al. (2002) corroboraron que la reducción del área proyectada promedio (observada en los cultivos desarrollados a las velocidades de agitación más altas) no modificó la producción de amiloglucosidasas. Por otro lado, Paul et al. (1999) y Papagianni et al. (1999) reportaron que las concentraciones más bajas de ácido cítrico (así como los agregados de mayor diámetro) fueron observados bajo las condiciones más suaves de agitación debido, probablemente, a limitaciones difusionales de oxígeno al interior de los agregados de *A. niger*.

De acuerdo a lo anterior, y para cada caso particular, parece existir una correlación entre la morfología desarrollada y la producción de un metabolito dado. No obstante, a la fecha, no existe un entendimiento básico de como la interacción morfología-fisiología-producción es influenciada por las condiciones de operación. Adicionalmente, la estrecha interrelación

presente entre éstos parámetros (figura 2.2.) dificulta el estudio de una variable en particular. En este sentido, y dado que las características morfológicas dependen en gran medida de las condiciones hidrodinámicas presentes, el estudio del efecto del estrés hidrodinámico es de gran importancia.

Sin embargo, resulta difícil evaluar, de manera sistemática, el efecto individual del estrés hidrodinámico sobre el resto de los parámetros del proceso (*i.e.* transferencia de oxígeno). Por un lado, las características hidrodinámicas marcan las condiciones micro-ambientales a las que está expuesto el micelio, además de influir, en conjunto con las propiedades reológicas, sobre los patrones de mezclado y la transferencia de masa (Cui et al., 1998). Por otro lado, debido a su baja solubilidad en agua (de 7 a 10 mg/L; Atkinson y Mavituna, 1983), el oxígeno es generalmente el sustrato limitante en cultivos aerobios, por lo que su disponibilidad depende, principalmente, de la capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor ($k_L a$). No obstante, la transferencia de oxígeno y la homogeneidad se ven drásticamente limitadas conforme avanza el cultivo debido al incremento en la viscosidad de los caldos (Nienow, 1990; Olsvik y Kristiansen, 1994). Para favorecer la transferencia de masa en estos casos, generalmente se incrementa la velocidad de agitación. Sin embargo, esto implica que además de afectar la transferencia de oxígeno, la morfología (y posiblemente la productividad) se modifique debido al cambio en las condiciones hidrodinámicas (Smith et al., 1990; Makagiansar et al., 1993; Jüsten et al., 1998). Lo anterior sugiere que la transferencia de oxígeno debe ser manipulada por estrategias diferentes a la agitación (*v.g.* mediante la manipulación de la composición de los gases de entrada).

Estrés hidrodinámico y mecánica de fluidos: generalidades

El efecto del estrés hidrodinámico sobre las células estará determinado por los esfuerzos de corte y/o deformación presentes durante los cultivos. Cualquier microorganismo colocado en un fluido cuyo movimiento genere gradientes de velocidad, experimentará esfuerzos de corte (*shear stress*) debido a las variaciones irregulares del flujo (Oldshue, 1983). Estrictamente hablando, los esfuerzos de corte (τ) son el resultado de diferencias espaciales de momentum entre las corrientes y/o trayectorias presentes en un fluido en movimiento (Tramper y van 't Riet, 1991). La magnitud de éstos esfuerzos es directamente proporcional al gradiente de deformación del fluido ($\dot{\gamma}$):

$$\tau = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (2.5)$$

donde η (viscosidad) es la constante de proporcionalidad [Pa·s]. Así, conforme aumente el gradiente de deformación (al aumentar la velocidad de agitación), también se incrementará el esfuerzo de corte y, por consecuencia, el efecto del estrés hidrodinámico será mayor.

El tipo de flujo determinará la intensidad de los esfuerzos de corte en un sistema (Joshi et al., 1996). De manera general existen tres tipos de flujo: laminar (los elementos del fluido siguen una línea de corriente o trayectoria de flujo), turbulento (los movimientos del fluido son aleatorios y la velocidad en cualquier punto es función del tiempo) y de transición (combinación entre los mecanismos de régimen laminar y turbulento). Dada la naturaleza aleatoria del flujo turbulento, los gradientes de velocidad (y por lo tanto los esfuerzos de corte) serán mayores en éste que los generados por un flujo laminar. El régimen turbulento es caracterizado por la formación de pequeños remolinos ó *eddies* (movimientos aleatorios del fluido) de diferentes tamaños y contenido de energía, cuyo traslape origina la fluctuación tridimensional de los componentes de la velocidad del flujo (Joshi et al., 1996). Estas fluctuaciones en la velocidad son las responsables de favorecer el transporte de masa, energía y momentum, frecuentemente observados en los sistemas turbulentos. El grado de turbulencia puede ser cuantificado a través del número de Reynolds ó Re (Benzi, 2003), el cual relaciona las fuerzas inerciales presentes con las fuerzas viscosas del fluido:

$$Re = \frac{UL}{\nu} \quad (2.6)$$

donde U y L son la velocidad y escala típica del flujo [m/s] y ν es la viscosidad cinemática del fluido [m²/s]. La mayoría de los flujos presentes en la naturaleza son de tipo turbulento.

El conocimiento del flujo turbulento en un campo tridimensional es muy complicado y, a la fecha, su predicción y/o modelamiento -durante un proceso real- no ha sido posible. La complejidad del estudio de la turbulencia radica en que las fluctuaciones de velocidad afectan notablemente la naturaleza no-lineal de la ecuación de flujo (*i.e.* Navier-Stokes). En este sentido, el valor cuantitativo de la velocidad no sólo cambiará con respecto al movimiento del fluido, sino que además determinará qué tan rápido ocurre dicho cambio (Pope, 2000). Como resultado, se han desarrollado otros métodos para caracterizar la turbulencia, entre los que destaca la teoría de la turbulencia isotrópica propuesta por A.

Kolmogorov en 1941. La idea general de Kolmogorov fue que, a números de Reynolds suficientemente altos (idealmente infinitos) y dentro de un cierto rango, las propiedades estadísticas de la turbulencia (*i.e.* tamaño, velocidad y contenido de energía de los *eddies*) son independientes de las condiciones iniciales y de frontera que originaron el flujo, exhibiendo, por lo tanto, propiedades universales. Así, Kolmogorov visualizó el flujo turbulento como una cascada de energía cinética contenida en grandes e inestables *eddies* primarios (cuyo tamaño es proporcional al diámetro del impulsor), los cuales desaparecen transfiriendo su energía a *eddies* de menor tamaño, y éstos a su vez, a otros más pequeños (terminales), donde ocurre la disipación de energía en forma de calor (Thomas y Zhang, 1998). La amplitud de la cascada de energía estará determinada por el rango de escalas (tamaños de *eddies*) presentes y será función del número de Reynolds (Re).

La teoría de Kolmogorov se basa en tres hipótesis básicas (Pope, 2000). En estas, se señala que, a Re suficientemente altos y dentro de un cierto rango, la distribución estadística de las pequeñas estructuras de flujo (*eddies*) serán localmente isotrópicas (idénticas en todas las direcciones) y homogéneas (las propiedades del flujo no varían respecto a su posición). Por consecuencia, los elementos del fluido presentarán propiedades universales (rango de equilibrio universal) y su distribución estará determinada exclusivamente por la disipación de energía (ϵ) y la viscosidad cinemática (ν) del fluido. El primer parámetro (ϵ) establece la velocidad de transferencia de energía en la cascada, mientras que el segundo (ν) determina la escala (tamaño) en la cual la energía se disipa -en forma de calor- debido a los efectos viscosos. En su última hipótesis, Kolmogorov postuló que la distribución de los elementos del fluido -dentro de la cascada de energía- dependen únicamente de ϵ (y por lo tanto son independientes de la viscosidad), por lo que la cascada (subrango inercial) continuará hasta la escala en donde las fuerzas inerciales de los pequeños *eddies* sean iguales a las fuerzas viscosas del fluido ($Re \approx 1$). A partir de este momento, la energía se disipará en forma de calor y el espectro de energía se ubicará en el rango de disipación.

Con base en un análisis dimensional, Kolmogorov (1941) postuló que la disipación de energía podría expresarse en función de las características individuales de los elementos del fluido presentes en el subrango inercial (cascada de energía), resultando:

$$\epsilon = \frac{u^3}{l} \quad (2.7)$$

donde ε es la velocidad de disipación de energía por unidad de masa [m^2/s^3], mientras que u y l son la velocidad [m/s] y longitud [m] características de los *eddies* en el rango inercial. Como ya se mencionó, la cascada de energía finalizará cuando las fuerzas inerciales sean del mismo orden que las fuerzas viscosas del fluido ($\text{Re} \approx 1$), en este caso:

$$u_d l_d \approx \nu \quad (2.8)$$

donde u_d y l_d son la velocidad [m/s] y longitud [m] características de los *eddies* terminales (escala donde termina el subrango inercial y comienza el rango disipativo); respectivamente. El tamaño de los *eddies* más pequeños (l_d) que pueden formarse en el flujo turbulento está dado por la microescala de Kolmogorov (λ), la cual resulta del análisis dimensional de las ecuaciones 2.7 y 2.8:

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (2.9)$$

Aunque, en realidad, tenemos sistemas quasi estacionarios, con anisotropía en los *eddies* primarios, y con características isotrópicas en un volumen muy limitado (Thomas y Zhang, 1998; Ball, 2004), la microescala de Kolmogorov puede ser utilizada para obtener una aproximación del tamaño de los *eddies* terminales (Croughan et al., 1987; Pope, 2000).

Estrés hidrodinámico en biorreactores

Las condiciones hidrodinámicas generadas durante el cultivo de células en biorreactores pueden afectar tanto a su crecimiento, como al metabolismo celular. Cuando se ejerce algún esfuerzo mecánico sobre la pared o membrana celular, diversos receptores (canales iónicos) específicos se deforman y estimulan una serie de reacciones en cascada que parecen afectar la síntesis de proteínas y RNA (Prokop y Bajpai, 1992; Joshi et al., 1996; Chisti, 2001), originando cambios, generalmente negativos, en el metabolismo celular. A este fenómeno (variación de las respuestas biológicas ante un cierto estímulo mecánico) comúnmente se le denomina estrés hidrodinámico y es particularmente importante en tanques agitados mecánicamente.

La sensibilidad de los microorganismos a los esfuerzos mecánicos estará determinado, principalmente, por el tamaño y las propiedades mecánicas de las células (Tramper y van't

Riet, 1991; Joshi et al., 1996). En este sentido, las células animales son particularmente sensibles a los esfuerzos de corte ya que no poseen pared celular. Por otro lado, el tamaño celular juega un papel primordial respecto a la sensibilidad de las células ante los esfuerzos mecánicos (tabla 2.1). De manera general, mientras mayor sea el tamaño celular, mayor será el daño a la partícula biológica ya que existirá un mayor grado de interacción entre las células y los pequeños remolinos (formados a partir de la turbulencia generada en el tanque de mezclado) conocidos como *eddies*. Los *eddies* son el resultado del flujo turbulento (ver sección anterior) y han sido señalados como los responsables de causar el daño mecánico a las células (Croughan et al., 1987; Ayazi-Shamlou et al., 1994; Thomas y Zhang, 1998; Li et al., 2002). Se postula que el mayor daño a la partícula biológica será ocasionado por *eddies* de un tamaño similar o menor al de la célula, debido a que los *eddies* más grandes llevan a las partículas en un movimiento convectivo. Por su parte, los *eddies* de tamaño comparable o más pequeños pueden actuar, de manera simultánea y con sentidos de rotación opuestos, sobre la superficie de las células, sometiéndolas a gradientes de deformación y, por lo tanto, a esfuerzos de corte (Prokop y Bajpai, 1992; Zhang et al., 1993; Cui et al., 1997). Como consecuencia, la intensidad en la interacción entre el *eddie* y la partícula determinará, en gran medida, el daño celular durante los cultivos.

Para el caso de biorreactores agitados mecánicamente, el tamaño de los *eddies* terminales (escala mínima que presenta flujo turbulento) puede ser calculado de acuerdo a la microescala de Kolmogorov (ec. 2.9), donde ϵ será la energía local suministrada por unidad de masa del líquido [W/kg]. De acuerdo a la microescala de Kolmogorov, conforme se reduzca la energía suministrada (*i.e.* al disminuir la velocidad de agitación o el diámetro de los

Tabla 2.1. Tamaño y sensibilidad de los microorganismos al esfuerzo de corte (adaptado de Tramper y van't Riet, 1991 y Cui et al., 1997).

Microorganismo	Tamaño	Sensibilidad
Bacterias	1 – 10 μm	-
Hongos filamentosos	> 100 μm	++
Células animales	20 μm	++
Células animales en microacarreadores	150 μm	+++
Células vegetales dispersas	100 μm	+
Células vegetales agregadas	> 1 cm	++

impulsores) y/o se incremente la viscosidad del medio, menor será el daño a la partícula biológica ya que el tamaño de los *eddies* se incrementará. Los valores típicos de λ en biorreactores, empleando energías de disipación entre 0.1 y 100 W/kg y agua como fluido, oscilan entre 10 y 50 μm (Cui et al., 1997; Li et al., 2002). Por lo tanto, los sistemas más susceptibles serán aquellos cuyos tamaños oscilen y/o superen dicho rango (tabla 2.1), tales como los hongos filamentosos y las células animales y vegetales ($> 20 \mu\text{m}$).

Diversos estudios con células animales han demostrado que el daño celular (lisis) ocurre cuando el tamaño de los *eddies* terminales (*i.e.* microescala de Kolmogorov) es del mismo orden de magnitud que el de las células. Empleando sistemas capilares, Mc Queen et al. (1987) y Zhang et al. (1993) observaron que la lisis de mielomas e hibridomas suspendidos (ATCC TIB 18, NS1 y TB/C3) ocurrió una vez que la microescala de Kolmogorov fue similar y/o ligeramente menor que el tamaño de las células ($\approx 10 \mu\text{m}$). De acuerdo a Zhang et al. (1993), la diferencia de velocidades entre *eddies* y células originó la deformación superficial de éstas, provocando un aumento en el área superficial y, por consecuencia, en la tensión de membrana. La lisis celular sobrevino una vez que la tensión de membrana sobrepasó un valor crítico (determinado por la propiedades mecánicas de las células), produciéndose la ruptura de las células. Resultados similares fueron reportados en cultivos agitados mecánicamente empleando células crecidas en microacarreadores y en agregados. Croughan et al. (1987) y Moreira et al. (1995), empleando fibroblastos y células de riñón (FS-4, CEF y BHK), observaron que el tamaño de los agregados celulares fue del mismo orden de magnitud que la microescala de Kolmogorov ($\approx 100 \mu\text{m}$) en “spinners” de 250 mL, por lo que el crecimiento de los agregados fue función de las condiciones hidrodinámicas.

Para el caso de cultivos miceliares, van Suijdam y Metz (1981) propusieron, por primera vez y en base a la teoría de la turbulencia isotrópica (Kolmogorov, 1941), que la longitud de las hifas de *P. chrysogenum* podría ser relacionada con el tamaño de los *eddies* generados en un reactor y, por lo tanto, con las condiciones de operación utilizadas. De igual manera, Ayazi-Shamlou et al. (1994) y Cui et al. (1997) reportaron que la fragmentación de las hifas del hongo *P. chrysogenum* fue determinada por la relación entre la longitud promedio de las hifas (L) y los *eddies* más pequeños, cuyo tamaño (*i.e.* microescala de Kolmogorov, λ) fue función de la energía suministrada al sistema. Sin embargo, y contrario a lo observado en diversos estudios con células animales, en ninguno de éstos se reportó una relación entre L

y λ . Una posible razón de lo anterior radica en el uso de las propiedades físicas del agua para estimar a λ (ec. 2.9). La suposición anterior podría ser válida al inicio de los cultivos, o bien cuando los valores de viscosidad y/o densidad no cambien significativamente. Sin embargo, cuando las propiedades reológicas del medio cambian (como en el caso de los cultivos filamentosos), es necesario incluir, en el cálculo de λ , los cambios eventuales en la viscosidad. Asimismo, y como resultado del aumento en la viscosidad, es probable que el suministro de energía (ϵ) disminuya debido a una mayor caída de potencia.

La importancia de incorporar el valor puntual de la viscosidad y de la energía suministrada (*i.e.* medida *in situ*) en λ fue demostrado por Li et al. (2002) en cultivos miceliales de *A. oryzae*. Como resultado directo del incremento en la viscosidad (≈ 1 Pa·s), Li et al. (2002) estimaron incrementos significativos en λ , los cuales alcanzaron valores de hasta 900 μm . De igual manera, Large et al. (1998) reportaron aumentos considerables en λ (de 100 μm a las 0 h hasta 350 μm a las 70 h) debido al incremento en la viscosidad del medio durante cultivos filamentosos de *Streptomyces clavuligerus*.

Estrés hidrodinámico en cultivos miceliales

Dada la marcada diferencia entre los valores típicos de λ y la longitud promedio de las hifas (10–50 vs. 100–300 μm , respectivamente; Ayazi-Shamlou et al., 1994; Cui et al., 1997), los esfuerzos de corte interaccionarán intensamente con la superficie de las hifas, ocasionando su fragmentación. El tamaño de los agregados miceliales será, entonces, el resultado final del equilibrio entre la fragmentación (producto del estrés hidrodinámico) y el crecimiento apical del hongo. Como resultado, se establecerá un diámetro de equilibrio (d_{eq}) cuando los esfuerzos de corte locales sean iguales a las fuerzas tensiles de las hifas [mismas que, de acuerdo a Li et al. (2002), dependen del estado fisiológico y de la composición de la pared celular del hongo]. En este sentido, el uso y desarrollo de técnicas de análisis de imágenes en cultivos miceliales han permitido relacionar, de manera objetiva y rigurosa, las características morfológicas generadas a partir de los esfuerzos mecánicos aplicados. Para el caso específico de los tanques agitados mecánicamente, las propiedades morfológicas serán función de la velocidad de agitación, del número, diámetro y geometría de los impulsores, y de las características del fluido, ya que éstas determinarán las condiciones hidro-dinámicas y los esfuerzos mecánicos presentes en el biorreactor.

De manera general, el aumento en la energía suministrada reducirá el tamaño del micelio ya que se favorecerá la fragmentación de las hifas. Amanullah et al. (1999) reportan una reducción en la longitud total promedio y en el área proyectada promedio de *A. oryzae* al aumentar la velocidad de agitación (y por lo tanto la energía suministrada) de 550 a 1000 rpm (de 2.2 a 12.6 kW/m³) en un biorreactor de 6 L equipado con dos turbinas Rushton. De igual manera, Papagianni et al. (1999) observaron un decremento en el diámetro y longitud promedio de las hifas al incrementar la velocidad de agitación (de 200 a 600 rpm) en cultivos sumergidos (8 L) de *A. niger*. En fermentaciones (6 L) de *A. awamori*, Johansen et al. (1998) reportaron la reducción de la longitud total promedio de las hifas al aumentar la velocidad de agitación —de una turbina Rushton— de 400 a 1100 rpm (de 0.6 a 13 kW/m³). Asimismo, Ayazi-Shamlou et al. (1994) observaron la disminución del tamaño (longitud promedio) de las hifas al incrementar la energía suministrada (1.7 – 33 kW/m³) en cultivos sumergidos (7 y 150 L) de *P. chrysogenum*. Por otro lado, el tamaño de los agregados y/o *pellets* también es influenciado significativamente por la energía suministrada. Paul et al. (1999) observaron la disminución del diámetro equivalente y del área de los agregados de *A. niger* al incrementar la velocidad de agitación (de 500 a 800 rpm) a las 17 h del cultivo. Por su parte, Cui et al. (1997) reportaron la reducción del diámetro promedio de los *pellets* de *A. awamori*, en cultivos realizados en biorreactores de 3 L y con 2 turbinas Rushton, como resultado del aumento en la velocidad de agitación (de 340 a 1050 rpm).

Las características morfológicas de los agregados miceliares (área proyectada promedio, diámetro, longitud y circularidad, entre otros) ha sido correlacionada con diversos parámetros de operación de un biorreactor. Sin duda alguna, el parámetro más utilizado es la potencia volumétrica suministrada ó P/V, la cual también ha sido empleada como criterio de escalamiento en diversos bioprocesos (Charles, 1985). La potencia volumétrica (P/V) supone una disipación homogénea y constante de la energía en todo el tanque e integra en un solo parámetro la velocidad de agitación, el volumen de trabajo, la geometría, el diámetro y el número de impulsores, entre otros. Así, conforme se incrementa la P/V (y por consecuencia los esfuerzos mecánicos que dañan al micelio), el tamaño del agregado disminuye. Este fenómeno ha sido reportado por diversos autores en cultivos de *P. chrysogenum* (Smith et al., 1990; Makagiansar et al., 1993; Ayazi-Shamlou et al., 1994; Jüsten et al., 1998), *A. oryzae* (Amanullah et al., 1999, 2002), *A. awamori* (Cui et al., 1997; Johansen et al., 1998) y *A. niger* (Papagianni et al., 1999; Paul et al., 1999).

Sin embargo, la relación obtenida entre morfología y P/V sólo es válida en la escala de estudio, tal y como lo demostraron Jüsten et al. (1996). En su trabajo, Jüsten et al. (1996) evaluaron el efecto de la energía suministrada sobre el área proyectada promedio de *P. chrysogenum* utilizando tres escalas de trabajo (1.4, 20 y 180 L) y una turbina Rushton. De acuerdo a sus resultados (figura 2.3a), resulta evidente que para cada escala de trabajo existe una correlación particular entre área proyectada y energía suministrada (P/V_L). Lo anterior sugiere un posible efecto del tamaño (volumen) del tanque sobre la disipación de energía y, por lo tanto, sobre las características morfológicas. Resultados similares fueron reportados por Makagiansar et al. (1993) en cultivos de *P. chrysogenum* desarrollados en biorreactores de 5, 100 y 1000 L y equipados con tres turbinas Rushton.

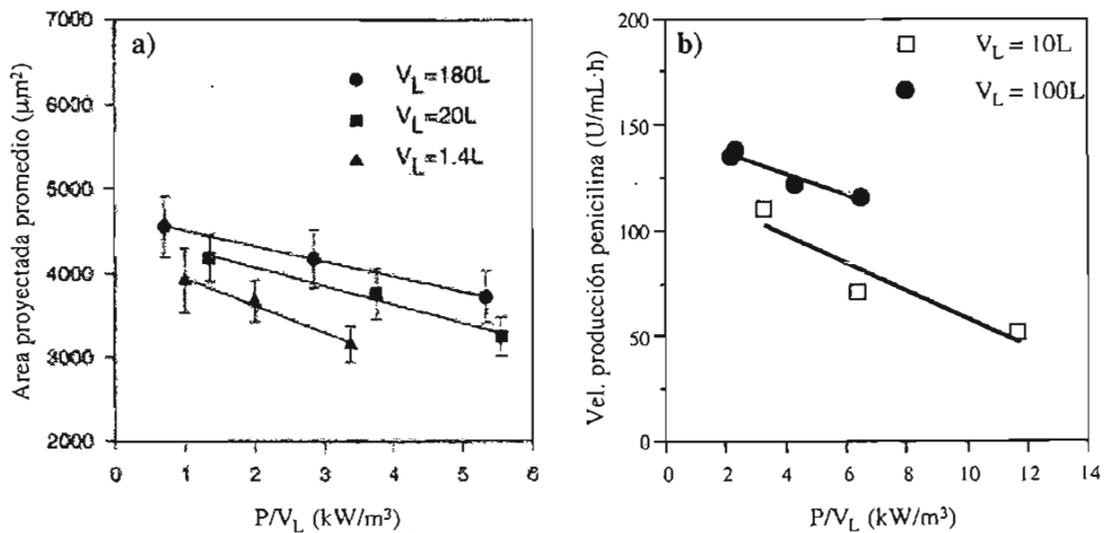


Figura 2.3. Efecto de la potencia volumétrica suministrada (P/V_L) sobre el área proyectada promedio (a) y la velocidad de producción de penicilina (b) en cultivos de *P. chrysogenum* desarrollados a diferentes escalas de trabajo (adaptado de Smith et al., 1990 y Jüsten et al., 1996).

Velocidad de disipación de energía (*EDCF*)

En vista de la limitada relación entre la potencia volumétrica y la morfología observada en las diferentes escalas de trabajo, diversos reportes sugieren el uso de la velocidad de disipación de energía (ó *EDCF*: “energy dissipation/circulation” function) como parámetro hidrodinámico para correlacionar las características morfológicas con las variables de operación de un biorreactor (Smith et al., 1990; Makagiansar et al., 1993; Jüsten et al., 1996, 1998; Amanullah et al., 2000, 2002; Li et al., 2000). Smith et al. (1990) desarrollaron

el concepto de velocidad de disipación de energía (*EDCF*) basados en los trabajos previos de van Suijdam y Metz (1981) y Reuss (1988), quienes propusieron que la fragmentación (y por lo tanto las características morfológicas) dependen de la energía disipada en la región de los impulsores (*i.e.* zona de dispersión de energía) y de la frecuencia de circulación del micelio por dicha zona, respectivamente. No obstante, la función propuesta por Smith et al. (1990) no permitió evaluar el efecto de otros impulsores diferentes a las turbinas Rushton. En estudios posteriores, Jüsten et al. (1996, 1998) modificaron la *EDCF* al incorporar un factor geométrico adicional que permitió evaluar el efecto hidrodinámico de diferentes tipos de impulsores (axiales y radiales), además de incluir –en el cálculo de la frecuencia de circulación– el efecto negativo de la viscosidad sobre el suministro de energía (caídas de potencia). La velocidad de disipación de energía (*EDCF*) esta dada por:

$$EDCF = \left(\frac{P}{k \cdot D^3} \right) \left(\frac{1}{t_c} \right) \quad (2.10)$$

donde $P/k \cdot D^3$ es la energía específica de disipación en la zona de barrido del impulsor [kW/m^3], P es la potencia suministrada [kW], k es una constante que depende de la geometría del impulsor [-], D es el diámetro del impulsor [m] y $1/t_c$ es la frecuencia de circulación del microorganismo por la zona del impulsor [s], definida como:

$$\frac{1}{t_c} = \frac{Fl_G \cdot N \cdot D^3}{V_L} \quad (2.11)$$

donde Fl_G es el número de flujo gaseado [-], N es la velocidad de agitación [rps] y V_L es el volumen del líquido [m^3]. Por lo tanto, el parámetro *EDCF* permitirá cuantificar la energía entregada al fluido en la zona de los impulsores en un tiempo dado. La estrecha correlación observada entre el tamaño micelial y la *EDCF* sugiere que la fragmentación de las hifas no sólo depende de la energía suministrada, sino también de la frecuencia a la que el micelio esta expuesto a un alto nivel de estrés mecánico.

En un estudio muy interesante, Jüsten et al. (1996) demostraron que la morfología micelial de *P. chrysogenum* (área proyectada promedio para agregados y longitud total promedio para micelio disperso) fue función de la *EDCF*, independientemente del nivel o volumen de trabajo utilizado (1.4, 20 y 180 L). La figura 2.4a muestra el efecto de la *EDCF* sobre el área proyectada promedio. Tal y como era de esperarse, el área proyectada disminuyó al

incrementarse la energía suministrada. No obstante, y contrario a lo que sucedió con la P/V , la $EDCF$ correlacionó bien todos los datos experimentales (figura 2.3a vs. 2.4a). El hecho de que el tamaño de los agregados haya disminuido –al aumentar la $EDCF$ – sugiere que el daño mecánico se incrementó conforme aumentó la energía suministrada, o bien cuando el volumen de operación disminuyó ($1/t_c$ se redujo), ya que en ambos casos se favoreció la circulación del micelio por la región de los impulsores (zona de alto estrés mecánico). Así, el micelio estuvo expuesto a diferentes niveles de esfuerzo de corte, cuya intensidad dependió de su posición dentro del tanque y de los tiempos de circulación del fluido. En un estudio similar, Makagiarsar et al. (1993) observaron la reducción de la longitud promedio de las hifas al incrementar la energía suministrada y/o la frecuencia de circulación, por lo que la fragmentación (y por consecuencia el tamaño miceliar) de *P. chrysogenum* fue función de la $EDCF$ bajo las tres escalas de trabajo utilizadas (5, 100 y 1000 L).

Dada la marcada interdependencia entre morfología-fisiología-productividad, y la notoria influencia del estrés hidrodinámico sobre la primera, diferentes grupos han empleado a la $EDCF$ para relacionar otros parámetros biológicos, además de la morfología miceliar, con las condiciones operacionales de un biorreactor. Smith et al. (1990), en cultivos (10 y 100 L) de *P. chrysogenum*, demostraron que la velocidad de producción de penicilina dependió de la escala de trabajo al utilizar como parámetro hidrodinámico la potencia volumétrica

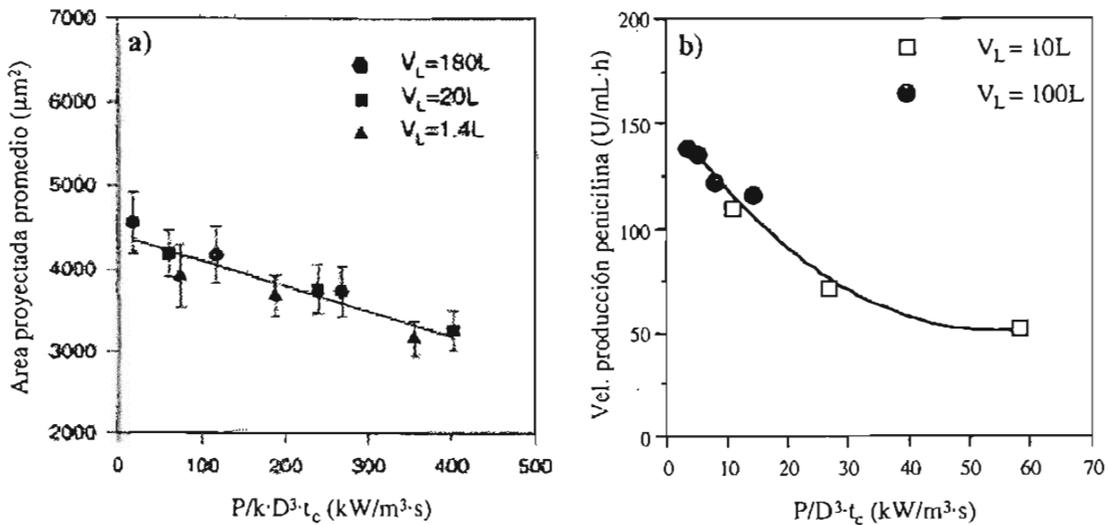


Figura 2.4. Efecto de la velocidad de disipación de energía ($EDCF$) sobre el área proyectada promedio (a) y la velocidad de producción de penicilina (b) en cultivos de *P. chrysogenum* desarrollados a diferentes escalas de trabajo (adaptado de Smith et al., 1990 y Jüsten et al., 1996).

(P/V), pero fue independiente de ésta bajo el criterio de la *EDCF* (figuras 2.3b y 2.4b). Resultados similares fueron reportados por Makagiansar et al. (1993) en cultivos de *P. chrysogenum* donde la longitud promedio de las hifas y la productividad específica de penicilina –producida en biorreactores de 5, 100 y 1000 L- fueron función de la *EDCF*. Por su parte, Jüsten et al. (1998) observaron que, además del área proyectada promedio, la velocidad específica de crecimiento (μ) y la productividad específica de penicilina fueron función de la *EDCF* en cultivos de *P. chrysogenum* desarrollados a diferentes velocidades de agitación y con tres geometrías de impulsores (paletas planas, turbinas Rushton y paletas inclinadas). No obstante, el uso de la *EDCF* para correlacionar la productividad con las condiciones hidrodinámicas es limitado, tal y como lo demostraron Amanullah et al. (1999, 2002) en cultivos continuos y alimentados de *A. oryzae* para la producción de proteínas recombinantes (α -amilasas y amiloglicosidasas). Así, y para cada caso particular, existirá una relación única y específica entre microorganismo y estrés hidrodinámico.

En todos estos estudios, sin embargo, gran parte de los datos reológicos y de potencia (necesarios para calcular la energía específica de disipación y el número de flujo) fueron estimados a partir de datos morfológicos (Jüsten et al., 1998), o bien medidos al final de los cultivos (Amanullah et al., 2002) o en tanques externos al biorreactor y empleando caldos diluidos o agua (Jüsten et al., 1996; Amanullah et al., 1999, 2000). Así, y dado los cambios reológicos presentes en los cultivos miceliares, la medición en línea de la energía específica de disipación (y no su simple estimación) se vuelve un requisito indispensable. En este sentido, lo ideal sería contar con un sistema de medición y control de la energía suministrada (*i.e.* potencia) durante el transcurso de la fermentación. Un sistema con tales características permitiría estudiar, además del efecto global de la *EDCF*, la influencia individual de sus componentes, ya que se podría mantener constante uno de éstos (*i.e.* la energía específica de disipación, $P/k \cdot D^3$) y variar –a través de la geometría- la frecuencia de circulación del micelio por la zona del impulsor ($1/t_c$).

Efecto de la energía suministrada en cultivos de *Trichoderma* sp.

Trichoderma es un hongo filamentoso imperfecto (su ciclo de vida carece de fase sexual), comúnmente encontrado en el suelo y perteneciente al grupo de los Deuteromycetes. Los hongos de éste género son capaces de sintetizar diferentes productos de interés industrial

como enzimas (celulasas, quitinasas, glucanasas, glucosidasas y xilanasas, entre otras), antibióticos (ciclosporina y trichodermina), aromas (6-pentil- α -pirona y γ -decalactona), ácidos orgánicos (ácido cítrico), proteínas extracelulares y, además, han sido empleados como agentes de control biológico (Mukataka et al., 1988; Lejeune y Baron, 1995; Apsite et al., 1998; Serrano-Carréon et al., 1997, 2004; Hjeljord y Tronsmo, 1998; Papagianni, 2004). Dado el crecimiento filamentoso del hongo, los caldos de cultivo pueden presentar serias deficiencias en el mezclado (y, por consecuencia, en la transferencia de masa y calor) durante la fermentación, afectando así la productividad de los bioprocesos.

Los aspectos hidrodinámicos y de transferencia de masa son particularmente importantes en cultivos sumergidos de *Trichoderma* sp., ya que tanto el crecimiento y tamaño micelial, como la producción de diversos metabolitos, dependen de las condiciones ambientales presentes en el biorreactor. En este sentido, varios autores han observado una relación similar, y en forma de campana, entre la productividad (*i.e.* celulasas, glucanasas, xilanasas, quitinasas) y la potencia ó energía suministrada (manipulada generalmente a través de cambios en la velocidad de agitación). La explicación general de éste fenómeno es que el aumento en la velocidad de agitación (y por consecuencia del estrés hidrodinámico) reduce los problemas de limitación por oxígeno, presentes frecuentemente en el interior de los agregados o *pellets*. Sin embargo, el efecto positivo originado al incrementar la velocidad de agitación tiene un límite (determinado principalmente por la sensibilidad del hongo al estrés hidrodinámico) por encima del cual los esfuerzos mecánicos dañan al micelio y, por lo tanto, afectan negativamente la producción del metabolito de interés.

Mukataka et al. (1988), en cultivos (2 L) de *T. reesei* QM 9414 y utilizando 5 velocidades de agitación (de 100 a 500 rpm) para la producción de enzimas y proteínas extracelulares, observaron que para cada metabolito específico existió una condición óptima de agitación. Así, la producción de celulasas, glucosidasas y biomasa fue máxima a 200, 400 y 300 rpm, respectivamente. Por su parte, la proteína extracelular mostró una concentración similar (y máxima) entre 300 y 400 rpm. Los autores sugieren que la pobre producción, observada en los cultivos desarrollados bajo las condiciones de agitación más bajas, se debió a una limitación por oxígeno en los grandes *pellets*, cuyos tamaños oscilaron entre 1 y 2 mm. Velocidades muy altas de agitación, por el contrario, originaron cambios morfológicos importantes (micelio corto y disperso), además de una reducción en la concentración de

biomasa y producto. Lo anterior, según los autores, fue consecuencia del daño micelial generado por el incremento en los esfuerzos de corte en el biorreactor. Observaciones similares fueron hechas por Lejeune y Baron (1995), Marten et al. (1996) y Felse y Panda (2000) en cultivos de *T. reesei* QM 9414, *T. reesei* RUT-C30 y *T. harzianum* NCIM 1185 para la producción de celulasas, xilanasas, quitinasas y proteínas extracelulares (tabla 2.2) en biorreactores de 15, 10 y 2 L, respectivamente. Asimismo, y de acuerdo a Felse y Panda (2000), la energía suministrada puede inducir la diferenciación celular de *T. harzianum* ya que este esporuló (diferenciación celular en hongos que se presenta cuando las condiciones ambientales para su desarrollo no son favorables) durante los cultivos desarrollados a las condiciones más altas de agitación (> 270 rpm).

Por su parte, Godoy-Silva et al. (1997) observaron que, además de la energía suministrada, la hidrodinámica generada por los impulsores influyó notoriamente sobre el crecimiento,

Tabla 2.2. Comparación entre los rangos de energía utilizados y agitación óptima, para la producción de diversos metabolitos de interés en cultivos de *Trichoderma* sp.

Hongo	Metabolito producido	Rango de energía evaluado...			Agitación óptima	Referencia
		Agitación (rpm)	P/V* (kW/m ³)	EDCF* (kW/m ³ .s)		
<i>T. reesei</i>	Celulasas	100 – 500	0.01 – 1.36	0.05 - 32.47	200	Mukataka et al., 1988
	Glucosidasas	“	“	“	400	
	Proteínas	“	“	“	300 - 400	
<i>T. reesei</i>	Celulasas	130 – 400	0.16 – 4.60	1.12 – 100.20	200	Lejeune y Baron, 1995
	Xilanasas	“	“	“	200 – 300	
	Proteínas	“	“	“	200	
<i>T. reesei</i>	Act. celulasa	250 - 550	N.D.	N.D.	550	Marten et al., 1996
<i>T. harzianum</i>	γ-Decalactona	59 - 275	0.056	N.D.	200	Godoy-Silva et al., 1997
<i>T. arzianum</i>	Quitinasas	150 – 300	0.001-0.005	0.003 – 0.051	224	Felse y Panda, 2000
<i>T. harzianum</i>	6-pentil-α-pirona	100 – 300	0.02 – 1.51	N.D.	300	Galindo et al., 2004

* En caso de no ser reportado, se determinó a partir de los datos proporcionados por los autores (velocidad de agitación, volumen de trabajo, diámetro y número de impulsores), asumiendo agua como fluido, una caída de potencia por aireación de 0.5 (Nienow, 1990) y un número de potencia (Po) de 4.52 para turbinas Rushton (Jüsten et al., 1996).

