

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

Estimación del flux de glucosa en cultivos superficiales de
Aspergillus niger

TESIS

Para obtener el grado de
Maestro en Biotecnología

PRESENTA

Eric Ortega Sánchez

Comité Tutorial:

Dr. Gustavo Viniegra González
Dr. Ernesto Favela Torres
Dr. Octavio Loera Corral

Abril del 2008

Iztapalapa, D.F. a 25 de Abril del 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la
tesis

Estimación del flux de glucosa en cultivos superficiales de
Aspergillus niger

que presentó

Eric Ortega Sánchez

Comité Tutorial:

Dr. Gustavo Viniegra González
Dr. Ernesto Favela Torres
Dr. Octavio Loera Corral

Jurado:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dr. Esteban Barranco Florido

Vocal: Dr. Gerardo Díaz Godinez

Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de
CONACYT (becario 202357)

ÍNDICE

	Página
Agradecimientos	i
Lista de figuras	ii
Lista de tablas	iii
Nomenclatura	iii
Resumen	iv
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades del género <i>Aspergillus</i>	1
1.2. Importancia de <i>Aspergillus</i> en la Biotecnología	3
1.3. Mecanismos de transporte: Generalidades	4
1.3.1. Difusión simple	6
1.3.2. Difusión facilitada	9
1.4. Análisis y procesamiento de imágenes	11
Capítulo 2. ANTECEDENTES	15
2.1. Características de la difusión facilitada	15
2.1.1. Rapidez y especificidad	15
2.1.2. El flux tiene un perfil típico de una cinética de saturación	16

2.1.3. La difusión facilitada es susceptible a inhibición competitiva	17
2.1.4. La difusión facilitada es susceptible a inactivación química	18
2.2 Transporte de glucosa en <i>Aspergillus niger</i>	18
2.2.1. Difusión simple	18
2.2.2. Difusión facilitada	19
2. 3. Cultivo en medio sólido y transporte	21
2.4. Morfometría de <i>Aspergillus niger</i>	22
Capítulo 3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	24
Objetivo general	24
Objetivos particulares	24
Hipótesis	24
Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1. Microorganismo	25
4.2. Conservación de la cepa	25
4.3. Unidades experimentales	26
4.4. Composición del medio de cultivo	26
4.5. Origen del inóculo	27
4.6. Determinación de la biomasa	27
4.7. Cuantificación de la glucosa residual	28
4.8. Medición de los diámetros de las hifas	29
Capítulo 5. DESARROLLO TEÓRICO	31

5.1. Estimación del flux de glucosa a partir de un modelo fisiológico	32
5.2. Modelo de difusión simple	35
5.3. Modelo de difusión facilitada	37
Capítulo 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
6.1. Estimación de la velocidad máxima de crecimiento específico (μ_{max}) y biomasa máxima (x_{max})	38
6.2. Rendimiento biomasa/sustrato (Yx/s)	40
6.3. Diámetro promedio de las hifas (d_H)	42
6.4. Estimación del flux de glucosa (J) con el modelo fisiológico	44
6.5. Comparación con el modelo de difusión simple	45
6.6. Cambios en la permeabilidad de <i>Aspergillus niger</i>	47
6.7. Comparación con el transporte por difusión Facilitada	49
Capitulo 7. CONCLUSIONES	51
Capitulo 8.RECOMENDACIONES	52
Capitulo 9.Bibliografía	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Estructura característica del género <i>Aspergillus</i>	2
2 Estructura de una membrana celular	5
3 Permeabilidad de algunos compuestos a través de una membrana lipídica	6
4 Difusión de una sustancia a través de una barrera semipermeable	7
5 Hidrofobicidad y permeabilidad de algunas sustancias	8
6 Modelos de transporte facilitado	9
7 Diferencias entre la energía de activación requerida en el mecanismo de difusión simple y en la difusión facilitada	11
8 Variación del flux de glucosa en un eritrocito humano	16
9 Doble recíproca para el flux de glucosa en un eritrocito	17
10 Secciones de una hifa, en base al tipo de organelos presentes	22
11 Simulación de la geometría de una hifa	33
12 Curvas de producción de biomasa, a diferentes concentraciones de glucosa	39
13 Cinéticas de concentración de glucosa	41
14 Cambios en el diámetro de las hifas con respecto a la concentración de glucosa.	43
15 Comparación de los flux de glucosa, considerando que no existen cambios morfológicos ($d_{H \text{ const}}$), con los flux de glucosa con $d_{H \text{ exp}}$	45
16 Diferencias entre los flux calculados con el modelo fisiológico y el modelo de difusión simple	47
17 Perfil de la permeabilidad de la membrana	48
18 Comparación entre los perfiles del flux de glucosa calculados con el modelo fisiológico y el de difusión facilitada	50

LISTA DE TABLAS

	Página
1 Productos obtenidos del género <i>Aspergillus</i>	4
2 Valores de μ_{max} y X_{max} en cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i> a diferentes concentraciones de glucosa	41
3 Datos de $Y_{x/s}$ y q_s calculados a partir de la ecuación propuesta por Pirt	42
4 Diámetros promedio de las hifas, correspondientes a diferentes concentraciones de glucosa	45
5 Coeficientes de permeabilidad (P) reportados para algunos microorganismos	50