N.D. No determinado debido a la falta de datos para su cálculo.

las características morfológicas y la producción de γ -decalactona (aroma a durazno) por *T. harzianum* en cultivos (10 L) desarrollados a potencias volumétricas iniciales similares (0.056 kW/m^3). Condiciones de bajo estrés mecánico (utilizando un impulsor helicoidal) originaron un mayor crecimiento (y en forma de *pellets*) si se compara con un sistema de alto estrés hidrodinámico (3 turbinas Rushton) en donde se generó micelio disperso. Adicionalmente, la producción de γ -decalactona fue inversamente proporcional a la concentración celular, ya que las máximas productividades fueron logradas empleando las turbinas Rushton, sistema en donde la concentración de biomasa fue menor. Por otro lado, Galindo et al. (2004), en cultivos de *T. harzianum* en matraces (500 mL), observaron una relación -en forma de campana- similar a la observada en biorreactores entre la energía suministrada y la productividad específica de 6-pentil- α -pirona (aroma a coco). La productividad máxima ($0.72 \text{ mg}_{6PP}/\text{g}\cdot\text{h}$) fue obtenida a una P/V de 0.9 kW/m^3 (250 rpm y utilizando 80 mL de medio), mientras que el mayor crecimiento fue reportado a 1.13 kW/m^3 (300 rpm), condición que a su vez presentó el diámetro más pequeño de agregados (0.06 mm).

Con base en lo anterior, *Trichoderma* sp. presentó, al igual que otros hongos filamentosos, un umbral de tolerancia al estrés mecánico (evidenciado por la relación en forma de campana entre la productividad y la energía suministrada). Sin embargo, el rango de energía evaluado en los cultivos de *Trichoderma* ha sido relativamente bajo (tabla 2.2), comparado con otros hongos (*i.e.* de 2.2 a 11.7 kW/m^3 y de 2.2 a 12.6 kW/m^3 en cultivos de *P. chrysogenum* y *A. oryzae*, respectivamente; Smith et al., 1990; Amanullah et al., 1999). Esto sugiere que *Trichoderma* presenta una mayor sensibilidad a los esfuerzos de corte (estrés mecánico), respecto a otros hongos filamentosos frecuentemente utilizados en cultivos sumergidos. Así, el estudio del efecto global del estrés hidrodinámico, a través de la velocidad de disipación de energía, permitirá un mayor entendimiento del fenómeno debido a que los efectos individuales de energía específica suministrada y circulación del micelio por las zonas de los impulsores, serán tomadas en cuenta.

No obstante, resulta indispensable eliminar posibles limitaciones por oxígeno disuelto, especialmente en los cultivos desarrollados bajo las condiciones más pobres de energía, ya que es factible la existencia de limitaciones de oxígeno al interior de los agregados (Mukatana et al., 1988; Lejeune y Baron, 1995; Felse y Panda, 2000; Galindo et al., 2004).

En este sentido, uno de los objetivos del presente trabajo fue la construcción de un sistema de fermentación (10 L) capaz de controlar, de manera individual, la concentración de oxígeno disuelto y la energía suministrada, independientemente de los cambios reológicos y de consumo de oxígeno generados por el crecimiento filamentoso.

Producción de 6-pentil- α -pirona por *Trichoderma* sp.

La 6-pentil- α -pirona (6PP) es una lactona (monoéster cíclico) insaturada, de 10 carbonos, ligeramente hidrofóbica ($\log P = 2.4$) y con aroma característico a coco. Este compuesto es considerado como un agente saborizante no tóxico (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization, JEFCA number: 245), por lo que tiene gran demanda en la industria alimentaria como aditivo “natural” en bebidas, yogurts, panadería y confitería, ya que puede ser producido por métodos biológicos (fermentación). Adicionalmente, estudios recientes destacan la actividad fungicida de la molécula hacia ciertas especies de hongos fitopatógenos (Scarselletti y Faull, 1994) e inclusive hacia la misma cepa de *Trichoderma* (Prapulla et al., 1992). Su producción por hongos del género *Trichoderma* fue reportada inicialmente en 1972 por Collins y Halim, mientras que su ruta biosintética fue propuesta hasta varios años después por Serrano-Carreón (1992). El mecanismo básico de biosíntesis -de ésta y otras lactonas- consiste en una serie de β -oxidaciones sucesivas de hidroxiácidos o de su precursor lipídico (generalmente un ácido graso insaturado ó un cetoácido), hasta obtener un carbono hidroxilado en la posición C₄ ó C₅. Posteriormente, el ciclo se cierra mediante una esterificación interna (lactonización) entre el grupo hidroxilado y el grupo carbonílico de la misma molécula (Serrano-Carreón, 1992).

Diversos trabajos se han realizado con el objetivo de estudiar la producción de 6PP en cultivos sumergidos de *Trichoderma* sp. (Zeppa et al., 1990; Serrano-Carreón et al., 1992; Kalyani et al., 2000; Galindo et al., 2004). Sin embargo, la producción de 6PP mediante procesos fermentativos ha sido limitada debido, principalmente, a la inhibición (toxicidad) que ésta produce sobre el propio hongo productor. Prapulla et al. (1992) observaron que el efecto inhibitorio se presentó cuando la concentración de 6PP en el medio alcanzó de 90 a 110 mg/L durante cultivos de *T. viride*. Serrano-Carreón (1992) y Bonnarne et al. (1997) demostraron los efectos de toxicidad de la 6PP, adicionando diferentes concentraciones de

la molécula en los caldos de cultivo de *T. harzianum* y *T. viride* TSP2, respectivamente. El crecimiento de ambas cepas disminuyó a partir de 100 mg/L y fue totalmente inhibido a concentraciones superiores a 200 mg/L.

La toxicidad de la 6PP tiene una función biológica específica, particularmente útil durante el proceso antagonista de *Trichoderma* contra otros hongos en su hábitat natural. La 6PP ha sido reportada como uno de los principales antibióticos volátiles sintetizados por hongos del género *Trichoderma*, cuya función es la de inhibir y, probablemente, predisponer a las hifas del hospedero para la infección (antibiosis), aún antes de que exista contacto físico entre los microorganismos (Cooney et al., 2000). Se presume que la 6PP se adsorbe a la membrana fungal, formando una barrera impermeable que interfiere con la correcta incorporación de nutrientes hacia el interior de la célula (Scarselletti y Faull, 1994). Como resultado, se ha demostrado que la 6PP tiene un marcado efecto antibiótico sobre diversos hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* (Poole y Whitaker, 1997; Cooney y Lauren, 1999). De hecho, tanto enzimas líticas, como algunos antibióticos volátiles (necesarios para el antagonismo) son sobreproducidos en presencia de las paredes celulares de éstos fitopatógenos (Schirmböck et al., 1994). En este sentido, Cooney y Lauren (1998) y Serrano-Carreón et al. (2004) demostraron que la biosíntesis de 6PP por *T. harzianum* puede ser “elicitada” (inducida) como respuesta a la presencia de los hongos fitopatógenos *B. cinerea* y *R. solani*, respectivamente.

Una buena alternativa para evitar y/o reducir los problemas de toxicidad en este tipo de cultivos son las técnicas de recuperación *in situ* o fermentación extractiva ya que permiten, además de evitar altas concentraciones del producto en la fase acuosa, recuperar *in situ* el metabolito de interés (en el solvente orgánico) conforme es sintetizado. Estas técnicas han sido utilizadas principalmente para la producción de solventes orgánicos (etanol y acetona), ácidos orgánicos (ácido láctico, acético y propiónico), antibióticos (penicilina), vitaminas y aditivos para alimentos (Freeman et al., 1993). Aunque en menor proporción, el uso de la fermentación extractiva también ha sido empleada por algunos autores para incrementar los rendimientos y la productividad de la 6PP en diversos procesos fermentativos.

Prapulla et al. (1992), con el objetivo de reducir el efecto inhibitorio de la 6PP hacia *T. viride*, emplearon una resina hidrofóbica (Amberlita) para la adsorción de la lactona y su

posterior extracción. La producción de 6PP fue 2.75 veces mayor en los cultivos con resina adsorbente (248 mg/L) que sin resina (cultivo control). Por otro lado, Bonnarme et al. (1997) reportaron concentraciones máximas de 303 y 322 mg/L de 6PP en cultivos (5 L) de *T. viride* utilizando ácido ricinoléico y aceite de ricino (ambos al 5 % p/p) como fuentes de carbono y, a su vez, como fases extractivas. Tekin et al. (1995), en sistemas de dos fases (solvente/agua), observaron que el volumen y el tipo del solvente orgánico utilizado (*n*-octano ó diisopropiléter) tuvo un fuerte efecto sobre la biosíntesis de 6PP, alcanzándose concentraciones de hasta 104 mg/L en cultivos de *T. reesei*. Serrano-Carreón et al. (2002), por su parte, evaluaron la compatibilidad de 4 solventes orgánicos (decano, hexadecano, dibutilftalato y dioctilftalato) como sistemas de fermentación extractiva en matraces. Los autores determinaron que el *n*-hexadecano fue el solvente más adecuado ya que fue biocompatible (no tóxico) y, además, generó la mayor producción de 6PP (173 mg/L) en cultivos de *T. harzianum*. Sin embargo, y a pesar de utilizar el mismo medio de extracción, la concentración de 6PP disminuyó drásticamente (83 mg/L) en los cultivos desarrollados en biorreactores (10 L) agitados mecánicamente, lo cual sugiere que las condiciones hidrodinámicas presentes tuvieron un fuerte impacto sobre la producción de 6PP.

A pesar de que la fermentación extractiva ha permitido incrementar la productividad de la 6-pentil- α -pirona (6PP) en diversos procesos, la producción de éste y otros metabolitos en cultivos miceliares depende en gran medida de las condiciones ambientales presentes en el biorreactor. Para el caso específico de *Trichoderma*, el estudio de estos aspectos es de gran importancia, ya que se ha demostrado la presencia de condiciones hidrodinámicas óptimas para el crecimiento y/o la producción de un metabolito dado (evidenciado por la relación en forma de campana entre la productividad y la energía suministrada). Así, el estudio del efecto del estrés hidrodinámico, particularmente evaluado como velocidad de disipación de energía (*EDCF*) es de gran importancia. Sin embargo, y dado la complejidad de los cultivos filamentosos, resulta difícil evaluar, de manera sistemática el efecto individual del estrés hidrodinámico sobre el resto de los parámetros del proceso (*i.e.* transferencia de oxígeno). Por ello, en el presente trabajo se propone estudiar, de manera rigurosa, el efecto de la velocidad de disipación de energía, y de sus componentes individuales (energía específica de disipación y frecuencia de circulación), sobre el crecimiento, morfología, viabilidad y producción de 6-pentil- α -pirona en cultivos de *Trichoderma harzianum*, bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto.

3. Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*) sobre el crecimiento, la morfología, la viabilidad y la producción de 6-pentil- α -pirona por *Trichoderma harzianum*, bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto.

Objetivos específicos

- Implementar un sistema de fermentación que permita evaluar, de manera independiente, los efectos hidrodinámicos de los de oxígeno disuelto.
- Determinar el efecto de la energía específica de disipación sobre el comportamiento cinético, morfológico y de producción de 6-pentil- α -pirona en cultivos de *Trichoderma harzianum*.
- Estudiar el efecto del tiempo de circulación, en cultivos de *Trichoderma harzianum* desarrollados bajo condiciones de energía específica de disipación constante, utilizando dos geometrías de turbinas Rushton.

4. Materiales y métodos

Microorganismo

Se utilizó la cepa *Trichoderma harzianum* var. *rifaii* obtenida, en forma liofilizada, del International Mycological Institute (IMI 206040). El microorganismo liofilizado fue recuperado cultivándolo durante 72 h a 29 °C y 200 rpm en un matraz Erlenmeyer (250 mL) que contenía 50 mL de medio de cultivo líquido constituido por extracto de malta (20 g/L, Bioxon) y dextrosa (10 g/L, J.T. Baker), con un pH de 5.6 y esterilizado previamente en autoclave a 120 °C durante 20 min. Una vez recuperado, el hongo se preservó en tubos de ensayo inclinados (*slants*) con agar papa-dextrosa (PDA, Bioxon) durante 4 días a 29 °C. Posteriormente, los *slants* fueron almacenados a 4 °C y resembrados mensualmente.

Preparación de inóculo

De la cepa preservada, se inoculó aproximadamente 1 cm² del medio sólido con células sobre cajas Petri con medio PDA fresco. Las cajas se incubaron durante 6 días a 29 °C. Dos veces al día y durante 15 min, las cajas se expusieron a la luz para inducir la esporulación. Las esporas obtenidas se recuperaron con 5 mL de solución salina (NaCl 0.9 % y Tween 40 al 0.05 %). El conteo de esporas se llevó a cabo en una cámara de Neubauer, utilizando el objetivo 20 x de un microscopio Nikon Alphaphot (modelo 2452). En todos los casos se utilizó una concentración de 1×10^5 esporas/mL para inocular el biorreactor.

Medio de producción

El medio de cultivo consistió de 80 % v/v de medio rico como fase acuosa (25 g/L, extracto de malta y 12.5 g/L, dextrosa) y 20 % v/v de *n*-hexadecano (Spectrum Chemical Corp., USA) como fase orgánica extrayente. Los componentes del medio rico se disolvieron en agua destilada y se ajustó el pH a 5.6 con ácido fosfórico (0.5 N). Posteriormente se adicionó el *n*-hexadecano y se esterilizó el medio en autoclave a 120 °C por 20 min. Este medio probó ser biocompatible (no tóxico para *T. harzianum*) y, además, generó la mayor producción de 6PP en cultivos sumergidos en matraces (Serrano-Carreón et al., 2002).

Cultivos en biorreactor

Los cultivos se realizaron en un biorreactor de 14 L, modelo MicroFerm (New Brunswick Scientific), ampliamente instrumentado, y con las siguientes características: altura, 45 cm; diámetro interno (T), 21 cm y cuatro mamparas de 2.1 cm (figura 4.1). Se utilizaron dos arreglos de tres turbinas Rushton, con una relación diámetro de impulsor/diámetro de jarra (D/T) de: $1/3$ y $1/2$ (7.4 y 10.45 cm, respectivamente). La separación entre impulsores fue, en todos los casos, de 0.33 el diámetro del tanque (T). Las condiciones iniciales de los cultivos fueron: temperatura, $29\text{ }^{\circ}\text{C}$; aireación, 0.5 vvm ; volumen de trabajo, 10 L y un rango de agitación entre 275 y 660 rpm (ver tabla 5.1 en la siguiente sección). Como difusor se utilizó un “anillo” con 14 orificios de aproximadamente 0.6 mm de diámetro.

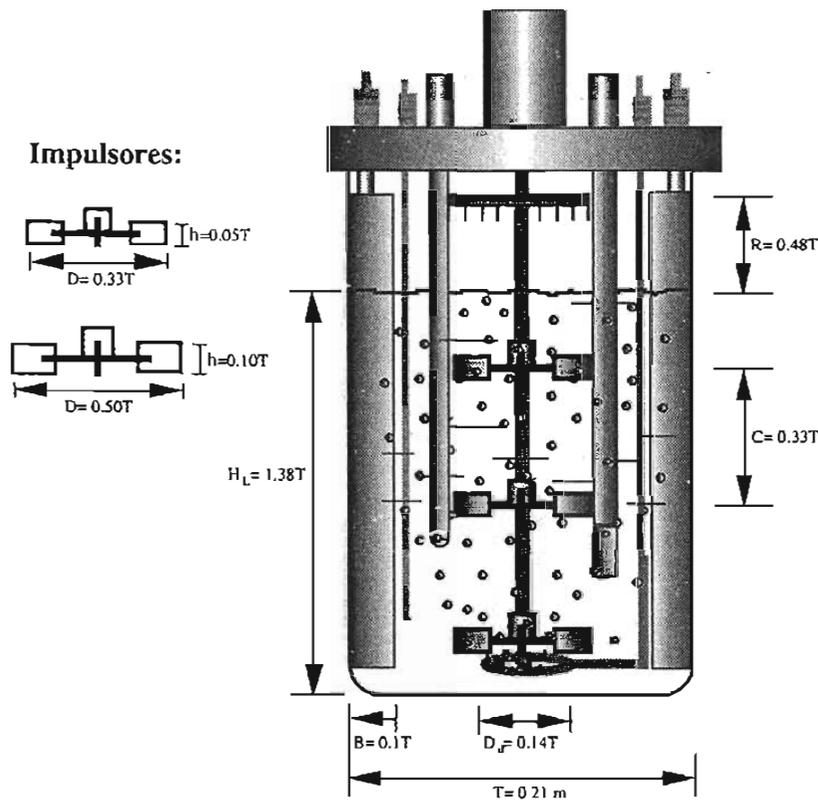


Figura 4.1. Diagrama esquemático del biorreactor y turbinas Rushton empleadas.

El oxígeno disuelto (TOD) y el pH se monitorearon mediante electrodos esterilizables, polarográfico y de cristal, respectivamente (Ingold Electodes Inc., USA) conectados a un amplificador de TOD y a un transmisor/controlador de pH (modelo 170 y 2300). La TOD se mantuvo, en todos los casos, por arriba de 35% mediante un algoritmo convencional PID (proporcional-integral-derivativo). Así, cuando la TOD en el medio disminuyó por

debajo de 35 %, el sistema tomó acción de control, el cual consistió básicamente en manipular la composición de los gases de entrada (aumentando ó disminuyendo los flujos individuales de aire y oxígeno mediante controladores de flujo másico; Brooks Instrument Div.) pero manteniendo el flujo total constante (0.5 vvm). Dado que la TOD se mantuvo independiente de la agitación y aireación, la concentración de oxígeno en el medio no fue influenciada por los cambios reológicos e hidrodinámicos presentes durante los cultivos. El pH, por su parte, se controló a 5.6 ± 0.3 mediante la adición automática de NaOH (0.4 N) con una bomba peristáltica, utilizando un sistema de control “On/Off” (encendido/apagado) del mismo transmisor/controlador. Por otro lado, el control de espuma empleó un sensor de nivel por conductividad, acoplado a un controlador New Brunswick (modelo 2300) que accionó, en caso de ser necesario, el bombeo de una suspensión de antiespumante AF al 20 % (Dow Corning). Adicionalmente, y con el propósito de romper la espuma, se colocó (10 cm por arriba del nivel superior del caldo de cultivo) un rompedor de espuma metálico.

El torque fue medido en línea mediante un torquímetro de celda de carga Himmelstein (S. Himmelstein and Co., modelo 66032) montado sobre la flecha de agitación (figura 4.2). Por su parte, la velocidad de giro de la flecha fue medida a través de un tacómetro. A partir de ambos valores (torque y velocidad de agitación) se calculó el suministro de potencia:

$$P = 2 \cdot \pi \cdot N \cdot (M - M_o) \quad (4.1)$$

donde P es la potencia entregada al caldo de cultivo [W], N es la velocidad de agitación [rps], M es la lectura de torque medida por el torquímetro durante la fermentación [N·m] y M_o es la lectura del torque debido a la fricción del sello mecánico y los rodamientos de la tapa del tanque [N·m]. Esta última se determinó, para cada cultivo, drenando asépticamente el medio de fermentación extractiva y operando el sistema de fermentación “al vacío”, pero a las condiciones reales de operación durante 8 a 10 h. Antes de cada fermentación se calibró estáticamente el torquímetro con la finalidad de obtener una correlación entre el torque impuesto y la señal de los sensores de esfuerzo (obtenida como voltaje) de acuerdo a lo reportado por Godoy-Silva (1998). Además de medir la potencia en línea, el sistema permitió mantener un suministro de potencia constante a través de manipular la velocidad de agitación con un motor de corriente directa acoplado a un tacómetro. Así, en caso de incrementarse el torque durante la fermentación (*i.e.* debido a cambios en la reología del caldo), la velocidad de agitación (N) disminuyó para mantener la potencia suministrada en

el valor preestablecido. Como resultado, el sistema desarrollado permitió, por primera vez, monitorear y a su vez controlar en línea (*in situ*) la energía suministrada en un biorreactor piloto (14 L), independientemente de los cambios reológicos en el medio de fermentación.

La concentración de bióxido de carbono (CO_2) en el gas efluente se monitoreó a través de un analizador de gases (Columbus Instruments International Corp., modelo 180C). El equipo estuvo constituido por una bomba de muestreo, un analizador infrarrojo (modelo 1410) y un convertidor (amperes/volts) del cual salió la señal al sistema de adquisición. Dado que el equipo midió exclusivamente el porcentaje de CO_2 a la salida, fue necesario convertir dicho porcentaje a flujo molar (mediante la ley de los gases ideales) y después integrar (suma de trapecios) el área bajo la curva para obtener la concentración de CO_2 ($\text{mol CO}_2/\text{L}$) durante el cultivo.

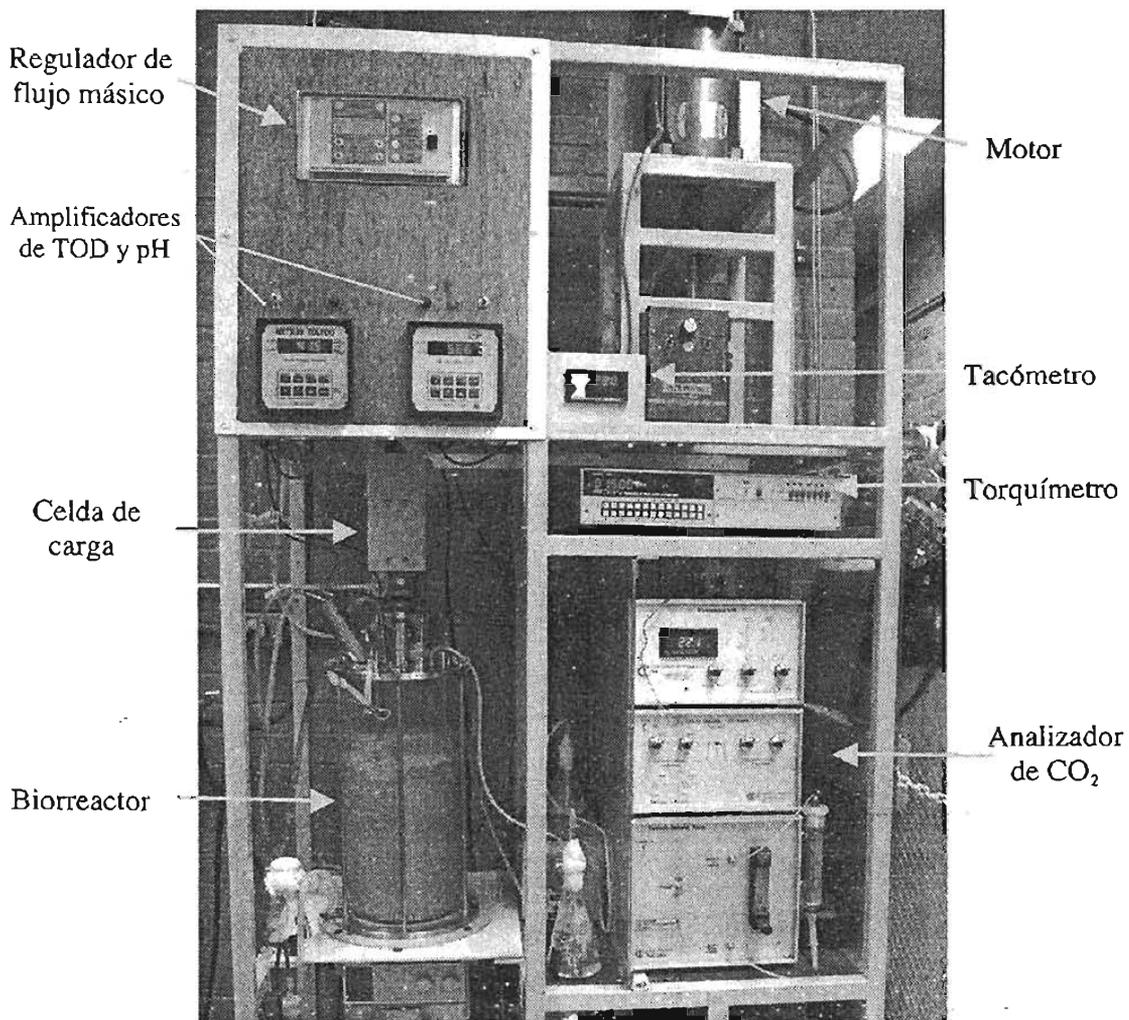


Figura 4.2. Sistema de fermentación desarrollado para evaluar, de manera independiente, los efectos hidrodinámicos y los de oxígeno disuelto.

Las señales amplificadas (electrodos) al igual que la obtenida por el torquímetro, tacómetro y convertidor (analizador de gases) fueron adquiridas y almacenadas en una computadora personal (PC) provista con tarjetas de adquisición de datos (National Instruments, AT-MIO-16XE-50 y PC-AO-2DC). Simultáneamente a la adquisición, las señales fueron desplegadas en línea sobre la pantalla de la computadora durante el proceso. El *software* se escribió utilizando el ambiente *LabView* versión académica y permitió la adquisición, almacenamiento, procesamiento y control de los parámetros previamente mencionados.

Evaluación del crecimiento micelial (biomasa)

El crecimiento micelial se evaluó mediante la determinación gravimétrica de la biomasa (peso seco). Se pesaron aproximadamente 10 g de caldo de cultivo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Beckman JHS2 (rotor JA20). El sobrenadante, compuesto principalmente por *n*-hexadecano ($\rho = 773.4 \text{ g/L}$), fue retirado del medio acuoso. Enseguida, a la muestra con micelio centrifugado se le agregaron 10 mL de solución salina para lavar el micelio (agitando vigorosamente) y se volvió a centrifugar para retirar nuevamente el sobrenadante. Este proceso de lavado se realizó 3 veces para retirar de la muestra la mayor cantidad de solvente. Posteriormente, el micelio se filtró al vacío sobre una membrana (papel filtro Whatman No. 1), previamente tarada. La muestra se secó a 85 °C en un horno (Hoffman-Pinther & Bosworth, modelo HA223) durante 24 h y luego se colocó en un desecador. La concentración de biomasa se calculó mediante la diferencia de peso del papel filtro, y se expresó como gramos de biomasa/litro de caldo de cultivo (g/L).

Determinación de glucosa

Se tomaron 5 mL de muestra y se centrifugó a 3,500 rpm durante 15 min. El solvente se retiró, en medida de lo posible, y se tomó 1 mL de la fase acuosa para colocarla en viales de 1.5 mL. La lectura de la concentración de glucosa (g/L) se realizó en un analizador automático YSI (Yellow Springs Instruments Co., modelo 2700). El analizador cuenta con un sensor que contiene la enzima glucosa-oxidasa inmovilizada en una delgada membrana de policarbonato, la cual, en presencia de oxígeno, oxida la glucosa, dando lugar a:



El H_2O_2 es detectado por una sonda electroquímica, en donde se genera una señal eléctrica que es proporcional a la concentración de glucosa. La calibración del instrumento se corroboró mediante la lectura de una muestra estándar de concentración conocida (10 g/L).

Caracterización morfológica

Las características morfológicas del micelio fueron evaluadas con un sistema de análisis de imágenes. Esto permitió generar información (parámetros morfológicos) del micelio a partir de imágenes procesadas digitalmente. El sistema consistió, básicamente, de una cámara CCD (Nikon Color, KP-D50) montada en un microscopio (Nikon Optiphot-2) o una cámara CCD (Nikon KP-160) montada en un estereomicroscopio (Olympus SZ40). Ambas cámaras estuvieron conectadas a una computadora PC. Las imágenes se capturaron a través del programa comercial *Image Pro Plus* v. 4.1 (Media Cybernetics, USA). La iluminación, el contraste y el enfoque de campo fueron ajustados para mejorar la nitidez de las imágenes obtenidas. Las magnificaciones utilizadas fueron 4 x y 2.5 x en el microscopio (micelio disperso) y estereoscopio (agregados), respectivamente. Los parámetros morfológicos cuantificados fueron el diámetro promedio (determinado a partir del diámetro de las longitudes de una serie de 180 trazos a través del centro de gravedad del micelio) y la porosidad, la cual se definió como: $I - \text{consistencia}$. La consistencia, por su parte, representa la compactibilidad de los agregados y está dada por la relación: $\text{área del objeto} / \text{área total del agregado}$ (estimada en base al perímetro). Se analizaron 300 objetos por muestra. En todos los casos se reporta la mediana ya que fue el parámetro que mejor representó a la distribución de la población micelial (Lucatero et al., 2003; Galindo et al., 2004).

Una muestra de biomasa fresca de 8 mL, previamente centrifugada (3,500 rpm durante 15 min) para remover el solvente, se suspendió con el mismo volumen de solución fijadora de formalina [13 mL de formaldehído (40 % w/v), 5 mL de ácido acético glacial y 200 mL de etanol (50 % w/v); Packer y Thomas, 1990]. Al momento del análisis morfológico, la muestra fijada fue diluida en una proporción 1:5 con agua destilada para evitar que los objetos se sobrepusieran uno encima de otro. Con el fin de producir una coloración oscura del micelio, y así mejorar su visualización en el campo brillante de iluminación, se utilizó el azul de metileno como colorante celular. La suspensión se agitó y se tomó una muestra de 30 μL (empleando puntas de 200 μL con la punta cortada) y se dispersó sobre la

superficie de un portaobjetos, cubriéndolo enseguida con un cubreobjetos. La muestra fue colocada sobre el microscopio y/o estereoscopio y la imagen fue capturada (con la cámara) y subsecuentemente procesada con el programa *Image Pro Plus* (para más información respecto al procesamiento, ver: Lucatero, 2002). En caso de ser necesario, la muestra se humedeció, con agua destilada en las orillas del cubreobjetos, para que no se secase.

Determinación del diámetro crítico de los agregados miceliarios

El tamaño crítico de los agregados (diámetro máximo alcanzable sin que se presenten limitaciones difusionales hacia el interior de los agregados y/o *pellets*) se determinó a través de la ecuación propuesta por Cui et al. (1998):

$$D_{crit} = \sqrt{\frac{24 \cdot C_{O_2} \cdot D_{ef}}{R_{O_2}}} \quad (4.2)$$

donde D_{crit} es el diámetro crítico de los agregados [m], C_{O_2} es la concentración de oxígeno en el seno del líquido [kg_{O_2}/m^3], D_{ef} es la difusión efectiva del oxígeno en los agregados [m^2/s] y R_{O_2} es la velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen [$kg_{O_2}/m^3 \cdot s$]. La concentración de oxígeno se determinó a partir de la lectura del electrodo de oxígeno disuelto sumergido en el medio de cultivo, mientras que D_{ef} se estimó por:

$$D_{ef} = \phi_{O_2} \cdot P \quad (4.3)$$

donde ϕ_{O_2} es el coeficiente de difusión molecular del oxígeno en agua ($9 \times 10^{-6} m^2/h$; Doran, 1995) y P es la porosidad (medida por análisis de imágenes) de los agregados. Por su parte, R_{O_2} se calculó a partir de:

$$R_{O_2} = q_{O_2} \cdot \rho \quad (4.4)$$

donde q_{O_2} es la velocidad específica de consumo de oxígeno [$kg_{O_2}/kg_X \cdot h$] y ρ es la densidad de los agregados [$50 kg_X/m^3$; Cui et al., 1998]. El valor de q_{O_2} se determinó en función de:

$$q_{O_2} = \frac{\mu}{Y_{X/O_2}} \quad (4.5)$$

donde μ es la velocidad específica de crecimiento [h^{-1} ; determinada del modelo logístico] y Y_{X/O_2} es el rendimiento de biomasa en base al oxígeno [$1.0125 kg_X/kg_{O_2}$ para *Trichoderma viride*; Atkinson y Mavituna, 1983].

Es importante mencionar que los valores de CO_2 y P empleados en el cálculo de la D_{crit} (para cada condición evaluada) fueron aquellos que presentaron las mayores restricciones para la transferencia de oxígeno (*i.e.* el valor más bajo de TOD y la porosidad del agregado en ese período del cultivo). El valor de μ se determinó a partir del modelo logístico, utilizando los valores experimentales de biomasa (ver sección: Cálculo de los parámetros cinéticos).

Extracción y cuantificación de la 6-pentil- α -pirona (6PP)

La extracción de la 6PP del caldo de cultivo se realizó mediante un aparato de destilación-extracción diseñado con base en el de Likens-Nickerson (figura 4.3). Se colocaron 20 mL de diclorometano grado cromatográfico (J.T. Baker) en un matraz de fondo redondo de 50 mL (matraz A). Simultáneamente, un volumen conocido de *n*-hexadecano (proveniente del caldo de fermentación) y agua destilada (empleada para aforar a 50 mL el *n*-hexadecano de la muestra) fue depositado en un matraz de fondo redondo de 250 mL (matraz B), junto con 6 perlas de cristal y 1 mL de estándar interno. Se utilizó como estándar interno la γ -undecalactona (Aldrich, USA) en concentraciones de 1000 – 1200 mg/L en diclorometano. Ambos matraces fueron entonces colocados en el aparato de extracción y calentados. El reflujo de ambas ramas del aparato de extracción se mantuvo durante 50 min, apagando posteriormente el calentamiento de la muestra (matraz B) y dejando el reflujo del diclorometano durante 15 minutos más, con el propósito de arrastrar la 6PP presente en las paredes del equipo. El diclorometano se recuperó del matraz A (10 mL) y se concentró 10 veces por medio del burbujeo con nitrógeno (gaseoso) para su posterior análisis.

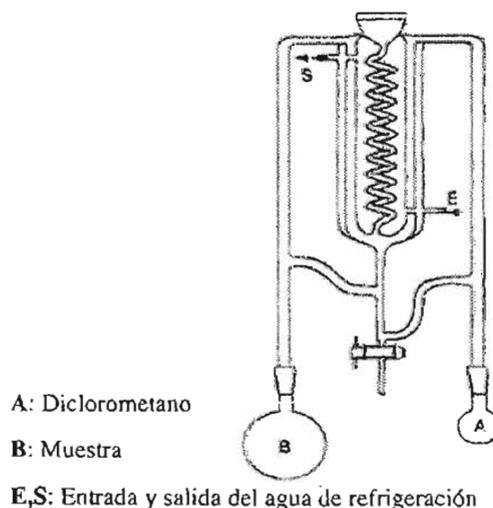


Figura 4.3. Aparato de destilación-extracción empleado para la extracción de la 6PP.

La cuantificación de la 6PP se realizó en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard (modelo 6890) equipado con un detector de ionización de flama y el *software Chemstation*. Para el análisis se inyectó 1 μL de la muestra concentrada, utilizando una jeringa de 10 μL (Hamilton, USA). Se utilizó una columna capilar HP-20 M (fase estacionaria Carbowax 20 M) de 25 m de longitud y 0.32 mm de diámetro interno con helio como gas acarreador. Las condiciones de operación del cromatógrafo se muestran en la tabla 4.1.

La cuantificación de la 6PP se hizo por el método del estándar interno, el cual consiste en relacionar las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma de la mezcla analizada con el área del pico de alguna sustancia de referencia (la cual posee características químicas similares al compuesto analizado) que se separa perfectamente de los demás componentes. La identificación de la 6PP, por su parte, se realizó mediante los tiempos de retención característicos de cada molécula.

Para el cálculo de la concentración de 6PP en el *n*-hexadecano ó fase extrayente $[6PP]_{FE}$ se utilizó la siguiente ecuación:

$$[6PP]_{FE} = \frac{(\text{área de 6PP}) \cdot (\text{concentración del estándar interno}) \cdot K}{(\text{área del estándar interno}) \cdot (\text{volumen de muestra})} \quad (4.6)$$

donde K es una constante (0.9725) calculada de la regresión entre el área de 6PP vs. área de estándar interno para concentraciones iguales de ambas moléculas (Godoy-Silva, 1998).

Tabla 4.1. Condiciones de operación del cromatógrafo de gases Hewlett Packard (6890).

Componentes del sistema	
Inyector:	
Temperatura	200 °C
Columna:	
Inicial	120 °C – 1 min
Incremento	3 °C/min – hasta 200 °C
Limpieza	210 °C – 10 min
Flujo	1.5 mL/min
Detector de ionización de flama:	
Temperatura	250 °C
Gases:	
Aire	350 mL/min
Helio	23 mL/min
Hidrógeno	35 mL/min

Es importante recordar que la 6PP fue extraída exclusivamente del *n*-hexadecano, ya que, y debido a la hidrofobicidad de la molécula, la gran mayoría de 6PP se encontró en la fase extrayente (Serrano-Carreón et al., 2002). Por ello, la concentración global de 6PP [6PP] reportada en el transcurso del presente trabajo fue determinada en base a la concentración de 6PP en el *n*-hexadecano [6PP]_{FE}, y fue definida como el producto de la [6PP]_{FE} por la fracción volumétrica de la fase extrayente, con respecto a la de la muestra total:

$$[6PP] = [6PP]_{FE} \cdot \left[\frac{Vol_{FE}}{Vol_{Tot}} \right] \quad (4.7)$$

Determinación de la viabilidad de *T. harzianum*

La técnica utilizada para cuantificar la viabilidad se basó en la combinación de tinciones fluorescentes y análisis de imágenes establecida previamente por nuestro grupo (Hassan et al., 2002). Como fluorocromo se empleó el diacetato de fluoresceína (FDA; Molecular Probes, USA), el cual, al ser hidrolizado por esterases intracelulares de células viables, produce la fluoresceína (compuesto que exhibe fluorescencia al excitarse a 490 nm). El principio de la técnica radica en el hecho de que sólo células viables con actividad esterase y con una membrana íntegra pueden acumular productos fluorescentes (Breeuwer y Abee, 2000). Células no viables son incapaces de hidrolizar el FDA (por falta de esterases) y/o de retener la fluorescencia (ya que ésta atraviesa la membrana y sale de la célula).