NOMENCLATURA

A_x	Superficie específica	$\text{cm}^2 \text{g}_x^{-1}$
S_{ext}	Concentración de sustrato fuera de la célula	g L^{-1}
D_j	Difusividad del soluto j	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
J_s	Flux de sustrato	$\text{g s}^{-1} \text{cm}^{-2}$
P	Coeficiente de Permeabilidad al sustrato	cm s^{-1}
K_m	Constante de Michaelis	g L^{-1}
d_H	Diámetro de la hifa	μm
ρ	Densidad de la biomasa seca	g cm^{-3}
q_s	Consumo específico de sustrato	$\text{g}_s \text{g}_x^{-1} \text{s}^{-1}$
[S]	Concentración de sustrato	g L^{-1}
X	Biomasa	g L^{-1}
μ_{max}	Tasa específica de crecimiento máximo	h^{-1}
$Y_{x/s}$	Rendimiento biomasa sustrato	$\text{g}_x \text{g}_s^{-1}$
m	Coeficiente de mantenimiento	$\text{g}_s \text{g}_x^{-1} \text{h}^{-1}$
V_{max}	Velocidad máxima de transporte de sustrato a través de la membrana	$\text{g}_s \text{g}_x^{-1} \text{s}^{-1}$

RESUMEN

Para explicar los niveles bajos de represión catabólica observados en cultivos en medio sólido cuando se emplean altas concentraciones de azúcar, Viniegra y Favela (2006) propusieron la hipótesis de que el organismo modifica la permeabilidad en la membrana celular, por lo que las señales bioquímicas propias de la represión catabólica no se expresan.

El entendimiento de este problema permitirá el mejor diseño de diversos procesos de fermentación sólida; así mismo, dará cabida a la búsqueda de mutantes genéticas que se adapten mejor a las concentraciones elevadas de sustrato pero, con alta producción de enzimas.

En este trabajo se procedió a medir las tasas específicas de crecimiento y consumo de glucosa en cultivos de *Aspergillus niger* extendidos uniformemente sobre placas de agar. También se midieron los diámetros de las hifas, con distintas concentraciones de azúcar; se realizó el balance de materia usando las ecuaciones empíricas: logística para el crecimiento y de Fick para el transporte, junto con la ecuación de Pirt para el acoplamiento entre el crecimiento y el consumo de sustrato. Usando estos modelos y tomando en cuenta una geometría cilíndrica para las hifas, se pudo calcular el valor de los coeficientes de permeabilidad aparente del sustrato a través de la membrana.

Los resultados obtenidos indican que la permeabilidad aparente disminuyó en un orden de magnitud cuando la concentración inicial de glucosa cambió de 12.5 g/L a 100 g/L. Estos resultados permiten ahora formular un estudio más detallado de la microfisiología de *A. niger* en las condiciones ya descritas pero que pueda medir directamente los flujos de sustrato a través de la membrana y que los pueda relacionar con la síntesis de las permeasas ligadas al transporte de sustrato. También justificará el estudio de mutantes de *A. niger* ya disponibles en cuanto a su adaptación a la hiper ósmosis del medio de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

- A mi pareja Geno que me ha provisto de amor, comprensión y motivación para esforzarme en todas mis actividades
- Especialmente a mis padres, Manuel y Guadalupe, por darme las herramientas para crecer y por su amor incondicional
- A mis hermanos: Manuel, Margarita, Concepción, Laura, Carlos y Yaneth por su ejemplo de lucha y prosperidad
- A las profesoras Ángeles Toro y Silvia Toro por la confianza que me brindaron en el momento más difícil de mi vida como estudiante
- A mis amigos: Armando, Roberto, Ricardo, Misael, Saúl, Oscar, Lizeth, Eduardo y José Alfredo, por sus consejos y compañía
- Al Dr. Gustavo Viniegra por su dirección, por compartirme sus vastos conocimientos y por su apoyo económico
- A mis Asesores, Dr. Ernesto Favela Torres y Dr. Octavio Loera Corral por su interés en mi formación, por haberme permitido equivocarme, por compartirme sus conocimientos y por comprender mis carencias como ser humano
- A mis revisores; Dr. Juan Esteban Barranco Florido y Dr. Gerardo Díaz Godinez por enriquecer este documento a través de sus comentarios.

RESUMEN

Para explicar los niveles bajos de represión catabólica observados en cultivos en medio sólido, cuando se emplean altas concentraciones de azúcar, Viniegra y Favela (2006) propusieron la hipótesis de que el organismo disminuye la permeabilidad membranal al sustrato, por lo que las señales bioquímicas propias de la represión catabólica no se expresan.

El entendimiento de este problema permitirá el mejor diseño de muy diversos procesos de fermentación sólida a la vez, dará cabida a la búsqueda de mutantes genéticas que se adapten mejor a las concentraciones elevadas de sustrato pero, con alta producción de enzimas.

En este trabajo se procedió a medir las tasas específicas de crecimiento y consumo de glucosa en cultivos de *Aspergillus niger* extendidos uniformemente sobre placas de agar. También se midieron los diámetros de las hifas y todo ello con distintas concentraciones de azúcar, se realizó el balance de materia usando las ecuaciones empíricas: logística para el crecimiento y de Fick para el transporte, junto con la ecuación de Pirt para el acoplamiento entre el crecimiento y el consumo de sustrato. Usando estos modelos y tomando en cuenta una geometría cilíndrica para las hifas, se pudo calcular el valor de los coeficientes de permeabilidad aparente del sustrato a través de la membrana.

Los resultados obtenidos indican que la permeabilidad aparente disminuyó en un orden de magnitud cuando la concentración inicial de glucosa cambió de 12.5 g/L a 100 g/L. Estos resultados permiten ahora formular un estudio más detallado de la microfisiología de *A. niger* en las condiciones ya descritas pero que pueda medir directamente los flujos de sustrato a través de la membrana y que los pueda relacionar con la síntesis de las permeasas ligadas al transporte

de sustrato. También justificará el estudio de mutantes de *A. niger* ya disponibles en cuanto a su adaptación a la hiper ósmosis del medio de cultivo.

INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades del género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez por Micheli (1729), que lo denominó con este nombre por su parecido con un “aspergillum” (instrumento religioso utilizado para dispersar agua bendita). Los microorganismos de éste género crecen sobre diversos materiales, debido a la gran variedad de enzimas que produce y se encuentra clasificado dentro del Reino Fungi. De acuerdo con Herrera y Ulloa (1990) este reino está formado por las siguientes divisiones: Myxomycota (hongos mucilaginosos), Eumycota (hongos verdaderos) y Lichens (hongos simbioses), a su vez la división Eumycota tienen cuatro subdivisiones: Ficomycetos, Ascomycetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos. Esta última también es conocida como la de los hongos filamentosos, grupo de estructura microscópica, que se caracteriza por formar micelio bien desarrollado, septado y ramificado, generalmente multinucleado y que se propaga mediante la producción asexual de conidios, que pueden tomar formas muy diversas, dentro de esta subdivisión se encuentra el género *Aspergillus* cuyas características fisiológicas se mencionan a continuación.

El micelio de *Aspergillus* se caracteriza por tener hifas ampliamente ramificadas, septadas y transparentes, regularmente multinucleadas (Figura 1), su forma de reproducción es asexual, el micelio produce abundantes conidióforos, los cuales provienen del cuerpo de la hifa. Las células de la hifa que se ramifican para dar origen a los conidióforos son llamadas células pie. Cada conidióforo termina en un bulbo llamado vesícula. La vesícula produce un gran número de conidias en toda su superficie. Las conidias son típicamente esféricas y unicelulares.

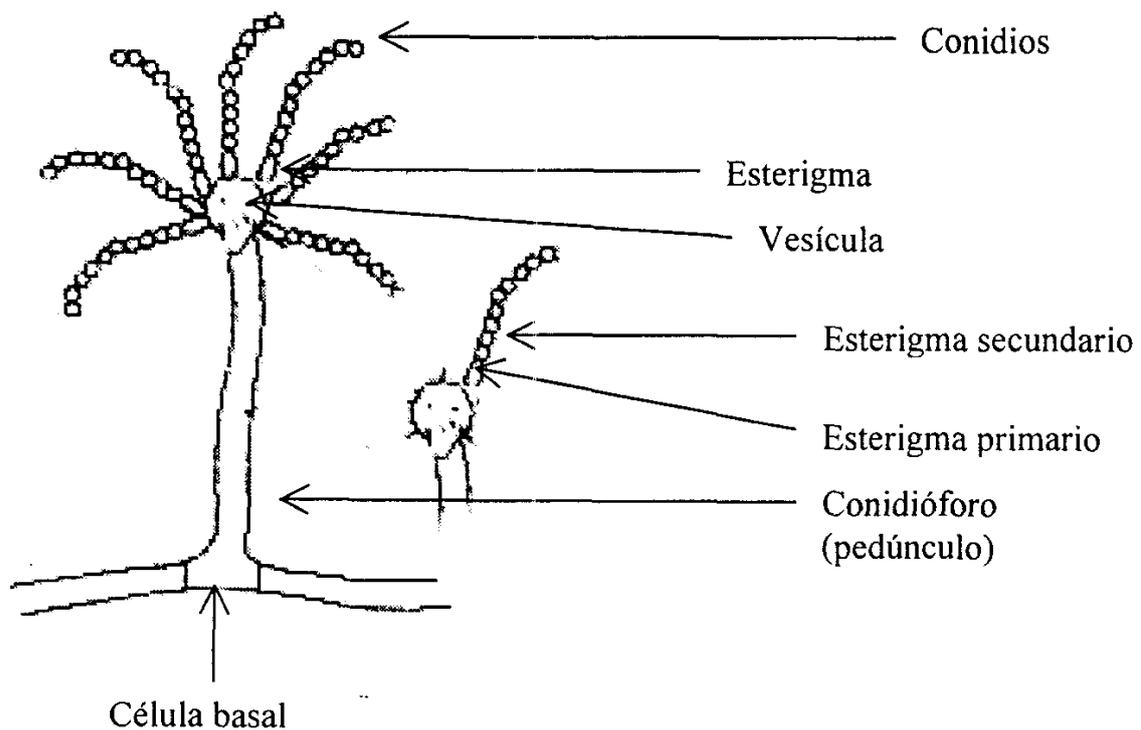


Figura 1. Estructura característica del género *Aspergillus*. (Díaz –Godínez, 2001)

El género *Aspergillus* tiene una pared celular responsable de su rigidez, químicamente es muy compleja, pero básicamente tiene polisacáridos, proteínas, lípidos e iones inorgánicos. Se distinguen microfibrillas formadas por polisacáridos. Son cadenas largas de polisacáridos que se unen y retuercen de forma parecida a una cuerda que va formando una especie de retículo, también tiene quitina (polímero de N-acetil-glucosamina) y β -glucanos, los más comunes son la celulosa (polímero de glucosa) y glucanos no celulósicos. Este retículo se encuentra en una matriz cuya composición es la siguiente:

- Polisacáridos de longitud mayor y más complejos que las microfibrillas: quitina, celulosa, polímeros de galactosamina y glucanos no celulósicos
- Proteínas
- Lípidos
- Iones

1.2. Importancia de *Aspergillus* en la biotecnología

La tendencia en la venta de enzimas indica que las ventas se duplicarán para el año 2009, con respecto a 1998 (<http://www.biocatalysts.com/>). Las enzimas que el mercado demanda, son utilizadas en industrias que producen textiles, detergentes, azúcares de maíz y quesos. Para la producción de tales enzimas se utilizan microorganismos que presentan ciertas ventajas a nivel industrial, tales como: facilidad para separar la biomasa del caldo de cultivo (biomasa en forma de micelio), que crezca con rapidez y que excrete un gran número de enzimas. Uno de los géneros que presenta estas ventajas, es el género *Aspergillus* (ver tabla 1).