En la técnica de tinción con FDA se utilizó una solución *stock* (1 mg de FDA por mL de acetona), previamente preparada, y una solución fresca de trabajo (10 µL de solución *stock* y 990 µL de agua destilada en un tubo Eppendorff de 1.5 mL de capacidad). De la muestra -previamente centrifugada para remover el *n*-hexadecano del sobrenadante- se tomaron 100 µL (con puntas de 200 µL) y se le adicionaron 300 µL de solución de trabajo en un tubo de 1.5 mL. La muestra se agitó manualmente durante 2.5 min y se colocaron, posteriormente, 200 µL de la muestra teñida en un portaobjetos (cubriéndolo con un cubreobjetos). Se analizaron entre 5 y 6 preparaciones por muestra ya que esta se secó (entre 15 y 20 min).

El sistema de análisis de imágenes fue el mismo que el descrito para la evaluación de la morfología (microscopio óptico Nikon, cámara de video digital y programa *Image Pro Plus*, v. 4.1) con la adición de un sistema de epifluorescencia. Por cada imagen se tomaron

dos fotografías: una con luz visible y otra con luz ultravioleta, de las cuales se cuantificó el área total y la teñida con FDA. La foto con luz visible proporciona el área total de las hifas que conforman la imagen (hifas viables y no viables), mientras que la foto con luz UV proporciona el área teñida con FDA, que corresponde al área metabólicamente activa de las hifas (área viable). La viabilidad micelial fue calculada entonces como la proporción del área teñida con FDA (viable) entre el área total (no fluorescente). El producto se multiplicó por 100 y se reporta como porcentaje de micelio viable (%). Dado que Hassan et al. (2002) reportan un índice de variación máxima del 16 % al procesar 30 juegos de imágenes, en el presente trabajo se adquirieron al menos 35 imágenes por cada muestra del proceso.

Caracterización reológica de los caldos de fermentación

La reología de los caldos miceliares se determinó mediante el uso de un impulsor helicoidal acoplado a un reómetro Contraves Rheomat 120 (Contraves, Zurich, Suiza), el cual estuvo conectado a una computadora PC para la adquisición de datos a través de una interfase GPIB. La adquisición y manejo de datos se realizó mediante el programa de computadora SWR 120, desarrollado por la compañía Mettler-Toledo. El torque máximo de medición y la resolución de torque del equipo fue de 50×10^{-3} y 2.5×10^{-5} N·m, respectivamente. Por su parte, la temperatura de las muestras se controló (29 °C) durante las mediciones por medio de un baño recirculador Contraves rheoterm 115.

El dispositivo helicoidal utilizado (construido *ex profeso*) fue diseñado y caracterizado por Godoy-Silva (1998) y constó de listón de acero inoxidable de 4.7 cm de diámetro doblado en espiral alrededor de un eje. El impulsor helicoidal evitó la sedimentación del micelio y la separación de las fases durante las mediciones reológicas (problemas comúnmente observados en caldos miceliares). El impulsor giró dentro de un recipiente cilíndrico (de 100 mL de volumen) cuya función fue contener y controlar temperatura de la muestra.

Se tomaron 100 mL de medio de cultivo fresco y se colocaron en el recipiente cilíndrico. Se sumergió el impulsor helicoidal en el recipiente y se puso a girar el motor del reómetro a velocidades desde 1 hasta 500 rpm, tomándose la lectura de torque (M) –para cada velocidad de agitación (N)- una vez que se estabilizó el sistema. A partir de los datos brutos del reómetro (M, N y M/N) y de los resultados de calibración del impulsor helicoidal

(Godoy-Silva, 1998), se calcularon los valores del índice de consistencia (K) y del índice de flujo (n) para el modelo de la ley de la potencia mediante la siguiente ecuación:

$$\log\left[\frac{M}{N}\right] = \log\left[\frac{K_p \cdot D^3 \cdot K \cdot K_s^{n-1}}{2\pi}\right] + [n - 1] \cdot \log[N] \quad (4.8)$$

donde M es el torque medido [N·m], N es la velocidad de agitación [rps], K_p es la constante adimensional de potencia de mezclado [434.11], D es el diámetro del impulsor [0.047 m], K es el índice de consistencia [Pa·sⁿ], K_s es la constante de proporcionalidad de Metzner y Otto para el impulsor helicoidal [23.96·(1.136)^{1/n}] y n es el índice de flujo [-]. Como primer paso fue necesario determinar el valor de n, el cual se obtuvo a partir de la pendiente de cada reograma (M/N vs. N) en coordenadas logarítmicas. Una vez determinado n, se calculó K al sustituir la ordenada a! origen en la ecuación 4.8. Es importante mencionar que se utilizaron exclusivamente los datos que estuvieron dentro del régimen laminar (10 ≤ Re).

Los valores de K y n fueron utilizados para ajustar los datos experimentales al modelo de la ley de la potencia (ecuación 2.1 de la sección: Crecimiento filamentoso), el cual ha sido ampliamente utilizado para describir el comportamiento de fluidos pseudoplásticos (la viscosidad aparente disminuye conforme se incrementa el gradiente de deformación):

$$\tau = K\dot{\gamma}^n \quad (2.1)$$

donde τ es el esfuerzo de corte [Pa] y $\dot{\gamma}$ es la velocidad ó gradiente de deformación [s⁻¹]. De acuerdo a la ley de la potencia, la viscosidad aparente [η_a] del fluido puede ser determinada mediante la siguiente ecuación:

$$\eta_a = K\dot{\gamma}_{av}^{n-1} \quad (2.2)$$

donde $\dot{\gamma}_{av}$ es el gradiente de deformación promedio [s⁻¹]. La ecuación anterior asume que el flujo generado por el sistema no es laminar (10 ≤ Re), por lo que se tiene que reemplazar el concepto de gradiente de deformación -que no puede ser calculado rigurosamente- por el gradiente de deformación promedio. En este caso, y de acuerdo a Metzner y Otto (1957), se supone que el flujo alrededor del impulsor se comporta como si *en promedio* tuviese un gradiente de deformación característico, mismo que depende de la velocidad de agitación (N) y de las características geométricas del impulsor (k_s). Como resultado, $\dot{\gamma}_{av}$ es igual a:

$$\dot{\gamma}_{av} = k_s \cdot N \quad (4.9)$$

Cálculo de los parámetros cinéticos

El efecto de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*) sobre el estado metabólico de *T. harzianum* fue evaluado mediante tres parámetros cinéticos: velocidad específica de crecimiento (μ), velocidad específica de consumo de glucosa (q_g) y velocidad específica de producción de CO_2 (q_{CO_2}).

- Crecimiento:

La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó de acuerdo al modelo logístico:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad (4.10)$$

donde dX/dt es la velocidad de crecimiento [g/L·h], X es la concentración de biomasa [g/L] y X_m es la concentración máxima de biomasa [g/L]. La ecuación 4.10 señala que μ será máxima cuando ΔX (X/X_m) se aproxime a cero, lo cual ocurre al inicio de los cultivos (*i.e.* X es mínimo). Este modelo ha sido utilizado por diversos autores (Koch, 1975; Weiss y Ollis, 1980; Serrano-Carreón et al., 1998; Papagianni, 2004) para describir las cinéticas de crecimiento de diversos microorganismos, entre ellos el de hongos filamentosos.

Integrando [para $X_0 = X(t=0)$] y reorganizando la ecuación 4.10 nos queda:

$$\ln \left(\frac{X^*}{1 - X^*} \right) = \mu \cdot t - \ln \left[\left(\frac{X_m}{X_0} \right) - 1 \right] \quad (4.11)$$

donde X^* es (X_t/X_m) y X_0 es el valor de X al tiempo t . Así, μ se determinó de los datos experimentales a partir de la pendiente de $\ln[X^*/1-X^*]$ vs. tiempo. Una vez calculada μ para cada condición estudiada, se modeló el crecimiento miceliar a través de:

$$X(t) = \frac{X_0 \cdot e^{\mu \cdot t}}{1 - \left[\left(\frac{X_0}{X_m} \right) (1 - e^{\mu \cdot t}) \right]} \quad (4.12)$$

- Consumo de glucosa:

Las cinéticas de consumo de glucosa fueron descritas mediante el modelo de Luedeking-Piret, el cual asocia el consumo de un sustrato dado con las etapas de crecimiento de un cultivo en lote (*i.e.* fase de crecimiento y estacionaria). De manera general, la ecuación de Luedeking-Piret para el consumo de glucosa (o de cualquier sustrato) esta dada por:

$$\left(\frac{dS}{dt}\right) = -\left(\frac{1}{Y_{X/S}}\right)\frac{dX}{dt} - (K_e)X \quad (4.13)$$

donde dS/dt es la velocidad de consumo de glucosa [g/L·h], $Y_{X/S}$ es el rendimiento de biomasa en base a glucosa [g_X/g_{gluc}] y K_e es la constante de mantenimiento [g_{gluc}/g_X·h]. La integración de la ecuación 4.13, y la posterior sustitución de la ecuación 4.12 en ésta, genera:

$$S_o - S(t) = \left(\frac{1}{Y_{X/S}}\right)\left\{X - X_o\right\} + (K_e)\frac{X_m}{\mu}\left\{\ln\left[1 - \left(\frac{X_o}{X_m}\right)\left(1 - e^{\mu t}\right)\right]\right\} \quad (4.14)$$

donde S_o es la concentración inicial de glucosa [g/L] y $S(t)$ es la concentración de glucosa al tiempo t [g/L]. Así, $Y_{X/S}$ se determinó de los datos experimentales a partir de la pendiente de $S_o - S(t) - K_e[X_m/\mu]\{\ln[1 - (X_o/X_m)(1 - e^{\mu t})]\}$ vs. $[X - X_o]$; donde el parámetro K_e se evaluó a partir de la velocidad de consumo de sustrato (dS/dt), tomado de la cinética de cultivo en la fase estacionaria:

$$K_e = \frac{\left(\frac{dS}{dt}\right)}{X_m} \quad (4.15)$$

Una vez calculado lo anterior ($Y_{X/S}$, K_e y μ), se modeló el consumo de glucosa a través de:

$$S(t) = S_o - \left(\frac{1}{Y_{X/S}}\right)X_o \left\{ \left[\frac{e^{\mu t}}{1 - \left(\frac{X_o}{X_m}\right)\left[1 - e^{\mu t}\right]}\right] - 1 \right\} - (K_e)\frac{X_m}{\mu}\left\{\ln\left[1 - \left(\frac{X_o}{X_m}\right)\left(1 - e^{\mu t}\right)\right]\right\} \quad (4.16)$$

- Producción de CO₂:

Al igual que en el caso anterior, las cinéticas de formación de producto fueron descritas mediante el modelo de Luedeking-Piret:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (4.17)$$

donde dP/dt es la velocidad de producción de un metabolito dado [g/L·h], α es la constante asociada al crecimiento [g/g] y β es la constante no asociada al crecimiento [g/g·h]. Para la producción de CO₂, la ecuación 4.17 se vuelve:

$$P(t) - P_o = \alpha(X - X_o) + \beta \left(\frac{X_m}{\mu} \right) \left\{ \ln \left[1 - \left(\frac{X_o}{X_m} \right) (1 - e^{\mu t}) \right] \right\} \quad (4.18)$$

donde P_o es la concentración inicial de CO₂ [gco₂/L], P(t) es la concentración de CO₂ al tiempo t [gco₂/L], α es la constante de producción de CO₂ asociada al crecimiento [gco₂/g_X] y β es la constante de producción de CO₂ no asociado al crecimiento [gco₂/g_X·h]. α se determinó entonces de la pendiente de P(t)-P_o- $\beta(X_m/\mu)\{\ln[1-(X_o/X_m)(1-e^{\mu t})]\}$ vs. [X-X_o], y β de la velocidad de producción de CO₂ (dP/dt) en la fase estacionaria:

$$\beta = \frac{\left(\frac{dP}{dt} \right)}{X_m} \quad (4.19)$$

Finalmente (y previa evaluación de los parámetros cinéticos), la producción de CO₂ se modeló utilizando la siguiente ecuación:

$$P(t) = P_o + \alpha X_o \left\{ \left[\frac{e^{\mu t}}{1 - \left[\left(\frac{X_o}{X_m} \right) (1 - e^{\mu t}) \right]} \right] - 1 \right\} + \beta \left(\frac{X_m}{\mu} \right) \left\{ \ln \left[1 - \left(\frac{X_o}{X_m} \right) (1 - e^{\mu t}) \right] \right\} \quad (4.20)$$

Tanto la velocidad específica de consumo de glucosa (q_g), como la velocidad específica de producción de CO_2 (q_{CO_2}), en la fase de crecimiento (etapa en donde las diferencias entre cultivos fueron más significativas), fueron determinadas a partir de μ y de los parámetros asociados al crecimiento ($Y_{X/S}$ y α_{CO_2}). Así, q_g fue el resultado de la relación entre μ y $Y_{X/S}$ ($\mu / Y_{X/S}$), mientras que q_{CO_2} fue el producto de μ por α_{CO_2} ($\mu \times \alpha_{\text{CO}_2}$). Los valores de μ , q_g , q_{CO_2} , $Y_{X/S}$ y α_{CO_2} fueron calculados para las condiciones estudiadas, a partir de los datos experimentales (anexo 4).

Las cinéticas de producción de 6PP, por su parte, no fueron descritas mediante el modelo de Luedeking-Piret ya que la concentración de 6PP -en los cultivos con mayor producción- disminuyó notablemente hacia el final de la fermentación (*i.e.* después de las 120 h).

Validación estadística

Para validar, estadísticamente, el efecto de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*) sobre las variables estudiadas [velocidad específica de crecimiento (μ), diámetro promedio de los agregados (ϕ), velocidad específica de consumo de glucosa (q_{gluc}) y velocidad específica de producción de CO_2 (q_{CO_2})], se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la significancia de la pendiente de un modelo lineal obtenida por mínimos cuadrados (Zar, 1999). En este caso, la hipótesis nula (H_0) fue que la pendiente fue independiente de la *EDCF* ($H_0: \beta = 0$). En caso contrario ($H_A: \beta \neq 0$), las variables estudiadas dependieron del valor de la *EDCF*. En todos los casos el valor crítico de "F" fue de 10.1 ($F_{0.05(1),1,3}$; Zar, 1999).

5. Estrategia experimental

Dado que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto individual de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*), el primer paso consistió en implementar un sistema de fermentación que permitió, además de evitar posibles limitaciones por oxígeno, mantener un suministro de energía (potencia) constante durante el transcurso de los cultivos. Para esto, a un fermentador de 14 L (10 L de trabajo) se le implementó un sistema de control de oxígeno disuelto mediante el cual fue posible manipular la composición de los gases de entrada (*i.e.* aumentando ó disminuyendo los flujos individuales de aire y oxígeno a través de controladores de flujo másico) en función de los requerimientos nutricionales del microorganismo. El consumo de potencia, por su parte, se mantuvo en un valor preestablecido al medir y manipular en línea el valor del torque (medido con un torquímetro de celda de carga), mediante cambios en la velocidad de agitación con un motor de corriente directa. Así, por primera vez en un biorreactor piloto, la potencia suministrada, y en consecuencia la energía específica de disipación en la zona de barrido del impulsor ($P/k \cdot D^3$), pudo ser monitoreada y controlada en línea (*in situ*) a un valor preestablecido.

Una vez concluida la implementación del sistema de control de oxígeno y potencia en el biorreactor, el sistema de fermentación se validó al desarrollar cultivos de *T. harzianum* empleando un medio de cultivo rico, favoreciendo así el crecimiento miceliar. El efecto de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*) se determinó, posteriormente, en cultivos de *T. harzianum* desarrollados bajo condiciones de energía de disipación constante. La tabla 5.1 muestra las condiciones iniciales de operación, las cuales se determinaron a partir de curvas de potencia y de las caídas de potencia (debido a la aireación) empleando dos arreglos de tres turbinas Rushton ($D/T = 1/3$ y $1/2$). La parte superior de la tabla (números romanos) indica las condiciones desarrolladas a energía específica de disipación constante ($P/k \cdot D^3$) donde se evaluó el efecto de los componentes de la *EDCF*. De manera general, el efecto del tiempo de circulación se determinó al mantener constante la energía de disipación, pero modificando el diámetro de impulsor (experimentos I-III y II-IV). Por su parte, el efecto de la energía de disipación se evaluó al realizar cultivos, con dos diferentes diámetros de impulsores, a tiempos de circulación iniciales similares (experimentos III-V). Finalmente, ambos parámetros se integraron para estimar el efecto global de la *EDCF* sobre el comportamiento cinético, morfológico y de producción de 6PP por *T. harzianum*.

Por otro lado, la tabla inferior (experimentos 6-8; números arábigos) señala las condiciones de las fermentaciones extractivas desarrolladas por Serrano-Carreón et al. (2002) y Estrada (2003), las cuales se emplearon para generar un mayor número de puntos experimentales en la zona de interés en relación a la productividad específica de 6PP. En este sentido, y dado el antecedente de una posible relación en forma de campana entre la productividad y la energía suministrada (Galindo et al., 2004), el uso de éstos datos permitirá una mayor certidumbre respecto al efecto de la *EDCF* sobre la producción de 6PP. Es importante señalar que en los trabajos de Serrano-Carreón et al. (2002) y Estrada (2003) se utilizaron los mismos impulsores ($D/T = 1/3$), cepa, protocolo y medio extractivo (*n*-hexadecano) que en el presente estudio. Asimismo, sus cultivos se desarrollaron en fermentadores similares (14 L MicroFerm), los cuales, sin embargo, se montaron en el sistema convencional del equipo (*i.e.* sin medición de torque); por lo que las potencias suministradas -mostradas en la tabla 5.1- fueron calculadas en base a las curvas de potencia del presente trabajo.

Tabla 5.1. Condiciones iniciales de operación en los cultivos de *T. harzianum*.

Experimento	D/T	N (rpm)	P/V (W/L)	P/k·D ³ (kW/m ³)	t _c (s)	EDCF (kW/m ³ ·s)	Símbolo
I	1/3	275	0.155	11.4	3.6	3.2	□
II	1/3	350	0.302	22.3	3.0	7.4	○
III	1/2	230	0.604	11.2	1.2	9.5	■
IV	1/2	292	1.199	22.2	0.9	23.9	●
V	1/3	660	2.025	149.5	1.6	95.9	△
6 ^A	1/3	200	0.08	5.9	4.4	1.3	◇
7 ^B	1/3	400	0.40	29.5	2.8	10.6	◇
8 ^B	1/3	500	0.80	59.1	2.2	26.7	◇

^A Serrano-Carreón et al. (2002)

^B Estrada (2003)

Los símbolos abiertos y cerrados representan los cultivos desarrollados con impulsores cuya relación D/T fue de 1/3 y 1/2, respectivamente. Los cuadrados son los cultivos que se llevaron a cabo a una P/k·D³ -constante- de 11.3 kW/m³, mientras que los círculos se desarrollaron a ≈ 22.2 kW/m³. El triángulo, por su parte, representa la condición más alta de *EDCF*, mientras que los rombos forman parte de los cultivos desarrollados por Serrano-Carreón et al. (2003) y Estrada (2003) utilizando impulsores con una relación (D/T) de 1/3.

6. Resultados y discusión

Evaluación del sistema de fermentación

Para evaluar el funcionamiento del sistema de fermentación se desarrollaron cultivos de *T. harzianum* empleando un medio de cultivo rico. El medio rico (glucosa 50 g/L y extracto de levadura 25 g/L) se utilizó con la finalidad de favorecer el crecimiento rápido del microorganismo. Así, la concentración de biomasa, la reología y el consumo de oxígeno (figura 6.1) cambiaron drásticamente durante el transcurso del cultivo.

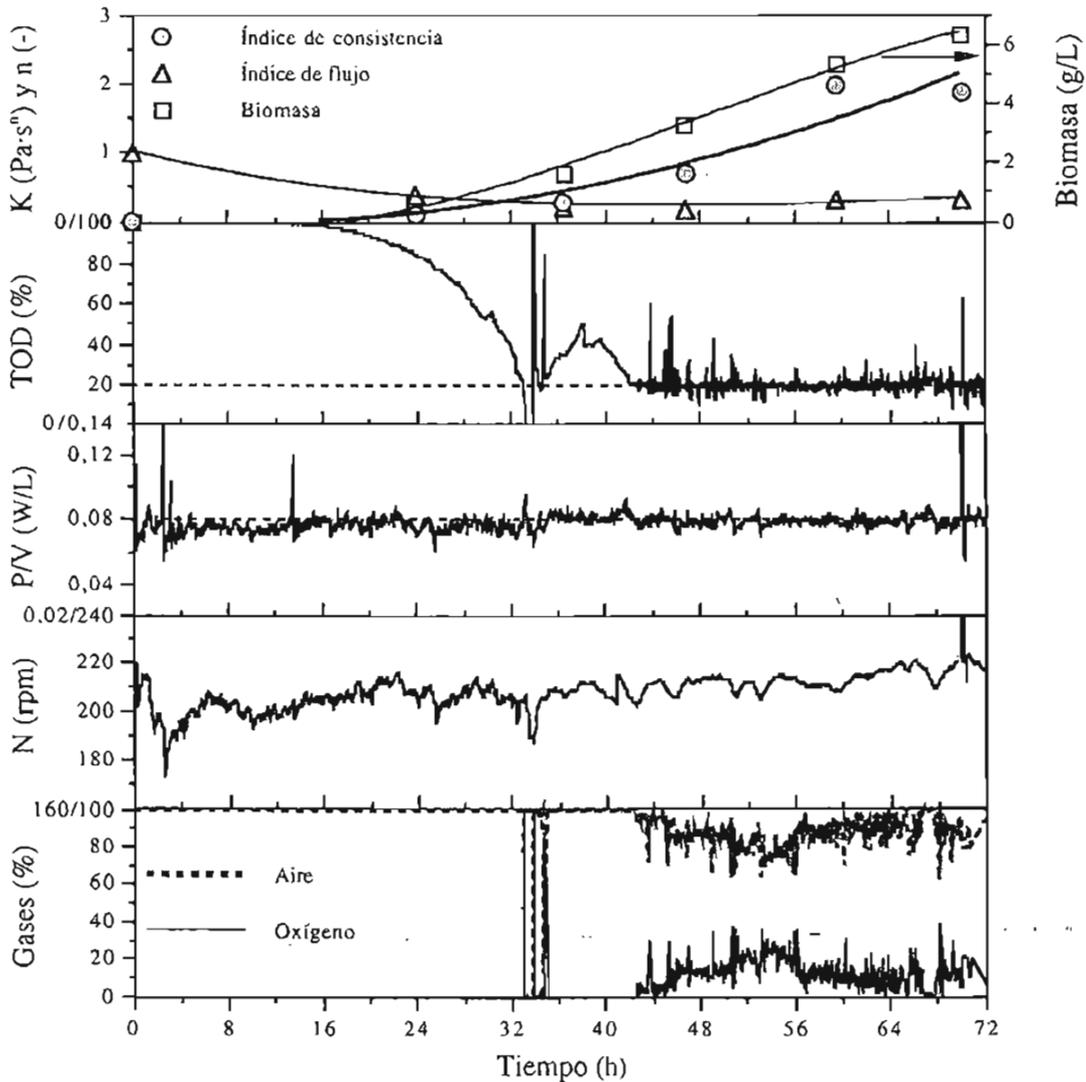


Figura 6.1. Evolución de biomasa, índice de flujo (n) y de consistencia (K), tensión de oxígeno disuelto (TOD), potencia volumétrica (P/V), velocidad de agitación (N) y flujo de gases en un cultivo de *T. harzianum* utilizando un medio rico.

La figura 6.1 muestra la evolución del cultivo desarrollado (en el medio de cultivo rico) a 0.08 W/L con tres turbinas Rushton ($D/T = 1/3$) y una aireación de 1 vvm. Dado que el control de la TOD se empleará como herramienta para evitar limitaciones por oxígeno, la TOD se controló (variando la composición de aire y oxígeno en el gas alimentado) hasta que su valor disminuyó por debajo del valor preestablecido (*set point*), el cual se fijó en 20 % (línea punteada). La P/V permaneció en un valor aproximado de 0.08 W/L a través de manipular la velocidad de agitación durante el transcurso de la fermentación.

La fase de crecimiento inició a las 24 h, alcanzando una concentración máxima de biomasa de 6.3 g/L a las 70 h. El medio de cultivo mostró un comportamiento no-Newtoniano, con características pseudoplásticas ($n < 1$), donde el índice de consistencia se incrementó hasta 1.9 Pa·s conforme aumentó la concentración de biomasa. Por su parte, el índice de flujo permaneció relativamente constante (≈ 0.3) después de las 36 h. A pesar de los cambios reológicos, tanto la potencia volumétrica como la TOD se controlaron en los valores preestablecidos (0.08 W/L y 20 %) a partir de las 0 y 42 h, respectivamente. En el período entre 33 y 34 h, el sistema no tomó acción de control para la TOD debido a una falla en el suministro eléctrico al equipo. No obstante, una vez corregido el problema (y cuando el proceso lo requirió), la TOD se controló en el *set point* deseado. De acuerdo al flujo de gases, el mayor consumo de oxígeno ocurrió en la fase de crecimiento (42 - 56 h).

La velocidad de agitación se incrementó ligeramente hacia el final del cultivo. Dado que la potencia suministrada permaneció relativamente constante, y recordando que $P = 2 \cdot \pi \cdot N \cdot M$, es probable que el torque (M) haya disminuido como consecuencia de una mayor caída de potencia (producto del aumento en la viscosidad del caldo). Diversos autores (Galindo et al., 1988; Özcan et al., 1990) han reportado la formación de cavidades de aire (detrás de las paletas del impulsor) más grandes y estables en medios viscosos, respecto a los de baja viscosidad, por lo que las caídas de potencia en éstos son mayores. Este punto se discutirá con mayor detalle en la sección "Comportamiento de la EDCF".

Se puede concluir que el sistema de fermentación permitió controlar efectivamente, y de manera individual, la concentración de oxígeno disuelto y la energía suministrada, independientemente de los cambios reológicos y de consumo de oxígeno generados por el crecimiento filamentoso, una vez que sus valores cambiaron del *set point* deseado.

Comportamiento de la EDCF en cultivos de *T. harzianum*

La velocidad de disipación de energía (EDCF) a lo largo del tiempo de cultivo se determinó a partir de calcular sus dos componentes: la energía específica de disipación en la zona de barrido del impulsor ($P/k \cdot D^3$) y el tiempo de circulación (t_c) del microorganismo por las zonas de los impulsores. La energía específica de disipación se determinó a partir de las mediciones de potencia suministrada, mientras que el tiempo de circulación se estimó de las caídas de potencia y de la velocidad de agitación medidas, ambas, en línea (ver anexo 1).

De acuerdo a la estrategia experimental (tabla 5.1), se desarrollaron cultivos bajo cinco condiciones de energía de disipación constante. En el anexo 2 se muestran las cinéticas de los cultivos, así como la evolución de la $P/k \cdot D^3$ y la velocidad de agitación. De manera global, la figura 6.2 muestra el control de la potencia volumétrica y su desenvolvimiento correspondiente, en términos de $P/k \cdot D^3$. Los cultivos se desarrollaron bajo un suministro prácticamente constante de energía, donde las fluctuaciones observadas fueron producto, principalmente, del muestreo (*i.e.* cada 24 h).

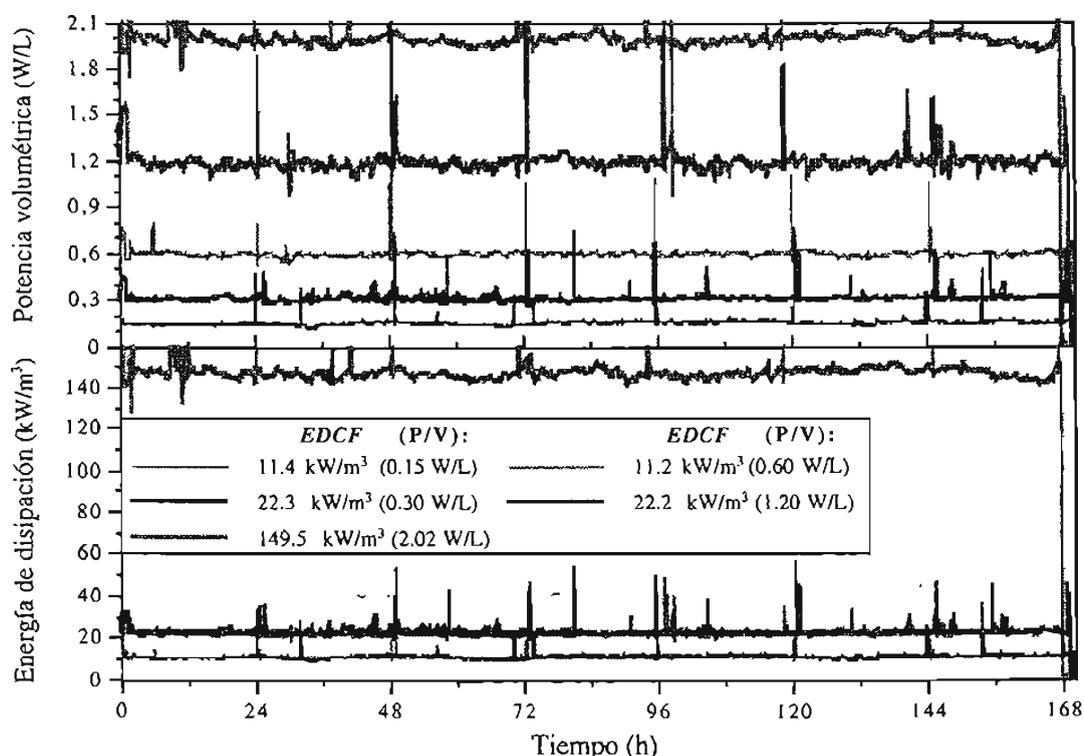


Figura 6.2. Control de la potencia volumétrica (0.15, 0.3, 0.6, 1.2 y 2.0 W/L) y evolución de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$) durante los cultivos de *T. harzianum* desarrollados en un medio de fermentación extractiva.

A pesar de las diferencias entre potencias volumétricas (*i.e.* 0.15 y 0.6 W/L), las energías de disipación fueron similares ($P/k \cdot D^3 \approx 11.3 \text{ kW/m}^3$), tal y como se planteó en la estrategia experimental. El hecho de igualar la energía específica de disipación entre cultivos asegura la misma disipación de energía en la zona de los impulsores (región de mayor estrés hidrodinámico). Como resultado, los microorganismos estarán sometidos a los mismos esfuerzos máximos de deformación (responsables del daño mecánico). En este sentido, se ha demostrado que la energía de disipación máxima (ϵ_{max}), entregada en la región de los impulsores, puede ser desde 20 hasta 100 veces mayor que la energía volumétrica global (P/V), ya que esta última asume una disipación homogénea y constante de energía en todo el tanque (Zhou y Kresta, 1998; Büchs y Zoels, 2001). En nuestro caso particular, la $P/k \cdot D^3$ (energía específica de disipación) fue al menos 18.5 veces mayor que la P/V y llegó a ser, de hecho, hasta de 76 veces más en el cultivo a 0.15 W/L. Así, el uso de la $P/k \cdot D^3$ permite una comparación más estricta, en relación a los efectos del estrés hidrodinámico, sobre los cultivos desarrollados en tanques agitados mecánicamente.

La figura 6.3 muestra el comportamiento del tiempo de circulación (inverso de la frecuencia de circulación) durante los cultivos desarrollados a $P/k \cdot D^3$ constante. El t_c fue estimado cada 24 h a partir de las caídas de potencia y velocidad de agitación medidas en línea (ver anexo 1). De manera general, el t_c se incrementó debido al aumento en la viscosidad generada por el crecimiento miceliar. El incremento en la viscosidad de los caldos generó una mayor resistencia al flujo, particularmente en los cultivos desarrollados

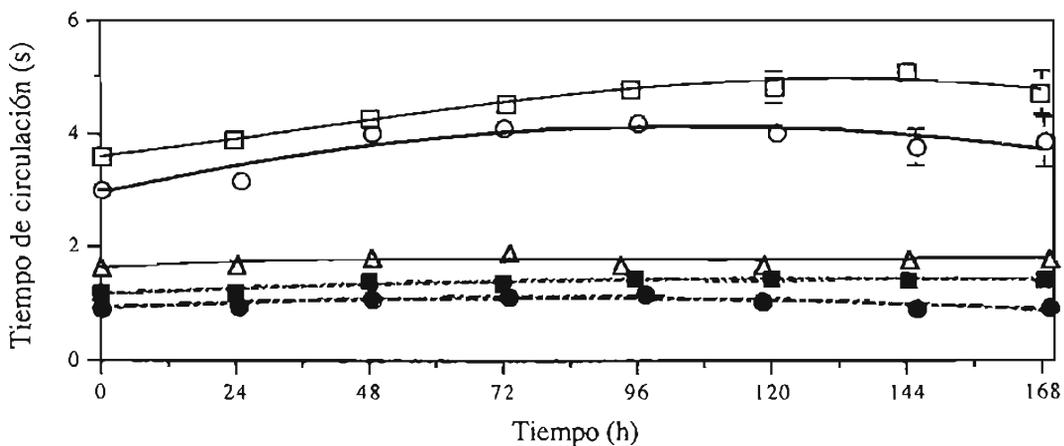


Figura 6.3. Evolución del tiempo de circulación (t_c) durante los cultivos de *T. harzianum* desarrollados a $P/k \cdot D^3$ constante en un medio de fermentación extractiva: □, 11.4 kW/m³ (D/T= 1/3); ■, 11.2 kW/m³ (D/T= 1/2); ○, 22.3 kW/m³ (D/T= 1/3); ●, 22.2 kW/m³ (D/T= 1/2) y △, 149.5 kW/m³ (D/T= 1/3).

a 11.4 y 22.3 kW/m³ (D/T = 1/3; *i.e.* símbolos abiertos), reduciendo por consecuencia la circulación del microorganismo en el seno del líquido. Así, a las 96 h, los t_c estimados en éstos cultivos (11.4 y 22.3 kW/m³) se incrementaron de 3.6 y 3.0 seg hasta 4.8 y 4.2 seg, respectivamente. Por otro lado, resulta evidente que los tiempos de circulación en los cultivos que se desarrollaron con impulsores de mayor diámetro (D/T= 1/2) fueron más cortos, en relación con aquellos que utilizaron impulsores pequeños (D/T= 1/3), a pesar de ser desarrollados a la misma $P/k \cdot D^3$ (cuadros llenos vs. cuadros abiertos). Esto se debió a que, conforme aumentó el tamaño de los impulsores, éstos ocuparon un mayor volumen dentro del tanque, incrementando así la frecuencia de circulación del micelio por esa zona.

Es importante recordar que la estimación de los t_c se llevó a cabo con base en mediciones *in situ* de la potencia suministrada. Reportes previos han estimado tanto al t_c , como a $P/k \cdot D^3$ a partir de datos reológicos y de potencia inferidos de datos morfológicos (Jüsten et al., 1998), o bien medidos al final de los cultivos (Amanullah et al., 2002) o en tanques externos al biorreactor y empleando caldos diluidos ó agua (Jüsten et al., 1996; Amanullah et al., 1999, 2000). En consecuencia, los valores estimados (específicamente durante el transcurso de los cultivos) podrían no ser representativos del proceso real. A diferencia de lo anterior, el sistema de fermentación desarrollado permitió una estimación más representativa del t_c ya que incorporó, mediante la medición *in situ* de las caídas de potencia, el efecto originado por los cambios reológicos presentes durante los cultivos filamentosos. Lo anterior se ejemplifica en la figura 6.4, donde se muestran las caídas de potencia (P_g/P) medidas por el torquímetro, en función del índice de consistencia (K) desarrollado durante los cultivos de *T. harzianum*.

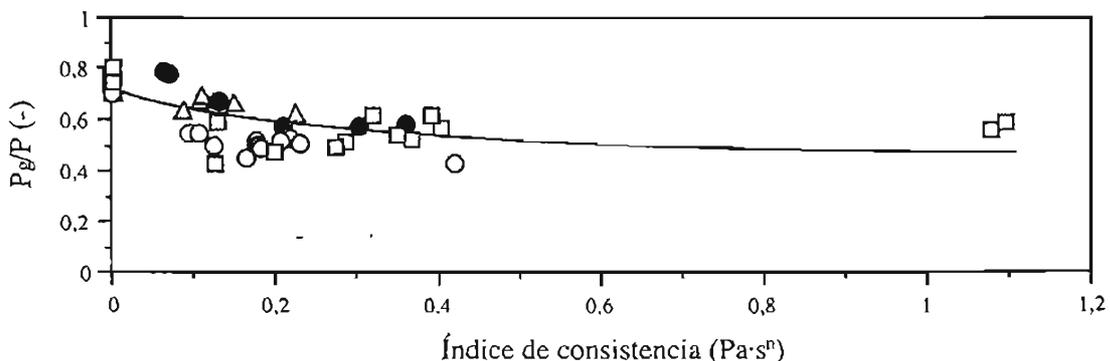


Figura 6.4. Caída de potencia (P_g/P) en función del índice de consistencia (K) durante los cultivos de *T. harzianum* desarrollados a: 11.4 (□), 11.2 (■), 22.3 (○), 22.2 (●) y 149.5 (Δ) kW/m³.

El incremento de K (y por lo tanto de la viscosidad aparente del caldo, ec. 2.2) originó una reducción en la energía suministrada al caldo ya que la caída de potencia (P_g/P) fue mayor. Dado que la potencia suministrada se mantuvo constante bajo condiciones aireadas (P_g), el valor de la potencia no aireada (P) tuvo que incrementarse para originar el decremento en la P_g/P observada. Lo anterior se corroboró al cerrar la aireación y medir la potencia no gaseada durante un breve período del cultivo (ver figura A.1.2 del anexo 1), condición bajo la cual se comprobó el gradual aumento en la resistencia al flujo (medida como torque) generada por la mayor viscosidad del caldo. Así, la reducción en la P_g/P medida permitió incorporar, en el tiempo de circulación (t_c), el efecto negativo de la viscosidad (*i.e.* formación de cavidades de aire más grandes y estables; Galindo et al., 1988; Nienow, 1990; Özcan et al., 1990) sobre la capacidad de bombeo de los impulsores.

La figura 6.5 muestra el comportamiento de la $EDCF$ durante los cultivos de *T. harzianum* obtenido a partir de integrar los valores de $P/k \cdot D^3$ (figura 6.2) y la estimación de $1/t_c$ (figura 6.3). La $EDCF$ disminuyó durante las primeras 96 h del cultivo (en todos los casos) y posteriormente se incrementó, o bien, permaneció en un valor relativamente constante. Dado que los cultivos se desarrollaron a $P/k \cdot D^3$ constante, la disminución de la $EDCF$ se debió exclusivamente a la reducción en la $1/t_c$, originado por el aumento en la viscosidad. Como resultado, el sistema de fermentación permitió separar y evaluar individualmente los componentes de la $EDCF$ ya que, por un lado, logró mantener un suministro constante de energía (independientemente de los cambios reológicos), y por otro, incorporó los efectos negativos de la viscosidad sobre el t_c .

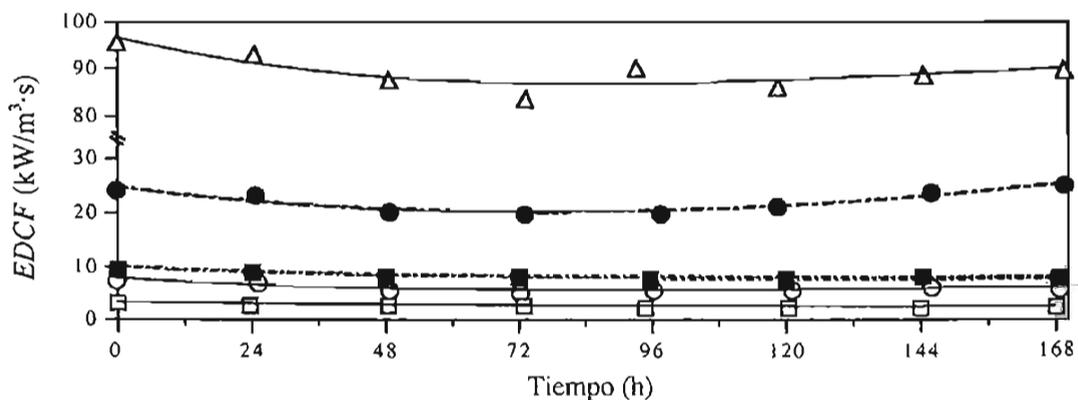


Figura 6.5. Comportamiento de la velocidad de disipación de energía ($EDCF$) durante los cultivos de *T. harzianum* desarrollados a $P/k \cdot D^3$ constante en un medio de fermentación extractiva: 3.2 (□), 7.4 (○), 9.5 (■), 23.9 (●) y 95.9 (Δ) $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$.

Efecto de la *EDCF* sobre el diámetro promedio de los agregados miceliares

La figura 6.6 muestra los cambios en el diámetro promedio de los agregados miceliares durante los cultivos desarrollados a diferentes velocidades de disipación de energía (*EDCF*). De manera general, la *EDCF* determinó el diámetro máximo de los agregados. Así, conforme ésta se incrementó (de 3 a 96 $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$), el diámetro máximo disminuyó gradualmente desde 0.39 hasta 0.19 mm. En este sentido, se sabe (Ayazi-Shamlou et al., 1994) que el tamaño de los agregados será el resultado final del equilibrio entre la fragmentación (producto del estrés hidrodinámico) y el crecimiento apical del hongo, por lo que se establecerá un diámetro de equilibrio (d_{eq}) cuando los esfuerzos de corte locales sean iguales a las fuerzas tensiles de las hifas (van Suijdam y Metz, 1981; Cui et al., 1997; Li et al., 2002). De acuerdo a lo anterior, el tamaño de los agregados disminuyó como consecuencia del mayor esfuerzo de corte originado por el aumento en la *EDCF*. Observaciones similares (reducción del tamaño al incrementar la energía suministrada) han sido reportadas en cultivos sumergidos de *P. chrysogenum*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. niger* y *T. harzianum* (Smith et al. 1990; Cui et al. 1997; Papagianni, 2004; Galindo et al. 2004).

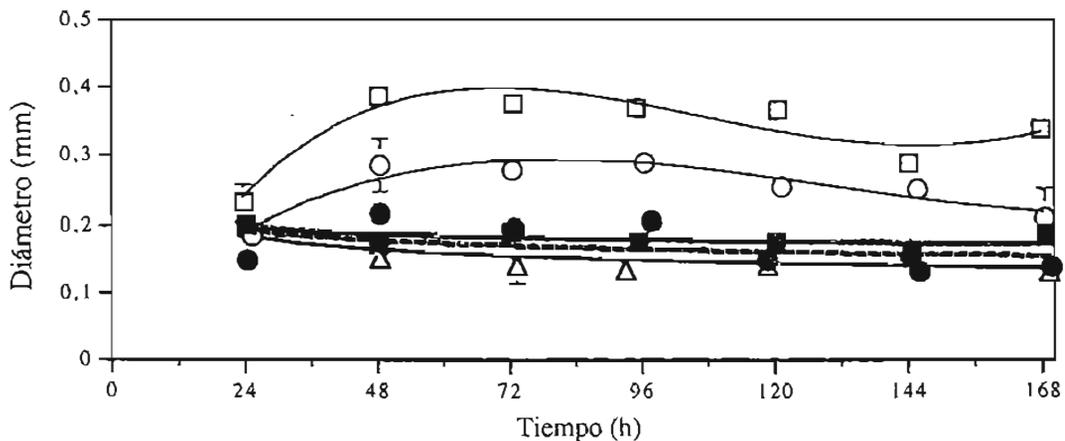


Figura 6.6. Evolución del diámetro promedio de *T. harzianum* como función de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*): 3.2 (\square), 7.4 (\circ), 9.5 (\blacksquare), 23.9 (\bullet) y 95.9 (\triangle) $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$.

La figura 6.7 muestra el efecto individual de los componentes de la *EDCF* sobre el diámetro promedio máximo del micelio. La energía específica de disipación ($P/k\cdot D^3$) presentó un efecto –sobre el tamaño de los agregados– sólo en aquellos cultivos donde el tiempo de circulación (t_c) fue \geq a 3 seg (símbolos abiertos). Por el contrario, el efecto del t_c fue significativo en todos los cultivos desarrollados a la misma $P/k\cdot D^3$. Como era de

esperarse, los cultivos desarrollados a t_c iniciales altos (3.6 y 3.0 seg) presentaron el mayor tamaño de agregados ya que estuvieron expuestos durante períodos más cortos a los esfuerzos de corte originados por la disipación de energía. Así, una mayor circulación del micelio por las zonas de los impulsores (región de alto estrés hidrodinámico) generó la reducción de los agregados debido a que se favoreció su fragmentación (*i.e.* la fragmentación prevaleció sobre la elongación). Lo anterior resalta la importancia de incluir al t_c en cualquier función que pretenda relacionar los efectos hidrodinámicos con la morfología durante cultivos miceliares.

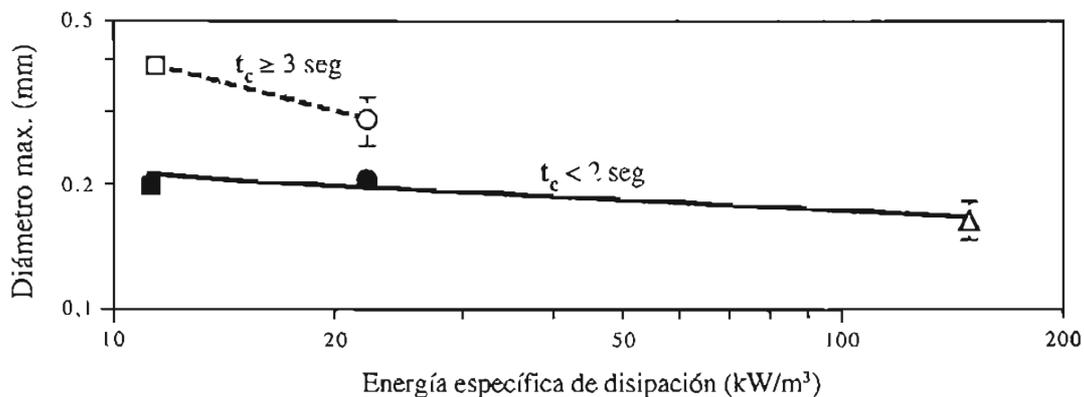


Figura 6.7. Efecto del tiempo de circulación (t_c) y de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$) sobre el diámetro promedio máximo de los agregados de *T. harzianum*. Las líneas trazadas sólo representan la unión entre puntos, siendo estos: 3.2 (□), 7.4 (○), 9.5 (■), 23.9 (●) y 95.9 (Δ) $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$.

La figura 6.8 muestra el efecto de la velocidad de disipación de energía ($EDCF$) sobre el diámetro promedio de los agregados miceliares. Dado que la $EDCF$ incorporó el efecto de la $P/k \cdot D^3$ y del t_c en una sola ecuación, el diámetro de los agregados fue función de la $EDCF$, independientemente de la velocidad de agitación y del diámetro de los impulsores, una vez que se alcanzó el d_{eq} (después de las 48 h). La dependencia del diámetro, respecto a la $EDCF$, se corroboró mediante el análisis de varianza (ver: Validación estadística) ya que el F calculado (16.4) fue mayor que el valor crítico de la prueba (10.1). Resultados similares (tamaño de agregado como función de la $EDCF$) fueron reportados previamente por Jüsten et al. (1998) y Amanullah et al. (1999, 2002) en cultivos de *P. chrysogenum* y *A. oryzae*, inoculados con micelio vegetativo.

Sin embargo, y a diferencia de otros estudios donde se utilizó micelio vegetativo (Jüsten et al., 1998; Amanullah et al., 2002), en el presente trabajo se utilizaron esporas para inocular

el biorreactor. Esto garantizó que la morfología y fisiología miceliar fueran determinadas (después de la germinación), exclusivamente por las condiciones hidrodinámicas presentes en el biorreactor; eliminando así posibles efectos metabólicos originados por la “historia” del inóculo. En este sentido, y dado que el tamaño de las esporas ($< 5 \mu\text{m}$) fue menor que el de la microescala típica de Kolmogorov (de 10 a $50 \mu\text{m}$; Li et al., 2002), es factible que la interacción entre los *eddies* y el micelio recién germinado haya sido relativamente baja, por lo que los procesos de germinación y extensión apical inicial fueron, probablemente, independientes de las condiciones hidrodinámicas aplicadas. Lo anterior resulta evidente en la figura 6.8 donde se observa que el diámetro de los agregados fue prácticamente el mismo hasta las 24 h para, posteriormente, ser función (*i.e.* diámetro de equilibrio) de la *EDCF*. Por el contrario, y para el caso específico de micelio vegetativo, las características morfológicas y fisiológicas del micelio inoculado (cultivado generalmente en matraces y cuya longitud supera los $100 \mu\text{m}$; Ayazi-Shamlou et al., 1994; Cui et al., 1997) cambiarán debido a que las hifas tendrán que adaptarse a las nuevas condiciones hidrodinámicas presentes en los tanques agitados mecánicamente.

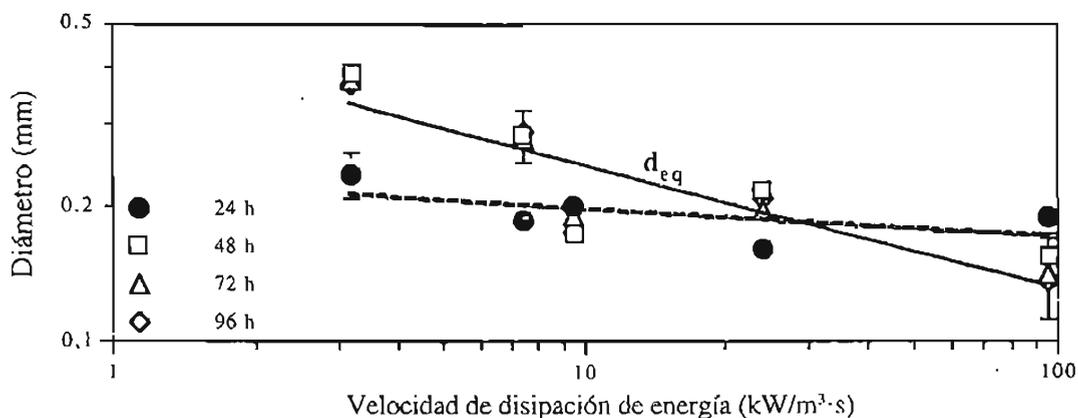


Figura 6.8. Evolución del diámetro promedio de los agregados miceliarios y diámetro de equilibrio (d_{eq}) de *T. harzianum* como función del tiempo y de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*).

El hecho de que el diámetro de equilibrio (d_{eq}) de los agregados miceliarios —desarrollados bajo las condiciones más altas de *EDCF*— fue menor que su diámetro promedio a las 24 h sugiere que el equilibrio entre los esfuerzos de corte y las fuerzas tensiles cambió. En este sentido, y dado que la energía específica de disipación permaneció constante, es factible que la fuerza tensil de las hifas haya disminuido durante el cultivo, tal y como a sido sugerido por van Suijdam y Metz (1981) y Li et al. (2002, 2002a) en estudios con *P. chrysogenum* y *A. oryzae*. Aunque el motivo de ésta reducción no es conocida, Li et al. (2002, 2002a)

especulan que esto pudo ser debido a una falta de sustrato (*i.e.* metabolismo endógeno), ya que la disminución de la fuerza tensil ocurrió en la segunda mitad de la fermentación (una vez alcanzado el tamaño de equilibrio). No obstante, y para nuestro caso particular, lo anterior no parece ser el caso, ya que la aparente disminución de la fuerza tensil ocurrió al inicio de los cultivos (48 - 72 h). Independientemente del motivo, el cambio en la fuerza tensil implica que el diámetro promedio de los agregados de *T. harzianum* será el resultado de un proceso dinámico en el que, además del estrés hidrodinámico, la composición y estructura celular deberán ser tomados en cuenta en estudios futuros.

Hasta ahora se a supuesto que la reducción en el tamaño de los agregados (como función del incremento en la *EDCF*) se debió, principalmente, a la fragmentación de las hifas. Sin embargo, existe la posibilidad de que los agregados se hayan compactado debido a los esfuerzos aplicados sobre su superficie (*i.e.* a mayor energía mayor compactación), originando el decremento observado en la figura 6.8. La compactación de un agregado ocasionará la disminución, tanto de su diámetro, como de la porosidad, mientras que la fragmentación influenciará, principalmente, el diámetro y no la porosidad, ya que los esfuerzos mecánicos actuarán primordialmente sobre su superficie (Ayazi-Shamlou et al., 1994; Cui et al., 1997, 1998). Con base en lo anterior, se evaluaron las cinéticas de la porosidad en función de la *EDCF* (figura 6.9). Si bien la porosidad disminuyó ligeramente al incrementarse la *EDCF*, dicha reducción no justifica el marcado decremento en el diámetro promedio observado después de las 48 h (figura 6.8), por lo que un fenómeno de compactación resulta improbable. Así, el mecanismo responsable de reducir el tamaño de los agregados miceliares fue la fragmentación.

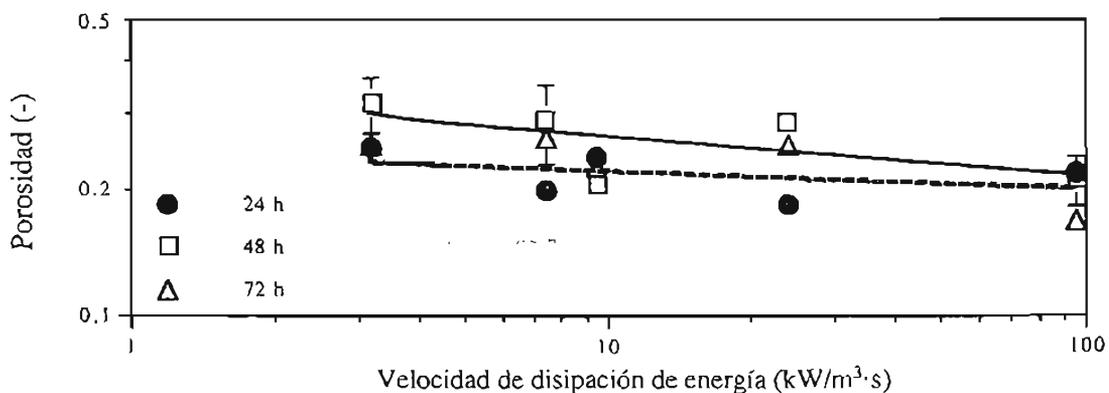


Figura 6.9. Evolución de la porosidad de los agregados miceliares de *T. harzianum* como función del tiempo y de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*).

Las fuerzas hidrodinámicas que originan la fragmentación han sido correlacionadas por diversos autores (van Suijdam y Metz, 1981; Ayazi-Shamlou et al., 1994; Li et al., 2002) con la microescala de Kolmogorov, λ (teoría de la turbulencia isotrópica). El valor de λ es de gran importancia ya que determina la intensidad de los esfuerzos de corte presentes durante las interacciones entre el micelio y los *eddies* más pequeños que pueden formarse. La figura 6.10 muestra el diámetro promedio de los agregados miceliarios en función de λ (ver anexo 3). Como puede observarse, existe una relación lineal entre ambos valores (diámetro promedio = $0.64\lambda + 0.08$), lo cual indica que el principal mecanismo responsable de la fragmentación (y por lo tanto de determinar el diámetro de los agregados) fueron los esfuerzos de corte originados por la turbulencia. Si bien tanto van Suijdam y Metz (1981), como Ayazi-Shamlou et al. (1994) partieron del principio de que la fragmentación es función de la turbulencia, ninguno mostró una relación entre el tamaño de los agregados y el tamaño de *eddy*. Lo anterior pudo ser debido a que en ambos trabajos se asumió una viscosidad constante (similar a la del agua) y, además, a que el valor de disipación de energía utilizado fue la global (P/V) y no la máxima (*i.e.* zona de los impulsores). En este sentido, Li et al. (2002) señalan la necesidad de incluir en el cálculo de λ el valor puntual de la viscosidad y de la energía de disipación en la región de los impulsores (ambos utilizados en el presente trabajo) para estimar valores más representativos de λ respecto a las condiciones reales del cultivo.

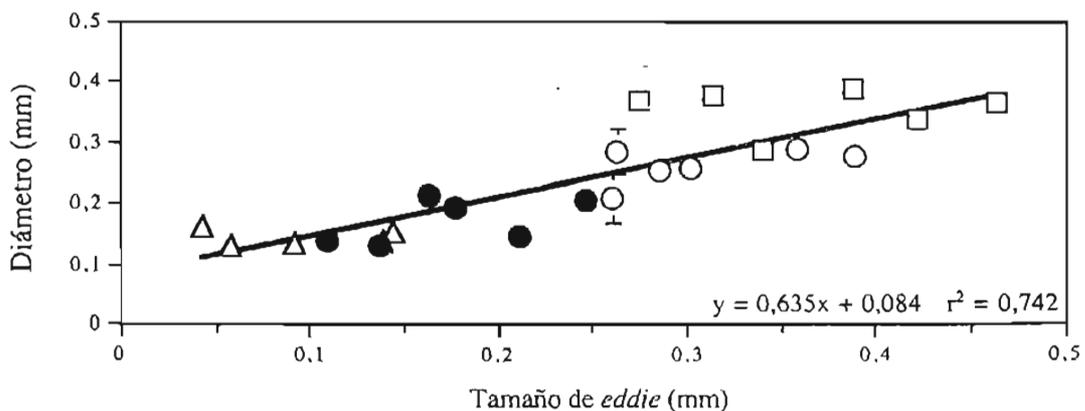


Figura 6.10. Diámetro promedio de los agregados miceliarios en función del tamaño de *eddy* (microescala de Kolmogorov) en cultivos de *T. harzianum* desarrollados a: 3.2 (□), 7.4 (○), 9.5 (■), 23.9 (●) y 95.9 (Δ) kW/m³·s.

El hecho de que la pendiente haya sido menor a uno (≈ 0.64) señala que el tamaño de los agregados fue siempre inferior al de los *eddies* debido, probablemente, a la fragmentación o “razuramiento” de la hifas en las capas exteriores de estos (Cui et al., 1997). Li et al.

(2002), por su parte, también determinaron valores inferiores a uno al relacionar la longitud promedio de las hifas respecto al tamaño de los *eddies* (λ) en cultivos alimentados de *A. oryzae* desarrollados en biorreactores (80 m^3) agitados mecánicamente. No obstante, la velocidad específica de crecimiento de *A. oryzae* fue limitada ($\mu \leq 0.01 \text{ h}^{-1}$) por la fuente de carbono alimentada durante gran parte del cultivo, por lo que el crecimiento y extensión apical estuvieron restringidos, en gran medida, por el suministro de la fuente de carbono.

Efecto de la velocidad de disipación de energía sobre el crecimiento miceliar

La figura 6.11 muestra el crecimiento miceliar (concentración de biomasa) en los cultivos realizados a diferentes *EDCF*. Las cinéticas de crecimiento muestran un marcado efecto de la *EDCF* sobre la concentración máxima de biomasa alcanzada.

De acuerdo a la figura 6.13a, condiciones de mayor estrés hidrodinámico (*i.e.* *EDCF*) originaron velocidades específicas de crecimiento (μ) más bajas. Así, los valores de μ disminuyeron gradualmente desde 0.0519 y 0.0441 h^{-1} (en los cultivos desarrollados a 3.2 y $9.5 \text{ kW/m}^3\cdot\text{s}$, respectivamente) hasta 0.0329 h^{-1} en las fermentaciones a mayor *EDCF* ($95.9 \text{ kW/m}^3\cdot\text{s}$). Las líneas en la figura 6.11 representan el ajuste de los datos experimentales de biomasa al modelo logístico mediante el cual se calculó μ (ver anexo 4). Resulta evidente la presencia de una fase de crecimiento (24 – 96 h) seguida de una etapa estacionaria (96 – 168 h) en donde la concentración de biomasa permaneció relativamente constante.

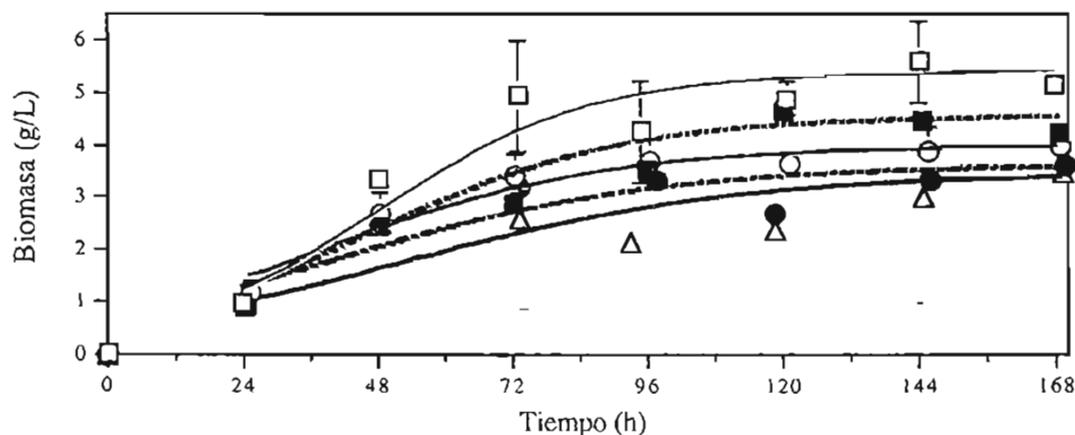


Figura 6.11. Evolución de la concentración de biomasa en función de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*): 3.2 (□), 7.4 (○), 9.5 (■), 23.9 (●) y 95.9 (△) $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$. Las líneas representan el ajuste logístico de los datos experimentales.

La figura 6.12 muestra el efecto individual de los componentes de la *EDCF* sobre μ . A diferencia de la morfología (figura 6.7), tanto $P/k \cdot D^3$, como t_c presentaron un efecto sobre μ . De manera general, un menor suministro de energía, o bien la disminución de la frecuencia de circulación del micelio por la zona de los impulsores ($1/t_c$) favoreció su crecimiento. Esto concuerda con lo reportado por Godoy-Silva et al. (1997) en relación a que, además de la energía suministrada, la hidrodinámica generada por la geometría de los impulsores influye significativamente sobre el crecimiento de *T. harzianum*. En su trabajo, los autores reportan que el uso de un impulsor helicoidal (impulsor de proximidad) favoreció el crecimiento en comparación con un sistema de impulsores remotos (turbinas Rushton) donde la frecuencia de circulación por las zonas de alto estrés fue marcada.

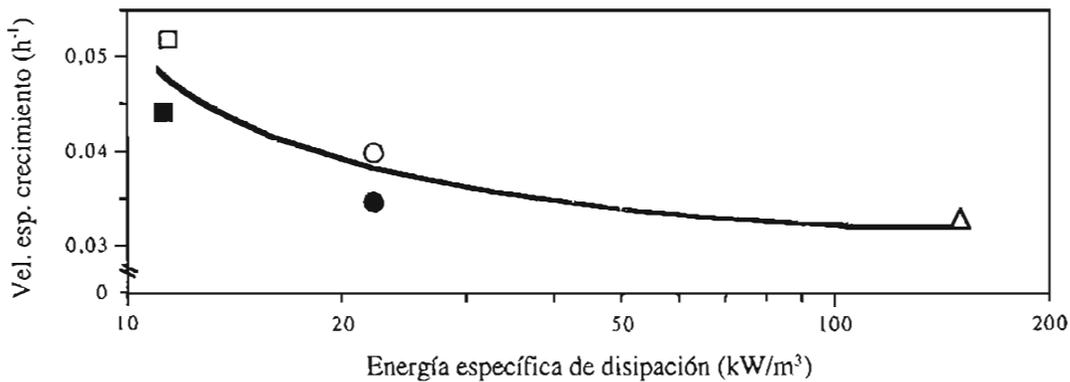


Figura 6.12. Efecto del tiempo de circulación (t_c) y de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$) sobre la velocidad específica de crecimiento (μ) de *T. harzianum* en cultivos a: 3.2 (□), 7.4 (○), 9.5 (■), 23.9 (●) y 95.9 (▲) $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$.

Como puede observarse en la figura 6.13a, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue función de la *EDCF*, independientemente de la velocidad de agitación y del diámetro de los impulsores utilizados. Así, la *EDCF* describió el efecto de los esfuerzos mecánicos sobre el crecimiento micelial. La dependencia de μ , respecto a la *EDCF*, fue reportada previamente por Jüsten et al. (1998) en cultivos de *P. chrysogenum*. Sin embargo, nuestros resultados contradicen lo expuesto por Jüsten et al. (1998) y otros autores (Papagianni et al., 1999; Amanullah et al., 2002), ya que éstos reportaron velocidades de crecimiento (y por lo tanto concentraciones de biomasa) mayores al incrementar la energía suministrada en cultivos inoculados con micelio vegetativo. La explicación de lo anterior, según Jüsten et al. (1998), fue que al incrementar la energía suministrada, y por lo tanto favorecer la fragmentación del micelio inoculado, aumentó el número de nuevas puntas, necesarias para el crecimiento apical. No obstante, y como ya se discutió previamente, en el presente

trabajo se utilizaron esporas para inocular el biorreactor. Por consecuencia, el crecimiento inicial fue determinado única y exclusivamente por la germinación de las esporas. Una vez que el micelio –recién germinado- alcanzó un cierto tamaño, el crecimiento y la morfología miceliar fueron determinados por las condiciones hidrodinámicas presentes en el sistema, tal y como se observa en las figuras 6.8 y 6.13a.

Efecto de la *EDCF* sobre el metabolismo y diferenciación celular

La figura 6.13 muestra el efecto de la velocidad de disipación de energía sobre la velocidad específica de crecimiento (μ), el consumo específico de glucosa (q_{gluc}) y la producción específica de CO_2 (q_{CO_2}) determinadas mediante el modelo logístico y de Luedeking-Piret. El cálculo y los valores requeridos para su estimación se presentan en el anexo 4. Dado que las concentraciones de glucosa y oxígeno fueron no limitantes (*i.e.* siempre por arriba de 1.5 g/L y 35 % TOD, respectivamente; anexo 2) y que el *n*-hexadecano ha demostrado ser un solvente biocompatible y de nula toxicidad en cultivos de *P. chrysogenum* (Ho et al., 1990) y *T. harzianum* (Serrano-Carreón et al., 2002), los efectos observados se debieron única y exclusivamente a las condiciones hidrodinámicas empleadas.

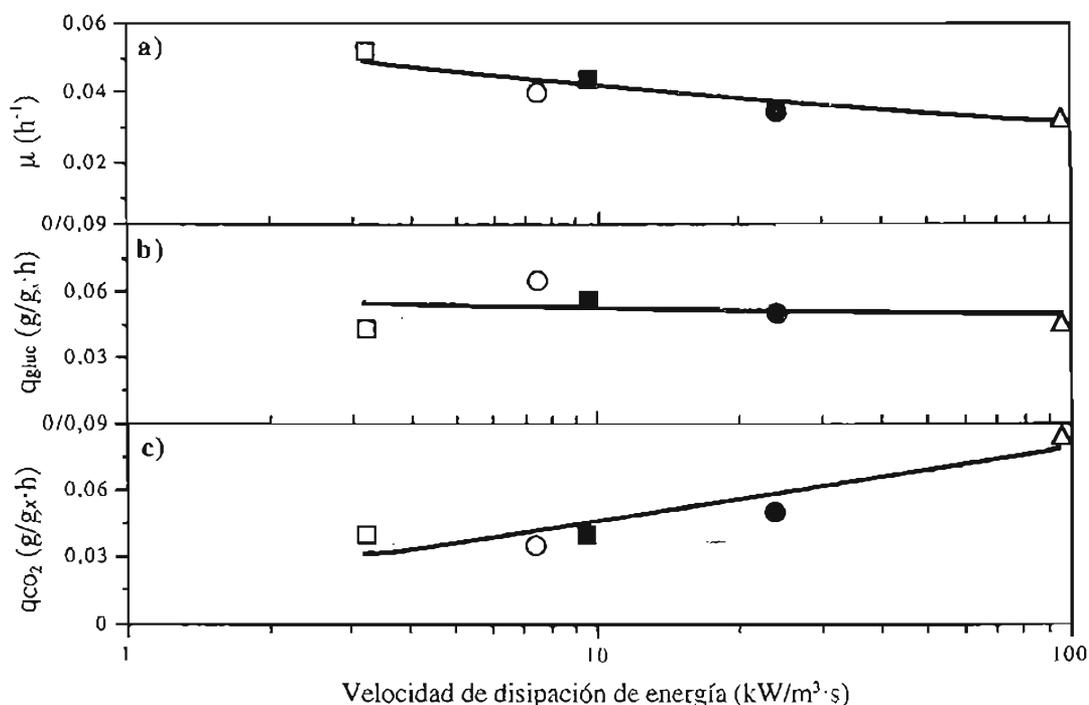


Figura 6.13. Efecto de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*) sobre: a) la velocidad específica de crecimiento (μ); b) el consumo específico de glucosa (q_{gluc}) y c) la producción específica de CO_2 (q_{CO_2}) en cultivos de *T. harzianum*.

El incremento en la velocidad de disipación de energía originó cambios en el metabolismo celular de *T. harzianum* ya que tanto μ , como q_{CO_2} presentaron una fuerte dependencia respecto a la *EDCF*. Lo anterior se corroboró mediante el análisis de varianza (ver sección: Validación estadística) ya que los F calculados (16.1 y 15.3 para μ y q_{CO_2} , respectivamente) fueron mayores que el valor crítico de la prueba (10.1). Por el contrario, la pendiente de la q_{gluc} no mostró ninguna relación con la *EDCF* ($F=0.2$), por lo que la velocidad de consumo de glucosa fue relativamente constante e independiente de las condiciones hidrodinámicas.

De acuerdo a la figura 6.13, condiciones de mayor estrés hidrodinámico (*i.e.* *EDCF*) originaron un gradual decremento en la μ , mientras que el q_{CO_2} aumentó. En este sentido, y dado que el consumo específico de glucosa (q_{gluc}) permaneció relativamente constante, los cambios en μ y q_{CO_2} sugieren un cambio en el metabolismo de la fuente de carbono. Por un lado, bajas *EDCF* favorecieron el crecimiento miceliar (figuras 6.11 y 6.13a), mientras que por otro, altas *EDCF* estimularon la oxidación de la fuente de carbono mediante el ciclo de Krebs, con un subsecuente aumento en la producción de energía y CO_2 . Como resultado, es probable que el mayor estrés mecánico aplicado haya incrementado los requerimientos energéticos del hongo (*i.e.* para fines de mantenimiento y/o reparación de la pared celular), sacrificando así la fuente de carbono disponible para la síntesis de biomasa. Johansen et al. (1998) reportaron un fenómeno similar en cultivos de *A. awamori* para la producción de lipasas en un biorreactor de 8 L inoculado con esporas.

En su trabajo, Johansen et al. (1998) reportaron una disminución en la concentración de biomasa conforme se incrementó la velocidad de agitación -desde 400 hasta 1100 rpm (aproximadamente de 10.7 a 635 kW/m³·s)- y sugieren que esto se debió al aumento en los requerimientos energéticos necesarios para el mantenimiento del hongo. En respaldo a su hipótesis, los autores señalan que los rendimientos de biomasa y CO_2 , con base en sustrato ($Y_{X/S}$ y $Y_{CO_2/S}$), disminuyeron y se incrementaron, respectivamente, conforme aumentó la velocidad de agitación. No obstante, los autores no especifican si los cambios observados en la concentración de biomasa fueron producto de diferencias en la velocidad de consumo de sustrato, o bien, a un cambio en el metabolismo de la fuente de carbono. Por otro lado, Lejeune y Baron (1995) observaron un marcado efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre el período de la fase lag y la producción de CO_2 en cultivos de *T. reesei* inoculados con micelio vegetativo. En los cultivos desarrollados a las condiciones más altas de

agitación (400 rpm), la duración de la fase lag y la velocidad específica de producción de CO₂ fueron significativamente mayores que en aquellos a bajas velocidades de agitación (\leq 300 rpm). Los autores concluyen que el hongo alargó su fase lag como un mecanismo de aclimatación a las nuevas condiciones hidrodinámicas, período en el cual produjo más CO₂ (y, por consecuencia, energía) para contender con los esfuerzos mecánicos impuestos.

El hecho de que los microorganismos (incluidos los hongos) poseen la capacidad de ajustar sus reservas energéticas con base en sus requerimientos fisiológicos (Joseph-Horne et al., 2001; Jin y Bethke, 2003) podría justificar los cambios metabólicos observados. En este sentido, Higashiyama et al. (1999) reportan ajustes energéticos similares a los expuestos en el presente trabajo al manipular la concentración de oxígeno disuelto en cultivos (25 L) miceliares de *Mortierella alpina* para la producción de ácido araquidónico. Concentraciones altas y constantes de oxígeno (20 - 30 mg/L) originaron un decremento en el rendimiento de biomasa con base en glucosa ($Y_{x/Glc}$) debido, según los autores, al aumento de los requerimientos energéticos necesarios para contender con el mayor estrés oxidativo impuesto. Se puede inferir, por lo tanto, que la transición en el metabolismo de carbono observado por *T. harzianum* y otros hongos obedece a una respuesta más genérica de éstos microorganismos hacia condiciones adversas para su desarrollo cuando son cultivados en biorreactor (*i.e.* estrés hidrodinámico u oxidativo).

A pesar de que varios autores han estudiado el efecto de las condiciones de agitación sobre el metabolismo y crecimiento micelial (incluyendo la producción de vacuolas y CO₂), no en todos los casos se ha reportado un decremento de la concentración celular, acompañado de una mayor producción de CO₂, al incrementar la energía suministrada. En este sentido, Amanullah et al. (1999) demostraron que cambios escalonados en la *EDCF* (de 950 a 90 kW/m³·s) no afectaron la velocidad de producción de CO₂ (V_{PCO_2}) en cultivos continuos de *A. oryzae*. Por su parte, Amanullah et al. (2002) y Jüsten et al. (1998) observaron concentraciones de biomasa y V_{PCO_2} más altas en cultivos alimentados de *A. oryzae* y *P. chrysogenum* desarrollados bajo las condiciones más altas de *EDCF* (340 y 1000 kW/m³·s, respectivamente). De igual manera, Paul et al. (1999) reportaron incrementos en las velocidades de crecimiento y de producción de CO₂ al aumentar, de manera escalonada, la energía suministrada (de 12.9 a 84 kW/m³·s) durante cultivos alimentados de *A. niger*. Por el contrario, Makagiarsar et al. (1993) observaron un decremento, tanto en la velocidad de

crecimiento, como en la $VPCO_2$, al incrementar la $EDCF$ (de 4 a 110 $kW/m^3 \cdot s$) en cultivos de *P. chrysogenum*. De acuerdo a lo anterior, resulta evidente que la producción de CO_2 puede ser influenciada por diversos parámetros, además de la energía suministrada, como la cepa, modo de cultivo, tipo y tamaño de inóculo, entre otros, lo cual podría explicar la falta de consistencia observada entre reportes.

Si bien diversos trabajos han estudiado el efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre cultivos de *Trichoderma* sp., ninguno había demostrado un cambio en el metabolismo de la fuente de carbono, respecto a la $EDCF$, bajo condiciones constantes de energía suministrada y sin limitación de oxígeno. Estos resultados formaron la parte central del manuscrito “6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology” publicado en la revista *Biotechnology and Bioengineering* (anexo 6).

Cabe aclarar que, desde el punto de vista de la fuente de carbono, el medio de cultivo es complejo, ya que además de glucosa contiene *n*-hexadecano y extracto de malta, los cuales en ciertas condiciones pueden ser cometabolizados junto con la glucosa. Un balance de carbono entre los valores de q_{CO_2} y q_{gluc} muestra que no todo el CO_2 producido proviene de la glucosa ($q_{CO_2}/q_{gluc} > 1$), por lo que una fuente adicional de carbono fue utilizada. Por un lado, el extracto de malta contiene aproximadamente 52 % de maltosa (Zabriskie et al., 1982), la cual pudo ser hidrolizada a glucosa. Por su parte, el hexadecano ha sido utilizado como fuente única de carbono y energía durante diversos cultivos miceliares (*A. fumigatus*; *P. americana*; *O. griseum*; *A. niger*; April et al., 2000; Volke-Sepúlveda et al., 2003). Sin embargo, y a pesar de su alta relación de carbono (0.85 $g_C/g_{hexadecano}$ vs. 0.4 $g_C/g_{glucosa}$), la degradación del solvente resulta poco probable ya que la concentración de glucosa nunca fue limitante (*i.e.* siempre fue superior a los 1.5 g/L ; ver anexo 2). Si bien no se evaluó el posible consumo del *n*-hexadecano durante los cultivos, el carbono presente en el medio rico (asumiendo que un 10 % de la maltosa presente en el extracto de malta se hidrolizará a glucosa) sería suficiente para satisfacer los requerimientos máximos de carbono generados durante los cultivos (5.9 g_C/L en el medio vs. 5.6 g_C/L requeridos por el hongo; anexo 4).