Las cepas silvestres del género *Aspergillus* producen diferentes compuestos (ver tabla 1). Además se ha mostrado que es factible transformar estas cepas, a través de técnicas de biología molecular, para obtener productos de interés industrial producidos por diferentes microorganismos (Berka y col.,1997).

Las investigaciones hechas por la empresa Genencor mostraron la factibilidad de clonar el gen del becerro que codifica para la quimosina (enzima utilizada en la manufactura del queso) para expresarla en *Aspergillus awomori* (Berka y col., 1991). Este hecho permitió incrementar la oferta de esta enzima, sin depender de la disponibilidad de becerros. Trabajos posteriores han corroborado que es posible expresar enzimas producidas por diferentes organismos en cepas del género *Aspergillus* (Berka y col.,1997;Juge y col.,1998;Takjashima y col., 1998), esto indica que la diversidad de enzimas producidas por *Aspergillus* aumentará, por ello es importante entender los fenómenos entorno a la capacidad productora de enzimas por estos microorganismos.

Tabla 1. Productos obtenidos por microorganismos del género *Aspergillus*.

Especie	Producto
<i>A. fumigatus</i>	Fumagilina
<i>A. niger</i>	Ácido cítrico
<i>A.niger</i>	Proteasa
<i>A.niger</i>	Lipasa
<i>A.niger</i>	Celulasa
<i>A.niger</i>	Lactasa
<i>A.niger</i>	Pectinasa
<i>A. awamori</i>	Glucoamilasa
<i>A. terreus</i>	Ácido itacónico

1.3. Mecanismos de transporte: generalidades

El transporte de nutrientes se lleva a cabo a través de la membrana, ésta tiene una estructura de tres capas, los lípidos en el centro y las proteínas dentro y fuera de la capa lipídica (figura 2). Los fosfolípidos son el componente mayoritario en las membranas y forman una doble capa que generan dos zonas hidrofílicas (dentro y fuera de la membrana) y una zona hidrofóbica. La mayoría de estas moléculas tienen dos cadenas hidrofóbicas de longitud variable, pero las más comunes tienen entre 16 y 18 átomos de carbono y un número variable de dobles enlaces. La parte hidrofílica tiene mayor variabilidad, no solo en la estructura, sino también en cuanto al número y al signo de las cargas eléctricas. Las proteínas en la membrana son muy diversas, ya que cada aminoácido que constituye a una de ellas tiene características específicas de tamaño, signo y número de cargas, hidrofobicidad, etc., lo que genera una gran variedad de proteínas con funciones específicas de transporte y de comunicación entre otras. El contenido de proteínas en las membranas varía entre un 25 y 75 %, esto parece depender del grado de especialización y actividad de cada una de ellas. Son numerosas las membranas celulares que contienen polisacáridos cuya función es servir de elementos de reconocimiento por parte de otras células u organismos, el caso más conocido en células animales es el de los polisacáridos de los glóbulos

rojos, que por la presencia en sus membranas dan lugar a los grupos sanguíneos.

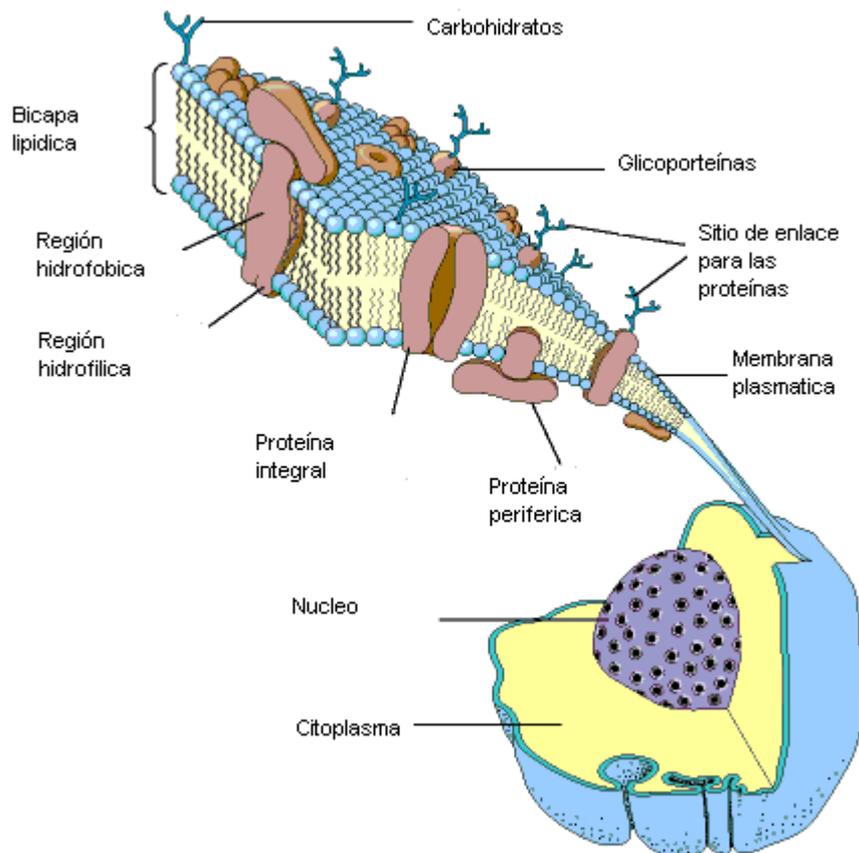


Figura 2. Estructura de la membrana celular (Van Holde, 1998).