Además de los cambios observados en el metabolismo de *T. harzianum*, la $EDCF$ también influyó significativamente sobre la viabilidad y diferenciación celular (esporulación) del

hongo. Condiciones de alto estrés mecánico ($\geq 24 \text{ kW/m}^3\cdot\text{s}$) indujeron la esporulación del microorganismo (diferenciación celular en hongos que se presenta cuando las condiciones ambientales para su desarrollo no son favorables) al final de los cultivos. A pesar de que no se cuantificaron las esporas, el proceso de esporulación fue evidente ya que se observó un cambio de color característico (de café claro a verde oscuro) en el medio de cultivo. La presencia de conidios en éstos cultivos fue confirmada por observaciones microscópicas durante la caracterización morfológica y de viabilidad. Fenómenos similares (esporulación) han sido reportados en cultivos de *T. harzianum*, bajo las condiciones más altas de energía suministrada (Felse y Panda, 2000; Gamboa, 2004), para la producción de enzimas (quitinasas) y agentes de control biológico (esporas) en biorreactores de 2 y 10 L, respectivamente.

La tabla 6.1 muestra la viabilidad (micelio metabólicamente activo) de *T. harzianum* como función del tiempo de cultivo y de la *EDCF* inicial. Al inicio de los cultivos (48 h), la viabilidad fue alta y relativamente similar en todos los casos debido a que, como ya se discutió, los esfuerzos mecánicos no influyeron significativamente sobre la germinación y extensión apical del hongo. Una vez que el tamaño de las hifas fue del mismo orden que la microescala de Kolmogorov (después de las 48 h), las condiciones hidrodinámicas tuvieron un efecto sobre la viabilidad, tal y como se observa a las 96 h. A este tiempo, la viabilidad fue menor en los cultivos desarrollados a las condiciones máximas y mínimas de *EDCF* (96 y $3 \text{ kW/m}^3\cdot\text{s}$, respectivamente), tendencias que se mantuvieron hasta el final de los cultivos.

El hecho de que la viabilidad (medida a través del método de fluorescencia utilizado) haya disminuido, sugiere un decremento en la actividad y/o producción de esterazas (necesarias

Tabla 6.1. Viabilidad de *T. harzianum* como función del tiempo de cultivo y de la velocidad inicial de disipación de energía (*EDCF*).

<i>EDCF</i> ($\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$)	Viabilidad (%)		
	48 h	96 h	168 h
3.2	95	79	64
7.4	96	91	79
9.5	96	93	87
23.9	93	90	57
95.9	95	78	44

para hidrolizar el diacetato de fluoresceína), o bien un mayor daño a la membrana celular (Breeuwer y Abee, 2000). Dado que las condiciones de mayor estrés hidrodinámico favorecieron la fragmentación (evidenciado por los agregados de menor tamaño; figura 6.8), es probable que la viabilidad disminuyó como resultado del mayor daño infringido a la pared celular en los cultivos desarrollados a las más altas *EDCF*. No obstante, un posible efecto de la esporulación sobre la biosíntesis de esterazas –hacia el final de los cultivos- no puede ser descartado. Por otro lado, y dado la naturaleza pluricelular de los hongos, es posible que la actividad esterasa presente en los agregados de mayor tamaño (observados en los cultivos desarrollados a bajas *EDCF*) haya disminuido, con respecto a aquellos de menor tamaño, debido a la formación de una mayor cantidad de regiones degeneradas o metabólicamente inactivas. Es importante recordar que, en fermentaciones sumergidas, las hifas pueden encontrarse en diferentes estados fisiológicos y mostrar diversas características estructurales en función de la distancia con la región apical (*i.e.* con la edad de los compartimientos). Así, conforme se incrementa la longitud de las hifas, mayor será la proporción de regiones vacuolizadas (Paul y Thomas, 1996; Papagianni et al., 1999). Provocando, como resultado, cambios drásticos en el metabolismo (y por consecuencia en la actividad enzimática) de las células (Nielsen, 1993).

Efecto de la *EDCF* sobre la producción de 6-pentil- α -pirona

La figura 6.14 muestra la producción de 6-pentil- α -pirona (6PP) durante los cultivos de *T. harzianum* desarrollados a diferentes velocidades de disipación de energía (*EDCF*). La concentración máxima de 6PP fue de 121 y 150 mg/L en los cultivos desarrollados a 7.4 y 9.5 kW/m³·s, respectivamente. La producción de 6PP se incrementó durante las primeras 48 h y su concentración permaneció relativamente constante hasta las 120 h para, posteriormente, disminuir hacia el final del cultivo. Dado que la viabilidad a las 48 h fue similar en todos los cultivos, independientemente de las condiciones de operación utilizadas (tabla 6.1), no se observó ningún tipo de relación entre la viabilidad y la producción de 6PP. Lo anterior concuerda con lo reportado por Jüsten et al. (1998) en cultivos alimentados (5.3 L) de *P. chrysogenum* para la producción de penicilina. En dicho trabajo, los autores tampoco observaron ninguna relación entre la productividad específica y el estado fisiológico del hongo (medido como porcentaje de regiones vacuolizadas o inactivas).

La concentración de 6PP disminuyó drásticamente después de las 120 h en los cultivos que presentaron la mayor producción del metabolito. Este fenómeno ha sido observado, tanto en cultivos convencionales, como en fermentaciones extractivas (Serrano-Carreón et al., 1992, 2002). Es poco probable que la disminución de la 6PP haya sido debido a la volatilización de la molécula. Experimentos diseñados para evaluar su pérdida en medios acuosos (*i.e.* agregando 6PP exógena a un medio de cultivo estéril) demostraron que ésta fue, para efectos prácticos, despreciable, ya que la concentración de 6PP adicionada (≈ 100 mg/L) permaneció relativamente constante durante los 6 o 9 días que duraron los ensayos (Flores et al., 2005; Cooney et al., 2000). Por otro lado, diversos estudios empleando hongos de las especies *Penicillium*, *Fusarium*, *Botrytis* y *Sclerotinia* (Poole y Whitaker, 1997; Cooney et al., 1997; Cooney y Lauren, 1999) y algunas células vegetales como *Pinus radiata* (Cooney et al., 2000) han demostrado que la 6PP puede ser biotransformada en isómeros monohidroxilados menos hidrofóbicos y, por lo tanto, menos tóxicos que la molécula original. Estudios recientes en nuestro laboratorio han demostrado la biotransformación intracelular de 6PP en caldos de fermentación de *T. harzianum* (datos no publicados). No obstante, a la fecha no se han determinado los compuestos resultantes de la biotransformación, ni el posible efecto de las condiciones de operación sobre éstas.

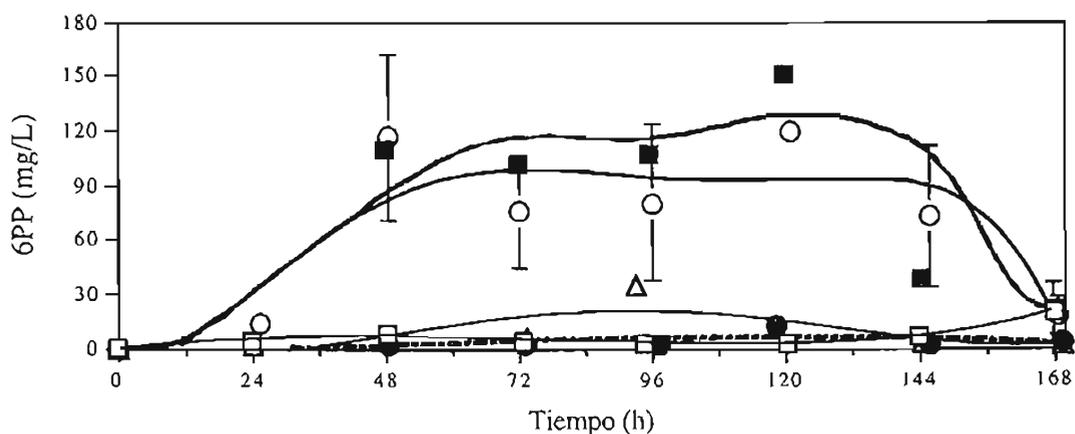


Figura 6.14. Producción de la 6-pentil- α -pirona (6PP) por *T. harzianum* como función de la velocidad de disipación de energía (EDCF): 3.2 (\square), 7.4 (\circ), 9.5 (\blacksquare), 23.9 (\bullet) y 95.9 (\triangle) $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$:

La productividad específica máxima de 6PP mostró una relación en forma de campana con la EDCF, alcanzándose un máximo entre los 7 y 10 $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$ (figura 6.15). Es importante mencionar que, además de las cinco condiciones evaluadas en el presente trabajo, la figura 6.15 muestra tres puntos adicionales (*i.e.* rombos; ver: Estrategia experimental) tomados de

los reportes de Serrano-Carreón et al. (2002) y Estrada (2003). En sus respectivos trabajos, los autores utilizaron el mismo medio de fermentación extractiva, además de un biorreactor de 14 L similar al empleado en el presente estudio (incluyendo 3 turbinas Rushton con un $D/T = 1/3$). Adicionalmente, los cultivos se desarrollaron bajo condiciones no limitantes de oxígeno disuelto ($\geq 30\%$ TOD) ya que se incrementó, en caso de ser necesario, la aireación.

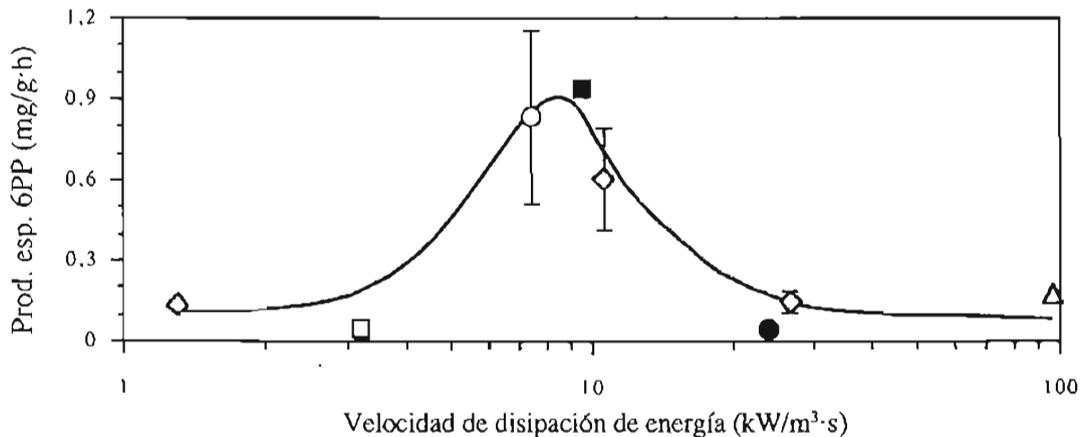


Figura 6.15. Efecto de la velocidad de disipación de energía ($EDCF$) sobre la productividad específica máxima de 6-pentil- α -priona (6PP) en cultivos de *T. harzianum* desarrollados a: 3.2 (□), 7.4 (○), 9.5 (■), 23.9 (●) y 95.9 (△) $\text{kW/m}^3\cdot\text{s}$.

Relaciones en forma de campana entre producto y energía suministrada (*i.e.* velocidad de agitación) han sido reportadas en fermentaciones sumergidas de *T. harzianum* y *T. viride* para la producción de 6PP en matraces (Galindo et al., 2004) y diversas enzimas en biorreactor, tales como: celulasas, quitinasas, xilanasas y β -glucanasas, entre otras (Lejeune y Baron, 1995; Mukataka et al., 1988). La explicación general de este fenómeno es que, dentro de un cierto rango, el aumento en la energía suministrada reduce los problemas de limitación por nutrientes (particularmente del oxígeno), presentes frecuentemente en el interior de los agregados o *pellets*. Sin embargo, el efecto positivo originado al incrementar la velocidad de agitación tiene un límite (determinado principalmente por la sensibilidad del microorganismo al estrés mecánico) por encima del cual los esfuerzos mecánicos dañan al micelio y, por lo tanto, afectan negativamente la producción del metabolito de interés.

De acuerdo a nuestros resultados, es posible que la producción de 6PP haya disminuido como consecuencia del estrés mecánico impuesto en los cultivos desarrollados a $EDCF$ por arriba de $20 \text{ kW/m}^3\cdot\text{s}$, velocidades que, de hecho, indujeron la diferenciación celular del hongo y generaron los esfuerzos mecánicos más intensos. Por otro lado, el aumento en la

productividad específica de 6PP, en el rango entre 3 y 10 kW/m³·s, tuvo que estar asociado con una mejoría en los fenómenos de transferencia de masa en el sistema, o bien, a fenómenos biológicos (síntesis del metabolito) inducidos por el aumento en el estrés hidrodinámico. Para el primer caso, los fenómenos de transferencia que pudieron ser favorecidos (al incrementarse la energía suministrada) tuvieron que estar relacionados con una posible mejoría en la capacidad de extracción de 6PP o de transferencia de nutrientes (oxígeno) en el medio.

Diversos autores (Armenante y Huang, 1992; Pacek et al., 1997; Kollmer et al., 1999) han demostrado, en sistemas inmiscibles líquido-líquido, que la dispersión y el tamaño de gota (y por lo tanto el área) de la fase dispersa es función de la energía suministrada al sistema. De manera general, al aumentar la energía suministrada se generó una reducción en el tamaño de gota de la fase dispersa (por lo que el área de transferencia entre fases aumentó) e hizo más eficiente la dispersión de la fase orgánica en el medio de cultivo (acuoso). Así, es factible que la baja turbulencia generada en el cultivo desarrollado a la más baja *EDCF* (3 kW/m³·s) haya favorecido la coalescencia del *n*-hexadecano (y por consecuencia la separación de fases) reduciendo la capacidad extrayente del medio. No obstante, la figura 6.16 muestra que la partición de 6PP exógena hacia la fase extrayente (*n*-hexadecano), en un sistema modelo desarrollado a 3 kW/m³·s (*EDCF* más baja evaluada), fue relativamente rápida, ya que en menos de un minuto se alcanzó el equilibrio entre fases. Además, el hecho de que la concentración de 6PP haya sido superior a los 100 mg/L (en los cultivos entre 7 y 10 kW/m³·s) señala que el *n*-hexadecano removió eficientemente la 6PP del medio acuoso ya que no se observaron limitaciones debido a la toxicidad de la molécula.

Sin duda alguna, el aumento de la *EDCF* incrementó la transferencia de oxígeno en el sistema. No obstante, y con la finalidad de eliminar posibles efectos y/o limitaciones por oxígeno, todos los cultivos se desarrollaron por arriba de 35 % TOD. Si bien la tensión crítica de TOD (C_{crit}) para la producción de 6PP es desconocida, su valor se eligió con base en otros C_{crit} reportados en cultivos miceliares de *G. lozoyensis*, *P. chrysogenum* y *A. oryzae* (Henriksen et al., 1997; Amanullah et al., 2002; Pollard et al., 2002), para la producción de diversos metabolitos, tales como: pneumocandina B₀, penicilina y amiloglucosidasas (20, 25 y 40 %, respectivamente). Adicionalmente, y dado el uso de *n*-hexadecano como fase extrayente, la solubilidad del oxígeno en el medio extractivo fue dos veces mayor que en

agua (16.8 vs. 7.8 mgO₂/L, respectivamente; anexo 5), incrementando así la concentración de oxígeno en el sistema. De acuerdo a lo anterior, el diámetro crítico (tamaño máximo que los agregados y/o *pellets* pueden alcanzar antes de que se presenten limitaciones por oxígeno disuelto al interior de estos), estimado de acuerdo a Cui et al. (1998) en el anexo 5, fue similar o mayor en todos los casos al diámetro máximo experimentalmente determinado (tabla 6.2). Así, un posible efecto por limitación de oxígeno disuelto sobre la productividad, en los cultivos desarrollados a bajas *EDCF*, resulta también poco probable.

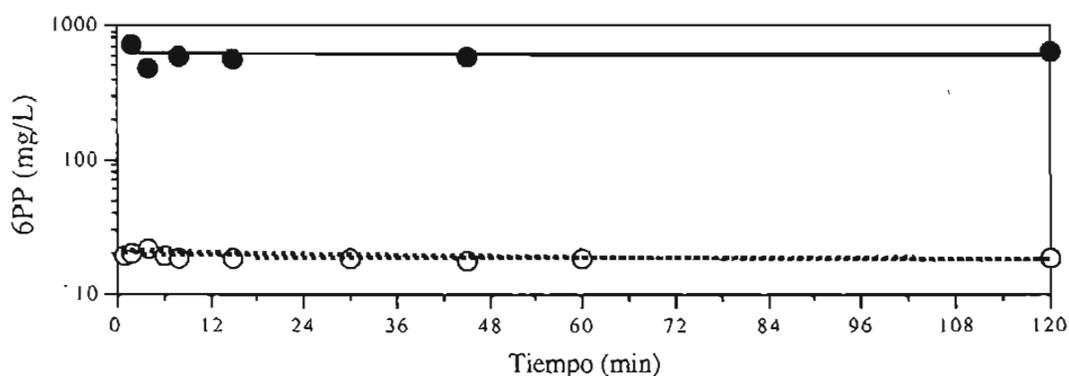


Figura 6.16. Evolución de la concentración de 6-pentil- α -pirona (6PP), adicionada de forma exógena, en un sistema modelo desarrollado a 3.2 kW/m³·s (*D/T* = 1/3). Fase acuosa (○), fase orgánica (●).

Con base en lo anterior, se propone que el incremento en la productividad observado entre 7 y 10 kW/m³·s (figura 6.15) se debió a la inducción del metabolito de interés. Como ya se mencionó (ver: Antecedentes), se ha demostrado -en experimentos de elicitación y de control biológico- que la 6PP puede ser inducida (sobreproducida) en presencia de algunos hongos fitopatógenos como *B. cinerea* y *R. solani* (Cooney y Lauren, 1998; Serrano-Carreón et al., 2004). La sobreproducción de 6PP durante el proceso antagonista le permite a *Trichoderma* inhibir y, probablemente, predisponer a las hifas del hospedero para la infección (antibiosis), aún antes de que exista contacto físico entre los microorganismos (Scarselletti y Faull, 1994). En consecuencia, la sobreproducción de 6PP es uno de los múltiples mecanismos de respuesta que *T. harzianum* exhibe ante condiciones hostiles (*i.e.* otros hongos) en su hábitat natural. Además de la presencia de hongos fitopatógenos, condiciones de limitación por nitrógeno han sido reportadas como favorables para la producción de 6PP en cultivos sumergidos de *T. harzianum* (Serrano-Carreón et al., 1992). Así, la presencia de ciertos estímulos ambientales, generalmente adversos y/o limitantes para su desarrollo, presentes tanto en su hábitat natural, como en condiciones artificiales, parecen estimular la biosíntesis de 6PP. Para nuestro caso particular, el aumento de la

EDCF (y por consecuencia de los esfuerzos mecánicos) originaron cambios importantes en el metabolismo y la fisiología de *T. harzianum*, los cuales, a su vez, pudieron favorecer la transición hacia un estado metabólico propicio para la producción de 6PP.

Tabla 6.2. Diámetro crítico estimado (d_{crit}) y diámetro máximo experimental en cultivos de *T. harzianum* como función de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*).

<i>EDCF</i> (kW/m ³ ·s)	3.2	7.4	9.5	23.9	95.9
d_{crit} (μm)	379	574	529	590	601
Diámetro máx. (μm)	388	286	200	206	187

Efecto global de la *EDCF* en cultivos de *T. harzianum*

La figura 6.17 muestra, de manera esquemática, el efecto global de la *EDCF* observado en el presente trabajo. El aumento de la *EDCF* redujo el diámetro promedio de los agregados miceliares (debido a que se favoreció su fragmentación) y originó cambios significativos en el metabolismo de la fuente de carbono (necesarios para satisfacer los requerimientos energéticos de mantenimiento). Condiciones de mayor estrés hidrodinámico redujeron la velocidad específica de crecimiento e incrementaron la velocidad específica de producción de CO₂ a velocidades específicas de consumo de glucosa relativamente constantes. Como resultado, el incremento en la *EDCF* estimuló reacciones catabólicas (producción de CO₂) e indujo la diferenciación celular (esporulación) del microorganismo. Se propone que éstos cambios favorecieron, hasta un cierto rango, la transición hacia un estado metabólico propicio para la producción de 6PP. En términos prácticos, es factible modificar el crecimiento y la productividad de *T. harzianum* (y posiblemente el de otros hongos) a través de la energía suministrada al cultivo.

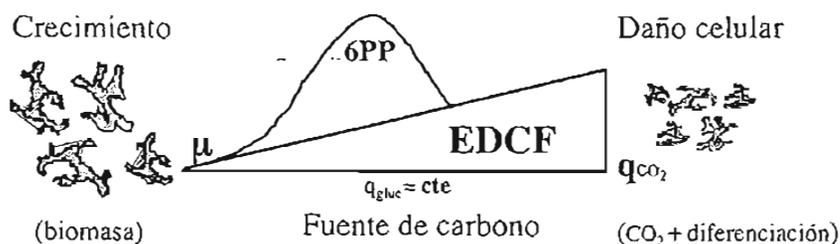


Figura 6.17. Diagrama esquemático del efecto global de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*) sobre la fisiología de *T. harzianum*.

7. Conclusiones

- Se implementó un sistema de fermentación que permitió estudiar, de manera independiente, los efectos hidrodinámicos de los de oxígeno disuelto a través de manipular la composición de los gases de entrada y de mantener un suministro de potencia constante durante los cultivos.
- El sistema de fermentación desarrollado permitió medir y controlar en línea la potencia suministrada durante cultivos miceliares filamentosos.
- La frecuencia de circulación ($1/t_c$) presentó, en el rango estudiado, una mayor influencia sobre el diámetro promedio de los agregados de *Trichoderma harzianum* que la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$).
- La velocidad de disipación de energía (*EDCF*) determinó la velocidad específica de crecimiento (μ) y el diámetro promedio máximo (ϕ_{max}) de los agregados miceliares de *Trichoderma harzianum*.
- El metabolismo de la fuente de carbono fue función de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*). A velocidades de disipación altas, *Trichoderma harzianum* dirigió el flujo intracelular de carbono hacia la producción de CO_2 .
- La productividad específica de 6-pentil- α -pirona (6PP) presentó un máximo entre 7 y 10 $kW/m^3 \cdot s$. Se propone que la biosíntesis de 6PP se indujo en este rango de velocidades como respuesta a los esfuerzos mecánicos aplicados.
- El resultado directo del estrés hidrodinámico sobre *T. harzianum* no fue estrictamente morfológico (fragmentación), ya que la cascada de respuestas fisiológicas incluyó cambios en las velocidades específicas de crecimiento y de producción de CO_2 , variaciones en la productividad específica de 6PP y, bajo ciertas condiciones, la diferenciación celular del hongo, modificando así el crecimiento y la productividad de los cultivos.

8. Perspectivas

- Evaluar el efecto de la velocidad de disipación de energía (*EDCF*), sobre el crecimiento, la morfología y la productividad de *Trichoderma harzianum*, bajo condiciones de disipación de energía relativamente homogéneas (evitando, en medida de lo posible, la compartimentalización de regiones de muy alto estrés mecánico) mediante el uso de impulsores de proximidad (*i.e.* helicoidal).
- Dado el alto costo del *n*-hexadecano, se recomienda evaluar otros solventes orgánicos para ser utilizados durante las fermentaciones extractivas de *Trichoderma harzianum*.
- Con la finalidad de comprobar si condiciones adversas y/o limitantes estimulan la síntesis de 6-pentil- α -pirona, se propone someter al microorganismo a otro tipo de estrés. En este sentido, y dado el sistema de fermentación desarrollado, una posibilidad es la de evaluar el efecto de diferentes concentraciones de oxígeno disuelto -desde relativamente bajas (limitantes) hasta altas (no limitantes)- sobre los cultivos de *Trichoderma harzianum* (*i.e.* realizar un barrido a TOD constantes desde 1 a 35 %).

9. Bibliografía

- Amanullah A, Blair R, Nienow AW, Thomas CR. 1999. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Bioeng* 62: 434-446.
- Amanullah A, Jüsten P, Davies A, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem Eng J* 5: 109-114.
- Amanullah A, Christensen LH, Hansen K, Nienow AW, Thomas, CR. 2002. Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 77: 815-826.
- April TM, Foght JM, Currah RS. 2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol* 46: 38-49.
- Apsite A, Viesturs U, Steinberga A, Toma M. 1998. Morphology and antifungal action of the genus *Trichoderma* cultivated in geometrically dissimilar bioreactors. *World J Microbiol Biotechnol* 14: 23-29.
- Armenante PM, Huang YT. 1992. Experimental determination of the minimum agitation speed for complete liquid-liquid dispersion in mechanically agitated vessels. *Ind Eng Chem Res* 31: 1398-1406.
- Atkinson B, Mavituna F. 1983. *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. The Nature Press, USA: 114-203.
- Ayazi-Shamlou P, Makagiansar HY, Ison AP, Lilly MD, Thomas CR. 1994. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem Eng Sci* 49: 2621-2631.
- Ball R. 2004. Kolmogorov cascade. En: *Encyclopedia of non-linear science*. Scott A. (Ed), Routledge (<http://www.routledge-ny.com/ref/nonlinearsci/>).
- Benzi R. 2003. Getting a grip on turbulence. *Science* 301: 605-606.

- Bonnarme P, Djian A, Latrasse A, Féron G, Giniés C, Durand A, Le Quéré JL. 1997. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J Biotechnol* 56: 143-150.
- Braun S, Vecht-Lifshitz SE. 1991. Mycelial morphology and metabolite production. *TIBTECH* 9: 63-68.
- Breeuwer P, Abee T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* 55: 193-200.
- Büchs J, Zoels B. 2001. Evaluation of maximum to specific power consumption ration in shaking bioreactors. *J Chem Eng Japan* 34: 647-653.
- Charles M. 1985. Fermentation design and scale-up. En: *Comprehensive Biotechnology*, Vol 2. Moo-Young M (Ed.), Pergamon Press, Oxford, UK: 120-150.
- Chisti Y. 2001. Hydrodynamic damage to animal cells. *Crit Rev Biotechnol* 21: 67-110.
- Collins RP, Halim AF. 1972. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *J Agric Food Chem* 20: 437-438.
- Cooney JM, Lauren DR, Poole P, Whitaker G. 1997. Microbial transformation of the *Trichoderma* metabolite 6-*n*-pentyl-2-one. *J Nat Prod* 60: 1242-1244.
- Cooney JM, Lauren DR. 1998. *Trichoderma*/pathogen interactions: measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. *Lett Appl Microbiol* 27: 283-286.
- Cooney JM, Lauren DR. 1999. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-*n*-pentyl-2*H*-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. *J Nat Prod* 62: 681-683.
- Cooney JM, Hotter G, Lauren DR. 2000. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-*n*-pentyl-2*H*-pyran-2-one by cell suspension cultures of *Pinus radiata*. *Phytochem* 53: 447-450.
- Croughan MS, Hamel JF, Wang DIC. 1987. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnol Bioeng* 29: 130-141.

- Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KCAM. 1997. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng* 55: 715-726.
- Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KChAM. 1998. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng* 57: 409-419.
- Doran PM. 1995. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, London UK: 98-217.
- Dyster KN, Koutsakos E, Jaworski Z, Nienow AW. 1993. An LDA study of the radial discharge velocities generated by a Rushton turbine: Newtonian fluids, $Re \geq 5$. *Trans IChemE* 71: 11-23.
- Estrada MM. 2003. Escalamiento de un proceso de fermentación extractiva para la producción de 6-pentil- α -pirona por el hongo *Trichoderma harzianum*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Tuxtla-Gutiérrez, Tuxtla-Gutiérrez, Chiapas.
- Felse PA, Panda T. 2000. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors-the influence of agitator speed. *Biochem Eng J* 4: 115-120.
- Freeman A, Woodley J, Lilly M. 1993. *In situ* removal as a tool for bioprocessing. *Bio/Technology* 11: 1007-1112.
- Galindo E, Nienow AW, Badham RS. 1988. Mixing of simulated xanthan gum broths. Proc 2nd Int Conf on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics. King R (Ed.), BHR Group, Cranfield, UK: 65-78.
- Galindo E, Flores C, Larralde-Corona P, Corkidi G, Rocha-Valadez JA, Serrano-Carreón L. 2004. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochem Eng J* 18: 1-8.
- Gamboa H. 2004. Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.

- Godoy-Silva RD, Serrano-Carreón L, Ascanio G, Galindo E. 1997. Effect of impeller geometry on the production of aroma compounds by *Trichoderma harzianum*. Proc 4th Int Conf on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics. Nienow AW (Ed.), BHR Group, Bedford, UK: 61-72.
- Godoy-Silva RD. 1998. Efecto de la geometría del impulsor sobre el crecimiento, reología y producción de aromas por *Trichoderma harzianum* en cultivo sumergido. Tesis de Maestría en Biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.
- Gómez R, Schnabel I, Garrido J. 1988. Pellet growth and citric acid yield of *Aspergillus niger* 110. *Enzyme Microb Technol* 10: 188-191.
- Hassan M, Corkidi G, Galindo E, Flores C, Serrano-Carreón L. 2002. Accurate and rapid viability assessment of *Trichoderma harzianum* using fluorescence-based digital image analysis. *Biotechnol Bioeng* 80: 677-684.
- Henriksen CM, Nielsen J, Villadsen J. 1997. Influence of the dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady-state cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Prog* 13: 776-782.
- Higashiyama K, Murakami K, Tsujimura H, Matsumoto N, Fujikawa S. 1999. Effects of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *Biotechnol Bioeng* 63: 442-448.
- Hjeljord L, Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. En: *Trichoderma and Gliocladium*, Vol 2. Harman and Kubicek (Ed.), Taylor and Francis, London: 131-151.
- Ho CS, Ju LK, Baddour RF. 1990. Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of *n*-hexadecane. *Biotechnol Bioeng* 36: 1110-1118.
- Janssens L, De Pooter HL, Schamp NM, Vandamme EJ. 1992. Production of flavors by microorganisms. *Process Biochem* 27: 195-215.
- Jin Q, Bethke C. 2003. A new rate law describing microbial respiration. *Appl Environ Microbiol* 69: 2340-2348.

- Johansen CL, Coolen L, Hunik JH. 1998. Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Biotechnol Prog* 14: 233-240.
- Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* 1504: 179-195.
- Joshi J, Elias C, Patole M. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Biochem Eng J* 62: 121-141.
- Ju LK, Ho CS. 1989. Oxygen diffusion coefficient and solubility in *n*-hexadecane. *Biotechnol Bioeng* 34: 1221-1224.
- Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 52: 672-684.
- Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 1998. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 59: 762-775.
- Kalyani A, Prapulla S, Karanth N. 2000. Study of production of 6-pentyl- α -pyrone using two methods of fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 610-612.
- Koch AL. 1975. The kinetics of mycelial growth. *J Gen Microbiol* 89: 209-216.
- Kollmer A, Schmid A, Rudolf von Rohr PH, Sonnleitner B. 1999. On liquid-liquid mass transfer in two-liquid-phase fermentations. *Bioproc Eng* 20: 441-448.
- Kolmogorov AN. 1941. The local structure of turbulence in incompressible viscous fluids for very large Reynolds numbers. *Dokl Akad Nauk SSSR* 30. Translated by V. Levin. 1991. Reprinted in *Proc R Soc Lond A* 434: 9-13.
- Large KP, Ison AP, Williams DJ. 1998. The effect of agitation rate on lipid utilization and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* 63: 111-119.
- Lejeune R, Baron GV. 1995. Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 43: 249-258.

- Li ZJ, Shukla V, Fordyce AP, Pedersen AG, Wenger KS, Marten MR. 2000. Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation at the production scale. *Biotechnol Bioeng* 70: 300-312.
- Li ZJ, Shukla V, Wenger K, Fordyce A, Pedersen AG, Marten M. 2002. Estimation of hyphal tensile strength in production-scale *Aspergillus oryzae* fungal fermentations. *Biotechnol Bioeng* 77: 601-613.
- Li ZJ, Bhargava S, Marten MR. 2002a. Measurements of the fragmentation rate constant imply that the tensile strength of fungal hyphae can change significantly during growth. *Biotechnol Lett* 24: 1-7.
- Lucatero S. 2002. Dispersión de aceite y aire en presencia de micelio disperso y *pellets* de *Trichoderma harzianum*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.
- Lucatero S, Larralde-Corona CP, Corkidi G, Galindo E. 2003. Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology. *Biotechnol Prog* 19: 285-292.
- Makagiansar HY, Ayazi-Shamlou P, Thomas CR, Lilly MD. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioproc Eng* 9: 83-90.
- Marten MR, Velkovska S, Khan SA, Ollis DF. 1996. Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnol Prog* 12: 602-611.
- Mc Queen A, Meilhoc E, Bailey JE. 1987. Flow effects on the viability and lysis of suspended mammalian cells. *Biotechnol Lett* 9: 831-836.
- Metzner AB, Otto RE. 1957. Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE J* 3: 3-10.
- Moreira JL, Cruz PE, Santana PC, Aunins JG, Carrondo MJT. 1995. Formation and disruption of animal cell aggregates in stirred vessels: mechanisms and kinetic studies. *Chem Eng Sci* 50: 2747-2764.

- Mukataka S, Kobayashi N, Sato S, Takahashi J. 1988. Variation in cellulase-constituting components from *Trichoderma reesei* with agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 32: 760-763.
- Nielsen J. 1993. A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnol Bioeng* 41: 715-727.
- Nienow AW. 1984. Mixing studies on high viscosity fermentation processes-xanthan gum. *World Biotechnol Report* 1: 293-304.
- Nienow AW, Ulbrecht JJ. 1985. Gas-liquid mixing and mass transfer in high viscosity liquids. En: *Mixing of Liquids by Mechanical Agitation*. Ulbrecht JJ, Patterson GE. (Ed.), Gordons and Breach, New York: 203-235.
- Nienow AW. 1990. Agitators for mycelial fermentations. *TIBTECH* 8: 224-233.
- Oldshue JY. 1983. *Fluid mixing technology*. Chemical Engineering, MacGraw-Hill Pub. Co. New York, NY.
- Olsvik E, Kristiansen B. 1994. Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnol Adv* 12: 1-39.
- Özcan NG, Decloux M, Bruxelmane M. 1990. Effect of viscosity on cavity formation and power characteristics of an aerated Newtonian fluid. *Trans IChemE* 68: 63-68.
- Packer HL, Thomas CR. 1990. Morphological measurements of filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol Bioeng* 35: 870-881.
- Pacek AW, Man CC, Nienow AW. 1997. Coalescence rates in water (aqueous)-in-oil and in oil-in-water (aqueous) dispersions. *Proc 9th Euro Mixing Conference* 11: 263-276.
- Papagianni M, Matthey M, Kristiansen B. 1999. Hyphal vacuolation and fragmentation in batch and fed-batch culture of *Aspergillus niger* and its relation to citric acid production. *Process Biochem* 35: 359-366.
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22: 189-259.

- Paul GC, Kent CA, Thomas CR. 1994. Hyphal vacuolation and fragmentation in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 44: 655-660.
- Paul GC, Thomas CR. 1996. A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 51: 558-572.
- Paul GC, Priede MA, Thomas CR. 1999. Relationship between morphology and citric acid production in submerged *Aspergillus niger* fermentations. *Biochem Eng J* 3: 121-129.
- Pollard DJ, Kirschner TF, Hernández D, Hunt G, Olewinski R, Salmon PM. 2002. Pilot-scale process sensitivity studies for the scaleup of a fungal fermentation for the production of pneumocandins. *Biotechnol Bioeng* 78: 270-279.
- Poole PR, Whitaker G. 1997. Biotransformation of 6-pentyl-2-pyrone by *Botrytis cinerea* in liquid cultures. *J Agric Food Chem* 45: 249-252.
- Pope SB. 2000. *Turbulent flows*. Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Prapulla SG, Karanth NG, Engel KH, Tressl R. 1992. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma viride*. *Flavor Frag J* 7: 231-234.
- Prokop A, Bajpai R. 1992. The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. *Adv Appl Microbiol* 37: 165-232.
- Reuss M. 1988. Influence of mechanical stress on the growth of *Rhizopus nigricans* in stirred bioreactors. *Chem Eng Technol* 11: 178-187.
- Riley GL, Tucker KG, Paul GC, Thomas CR. 2000. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnol Bioeng* 68: 160-172.
- Scarselletti R, Faull JL. 1994. In vitro activity of 6-pentyl- α -pyrone a metabolite of *Trichoderma harzianum* in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycology Research* 98: 1207-1209.
- Schirmböck M, Lorito M, Wang YL, Hayes CK, Arisan-Atac I, Scala F, Harman GE, Kubicek CP. 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of

- Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 60: 4364-4370.
- Serrano-Carreón L. 1992. Étude sur le métabolisme des lipides et la production de 6-pentyl- α -pyrone par deux espèces du genre *Trichoderma*. Thèse de Doctorat, de l'Université de Bourgogne, ENS, BANA, Francia.
- Serrano-Carreón L, Hathout Y, Bensoussan M, Belin JM. 1992. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnol Lett* 14: 1019-1024.
- Serrano-Carreón L, Flores C, Galindo E. 1997. γ -Decalactone production by *Trichoderma harzianum* in stirred bioreactors. *Biotechnol Prog* 13: 205-208.
- Serrano-Carreón L, Corona RM, Sánchez A, Galindo E. 1998. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. *Process Biochem* 33: 133-146.
- Serrano-Carreón L, Balderas-Ruíz K, Galindo E, Rito-Palomares M. 2002. Production and biotransformation of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 170-174.
- Serrano-Carreón L, Flores C, Rodríguez B, Galindo E. 2004. *Rhizoctonia solani*, an elicitor of 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum* in a two liquid phases, extractive fermentation system. *Biotechnol Lett* 26: 1403-1406.
- Smith JJ, Lilly MD, Fox, RI. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 35: 1011-1023.
- Tekin AR, Oner MD, Kaya A. 1995. Production of a coconut-like aroma by *Trichoderma viride* in aqueous and two phase fermentation. *Trans J Eng Environ Sci* 19: 247-251.
- Thomas CR, Zhang Z. 1998. The effect of hydrodynamics on biological materials. En: *Adv. Bioprocess Eng. II*. Galindo E. y Ramírez OT. (Eds), Kluwer Academic Publishers, 137-170.
- Tramper J, van't Riet K. 1991. *Basic bioreactor design*. Marcel Dekker Inc, New York: 136-180.

- van Suijdam JC, Metz B. 1981. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnol Bioeng* 23: 111-148.
- Vardar-Sukan F. 1986. Dynamics of oxygen mass transfer in bioreactors. Part II: Design variables. *Process Biochem* 5: 40-44.
- Volke-Sepúlveda TL, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E. 2003. Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol* 87: 81-86.
- Weiss RM, Ollis DF. 1980. Extracellular microbial polysaccharides I. Substrate, biomass and production kinetics. Equations for batch xanthan gum fermentation. *Biotechnol Bioeng* 22: 859-873.
- Zabriskie DW, Armiger WB, Phillips DH, Albano PA. 1982. Traders guide to fermentation media formulation. Produced by Traders Protein, P.O. Box 8407, Memphis, Tennessee, 38108, USA.
- Zar JH. 1999. Biostatistical analysis. Prentice-Hall Inc, New Jersey: 324-359.
- Zeppa G, Allegrone G, Barbeni M, Guarda PA. 1990. Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride*. *Ann Microbiol* 40: 171-176.
- Zhang Z, Al-Rubeai M, Thomas CR. 1993. Estimation of disruption of animal cells by turbulent capillary flow. *Biotechnol Bioeng* 42: 987-993.
- Zhou G, Kresta SM. 1998. Correlation of mean drop size and minimum drop size with the turbulence energy dissipation and the flow in an agitated tank. *Chem Eng Sci* 53: 2063-2079.

Anexo 1

Determinación de la energía específica de disipación en la zona de barrido del impulsor y de la frecuencia de circulación en cultivos de *T. harzianum*

De acuerdo a la ecuación 2.10, la energía específica de disipación en la zona de barrido del impulsor esta dada por: $P/k \cdot D^3$. Así, y a partir de la potencia medida en línea con el torquímetro, se determinó su valor puntual. La tabla A.1.1 muestra los cálculos realizados para su determinación al inicio de los cultivos. Cálculos similares fueron realizados para determinar el resto de los valores presentados en la figura 6.2.

Tabla A.1.1. Determinación de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$).

Experimento	P_{tot} [W]	P_{imp} [W]	D [cm]	W [cm]	k [-]	$P/k \cdot D^3$ [kW/m ³]
I	1.54	0.513	7.4	1.05	0.11144	11.37
II	3.02	1.007	7.4	1.05	0.11144	22.29
III	6.05	2.017	10.45	2.10	0.15783	11.20
IV	11.99	3.997	10.45	2.10	0.15783	22.19
V	20.25	6.750	7.4	1.05	0.11144	149.47

donde P_{tot} es la potencia total suministrada, P_{imp} es la potencia suministrada por impulsor (asumiendo que los tres impulsores suministran la misma potencia), D es el diámetro del impulsor, W es la altura de la paleta del impulsor, k es un factor geométrico (Jüsten et al., 1996), definido como: $[(\pi/4) \cdot (W/D)]$ y $P/k \cdot D^3$ es la energía específica de disipación.

Por otro lado, la frecuencia de circulación del micelio por la zona de los impulsores o $1/t_c$ esta dado por la ecuación 2.11: $(F_{lc} \cdot N \cdot D^3) / V_L$. Para estimar su valor se utilizaron los valores de potencia (gaseada y no gaseada), la velocidad de agitación y los parámetros reológicos (K y n) medidos por el torquímetro, tacómetro y reómetro, respectivamente. A partir de lo anterior, se calculó el valor del número de flujo gaseado (F_{lc}); el cual es definido como (Jüsten et al., 1998):

$$F_{lc} = F_l \left(\frac{P_g}{P} \right) \quad (A.1.1)$$

donde F_l es el número de flujo no gaseado [-] y (P_g/P) es la caída de potencia [-] medida *in situ* por el equipo. La metodología empleada para calcular el F_l dependió del régimen de

flujo generado (transición o turbulento), determinado, a su vez, por medio del número de Reynolds modificado (utilizado para fluidos que siguen el modelo reológico de la ley de la potencia), dado por:

$$Re = \frac{\rho \cdot N^{2-n} \cdot D^2}{K \cdot k_s^{n-1}} \quad (A.1.2)$$

donde ρ es la densidad del medio [Kg/m^3], N es la velocidad de agitación [rps], n es el índice de flujo [-], K es el índice de consistencia [$\text{Pa}\cdot\text{s}^n$] y k_s es la constante de Metzner y Otto para turbinas Rushton (*i.e.* 11.5; Doran, 1995). Dado que se utilizó *n*-hexadecano como fase extractante (20% v/v), la densidad promedio del medio de fermentación extractiva fue de aproximadamente 955 Kg/m^3 [$(1000 \times 0.80) + (773.4 \times 0.20)$].

Para régimen turbulento ($Re > 2000$; Dyster et al., 1993), el número de flujo no gaseado (F_l) estuvo definido como (Jüsten et al., 1996):

$$F_l = \left[0.91 \cdot P_o \cdot \left(\frac{W}{D} \right) \right]^{0.5} \quad (A.1.3)$$

donde W/D es la relación altura de paleta/diámetro de impulsor [-] y P_o es el número de potencia [-], calculado a través de la ecuación de la potencia (Tramper y van't Riet, 1991):

$$P_o = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5} \quad (A.1.4)$$

donde P es la potencia (no gaseada) suministrada por impulsor [W].

Para el régimen de transición ($Re < 2000$; Dyster et al. 1993), el número de flujo no gaseado (F_l') se determinó al igual que para el turbulento (ec. A.1.3), pero su valor se corrigió en base a la gráfica logarítmica de F_l vs. Re (figura A.1.1) publicada por Dyster et al. (1993).

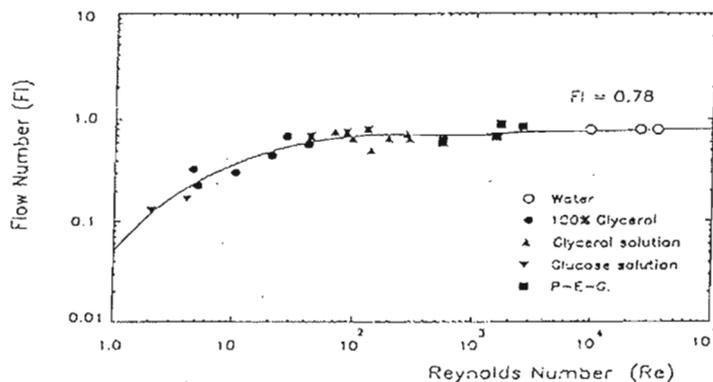


Figura A.1.1. Número de flujo (F_l) vs. número de Reynolds (Re) para turbinas Rushton utilizando diferentes tipos de fluidos (adaptado de Dyster et al., 1993).

Como ejemplo, a continuación se muestra el cálculo de los tiempos de circulación para las 0 y 73 h en el cultivo desarrollado a 22.3 kW/m^3 ($P/V \approx 0.3 \text{ W/L}$) con impulsores de 7.4 cm de diámetro ($D/T = 1/3$). Primeramente, el valor aproximado de la potencia suministrada no gaseada (P) se determinó a partir de cerrar la aireación durante un breve período (figura A.1.2). La tabla A.1.2 muestra los valores de velocidad de agitación (N), potencia gaseada (P_g) y no gaseada (P) y caída de potencia (P_g/P) medidos por el sistema de fermentación, así como el número de potencia (P_o) determinado a partir de éstos (ec. A.1.4).

Tabla A.1.2. Potencia suministrada y agitación medidos *in situ* en el cultivo a 22.3 kW/m^3 .

Tiempo (h)	N (rpm)	P_g (W)	P (W)	P_o (-)	P_g/P
0	350	3.02	4.23	3.35	0.71
72.8	363	2.88	5.44	3.86	0.53

Es importante recordar que el número de potencia (P_o) se determinó a partir de la potencia no gaseada (P) suministrada por impulsor (la cual se asumió fue el cociente de P entre el número de impulsores). Para nuestro caso particular, se emplearon tres turbinas Rushton.

Posteriormente, y en base las propiedades reológicas de los caldos (K y n), se calculó el Re modificado (ec. A.1.2). La tabla A.1.3 muestra los valores de índice de consistencia (K) y flujo (n) medidos por el reómetro, así como el Re determinado a partir de éstos. Una vez definido el régimen de flujo del sistema, se estimó el número de flujo no gaseado (Fl) en base a la ecuación A.1.3 (turbulento) y figura A.1.1 (transición). El Fl calculado se utilizó, posteriormente, para definir el número de flujo gaseado (Fl_g) mediante la ecuación A.1.1.

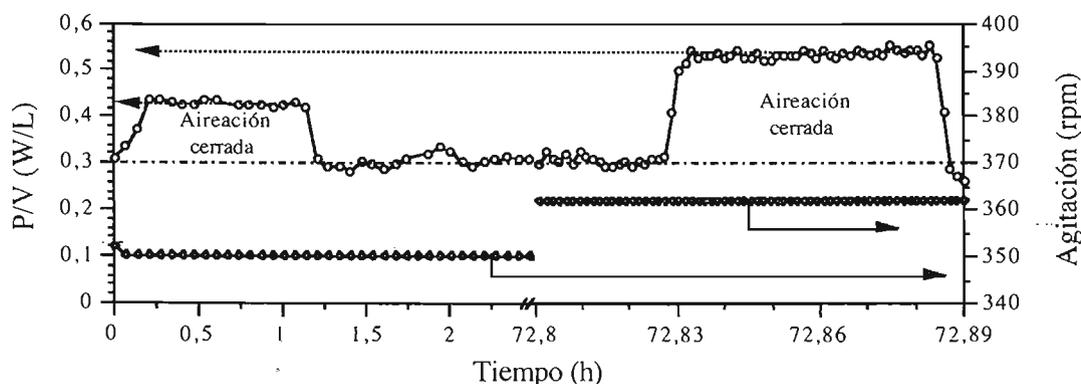


Figura A.1.2. Medición de la potencia suministrada (gaseada y no gaseada) y velocidad de agitación a las 0 y 73 h en el cultivo desarrollado a una potencia volumétrica (P/V) constante de 0.3 W/L (22.3 kW/m^3).

La tabla A.1.3 muestra la frecuencia de circulación estimada ($1/t_c$) y las determinaciones realizadas (Re , Fi , Fi' y Fi_G) para llegar a este valor. Al inicio del cultivo, cuando las condiciones del medio fueron similares a las del agua, el flujo fue turbulento, por lo que Fi se estimó, exclusivamente, de la ecuación A.1.3. Por el contrario, a las 73 h, el medio presentó características pseudoplásticas, por lo que el Fi tuvo que corregirse (figura A.1.1) en función de la diferencia observada entre el valor en régimen turbulento (> 2000) y de transición (≈ 418). Una vez calculado el Fi , el número de flujo gaseado (Fi_G , ec. A.1.1) se estimó y su valor se incorporó en la ec. 2.10 para determinar la frecuencia de circulación. Dado que el análisis realizado fue por impulsor, el volumen total (10 L) se dividió entre el número de impulsores (tres) y éste volumen se utilizó para el cálculo de $1/t_c$.

Tabla A.1.3. Determinación de la frecuencia de circulación ($1/t_c$).

K (Pa·s ⁿ)	n (-)	Re (-)	Fi (-)	Fi' (-)	Fi _G (-)	1/t _c (s ⁻¹)	t _c (s)
0.001	1	30,506 ^A	0.658	-	0.467	0.331	3.02
0.191	0.782	418 ^B	0.706	0.634	0.336	0.247	4.05

^A, régimen turbulento

^B, régimen de transición

Es importante mencionar que los Re más bajos calculados fueron de aproximadamente 280 durante los cultivos desarrollados a las condiciones más bajas de *EDCF* (3.2 kW/m³·s), por lo que, de acuerdo al número de Reynolds modificado, en ningún cultivo predominó el flujo laminar ($Re < 10$; Doran, 1995).

Anexo 2

Cultivos de *T. harzianum* desarrollados a energía de disipación constante

En este anexo se muestran las cinéticas individuales de los cultivos desarrollados a energía específica de disipación, en la zona de barrido del impulsor, constante (y cuyas condiciones se presentan en la tabla 5.1). En total se realizaron 8 fermentaciones. Los experimentos I, II y V ($D/T = 1/3$) se realizaron por duplicado, mientras que los cultivos III y IV ($D/T = 1/2$) se desarrollaron sólo una ocasión. Las figuras (A.2.1 – A.2.5) muestran la evolución de la energía de disipación ($P/k \cdot D^3$), velocidad de agitación (N), concentración de biomasa (X), consumo de glucosa (S), índice de flujo (n) y consistencia (K), diámetro promedio (ϕ) y consistencia (C) de los agregados, tensión de oxígeno disuelto (TOD), porcentaje de CO_2 a la salida y producción de 6-pentil- α -pirona (6PP) durante los cultivos. Las líneas trazadas sólo muestran la tendencia general de los datos. En algunos casos no se muestran todos los datos experimentales debido a una incorrecta calibración (analizador de CO_2) ó a fallas técnicas en el reómetro. En éste último caso, la ecuación A.1.3 se utilizó directamente para estimar el número de flujo no gaseado (*i.e.* se asumió flujo turbulento).

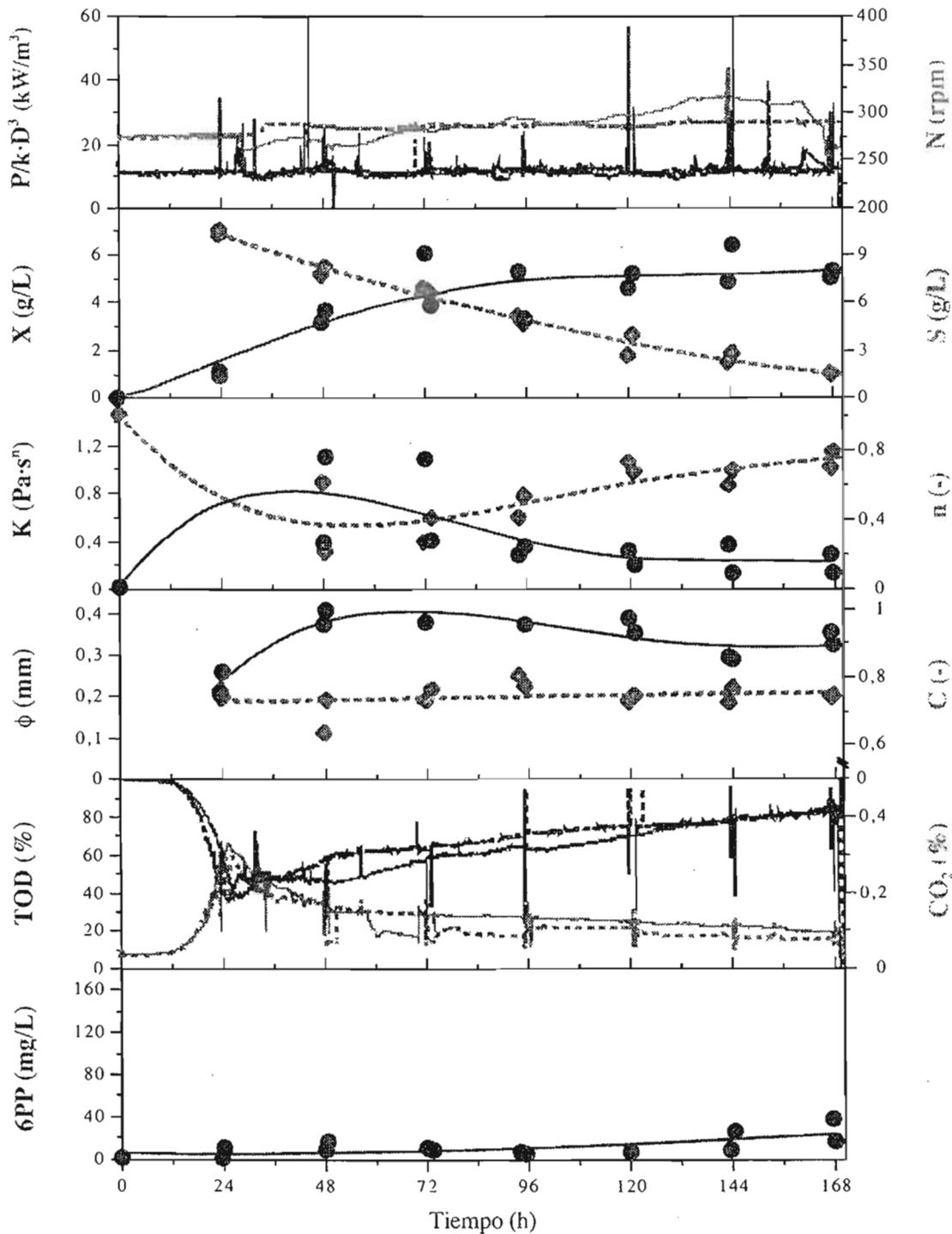


Figura A.2.1. Evolución de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$), velocidad de agitación (N), concentración de biomasa (X), consumo de glucosa (S), índice de consistencia (K) y flujo (n), diámetro promedio (ϕ) y consistencia (C) de los agregados, tensión de oxígeno disuelto (TOD), porcentaje de CO_2 a la salida y producción de 6-pentil- α -pirona (6PP) en los cultivos de *T. harzianum* desarrollados a 11.4 kW/m^3 utilizando tres turbinas Rushton con una relación $D/T = 1/3$.

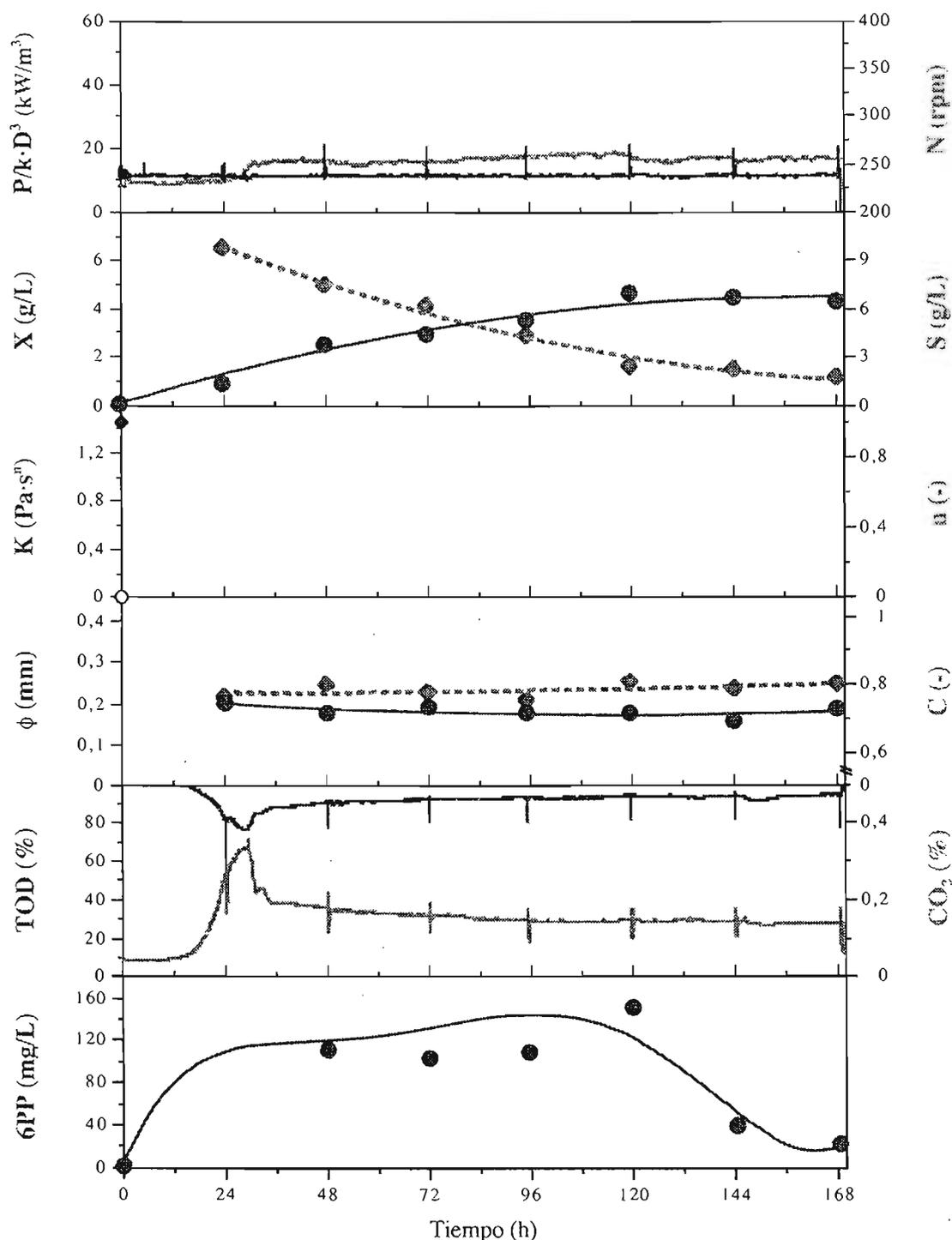


Figura A.2.2. Evolución de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$), velocidad de agitación (N), concentración de biomasa (X), consumo de glucosa (S), índice de consistencia (K) y flujo (n), diámetro promedio (ϕ) y consistencia (C) de los agregados, tensión de oxígeno disuelto (TOD), porcentaje de CO_2 a la salida y producción de 6-pentil- α -pirona (6PP) en el cultivo de *T. harzianum* desarrollado a 11.2 kW/m^3 utilizando tres turbinas Rushton con una relación $D/T = 1/2$.

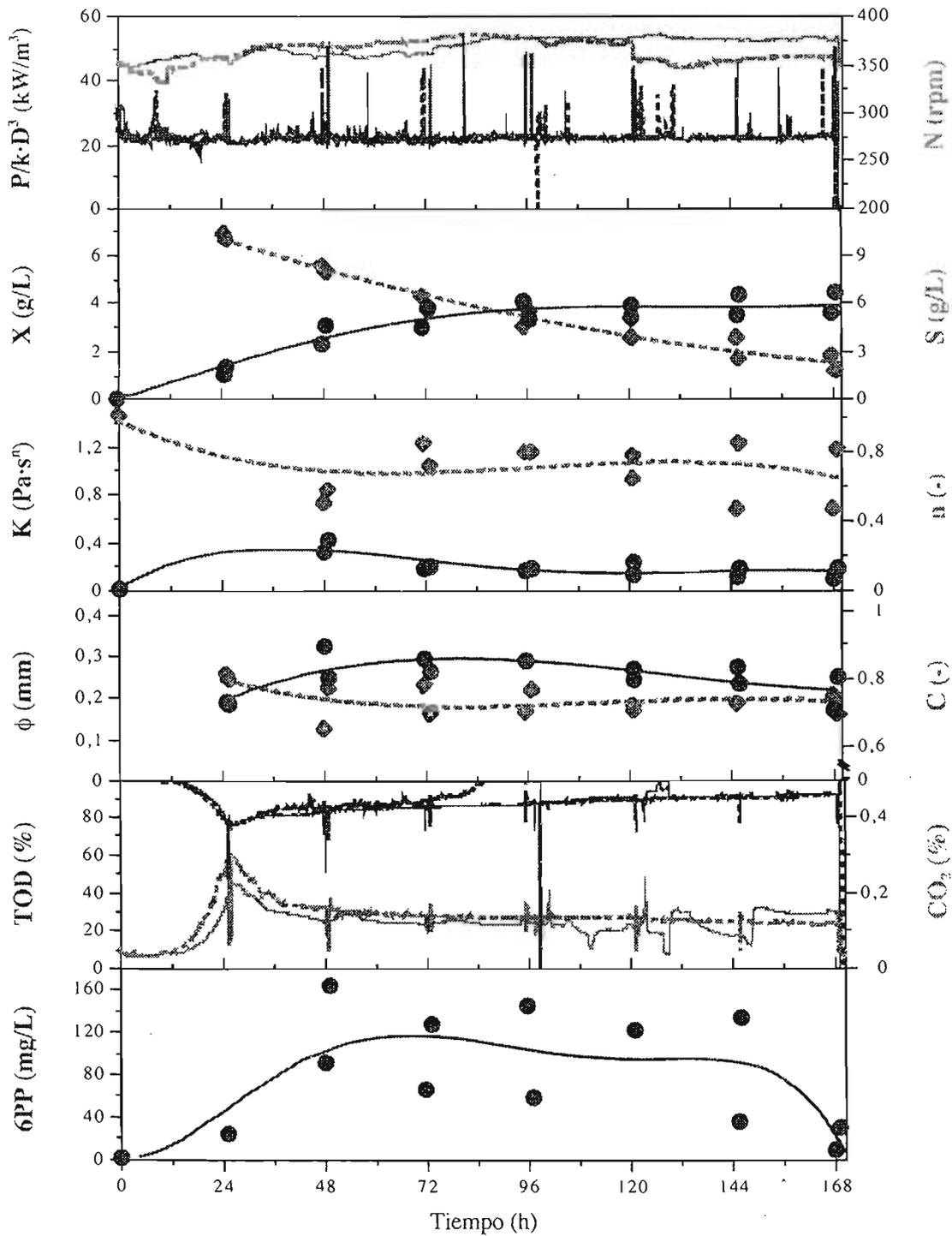


Figura A.2.3. Evolución de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$), velocidad de agitación (N), concentración de biomasa (X), consumo de glucosa (S), índice de consistencia (K) y flujo (n), diámetro promedio (ϕ) y consistencia (C) de los agregados, tensión de oxígeno disuelto (TOD), porcentaje de CO_2 a la salida y producción de 6-pentil- α -pirona (6PP) en los cultivos de *T. harzianum* desarrollados a 22.3 kW/m^3 utilizando tres turbinas Rushton con una relación $D/T = 1/3$.

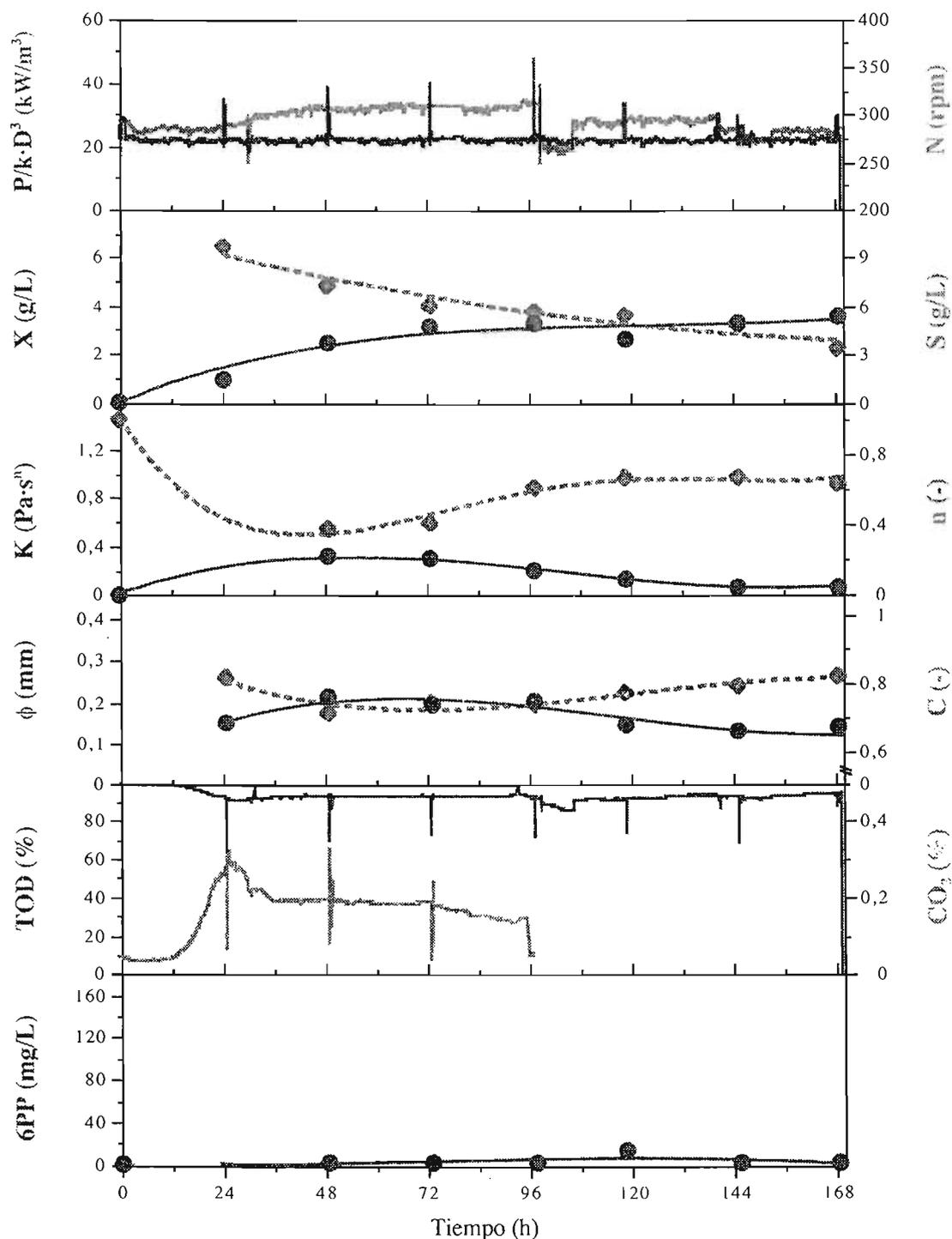


Figura A.2.4. Evolución de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$), velocidad de agitación (N), concentración de biomasa (X), consumo de glucosa (S), índice de consistencia (K) y flujo (n), diámetro promedio (ϕ) y consistencia (C) de los agregados, tensión de oxígeno disuelto (TOD), porcentaje de CO_2 a la salida y producción de 6-pentil- α -pirona (6PP) en el cultivo de *T. harzianum* desarrollado a 22.2 kW/m^3 utilizando tres turbinas Rushton con una relación $D/T = 1/2$.

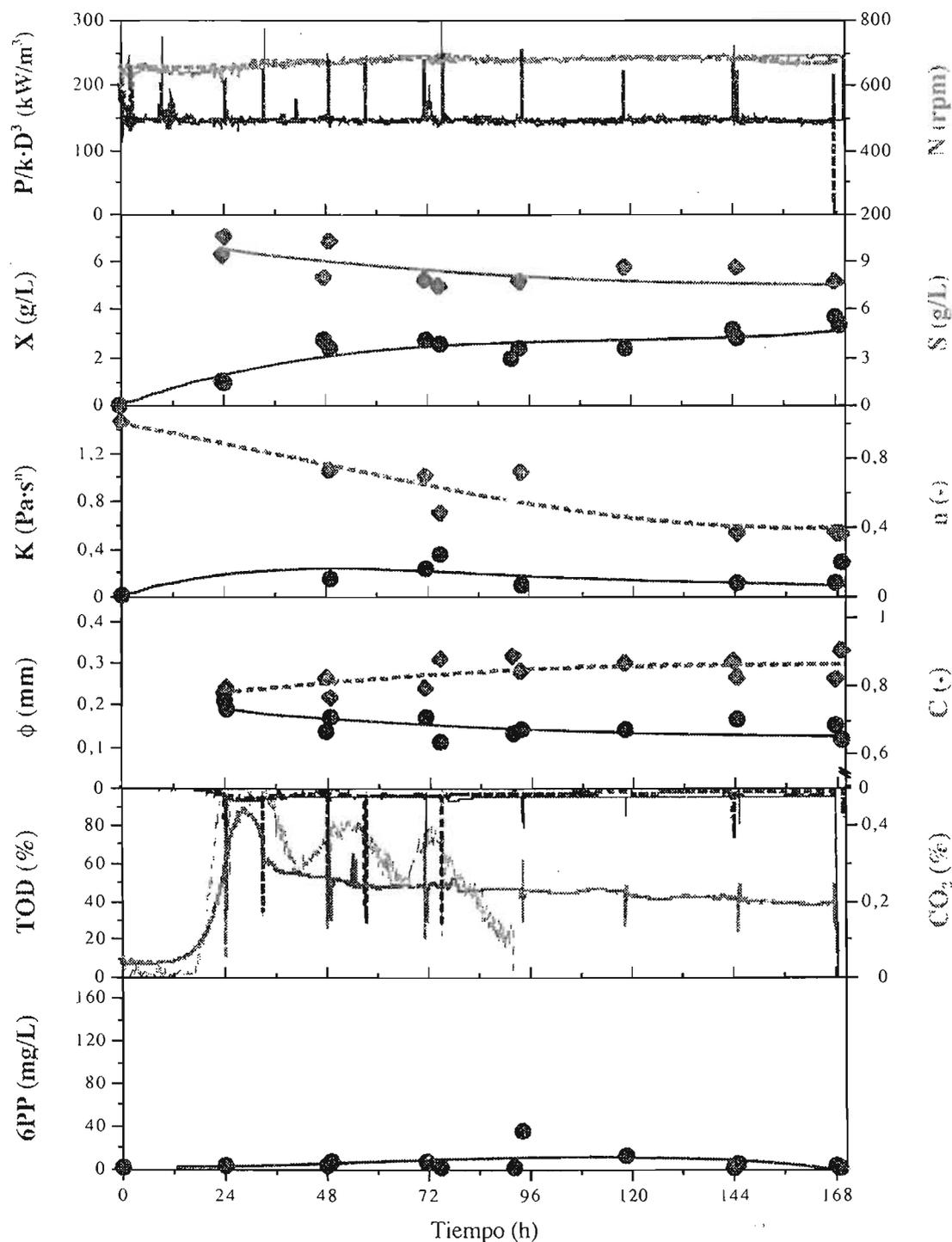


Figura A.2.5. Evolución de la energía específica de disipación ($P/k \cdot D^3$), velocidad de agitación (N), concentración de biomasa (X), consumo de glucosa (S), índice de consistencia (K) y flujo (n), diámetro promedio (ϕ) y consistencia (C) de los agregados, tensión de oxígeno disuelto (TOD), porcentaje de CO_2 a la salida y producción de 6-pentil- α -pirona (6PP) en los cultivos de *T. harzianum* desarrollados a 149.5 kW/m^3 utilizando tres turbinas Rushton con una relación $D/T = 1/3$.

Anexo 3

Determinación del tamaño de *eddie* (microescala de Kolmogorov)

De acuerdo a la ec. 2.9, la microescala de Kolmogorov (tamaño de *eddie* más pequeño que puede formarse) esta dada por:

$$\lambda = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4} \quad (2.9)$$

donde λ es el tamaño de *eddie* [m], ν es la viscosidad cinemática del líquido [m^2/s] y ε es la energía local de disipación por unidad de masa [W/kg]. La viscosidad cinemática (ν) a su vez esta definida como:

$$\nu = \frac{\eta_a}{\rho} \quad (A.3.1)$$

donde ρ es la densidad del medio extractivo (aproximadamente $955 \text{ Kg}/\text{m}^3$; anexo 1) y η_a es la viscosidad aparente del caldo [$\text{Pa}\cdot\text{s}$], determinada mediante la ecuación de la ley de la potencia (ec. 2.2). Para estimar el gradiente de deformación ($\dot{\gamma}$) se utilizó el concepto de gradiente de deformación promedio propuesto por Metzner y Otto (ec. 4.9), empleando un valor de 11.5 para k_s (Doran, 1995). Como resultado, η_a se estimó de acuerdo a:

$$\eta_a = K \cdot (11.5 \cdot N)^{n-1} \quad (A.3.2)$$

donde K es el índice de consistencia [$\text{Pa}\cdot\text{s}^n$], N es la velocidad de agitación [rps] y n es el índice de flujo [-]. Por otro lado, y dado que los esfuerzos máximos de deformación se encuentran en la zonas aledañas a los impulsores, la energía local de disipación por unidad de masa (ε) se calculó en base a $P/k\cdot D^3$ y no a la energía global (P/V). El anexo 1 describe detalladamente la determinación de la energía específica de disipación ($P/k\cdot D^3$).

Como ejemplo, la tabla A.3.1 muestra los valores experimentales y los cálculos realizados para determinar a λ a las 0 y 73 h del cultivo desarrollado a $22.3 \text{ kW}/\text{m}^3$ ($D/T = 1/3$).

Tabla A.3.1. Determinación del tamaño de *eddie* (λ).

Tiempo (h)	N (rpm)	P_g (W)	$P/k\cdot D^3$ (kW/m^3)	ε (m^2/s^3)	K ($\text{Pa}\cdot\text{s}^n$)	n (-)	ν (m^2/s)	λ (μm)
0	350	3.02	22.29	23.34	0.001	1	1.05×10^{-6}	15
72.8	363	2.88	21.26	22.26	0.191	0.782	79.3×10^{-6}	387

Anexo 4

Estimación de los parámetros cinéticos y ajuste de los datos experimentales al modelo logístico y de Luedeking-Piret

La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó de acuerdo al modelo logístico:

$$\ln\left(\frac{X^*}{1-X^*}\right) = \mu \cdot t - \ln\left[\left(\frac{X_m}{X_o}\right) - 1\right] \quad (4.11)$$

μ se calculó a partir de la pendiente $\ln[X^*/1-X^*]$ vs. tiempo (figura A.4.1). Los valores determinados se muestran en la tabla A.4.1. Con estos datos (μ) y mediante la ecuación 4.12 se modeló el crecimiento miceliar. La figura A.4.2 muestra el ajuste de los datos experimentales al modelo logístico.