Las membranas celulares regulan el intercambio de agua de especies iónicas, de oxígeno y de materia orgánica entre los medios intracelular y extracelular; que se llevan a cabo por diferentes mecanismos: difusión simple y transporte activo.

1.3.1. Difusión simple

Las células cuentan con diversos mecanismos que les permiten transportar sustancias con diversas características químicas. La difusión simple es un mecanismo que opera para sustancias que pueden difundirse a través de la membrana debido a un gradiente electroquímico y a su solubilidad en la bicapa lipídica. En la figura 3 se muestran las sustancias que difunden a través de la membrana, que de manera general son sustancias de bajo peso molecular e hidrofóbicas.

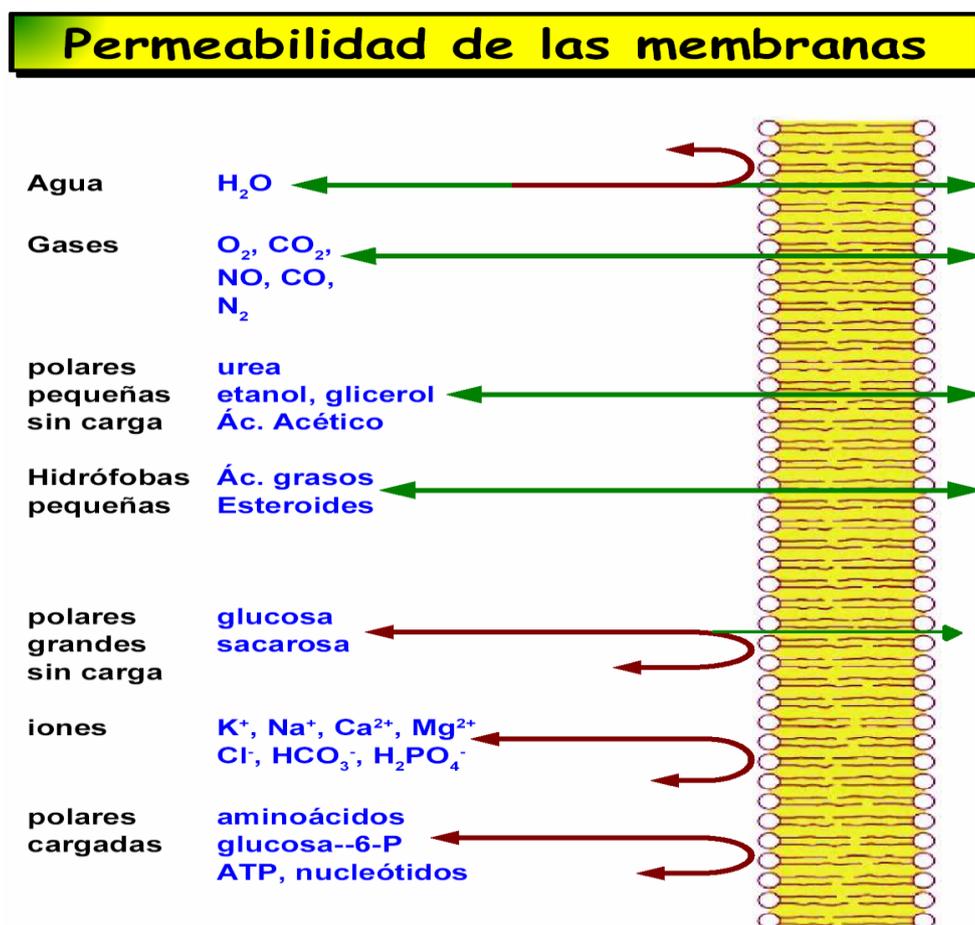


Figura 3. Permeabilidad de algunos compuestos a través de una membrana lipídica (Castro, 2004).

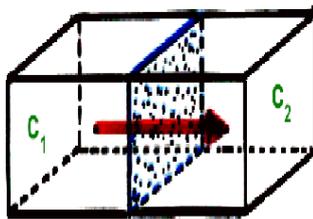
Cuando la membrana es permeable a un soluto, el transporte es controlado por el fenómeno de difusión simple que es descrito por la primera ley de Fick

(figura 4), Para una membrana de espesor x , la primera ley de Fick se puede reducir aproximadamente a:

$$J = \left(\frac{D}{x}\right)(C_{fuera} - C_{dentro})$$

Donde: J es el flux de una sustancia, D es el coeficiente de difusión de dicha sustancia a través de la membrana y $(C_{fuera}-C_{dentro})$ es el gradiente de concentración a través de la membrana. Un parámetro al que se hace referencia frecuentemente es el índice de permeabilidad (P), el cual se define como el cociente (D/x) , este es un parámetro que indica qué tan rápido pasa una sustancia a través de una membrana.

➤ Flujo a través de una frontera: 1° ley de Fick



$$J = -D \cdot \frac{dc}{dx}, \quad [J] = \frac{M}{L^2 \cdot T} = \frac{mol}{cm^2 \cdot s}$$

Flujo proporcional al gradiente de concentración

Figura 4. Difusión de una sustancia a través de una barrera, el flux (J) es proporcional al gradiente de concentración (dc).

Collander (1954) encontró que la permeabilidad de una sustancia tiene una estrecha relación con su solubilidad en las grasas. En la figura 5 se presenta la relación entre el coeficiente de permeabilidad y la solubilidad de compuestos orgánicos en grasas.