Por su parte, el rendimiento de biomasa en base a glucosa ($Y_{X/S}$) se estimó de acuerdo al modelo de Luedeking-Piret:

$$S_o - S(t) = \left(\frac{1}{Y_{X/S}}\right)(X - X_o) + (K_e) \frac{X_m}{\mu} \left\{ \ln\left[1 - \left(\frac{X_o}{X_m}\right)(1 - e^{\mu t})\right] \right\} \quad (4.14)$$

$Y_{X/S}$ se calculó entonces de la pendiente $S_o - S(t) - K_e[X_m/\mu]\{\ln[1 - (X_o/X_m)(1 - e^{\mu t})]\}$ vs. $[X - X_o]$ (figura A.4.3). La tabla A.4.1 muestra los $Y_{X/S}$ calculados para cada condición de cultivo, mismos que se utilizaron para modelar el consumo de glucosa mediante la ecuación 4.16. El ajuste entre la glucosa residual y el modelo (Luedeking-Piret) se muestra en la figura A.4.4.

Tabla A.4.1. Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ), rendimiento de biomasa en base a glucosa ($Y_{X/S}$) y constante de producción de CO_2 (α) de acuerdo al modelo logístico y de Luedeking-Piret.

EDCF (kW/m ³ ·s)	D/T (-)	μ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g _x /g _s)	α (g _{CO2} /g _x)
3.2	1/3	0.05193	1.1859	0.7756
7.4	1/3	0.04006	0.6160	0.8786
9.5	1/2	0.04407	0.7905	0.9246
23.9	1/2	0.03487	0.6957	1.4488
95.9	1/3	0.03292	0.7214	2.5716

Es importante mencionar que los rendimientos determinados ($Y_{x/s}$) son aparentes ya que no fue posible determinar la concentración total de glucosa presente en el medio de cultivo debido a la posible hidrólisis de la maltosa (disacárido D-glucosa + D-glucosa presente en el extracto de malta y cuyo contenido es superior al 52 % de la composición total; Zabriskie et al., 1982). Como resultado, la concentración total de glucosa (inicial + generada) fue desconocida. Adicionalmente, existe la posibilidad de que *T. harzianum* haya degradado y, posteriormente, utilizado al *n*-hexadecano (20 % v/v) como fuente adicional de carbono ya que su contenido en base a gramo de carbono por litro de medio (g_C/L) es aproximadamente 13.5 veces mayor que en el medio rico (131.5 vs. 9.7 g_C/L).

Sin embargo, y a pesar de la alta relación de carbono presente en el *n*-hexadecano (0.85 $g_C/g_{\text{hexadecano}}$ vs. 0.4 g_C/g_{glucosa}), la degradación de éste resulta poco probable. Si bien no se evaluó el posible consumo del *n*-hexadecano durante los cultivos, la concentración de glucosa nunca fue limitante (*i.e.* siempre fue superior a los 1.5 g/L ; anexo 2). Un balance de carbono, que incluyó a la biomasa (1 $g_X/L \approx 0.49 g_C/L$) y la producción de CO_2 (1 $g_{CO_2}/L \approx 0.273 g_C/L$), confirmó que el carbono presente en el medio rico (glucosa y extracto de malta) permitiría satisfacer los requerimiento máximos de carbono generados en el cultivo desarrollado a 95.9 $kW/m^3 \cdot s$ (3.46 $g_X/L + 321.9 mmol_{CO_2}/L \approx 5.56 g_C/L$). En este sentido, y tomando en cuenta que la composición del extracto de malta contiene aproximadamente 19 % de glucosa y 52 % de maltosa (Zabriskie et al., 1982), bastaría tan solo un 10 % de la hidrólisis de la maltosa para satisfacer los 5.56 g_C/L requeridos por el cultivo. Recordando que la composición global del medio de producción es de 10 g/L de glucosa y 20 g/L de extracto de malta, el carbono generado, con un 10 % de hidrólisis de maltosa, sería de **5.94 g_C/L** [$10 g_{gluc}/L + (20 g_{\text{extracto}}/L \times 0.19 g_{gluc}/g_{\text{extracto}}) + (20 g_{\text{extracto}}/L \times 0.52 g_{gluc}/g_{\text{extracto}} \times 0.1 \text{ hidrolizada}) \approx 5.94 g_C/L$], lo cual satisfecería el consumo del hongo (*i.e.* $5.56 < 5.94 g_C/L$).

Con base en lo anterior, y a pesar de desconocer el valor absoluto de $Y_{x/s}$ (determinado a través del modelo de Luedeking-Piret), los valores de la tabla A.4.1 fueron utilizados para evaluar las diferencias entre cultivos ya que en todos los experimentos se utilizó el mismo medio de cultivo.

Por otro lado, y al igual que para el consumo de sustrato, la constante de producción de CO_2 (α) se estimó de acuerdo al modelo de Luedeking-Piret:

$$P(t) - P_o = \alpha(X - X_o) + \beta \left(\frac{X_m}{\mu} \right) \left\{ \ln \left[1 - \left(\frac{X_o}{X_m} \right) (1 - e^{\mu t}) \right] \right\} \quad (4.18)$$

donde α se determinó de la pendiente $P(t) - P_o - \beta [X_m / \mu] \{ \ln [1 - (X_o / X_m) (1 - e^{\mu t})] \}$ vs. $[X - X_o]$ (figura A.4.5). La tabla A.4.1 muestra los valores calculados para las cinco condiciones evaluadas. Con estos datos (α) y mediante la ecuación 4.20 se modeló la producción global de CO₂. La figura A.4.6 muestra el ajuste de los datos experimentales al modelo de Luedeking-Piret para la producción de CO₂.

El coeficiente de correlación entre los datos experimentales y el modelo correspondiente fue relativamente alto (mayor a 0.82 en todos los casos), considerando la complejidad del sistema multifásico empleado y los cambios en la viscosidad de los caldos debido al crecimiento filamentoso. Lo anterior señala que los parámetros determinados (μ , $Y_{X/S}$ y α) representaron fehacientemente el comportamiento cinético observado durante los cultivos miceliares.

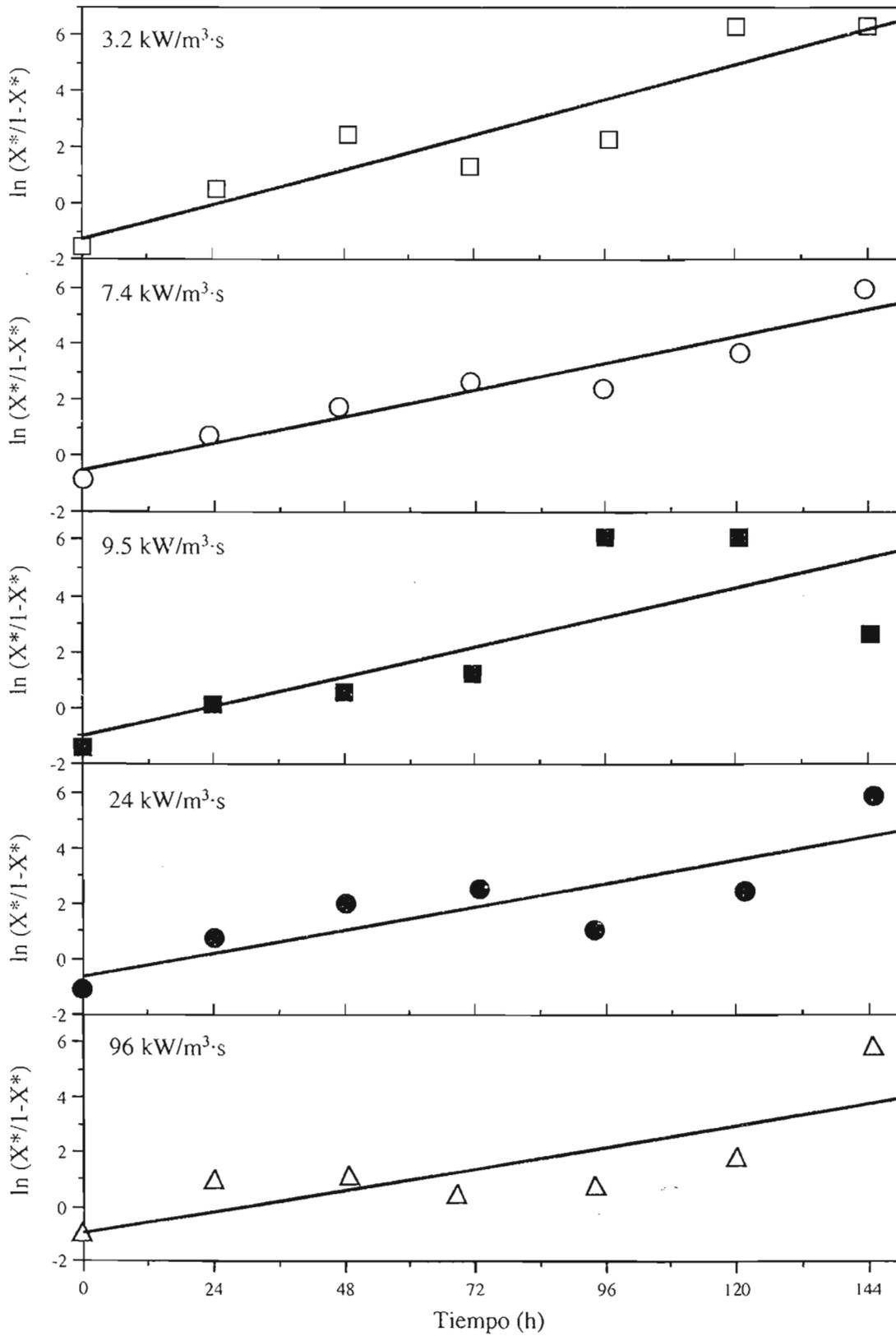


Figura A.4.1. Estimación de la velocidad específica de crecimiento (μ) de acuerdo al modelo logístico.

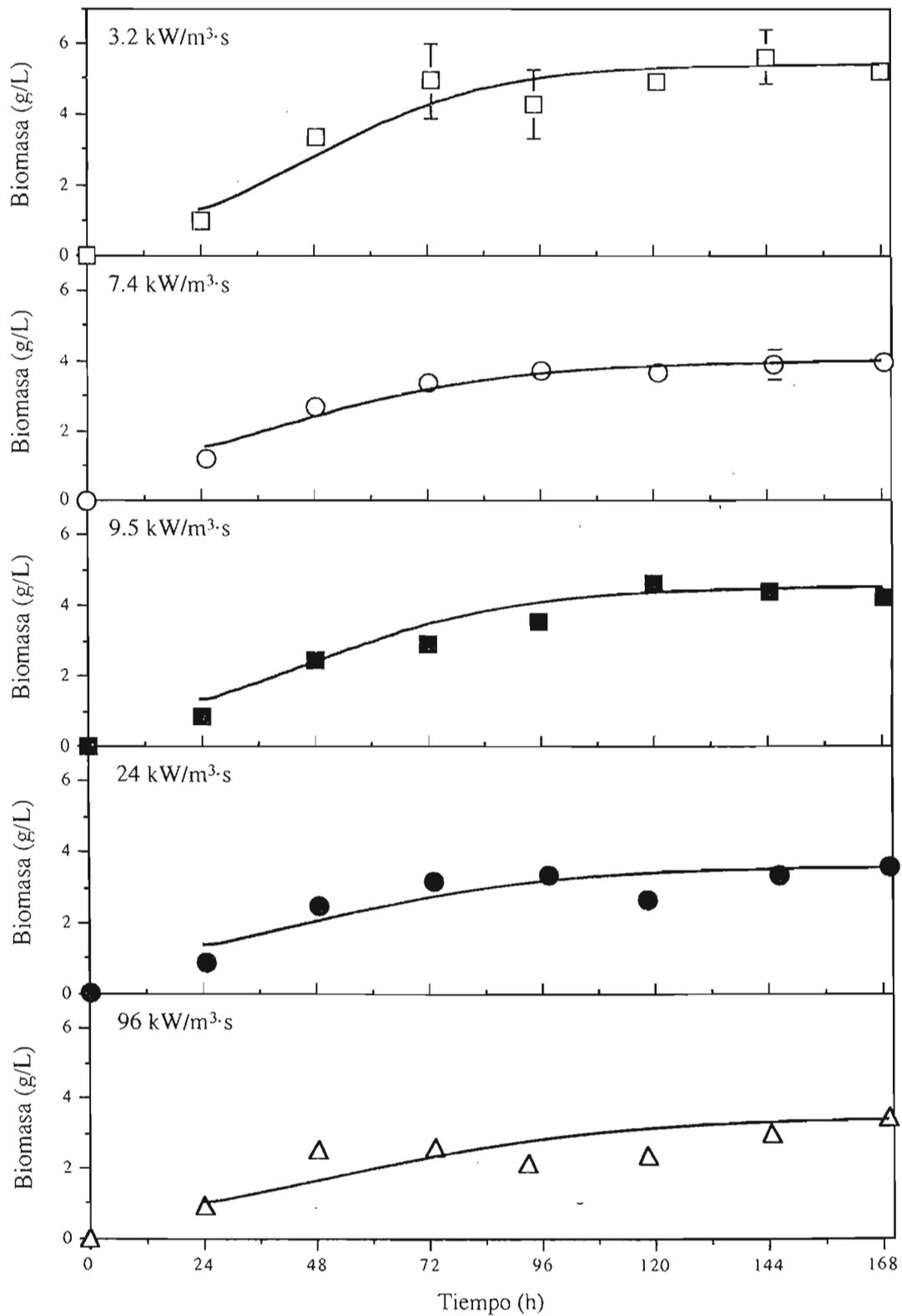


Figura A.4.2. Ajuste de los datos experimentales de biomasa al modelo logístico utilizando los valores de velocidad específica de crecimiento (μ) mostrados en la tabla A.4.1.

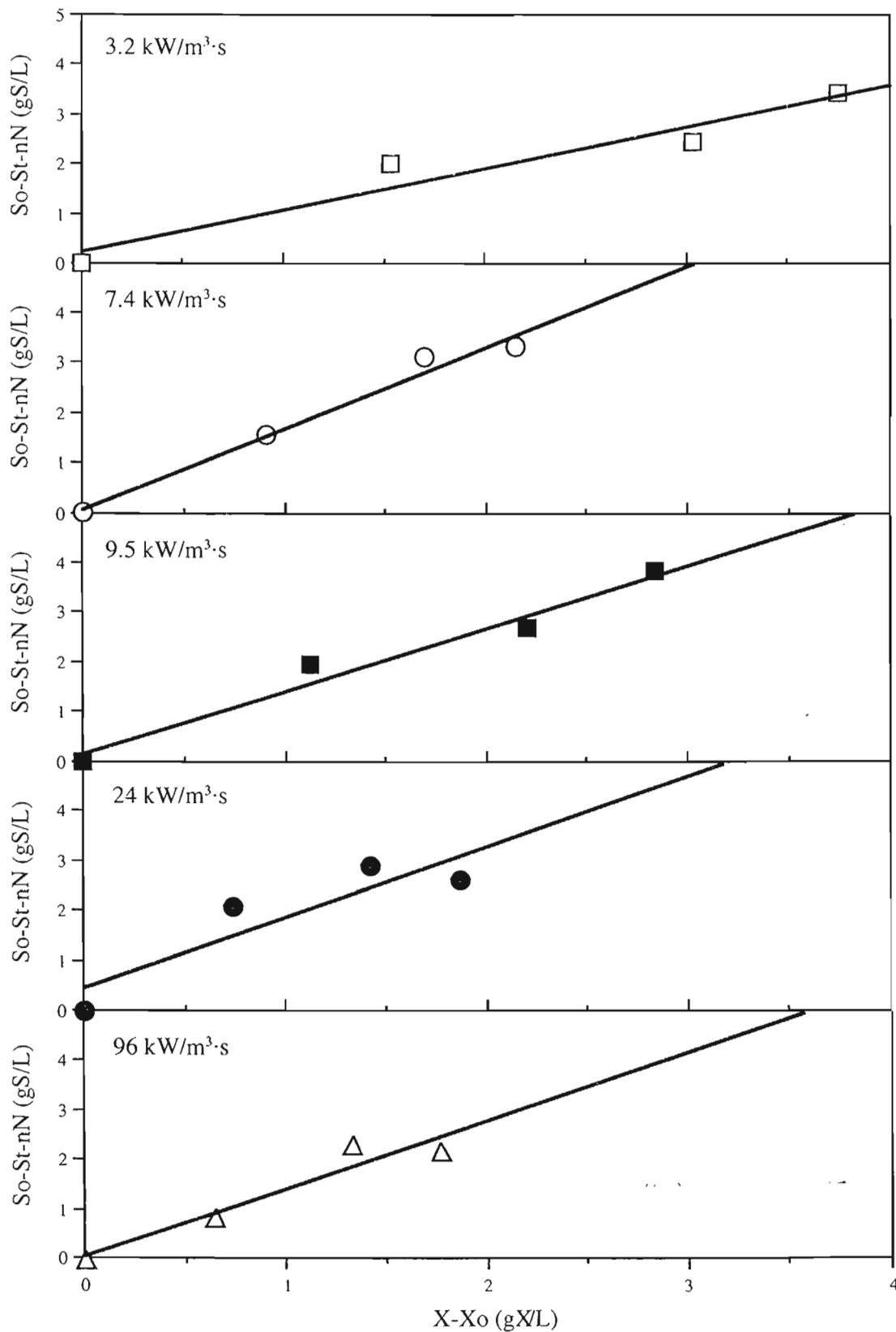


Figura A.4.3. Estimación del rendimiento de biomasa en base a glucosa ($Y_{x/s}$) de acuerdo al modelo de Luedeking-Piret.

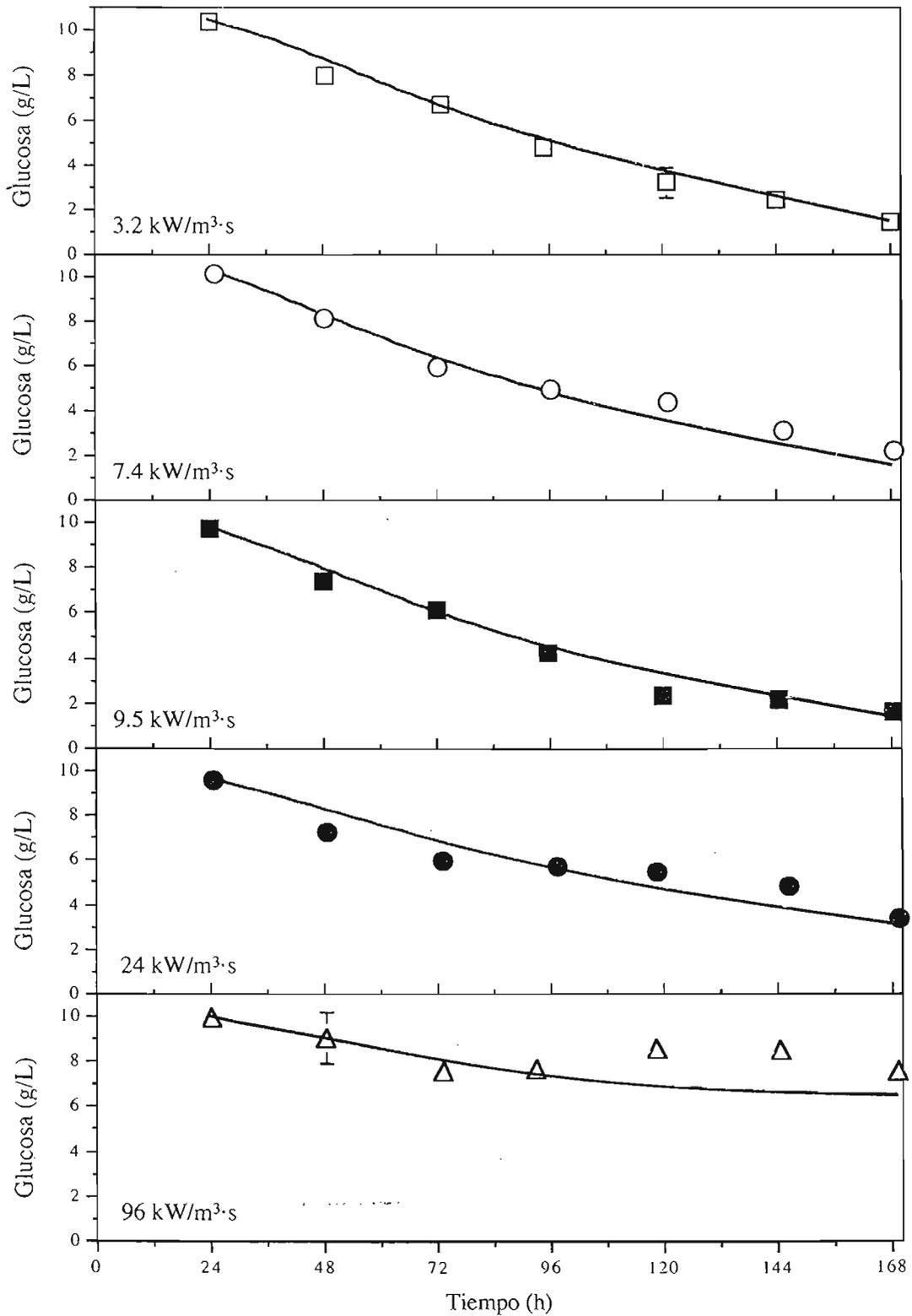


Figura A.4.4. Ajuste de los datos experimentales de glucosa al modelo de Luedeking-Piret (consumo de sustrato) utilizando los rendimientos de biomasa, en base a glucosa ($Y_{X/S}$), mostrados en la tabla A.4.1.

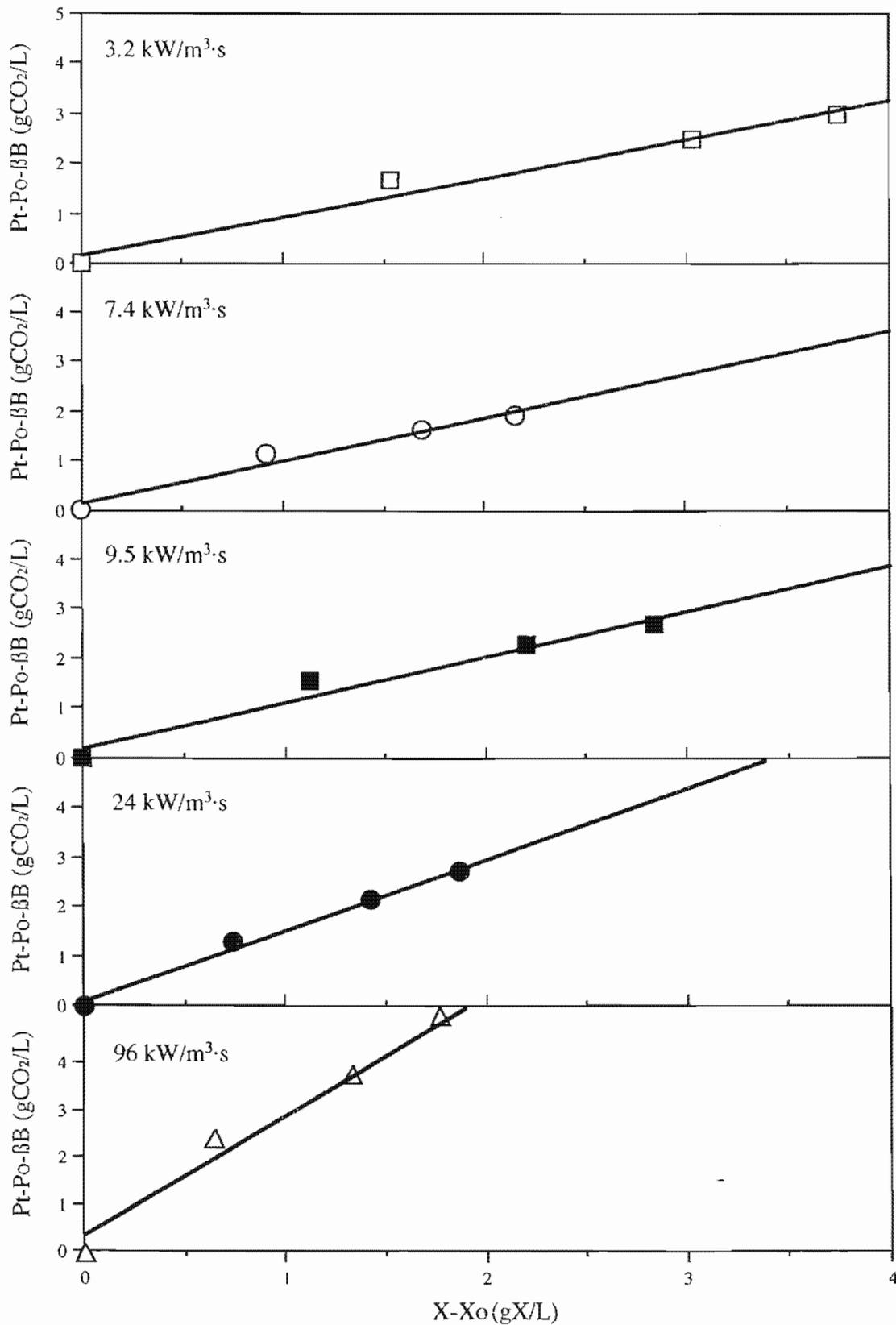


Figura A.4.5. Estimación de la constante de producción de CO₂ (α) de acuerdo al modelo de Luedeking-Piret.

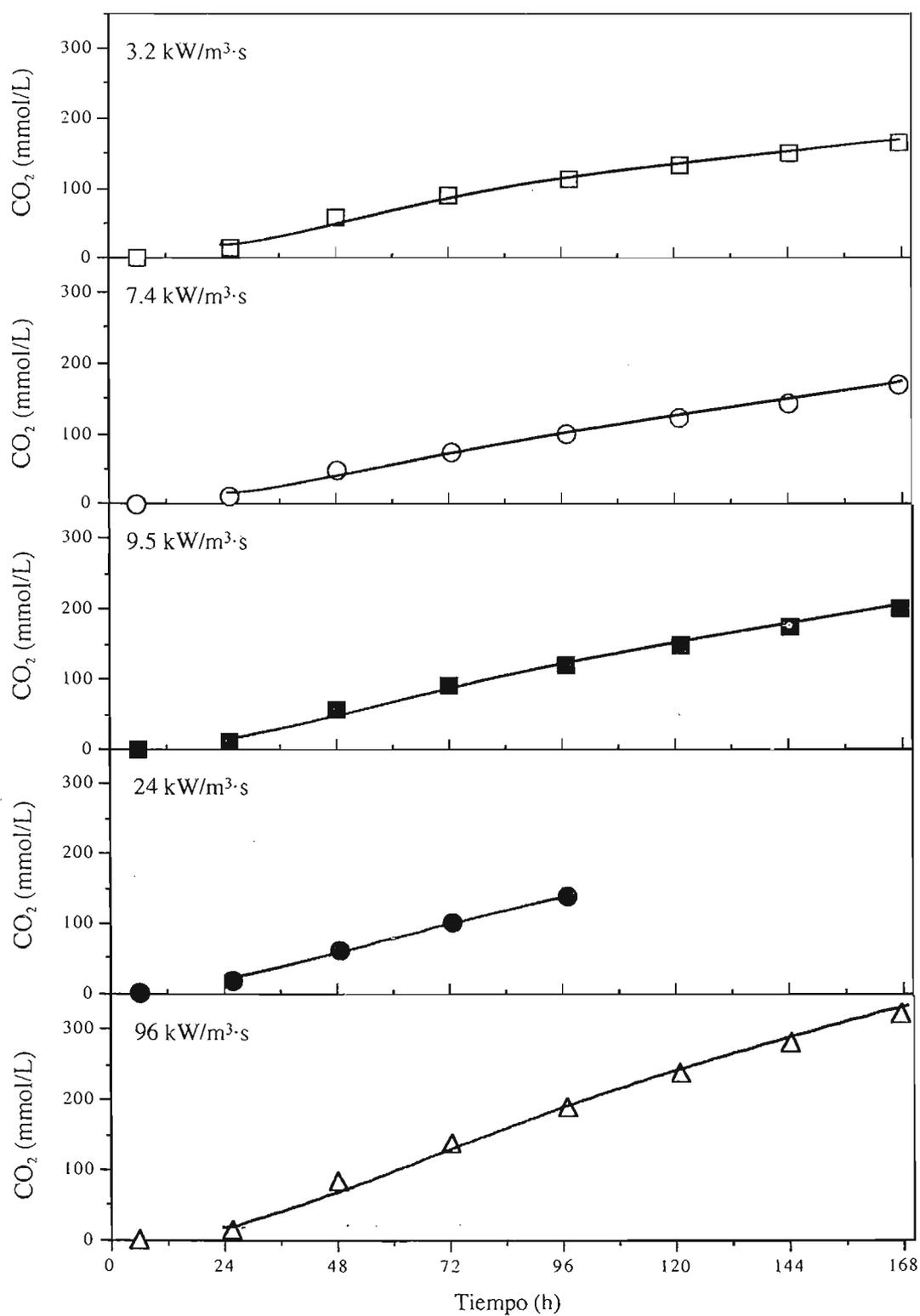


Figura A.4.6. Ajuste de los datos experimentales de CO_2 al modelo de Luedeking-Piret (formación de producto) utilizando las constantes de producción de CO_2 (α) mostrados en la tabla A.4.1.

Anexo 5

Determinación del diámetro crítico de los agregados de *T. harzianum*

El tamaño crítico de los agregados (diámetro máximo alcanzable sin que se presenten limitaciones difusionales hacia el interior de éstos) se determinó a través de la ecuación 4.2 (Cui et al., 1998):

$$D_{crit} = \sqrt{\frac{24 \cdot C_{O_2} \cdot D_{ef}}{R_{O_2}}} \quad (4.2)$$

donde D_{crit} es el diámetro crítico de los agregados [m], C_{O_2} es la concentración de oxígeno en el seno del líquido [kgO_2/m^3], D_{ef} es la difusión efectiva del oxígeno en los agregados [m^2/s] y R_{O_2} es la velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen [$\text{kgO}_2/\text{m}^3 \cdot \text{s}$]. En base a la ecuación 4.3 y a la definición de porosidad (1 - consistencia), D_{ef} se estimó de acuerdo a:

$$D_{ef} = (2.5 \times 10^{-9}) \cdot (1 - C) \quad (A.5.1)$$

donde $2.5 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ es el valor del coeficiente de difusión molecular del oxígeno en agua (Doran, 1995) y C es la consistencia del agregado en el período donde la concentración de TOD fue más baja (promedio de los valores experimentales medidos a las 24 y 48 h). Por otro lado, R_{O_2} se calculó al incorporar la ecuación 4.5 en 4.4, quedando:

$$R_{O_2} = \left(\frac{\mu}{1.0125} \right) \cdot 50 \quad (A.5.2)$$

donde μ es la velocidad específica de crecimiento para cada condición evaluada (anexo 4), $1.0125 \text{ kg}_X/\text{kgO}_2$ es el rendimiento de biomasa en base al oxígeno para *T. viride* (Atkinson y Mavituna, 1983) y $50 \text{ kg}_X/\text{m}^3$ es la densidad de los agregados miceliares en base al peso seco (Cui et al., 1998). La concentración de oxígeno, por su parte, se determinó a partir de la lectura del electrodo de oxígeno disuelto sumergido en el medio de cultivo. Sin embargo, es importante mencionar que, dado la incorporación del *n*-hexadecano como fase extrayente (20 % v/v), la solubilidad del oxígeno en el medio de fermentación extractiva fue mayor a la del agua. En este sentido, se ha reportado (Ju y Ho, 1989) que el coeficiente de difusión y la solubilidad del oxígeno en *n*-hexadecano a 22 °C es de aproximadamente $2.49 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ y 340.3 mg/L , respectivamente. El coeficiente de difusión es, por lo tanto,

muy similar al del agua, mientras que la solubilidad del oxígeno es 8 veces mayor en el solvente orgánico (340.3 vs. 41.8 mg/L). Así, y de acuerdo a Ho et al. (1990), la solubilidad del oxígeno en el medio de fermentación extractiva se estimó en base al porcentaje de volumen ocupado por el solvente orgánico en el sistema *n*-hexadecano-agua, de acuerdo a:

$$k_e = \sum_i k_i f_i \quad (\text{A.5.3})$$

donde k_e es la solubilidad del oxígeno en el sistema heterogéneo, k_i es la solubilidad del oxígeno en el compuesto i y f_i es la fracción volumétrica del compuesto i en el sistema. En base a lo anterior, la solubilidad del oxígeno en el medio de fermentación extractiva (k_e) a 30 °C fue de:

$$k_e = (1.16 \text{ mmol/L}) \cdot (0.80) + (7.88 \text{ mmol/L}) \cdot (0.20)$$

$$k_e = 2.5 \text{ mmol/L} = 80.1 \text{ mg/L}$$

Como resultado, la solubilidad del oxígeno en el medio extractivo fue dos veces mayor que en agua (*i.e.* 1.16 vs. 2.5 mmol/L). No obstante, y dado que la aireación no se realizó con oxígeno puro sino con aire (fracción molar del oxígeno en el aire ≈ 0.21), la concentración de oxígeno en el medio de cultivo fue de aproximadamente:

$$k_e|_{\text{Aire}} = (80.1) \cdot (0.21) = \mathbf{16.82 \text{ mg/L}}$$

Por lo tanto, las concentraciones de oxígeno determinadas a partir del electrodo de oxígeno disuelto se calcularon en base a una solubilidad de 16.82 mg/L.

La tabla A.5.1 muestra los valores experimentales utilizados para el cálculo de Co_2 , D_{ef} , Ro_2 y D_{crit} en los cultivos desarrollados a 11.4 y 22.3 kW/m³ ($D/T = 1/3$).

Tabla A.5.1. Determinación del diámetro crítico de los agregados de *T. harzianum* (D_{crit}).

$P/k \cdot D^3$ (kW/m ³)	TOD (%)	Co_2 (kg/m ³)	C (-)	D_{ef} (m ² /s)	μ (h ⁻¹)	Ro_2 (kg/m ³ ·s)	D_{crit} (μm)
11.4	36	6.055×10^{-3}	0.718	7.05×10^{-10}	0.0519	71.2×10^{-5}	379
22.3	74	12.44×10^{-3}	0.757	6.08×10^{-10}	0.0401	55.0×10^{-5}	574

Anexo 6

Artículo en *Biotechnology and Bioengineering*

Rocha-Valdez JA, Hassan M, Corkidi G, Flores C, Galindo E, Serrano-Carreón L. 2005. 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum*: the influence of energy dissipation rate and its implications on fungal physiology. *Biotechnol Bioeng.*

6-Pentyl- α -Pyrone Production by *Trichoderma harzianum*: The Influence of Energy Dissipation Rate and Its Implications on Fungal Physiology

J. Antonio Rocha-Valadez,¹ Mainul Hassan,¹ Gabriel Corkidi,² Celia Flores,¹ Enrique Galindo,¹ Leobardo Serrano-Carreón¹

¹Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, 62210, Morelos, México; telephone: +52 777 329 1630; fax: +52 777 317 2388; e-mail: leobardo@ibt.unam.mx

²Laboratorio de Procesamiento de Imágenes (Unidad Morelos), Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, 62210, Morelos, México

Received 22 June 2004; accepted 27 January 2005

DOI: 10.1002/bit.20489

Abstract: The influence of the agitation conditions on biomass growth, morphology, carbon metabolism, viability, and 6-pentyl- α -pyrone (6PP) production by *Trichoderma harzianum* were studied in an extractive fermentation system. Batch spore-inoculated cultures developed at dissolved oxygen concentrations above 35% of air saturation were carried out in a 14 L bioreactor. The effect of energy dissipation rate over culture performance was assessed using two sets of three Rushton turbines (having different diameters) operated at different agitation speeds. Higher mechanical stress enhanced cellular differentiation (i.e., sporulation), while yielding lower specific growth rates and increased specific CO₂ production rates (CPRs) at relatively constant specific glucose consumption rates. In addition, fungal viability and clump mean diameter decreased gradually at higher energy dissipation rates. 6PP biosynthesis was growth associated and its specific productivity showed a bell-shaped relationship with the energy dissipation rate. *T. harzianum* physiology was, therefore, strongly influenced by the prevailing hydrodynamic conditions as it triggered cellular metabolism and differentiation shifts.

© 2005 Wiley Periodicals, Inc.

Keywords: energy dissipation rate; filamentous fermentations; fungal physiology; 6-pentyl- α -pyrone; *Trichoderma harzianum*

INTRODUCTION

Filamentous fungi are morphologically complex microorganisms used extensively for the production of commercially important products, such as enzymes, antibiotics, and organic acids. In stirred tank bioreactors, fungal physiology is strongly influenced, among others, by the agitation condi-

tions employed. Good bulk mixing of the fermentation broth is needed to minimize nutrient concentration gradients and ensure sufficient oxygen transfer throughout the vessel. However, agitation also creates shear forces that can have a variety of effects on filamentous microorganisms. These may include cell wall rupture, morphological and/or physiological changes and variation in product rate synthesis, biomass concentrations, and overall growth rates (Amanullah et al., 2002; Cui et al., 1998; Johansen et al., 1998; Jüsten et al., 1996; Li et al., 2000; Papagianni et al., 1999; Smith et al., 1990). Accordingly, for each filamentous culture, optimum conditions of agitation will exist that partly depend on the resistance of the hyphae to mechanical forces and also on their physiological state (Jüsten et al., 1996; Paul et al., 1994). Although several authors (Amanullah et al., 1999; Jüsten et al., 1998; Lejeune and Baron, 1995; Makagiarsar et al., 1993; Papagianni, 2004; Papagianni et al., 1999) have reported the influence of agitation on morphology, productivity and, in some instances, physiology, the study of the agitation effects directly on fungal growth rates, yields, and physiology is complicated by its other effects on mixing and oxygen transfer, especially when the broths develop high viscosities and pseudoplastic behavior. Hence, it is essential to dissociate the influence of agitation from mass transfer effects if precise knowledge of the growth characteristics and physiology, with respect to agitation-induced mechanical stress, are to be elucidated.