Por lo tanto, si bien la difusión es un mecanismo de transporte suficientemente efectivo para algunas moléculas, el transporte está limitado por la permeabilidad

de la membrana al soluto en cuestión, por lo que la célula debe utilizar otros mecanismos para transportar compuestos que no pueden pasar libremente a través de la membrana.

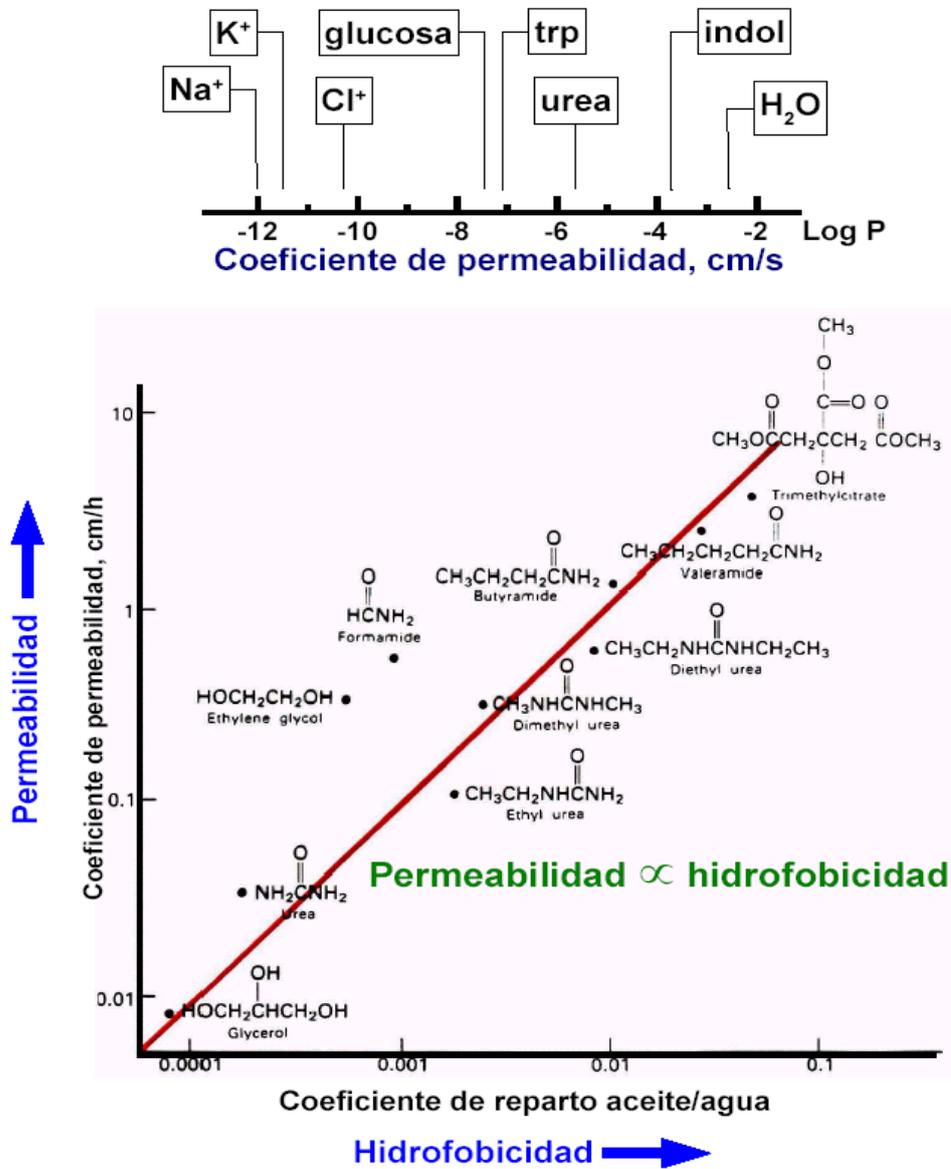


Figura 5. Hidrofóbcidad y permeabilidad de algunas sustancias y su relación con el coeficiente de permeabilidad en una membrana lipídica (Castro, 2004).

1.3.2. Difusión facilitada

Algunas sustancias no pueden atravesar libremente la membrana lipídica ya sea por su tamaño o polaridad, estas entran a la célula a través de canales o proteínas transportadoras. Al respecto únicamente se conoce la velocidad con que se mueven dichas sustancias y su afinidad, poco se sabe sobre los mecanismos que le permiten a una proteína reconocer y luego permitir de manera selectiva el paso de ciertas sustancias; solo se ha logrado imaginar modelos (figura 6) que permiten continuar estudiando estos fenómenos.

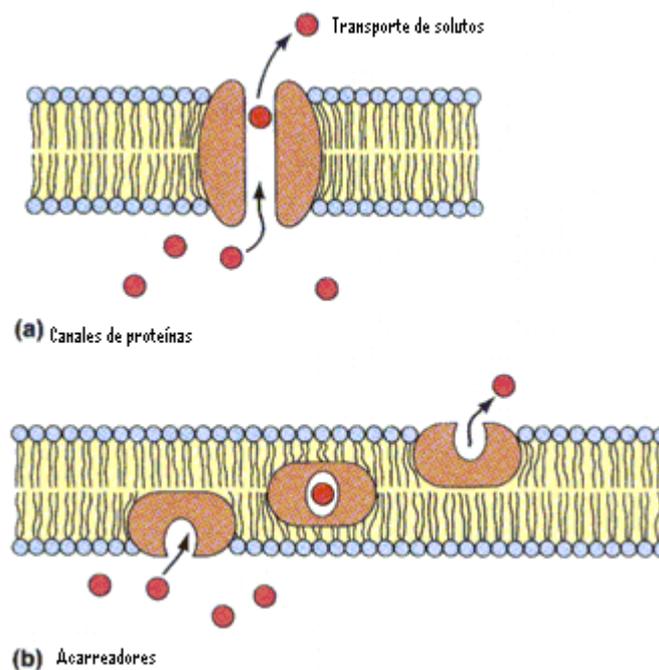


Figura 6. Modelos de transporte facilitado a través de canales transmembranales y de proteínas transportadoras (Van Holde, 1998)

La difusión facilitada se puede estudiar como un mecanismo enzimático que disminuye la energía de activación necesaria para que se lleve a cabo el movimiento de solutos a través de la membrana (figura 7), la velocidad de transporte al igual que en el mecanismo de difusión simple depende del gradiente de concentración, pero también de la afinidad que tenga la proteína por el soluto y de la cantidad de proteínas transportadoras, por lo que resulta ser un mecanismo más complejo.

El modelo actual del mecanismo de transporte llevado a cabo por proteínas sugiere que la proteína transportadora se une específicamente a la molécula a transportar y sufre cambios temporales en su configuración, los mismos que permiten la transferencia del soluto a través de la membrana. En el sistema de transporte más simple, conocido como uniporte, un soluto se mueve directamente a través de la membrana en una dirección. El tipo de cotransporte conocido como simporte dos solutos diferentes se mueven a través de la membrana, simultáneamente y en el mismo sentido. Frecuentemente, un gradiente de concentración que involucra a uno de los solutos transportados, impulsa el transporte del otro: por ejemplo un gradiente de concentración de iones Na^+ frecuentemente impulsa el cotransporte de moléculas de glucosa. En otro tipo de sistema de cotransporte, conocido como antiporte, dos solutos diferentes se mueven a través de la membrana simultánea o secuencialmente en sentidos opuestos, La bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ es un ejemplo de sistema de cotransporte que implica un antiporte.

Las proteínas que forman canales no se unen al soluto, sino que forman poros hidrofílicos que atraviesan la membrana permitiendo exclusivamente el pasaje de iones, el tipo de ion se selecciona de acuerdo al tamaño y a la carga. Los canales iónicos se encuentran generalmente cerrados en una especie de “compuerta”, que impide el pasaje de iones por el poro. Los canales pueden abrirse por un intervalo de tiempo breve como respuesta a distintos tipos de estímulos.

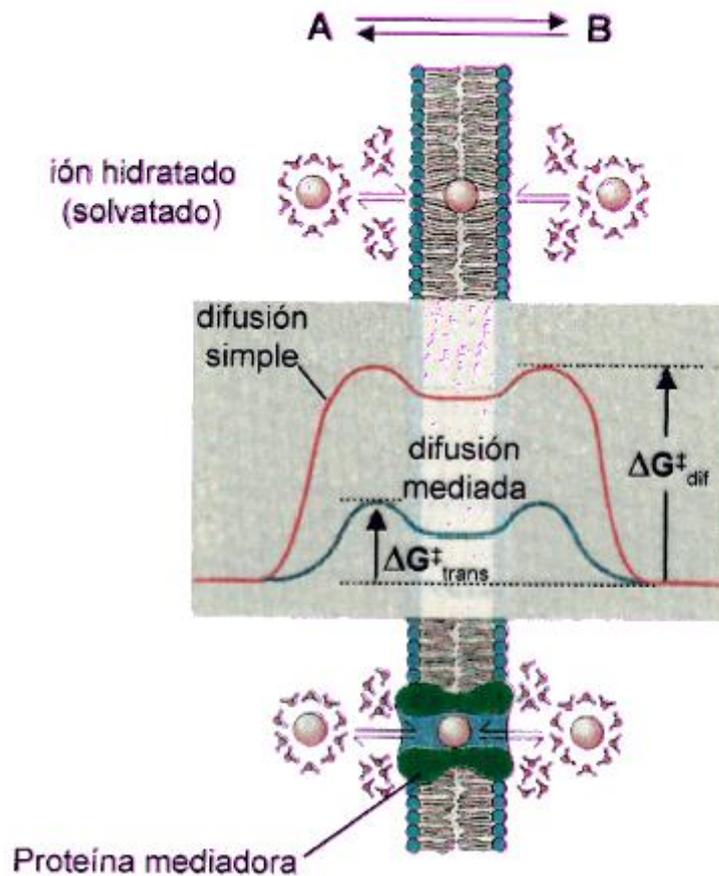


Figura 7. Diferencias entre la energía de activación requerida en el mecanismo de difusión simple y en la difusión facilitada (Castro, 2004).

1.4. Análisis y procesamiento de imágenes

El avance de las técnicas computarizadas ha permitido la aplicación conjunta de paquetes estadísticos, microscopios y computadoras, para la obtención y procesamiento de imágenes. En la biotecnología se han explotado estos recursos para los siguientes fines: estimación de características morfométricas en hongos, conteo de microorganismos en superficie, estimación del volumen de la biomasa (con las suposiciones adecuadas), distinción entre especies bacterianas, monitoreo de colonias bacterianas y fúngicas, cuantificación de reacciones químicas en placa y análisis geométrico de burbujas en reactores.

Actualmente, es posible realizar mediciones rápidas y precisas y analizar los datos obtenidos con diversos programas. La secuencia de operaciones en un analizador de imágenes consiste en adquirir, digitalizar, procesar, segmentar y medir las imágenes. Los resultados de las mediciones se procesan eficientemente en paquetes estadísticos.

Adquisición de datos.