Filamentous fungal strains of *Trichoderma*, apart from being potential biocontrol agents, synthesize a wide variety of commercial products (Bonnarme et al., 1997; Cooney and Lauren, 1998; Lejeune and Baron, 1995; Papagianni, 2004), including enzymes (cellulase, α -amylase, xylanase, chitinase, β -glucanase), organic acids (citric acid), extracellular proteins, and aroma compounds. Among the aroma com-

Correspondence to: Leobardo Serrano-Carreón

Contract grant sponsor: CONACyT; Contract grant number: 39906; Contract grant sponsor: IFS; Contract grant number: E/2548-2; Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant number: IN-226202.

pounds synthesized, the polyketide 6-pentyl- α -pyrone (6PP) stands out as a potentially attractive commercial food additive because its characteristic coconut-like aroma (Bonnarme et al., 1997; Janssens et al., 1992; Serrano-Carreón et al., 2004). As in other submerged fungal fermentations, its production is strongly influenced by the agitation conditions employed as specific 6PP productivity and *Trichoderma* growth have been shown to be a function of power drawn in shake flask systems (Galindo et al., 2004). Nonetheless, and although the influence of agitation-induced mechanical stress is of great importance, industrial production of 6PP by *Trichoderma* has been limited by growth inhibition caused by very low 6PP concentrations (100 mg/L; Prapulla et al., 1992). A feasible solution to overcome such drawback is to use an extractive process system (in situ removal of products as they are formed) as it has been shown to reduce the toxic effect of 6PP on *Trichoderma harzianum* cultures conducted in stirred tanks and shake flasks (Serrano-Carreón et al., 2002).

The present study reports the influence of the energy dissipation rate on the growth, morphology, carbon metabolism, viability, and 6PP productivity of *T. harzianum* during extractive batch fermentations developed under non-limiting oxygen conditions in a 14 L fermenter. Specific growth, glucose uptake, and CO₂ production rates (CPRs) were evaluated in order to assess the metabolic state of the fungus. With such an approach, the carbon metabolism of *T. harzianum* was studied and related to fungal growth and 6PP productivity as a function of the energy dissipation rate.

MATERIALS AND METHODS

Microorganism and Extractive Culture Medium

T. harzianum IMI 206040 was used. Strain maintenance and inoculum development was performed as previously described (Hassan et al., 2002; Serrano-Carreón et al., 2002). In an attempt to reduce possible physiological changes due to differences in the shear conditions prevailing in stirred tanks and shake flasks (i.e., where vegetative inocula are generally grown), fresh spores were inoculated—in all cases—at a concentration of 10⁵ spores/mL. The extractive culture medium contained 80% v/v of aqueous rich media (malt extract, 25 g/L; glucose, 12.5 g/L; pH 5.6) and 20% v/v of *n*-hexadecane (Serrano-Carreón et al., 2002). The presence of 20% v/v of *n*-hexadecane was estimated (Ho et al., 1990)

to increase over two-fold oxygen availability in the culture medium, with respect to water (16.8 vs. 7.9 mg O₂/L, respectively), as oxygen solubility in *n*-hexadecane has been measured to be more than eight times higher than in pure water (Ju and Ho, 1989).

Culture Conditions

Stirred tank fermentations were carried out in an instrumented 14 L bioreactor (MF 14, New Brunswick Scientific, Edison, NJ) with a working volume of 10 L, vessel diameter (*T*) of 0.21 m, and four baffles. Two sets of three Rushton turbines with an impeller-vessel diameter ratio (*D/T*) of 1/3 and 1/2 were used. Impeller spacing was 0.074 m. The cultures were kept at 29°C and sparged at a constant airflow rate of 0.5 vvm. pH was maintained at 5.6 ± 0.3 by automatic NaOH (0.4N) addition. Dissolved oxygen tension (DOT) and pH measurements were carried out using a polarographic DOT and pH probe, respectively (Ingold Electrodes Inc., Wilmington, MA). DOT was always kept above 35% of air saturation by blending—when needed—oxygen with air using two mass flow controllers (Brooks Instrument Div., Veenendaal, The Netherlands). Thus, agitation rate could be varied without affecting either the DO concentration in the broth or the gas flow rate. Agitation speeds (*N*) from 275 to 660 rpm were used (Table I). These speeds were chosen to give volumetric gassed power inputs in the range of those used in industry (0.15–2 kW/m³). The gassed and ungassed power inputs were measured online using a commercial Himmelstein torque meter (66032) coupled to the shaft. Before each experiment, the system was calibrated (by removing all the culture medium from the tank) to eliminate power loss by friction. An infrared CO₂ analyzer (Columbus Instruments International Corp., Columbus, OH) was used to measure the CO₂ concentration in the exit gas. DOT, pH, agitation rate, torque, and CO₂ readings were monitored and recorded continuously using *Labview* software. Table I shows the initial operating conditions.

EDCF Estimation

Since two impeller geometries (i.e., *D/T* = 1/3 or 1/2) were employed, impeller power—and its subsequent effect on culture performance—is reported in terms of the energy dissipation/circulation function or EDCF (Eq. 1, Table II). EDCF has been found to correlate better with morphological

Table I. Initial operating conditions and estimated circulation times—under gassed conditions—(*t_c*) and energy dissipation/circulation function (EDCF) at 0 and 96 h of culture time.

<i>D/T</i> (–)	Agitation rate (rpm)	Power drawn (kW/m ³)	<i>P/k · D</i> ³ (kW/m ³)	<i>t_{c0h}</i> (s)	EDCF _{0h} (kW/m ³ · s)	<i>t_{c96h}</i> (s)	EDCF _{96h} (kW/m ³ · s)	Symbol (–)
1/3	275	0.16	11.4	3.6	3.1	4.8	2.4	□
1/3	350	0.30	22.3	3.0	7.3	4.2	5.5	○
1/2	230	0.61	11.2	1.2	9.3	1.4	7.6	■
1/2	292	1.20	22.2	0.9	23.5	1.1	19.6	●
1/3	660	2.03	149.5	1.6	94.1	1.7	90.4	△

Table II. Equations used for the determination of the energy dissipation/circulation function (EDCF).

Equation	Reference
(1) $EDCF = (P/k \cdot D^3)(1/t_c)$	Jüsten et al. (1996)
(2) $k = (\pi/4)(W/D)$	Jüsten et al. (1996)
(3) $t_c = V_L/(Fl_G \cdot N \cdot D^3)$	Jüsten et al. (1998)
(4) $Fl_G = Fl(P_{OG}/P_O)$	Jüsten et al. (1998)
(5) $Fl = (0.91 \cdot P_O \cdot [W/D])^{0.5}$	Jüsten et al. (1996)

P, gassed impeller power; *k*, geometric constant; *D*, impeller diameter; *t_c*, gassed circulation time; *W*, impeller blade height; *V_L*, liquid volume; *Fl_G*, gassed impeller flow number; *N*, impeller agitation speed; *Fl*, ungassed flow number; *P_{OG}*, gassed power number; *P_O*, ungassed power number.

data than power per unit volume of liquid (*P/V*) or impeller tip speed as it incorporates the frequency at which mycelia circulate through the high-energy dissipating impeller region (Jüsten et al., 1996). The specific energy dissipation rate in the impeller swept volume ($P/k \cdot D^3$, Table II) was determined from the measured gassed power input and from the constant impeller diameter and geometric factor, *k* (blade height/impeller diameter ratio, Eq. 2). Based on previous reports (Amanullah et al., 2002; Nienow, 1990; Nienow and Elson, 1988), and given the fact that the impellers of each set were of the same size (*D/T* was either 1/3 or 1/2), the gassed power input for each impeller was determined by dividing equally the total measured power input by the three impellers employed. During each sample time, the ungassed power input was also measured (by shutting off the aeration during a very short period of time) allowing the online calculation of the gassed and ungassed power numbers (determined through, $P = P_O \cdot \rho \cdot N^3 \cdot D^5$). Both power numbers were subsequently used to estimate power drop (P_{OG}/P_O , Eq. 4). The gassed circulation time (*t_c*, Eq. 3) was, therefore, calculated using the constant impeller diameter, along with the estimated ungassed flow numbers (*Fl*, Eq. 5) and power drops developed during the actual filamentous fungal cultures. The liquid volume (*V_L*) in each impeller region was estimated as the ratio between the total working volume (10 L) and number of impellers (3). Table I shows the *t_c* and EDCF calculated values, at the initial operating conditions (0 h) and at the end of the growth phase (96 h).

Analytical Methods

Biomass concentration was determined by dry weight measurements as previously reported (Serrano-Carreón et al., 2002). Residual glucose was enzymatically measured using an automatic biochemical analyzer (YSI, Yellow Springs Inst., Yellow Springs, OH). Mycelial morphology (mean clump diameter) was measured using a previously described image analysis system (Lucatero et al., 2003). Three hundred objects per sample were measured. Size distributions of the mean clump diameter were positively skewed; hence, the median of the size distributions is reported. The extraction of 6PP from the extractive culture medium and its subsequent analysis—performed by gas

chromatography—were carried out as described before (Serrano-Carreón et al., 2002). Specific 6PP productivity was defined as the concentration of aroma per concentration of biomass divided by culture time (i.e., $\text{mg}_{6PP}/\text{g}_X \cdot \text{h}$).

Fungal viability (% of metabolically active cells) was measured at 48, 96, and 168 h using a fluorescent-based image analysis method previously described (Hassan et al., 2002). Viability was calculated as the ratio between fluorescein diacetate (FDA) stained hyphal area and total (i.e., stained and not stained) hyphal area. At least 35 sets of images were taken per sample as a maximal variation index of 16% of FDA-stained area was reported for 30 sets of images (Hassan et al., 2002).

Kinetic Characterization

Specific growth rate (μ) was determined from the measured biomass concentrations through the logistic model. The logistic equation has been previously employed to describe mycelial overall growth kinetics (Papagianni, 2004). On the other hand, the experimental glucose and CO₂ concentration data were fitted to Luedeking-Piret type model kinetics from which $Y_{X/S}$ (biomass yield on glucose, g_X/g_g) and α_{CO_2} (CO₂ growth-associated production constant, g_{CO_2}/g_X) were determined. Specific glucose consumption rate (q_g) and specific CPR (q_{CO_2}) were subsequently determined, using both growth-associated parameters ($Y_{X/S}$ and α_{CO_2}) and μ (calculated through the logistic model), as the ratio between μ and $Y_{X/S}$ and the product of μ and α_{CO_2} , respectively. Such an approach has been effectively used to predict substrate utilization and product formation in other biological processes (Luong et al., 1988; Serrano-Carreón et al., 1998). Estimates of μ , q_g , and q_{CO_2} were determined—from the experimental data—for each of the five operating conditions. 6PP production was not characterized by Luedeking-Piret type kinetics as 6PP depletion was observed at the latter stages of the cultures (i.e., after 120 h).

RESULTS AND DISCUSSION

EDCF Evolution and Fermentation Kinetics

As shown in Table I, a decrease in EDCF was observed in all cases as culture time proceeded. Similar EDCF reductions have been observed in large-scale 80 m³ *Aspergillus oryzae* fermentations, where power was measured directly from the electrical consumption of the motor (Li et al., 2000). Lower EDCF values were the result of increased circulation times (i.e., t_{C0h} vs. t_{C96h} ; Table I). Higher circulation times were calculated as larger power drops were measured throughout the cultures. Larger power drops could have resulted from increased broth viscosities through the stabilization of the gas-filled cavity structures, as reported by other authors (Nienow, 1990; Nienow and Elson, 1988). This is consistent with the fact that the largest differences among *t_c* were observed in the lower EDCF conducted cultures where clump diameter (and possibly broth viscosity) was larger.

Figure 1 shows the kinetics of replicate cultures developed at the lowest energy dissipation rate where the largest data scattering was observed ($3 \text{ kW/m}^3 \cdot \text{s}$). Overall, the logistic and Luedeking-Piret models fitted reasonable well the experimental biomass and glucose data assessed throughout the five culture conditions (yielding relatively high regression coefficients, ranging from 0.83 to 0.99), despite the complexity shown by this viscous, immiscible four-phases fermentation system. Clump diameter increased constantly—after spore germination—reaching a maximum of approximately 0.39 mm (48 h) and then remained relatively constant until 120 h (Fig. 1c). The latter is in agreement with the concept, based on isotropic turbulence theory, of an equilibrium hyphal length or aggregate size reached when the local shearing forces equal hyphal tensile strength (Li et al., 2000, 2002; van Suijdam and Metz, 1981). Afterwards, a slight reduction in clump size was observed, probably due to a reduction in hyphal tensile strength (at the latter stages of the fermentation) as reported by other authors (Li et al., 2002; van Suijdam and Metz, 1981). The highest respiration rate was observed after spore germination (which occurred about 12 h after inoculation), as CO_2 production peaked (Fig. 1d)

and dissolved oxygen reached its lowest concentration (Fig. 1e).

Although the DO critical tension for maximum 6PP production is not known, a value of 35% of air saturation was chosen based on the determined values reported for other fungal metabolites, such as pneumocandin B₀, penicillin, and amyloglucosidase (20%, 25%, and 40%, respectively) produced in submerged fermentation by *Glarea lozoyensis*, *Penicillium chrysogenum*, and *A. oryzae* (Amanullah et al., 2002; Henriksen et al., 1997; Pollard et al., 2002). Calculations using a model of a pellet under diffusional limitation (Cui et al., 1998), which took into account the oxygen concentration in the bulk, pellet porosity, and oxygen consumption rate, showed that even pellets with core diameters similar to our largest aggregates ($<360 \mu\text{m}$) would not be oxygen limited. Moreover, it should be kept in mind that oxygen availability in the extractive culture medium (which included 20% v/v of *n*-hexadecane) was over two fold higher, with respect to pure tap water (see Materials and Methods), therefore increasing the actual oxygen concentration in the culture broth. Consequently, it is unlikely that local DOT limitations existed within the microenvironment of clumps during our *T. harzianum* cultures. On the other hand, carbon shortage and 6PP or *n*-hexadecane toxicity can also be discarded, as measured glucose concentrations were at least 1.5 g/L after 168 h of cultivation (Fig. 1b) and maximum 6PP production was above the reported toxic concentration of 100 mg/L (Prapulla et al., 1992). Additionally, *n*-hexadecane has proven to be non-toxic to *P. chrysogenum* and *T. harzianum* strains (Ho et al., 1990; Serrano-Carreón et al., 2002). Therefore, the differences observed in culture behavior can be attributed to the effects caused by the different energy dissipation rates evaluated.

Dependence of Morphology and Growth on EDCF

Early attempts to correlate the production rate and morphological data of mycelial cultures employed parameters related to the average or mean energy dissipation rate, such as impeller tip speed (Oldshue, 1966) or power per unit volume of liquid (P/V ; Einsele, 1978). However, both of these parameters did not correlate well morphological behavior and/or productivity. The importance of the frequency at which the mycelia are subjected to high stresses (near the impellers) and the forces to which they are exposed as they pass through the impeller zones were later taken into account by Reuss (1988) and Smith et al. (1990). Jüsten et al. (1996) incorporated these two ideas, along with a geometrical factor, k (which took into account the different impeller geometries employed), and fitted the fragmentation data of *P. chrysogenum* with an energy dissipation/circulation function developed from the earlier study of Smith et al. (1990) and Makagiansar et al. (1993). This expression (EDCF; Eq. 1, Table II) was employed in this study since two impeller geometries were used (along with a constant working volume). Similar $P\mu \cdot D^3$ values, yielding very different circulation

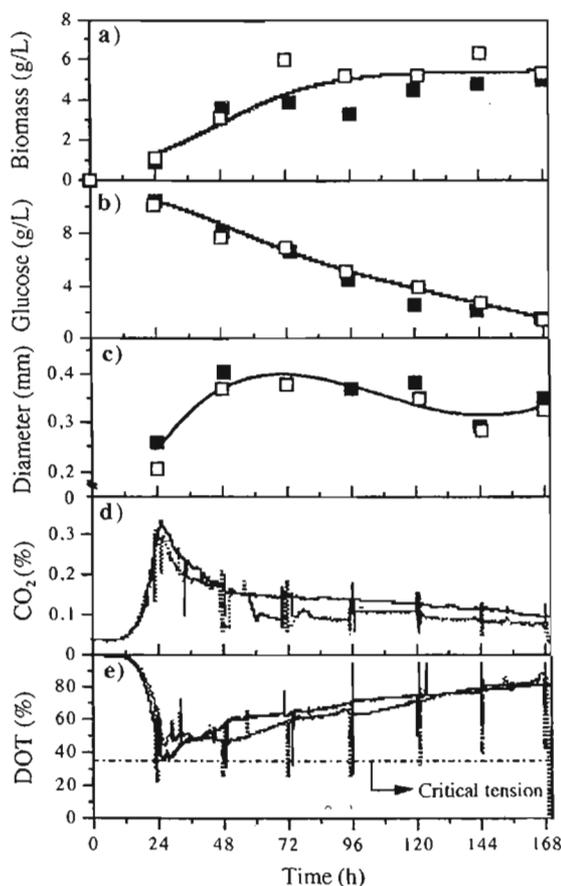


Figure 1. Reproducibility of two cultures developed at an initial EDCF of $3.1 \text{ kW/m}^3 \cdot \text{s}$: (a) biomass concentration, (b) glucose concentration, (c) clump mean diameter, (d) carbon dioxide production, and (e) dissolved oxygen tension (DOT).

times, were achieved at different power inputs (Table I). Therefore, and in contrast when a single impeller configuration is used (where similar $P/k \cdot D^3$ or t_c values can not be achieved at different power inputs), EDCF incorporated, apart from the energy dissipation rates, the influence generated by the impeller geometrical characteristics—such as circulation times at two different impeller to tank diameter ratios—over fungal morphology.

Figure 2 shows *T. harzianum*'s maximum clump diameter as a function of EDCF. As expected, EDCF correlated well clump diameter under growing conditions (being significantly lower at higher dissipation rates), independently of impeller diameter and agitation intensity. This has already been shown for other fungal strains, such as *P. chrysogenum* (Jüsten et al., 1998) and *A. oryzae* (Amanullah et al., 1999, 2002) in both fed-batch and chemostat cultures inoculated with vegetative cells. In this study, however, spore inocula were used. In this context, and given the fact that spore size ($<5 \mu\text{m}$) is well below the reported stirred tank Kolmogorov's microscale (i.e., $10\text{--}50 \mu\text{m}$; Li et al., 2002), it is unlikely that the turbulent hydrodynamic forces influenced spore germination or initial hyphal extension. Hence, fungal morphology and physiology were determined—just after germination—by the actual operating conditions. By contrast, the physiological and/or morphological states of the vegetative inoculated mycelia (generally grown in shake flasks and whose size is typically above $100 \mu\text{m}$) were probably affected by the mechanical forces as the previously grown hyphae had to adapt to the new shear conditions in the stirred tank. Therefore, and although the aggregates developed from vegetative or spore inocula might be of the same size, cellular physiology and differentiation (i.e., vacuolation; Paul et al., 1994) may differ.

Figure 3 shows the biomass concentration as a function of culture time for each of the five EDCF conditions evaluated. Biomass concentration decreased as EDCF increased. Accordingly, the highest and lowest biomass concentrations (approximately 5 and 2.6 g/L) were obtained in the 3 and 94 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$ cultures, respectively. The fact that the lowest DOT and glucose concentrations were measured in the highest biomass producing cultures ($3 \text{ kW/m}^3 \cdot \text{s}$; Fig. 1) is consistent with the assumptions made earlier that neither oxygen nor carbon were limiting (at least for biomass

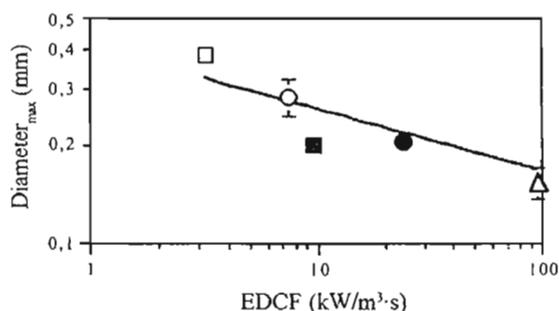


Figure 2. Dependence of maximum clump mean diameter on the energy dissipation/circulation function (symbols as in Table I).

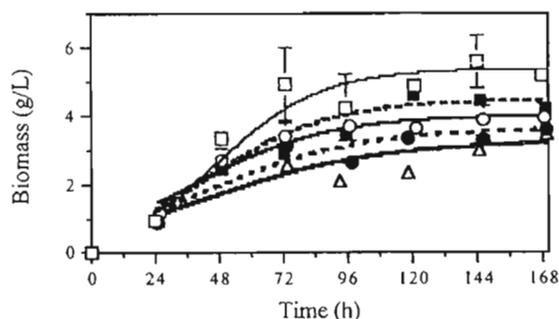


Figure 3. Comparison of the biomass concentrations at different energy dissipation rates (symbols as in Table I). The lines show the logistic model fit.

production) and, hence, did not influence growth performance. Further evidence of the latter is given by the fact that the specific glucose consumption rates were relatively constant in all cultures, independently of the energy dissipation rates (q_g ; Fig. 4b).

EDCF correlated effectively the fungus specific growth rates (μ ; Fig. 4a); therefore, it was a suitable parameter to describe the effect of mechanical forces over fungal growth. Although EDCF has already been shown to correlate μ in *P. chrysogenum* fed-batch cultures (Jüsten et al., 1998), our results contradict Jüsten et al. (1998) and other studies (Amanullah et al., 2002; Papagianni et al., 1999) regarding higher specific growth rates (and hence biomass concentrations) at larger energy dissipation rates in cultures inoculated with vegetative cells. It has been suggested that higher mycelial fragmentation, at larger energy dissipation rates, promotes improved fungal growth through the increased formation of new growing tips. However, since spore inocula were used, growth was initially determined by spore germination (which, as already discussed, is likely to be independent of the energy dissipation rate). After spore germination ceased, growth performance and clump size were determined mainly by the prevailing hydrodynamic conditions, as shown in Figures 2 and 3.

Carbon Metabolism and Differentiation

Specific growth rate (μ), specific glucose consumption rate (q_g) and specific CPR (q_{CO_2}) were correlated with EDCF (Fig. 4). Higher mechanical stress yielded lower specific growth rates as μ decreased from 0.052 to 0.032 per hour (Fig. 4a). By contrast, the specific CPR increased (Fig. 4c), while the specific glucose consumption rate remained relatively constant (Fig. 4b). These results imply that glucose was preferentially used for respiration (yielding higher CO_2 concentrations) rather than for biomass biosynthesis as cell viability decreased at higher EDCF values (Table III). Thus, it is proposed that mechanical stress determined the fungal carbon flux (and hence its metabolic activity) which, in an attempt to adjust its increasing energetic maintenance requirements, shifted essentially from anabolic (biosynthetic reactions) to catabolic (provision of precursors and energy) metabolism. This is in agreement with Johansen et al. (1998)

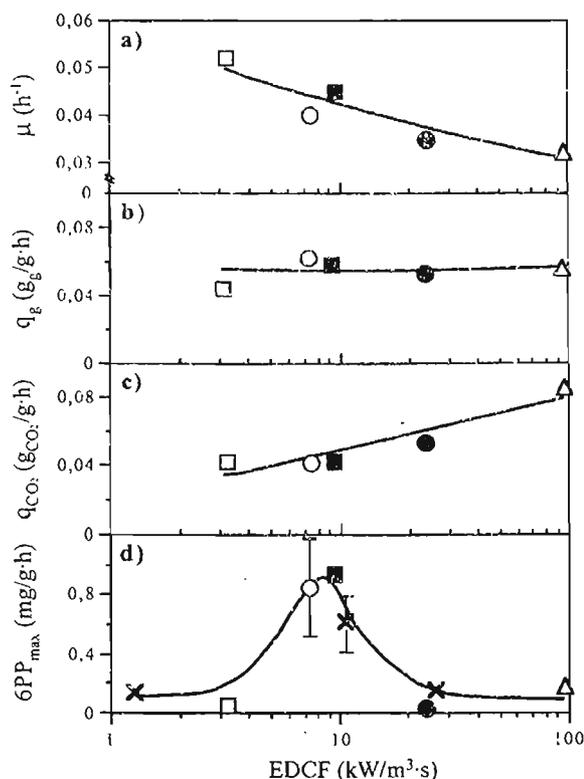


Figure 4. Carbon metabolic shift as a result of agitation-induced mechanical stress (symbols as in Table I): (a) specific growth rate (μ), (b) specific glucose consumption rate (q_g), (c) specific CO_2 production rate (q_{CO_2}), and (d) maximum specific 6-pentyl- α -pyrone (6PP) productivity (additional experimental points are shown as \times ; see text for further details).

who observed a similar metabolic shift (increased maintenance requirements at higher agitation rates) during spore-inoculated *Aspergillus awamori* fermentations. Indeed, the ability of microorganisms (including fungi) to adjust the amount of energy reserved to meet cellular and physiological demands has been reported (Jin and Bethke, 2003; Joseph-Hornø et al., 2001). In this context, Higashiyama et al. (1999) observed similar energetic adjustments while studying the effect of dissolved oxygen in *Mortierella alpina* cultures developed in a 25 L bioreactor. High oxygen concentrations (20–30 mg/L) increased the metabolic energetic requirements of the fungus, presumably due to adaptation efforts caused by oxidative stress.

Table III. *Trichoderma harzianum* viability as a function of time and initial energy dissipation rate (EDCF).

EDCF ($\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$)	Viability (%)		
	48 h	96 h	168 h
3.1	95	79	64
7.3	96	91	79
9.3	96	93	87
23.5	93	90	57
94.1	95	78	44

Although many papers have studied the influence of the agitation conditions on fungal growth and metabolism (including vacuolation and CO_2 production), only this study and that of Johansen et al. (1998) have reported results supporting the fact that higher maintenance requirements are needed as energy dissipation rate increases. Amanullah et al. (1999) showed in chemostat cultures of *A. oryzae* that a step-change in energy dissipation rate (from 950 to 90 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$) did not affect either biomass concentration or CPR. On the other hand, Jüsten et al. (1998) and Amanullah et al. (2002) observed higher CPR and biomass concentrations in *P. chrysogenum* and *A. oryzae* fed-batch fermentations at larger EDCF values (1000 and 350 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$, respectively). By contrast, Makagiarsar et al. (1993) reported lower growth rates and CPR at higher energy dissipation rates (i.e., 1100 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$) during *P. chrysogenum* batch cultures. From the above, it is evident that CO_2 production may be influenced by other parameters, besides energy dissipation rate, such as fungal strain, fermentation mode, and inoculum size and type, among others, which might partially explain the lack of consistency observed between published reports.

In addition to the metabolic changes observed, mechanical stress also influenced fungal differentiation (i.e., sporulation) and viability. Sporulation was recurrently observed at the latter stages of the cultures conducted at the highest EDCF ($\geq 23.5 \text{ kW/m}^3 \cdot \text{s}$), probably due to the higher shear rates developed. The latter is in agreement with Felse and Panda (2000) who also reported *T. harzianum* sporulation in submerged 2 L cultures under the highest agitation rates employed. Meanwhile, fungal viability (Table III) decreased towards the end of all fermentations, especially during the lowest and highest EDCF-operated cultures. This suggests either a reduction in esterase activity or an increase in membrane damage (Breeuwer and Abee, 2000). Higher mechanical stress increased hyphal fragmentation as smaller clump diameters were measured (Fig. 2); hence, the lower viabilities—observed at the highest energy dissipation rates—were probably the result of increased cell wall damage. Nonetheless, a decrease in esterase activity cannot be discarded as sporulation could have influenced esterase synthesis at the latter stages of the cultures. On the other hand, lower esterase activities could have resulted from larger mycelial aggregates (such as those observed in the 3 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$ cultures) since larger metabolically inactive vacuolated regions are expected to appear in the older hyphal compartments as mycelial size increases (i.e., the further the compartments are from the apex; Papagianni et al., 1999; Thomas, 1992).

Production of 6-Pentyl- α -Pyrone (6PP)

Significant 6PP biosynthesis was observed only during the growth phase of the 7 and 9 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$ cultures (Fig. 5). Given the fact that 6PP concentrations were relatively constant after 48 h, and that fungal viabilities were very similar at this time (independently of the operating conditions; Table III), no direct link between fungal viability and 6PP production was

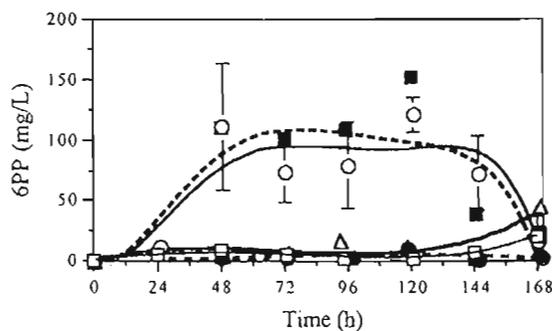


Figure 5. Comparison of 6PP production at different energy dissipation rates (symbols as in Table I).

observed. This is in line with Jüsten et al. (1998) who found no relationship between penicillin productivity and the microbial physiological state (measured as the percentage of vacuoles and empty cells) during submerged *P. chrysogenum* fed-batch fermentations.

6PP depletion was observed in cultures yielding the highest 6PP concentrations (Fig. 5). Experiments aimed at measuring the evaporation rate with sterile media and exogenous 6PP showed that the molecule was not volatile under the culture conditions employed. 6PP depletion by *T. harzianum* has been previously reported in fermentation processes with and without extractive solvents (Serrano-Carreón et al., 1992, 2002) and has been attributed to the biotransformation of the molecule. Although 6PP biotransformation by *Trichoderma* sp. has not been reported, it has been shown to occur in other fungi (i.e., *Penicillium*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Botrytis*) as part of a fungal strategy to eliminate metabolites that would otherwise be toxic (Cooney and Lauren, 1999).

Maximum specific 6PP productivity as a function of EDCF is shown in Figure 4d. A bell-shaped relationship was observed, which peaked between 7 and 10 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$ and then dropped at higher dissipation rates, suggesting a hydrodynamic stress threshold in 6PP productivity. Three additional productivity points (1.3, 10.2, and 25.8 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$), obtained from previously developed non-limiting DOT extractive fermentations (i.e., above 30% of air saturation; unpublished data) using a similar bioreactor and impeller system (but in which the aeration rate was gradually increased) were plotted to further illustrate such relationship. Similar bell-shaped relationships, yielding lower productivities (i.e., cellulase, xylanase, chitinase, 6PP) as result of the higher shear stresses developed, have been reported in *T. reesei* and *T. harzianum* stirred tank and shake flask cultures (Felse and Panda, 2000; Galindo et al., 2004; Lejeune and Baron, 1995; Mukataka et al., 1988).

As previously discussed, oxygen or carbon shortages were unlikely in the extractive fermentation process; thus, enhanced 6PP production was most probably linked to the metabolic changes observed. It has been shown in biological control and elicitation experiments that 6PP biosynthesis is induced by the presence of phytopathogenic fungi, as 6PP is a

natural antifungal agent (Cooney and Lauren, 1998; Serrano-Carreón et al., 2004). Consequently, 6PP production can be viewed as a response mechanism through which *Trichoderma* responds to a stressful condition in its natural habitat. In addition to sensing the presence of other fungi, 6PP enhancement has also been reported during *T. harzianum* nitrogen-limited fermentations (Serrano-Carreón et al., 1992); hence, 6PP synthesis seems to be triggered by the application of different (biotic or abiotic) stresses. In this study, *T. harzianum* responded to increasing mechanical stress through a carbon metabolic shift (from growth to maintenance related-activities), which, apparently, induced an intermediate metabolic state (i.e., from 7 to 10 $\text{kW/m}^3 \cdot \text{s}$; Fig. 4) that resulted in enhanced 6PP production.

Overall, the practical and important implication of this study relies on the fact that mechanical stress not only determined *T. harzianum* morphology, but it induced a complex physiological response cascade that triggered cell metabolism and differentiation shifts, thus influencing fungal growth and culture productivity.

This study was financed in part by CONACyT (39906), IFS (E/2548-2), and DGAPA-UNAM (IN-226202). The technical assistance of J. Vanegas in the image analysis work is acknowledged. We thank M.A. Caro, V. Albiter and M. Ortiz (Pilot Plant staff) for their technical assistance.

References

- Amanullah A, Blair R, Nienow AW, Thomas CR. 1999. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnol Bioeng* 62:434–446.
- Amanullah A, Christensen LH, Hansen K, Nienow AW, Thomas CR. 2002. Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 77:815–826.
- Bonnarme P, Djian A, Latrasse A, Féron G, Giniés C, Durand A, Le Quére JL. 1997. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma* sp. from vegetable oils. *J Biotechnol* 56:143–150.
- Breeuwer P, Abee T. 2000. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *Int J Food Microbiol* 55:193–200.
- Cooney JM, Lauren DR. 1998. *Trichoderma*/pathogen interactions: Measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. *Let Appl Microbiol* 27: 283–286.
- Cooney JM, Lauren DR. 1999. Biotransformation of the *Trichoderma* metabolite 6-*n*-pentyl-2H-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. *J Nat Prod* 62:681–683.
- Cui YQ, van der Lans RGM, Luyben KChAM. 1998. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol Bioeng* 57:409–419.
- Einsele A. 1978. Scaling up bioreactors. *Process Biochem* 13:13–14.
- Felse PA, Panda T. 2000. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors—The influence of agitator speed. *Biochem Eng J* 4:115–120.
- Galindo E, Flores C, Larralde-Corona P, Corkidi G, Rocha-Valadez JA, Serrano-Carreón L. 2004. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* cultured in unbaffled and baffled shake flasks. *Biochem Eng J* 18:1–8.
- Hassan M, Corkidi G, Galindo E, Flores C, Serrano-Carreón L. 2002. Accurate and rapid viability assessment of *Trichoderma harzianum*

- using fluorescence-based digital image analysis. *Biotechnol Bioeng* 80:677–684.
- Henriksen CM, Nielsen J, Villadsen J. 1997. Influence of the dissolved oxygen concentration on the penicillin biosynthetic pathway in steady-state cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Prog* 13:776–782.
- Higashiyama K, Murakami K, Tsujimura H, Matsumoto N, Fujikawa S. 1999. Effects of dissolved oxygen on the morphology of an arachidonic acid production by *Mortierella alpina* 1S-4. *Biotechnol Bioeng* 63:442–448.
- Ho CS, Ju LK, Baddour RF. 1990. Enhancing penicillin fermentations by increased oxygen solubility through the addition of *n*-hexadecane. *Biotechnol Bioeng* 36:1110–1118.
- Janssens L, De Pooter HL, Schamp NM, Vandamme EJ. 1992. Production of flavors by microorganism. *Process Biochem* 27:195–215.
- Jin Q, Bethke C. 2003. A new rate law describing microbial respiration. *Appl Environ Microbiol* 69:2340–2348.
- Johansen CL, Coolen L, Hunik JH. 1998. Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations. *Biotechnol Prog* 14:233–240.
- Joseph-Hornic T, Hollomon DW, Wood PM. 2001. Fungal respiration: A fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* 1504:179–195.
- Ju LK, Ho CS. 1989. Oxygen diffusion coefficient and solubility in *n*-hexadecane. *Biotechnol Bioeng* 34:1221–1224.
- Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 52:672–684.
- Jüsten P, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR. 1998. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 59:762–775.
- Lejeune R, Baron GV. 1995. Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:249–258.
- Li ZJ, Shukla V, Fordyce AP, Pedersen AG, Wenger KS, Marten MR. 2000. Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation at the production scale. *Biotechnol Bioeng* 70:300–312.
- Li ZJ, Shukla V, Wenger K, Fordyce A, Pedersen AG, Marten M. 2002. Estimation of hyphal tensile strength in production-scale *Aspergillus oryzae* fungal fermentations. *Biotechnol Bioeng* 77:601–613.
- Lucatero S, Larralde-Corona CP, Corkidi G, Galindo E. 2003. Oil and air dispersion in a simulated fermentation broth as a function of mycelial morphology. *Biotechnol Prog* 19:285–292.
- Luong JHT, Mulchandani A, Leduy A. 1988. Kinetics of biopolymer synthesis: A revisit. *Enzyme Microb Technol* 10:326–332.
- Makagiarsar HY, Ayazi-Shamlou P, Thomas CR, Lilly MD. 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biopr Eng* 9:83–90.
- Mukataka S, Kobayashi N, Saio S, Takahashi J. 1988. Variation in cellulase-constituting components from *Trichoderma reesei* with agitation intensity. *Biotechnol Bioeng* 32:760–763.
- Nienow AW, Elson T. 1988. Aspects of mixing rheological complex fluids. *Chem Eng Res Des* 66:5–15.
- Nienow AW. 1990. Gas dispersion performance in fermenter operation. *Chem Eng Prog* 86:61–71.
- Oldshue JY. 1966. Fermentation mixing scale up techniques. *Biotechnol Bioeng* 8:3–24.
- Papagianni M, Matthey M, Kristiansen B. 1999. Hyphal vacuolation and fragmentation in batch and fed-batch cultures of *Aspergillus niger* and its relation to citric acid production. *Process Biochem* 35:359–366.
- Papagianni M. 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22:189–259.
- Paul GC, Kent CA, Thomas CR. 1994. Hyphal vacuolation and fragmentation in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 44:655–660.
- Pollard DJ, Kirschner TF, Hernandez D, Hunt G, Olewinski R, Salmon PM. 2002. Pilot-scale process sensitivity studies for the scaleup of a fungal fermentation for the production of pneumocandins. *Biotechnol Bioeng* 78:270–279.
- Prapulla SG, Karanth NG, Engel KH, Tressl R. 1992. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma viride*. *Flavor Frag J* 7:231–234.
- Reuss M. 1988. Influence of mechanical stress on the growth of *Rhizopus nigricans* in stirred bioreactors. *Chem Eng Technol* 11:178–187.
- Serrano-Carreón L, Hathout Y, Bensoussan M, Belin JM. 1992. Production of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* from 18:n fatty acid methyl esters. *Biotechnol Lett* 14:1019–1024.
- Serrano-Carreón L, Corona RM, Sánchez A, Galindo E. 1998. Prediction of xanthan fermentation development by a model linking kinetics, power drawn and mixing. *Process Biochem* 33:133–146.
- Serrano-Carreón L, Balderas-Ruiz K, Galindo E, Rito-Palomares M. 2002. Production and biotransformation of 6-pentyl- α -pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:170–174.
- Serrano-Carreón L, Flores C, Rodríguez B, Galindo E. 2004. *Rhizoctonia solani*, an elicitor of 6-pentyl- α -pyrone production by *Trichoderma harzianum* in a two liquid phases, extractive fermentation system. *Biotechnol Lett* 26:1403–1406.
- Smith JJ, Lilly MD, Fox RL. 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol Bioeng* 35:1011–1023.
- Thomas CR. 1992. Image analysis: Putting filamentous microorganisms in the picture. *TIBTECH* 10:343–348.
- van Suijdam JC, Metz B. 1981. Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnol Bioeng* 23:111–148.