La adquisición de la imagen resulta ser trascendente, ya que se debe capturar el fenómeno de interés para la investigación (tamaño, forma, longitud, diámetro), en ocasiones es necesario dar un tratamiento previo al objeto de estudio (cortar, teñir etc.), si es el caso, se deben de uniformar los métodos, a fin de obtener reproducibilidad en las imágenes, una vez tratado el objeto (si es que es necesario), se procede a enfocar la imagen a través de un microscopio, en este punto cabe mencionar que se debe realizar con el objetivo de mayor aumento, sobre todo cuando interesa realizar mediciones, de esta manera las mediciones serán más precisas. Posteriormente, se captura la imagen con la cámara adaptada al microscopio.

Mejoramiento de la imagen.

El sistema del analizador de imágenes, contiene una serie de herramientas, que permite mejorar la imagen, a fin de resaltar la característica o el parámetro que se desea medir, dentro de estas herramientas se encuentran: modificar (normalizar) el rango de la distribución de tonos de gris, filtros (funciones: mediana, no-lineal, gaussiana, laplaciano, de gradiente), erosión y dilatación de los contornos,

Segmentación:

Esta operación permite quitar y/o seleccionar, el rango de los tonos, en donde se encuentra el objeto que interesa medir, lo anterior se puede realizar manualmente con el "ratón" o bien a través de un histograma de tonos de gris, el cual se basa en un modelo probabilístico. En otros casos también resulta práctico extraer la imagen que interesa cuantificar, o bien utilizar un pseudocolor que

podría ser más discernible para el ojo humano, lo anterior podría ser de mucha utilidad cuando los cambios en la intensidad de color, se encuentran asociados a algún cambio biológico o químico.

Medición:

El objetivo final del procesamiento de una imagen es obtener un parámetro que cuantifique algún fenómeno de interés, en ese sentido el procesador de imágenes, puede realizar mediciones en una ó 2 dimensiones, las más comunes son: centros de gravedad, áreas, longitudes, diámetros, ángulos y número de objetos y por supuesto las combinaciones que resulten de estas.

Salida.

Es deseable extraer una copia de las imágenes, ya que son una prueba contundente del fenómeno de estudio, las copias se pueden extraer a través de una memoria USB. Actualmente es posible extraer las imágenes y además analizarlas con algunos programas disponibles en Internet, los cuales son muy amigables y facilitan esta parte del trabajo.

Los usos del analizador de imágenes en biotecnología han sido diversos, algunos se mencionan a continuación: Loera y col. (1998), midieron la longitud y el diámetro de las hifas de *Aspergillus* para estimar los parámetros de crecimiento a través de un modelo. El usado por Larralde y col. (1997), quienes realizaron estudios de crecimiento fúngico a través de un analizador de imágenes, en este trabajo, se midió la longitud y diámetro de las hifas, para asociarlos a un modelo de crecimiento que considera estos parámetros, éste modelo de crecimiento fue validado, a través de mediciones del diámetro y longitud de las hifas, crecidas en medios con diferentes concentraciones de glucosa (10 -300 g/L), encontraron una relación inversa entre el diámetro de las hifas y la longitud de la misma, con la concentración de glucosa en el medio.

También existen trabajos, en donde se utiliza el analizador de imágenes para cuantificar gradientes de sustancias químicas. Olsson (1994) desarrolló una

metodología para cuantificar gradientes de fósforo y glucosa en caja de Petri. La metodología consiste en hacer crecer al hongo sobre una película de celofán, después se retira el celofán y se impregna el agar con un reactivo específico, que reacciona con la glucosa o el fósforo, según el caso, y que desarrolla una intensidad de color proporcional al reactivo analizado. La intensidad del color es procesada en el analizador de imágenes, y entonces se puede conocer la concentración radial de nutriente en la caja de Petri, asociando la intensidad del color con la concentración.

En el trabajo de Muller y col. (2000) se presenta una aplicación novedosa, del analizador de imágenes. En este trabajo se observó el efecto de la concentración de glucosa en los niveles de duplicación nuclear (mitosis) tiñendo los núcleos con blanco de calcofluor y después observándolos en un microscopio fluorescente; parte de sus conclusiones son que las bajas concentraciones de glucosa producen un compartimiento apical corto con pocos núcleos y que altas concentraciones de glucosa generan compartimentos apicales largos con muchos núcleos. Se han desarrollado técnicas que utilizan analizadores de imágenes para estimar la producción de biomasa en cultivos sólidos a través de relaciones entre la biomasa medida por la producción de un metabolito y la estimada por el área que ocupan las hifas (Couri y col., 2006)

ANTECEDENTES

2. 1. Características de la difusión facilitada

En la difusión facilitada de glucosa a través de la membrana se han distinguido cuatro características importantes a considerar:

1. Rapidez y especificidad.
2. El flux tiene un perfil típico de una cinética de saturación.
3. Es susceptible a inhibición competitiva.
4. Susceptible a inactivación química.

2.1.1. Rapidez y especificidad

Esta característica fue observada por Jung (1975), quien por medio de una comparación de la permeabilidad de la glucosa y el manitol, en dos sistemas diferentes, uno en membranas sintéticas, y el otro en un eritrocito humano, comprobó que el coeficiente de permeabilidad para estos solutos en las membranas sintéticas, eran similares(en el orden de $10^{-10} \text{ cm s}^{-1}$) y también muy parecidos a los obtenidos por un modelo de difusión simple ($10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$). Hasta este punto todo era lógico, ya que el flux de solutos en la membrana sintética, solo obedecía al gradiente de concentración de cada sustancia, por lo tanto los valores deberían ser similares a los calculados por el modelo de difusión simple. Sin embargo, cuando se midió experimentalmente el coeficiente de permeabilidad para estos dos solutos en un eritrocito humano, los coeficientes fueron: para la glucosa del orden de $10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$ y para el manitol de $10^{-9} \text{ cm s}^{-1}$, esto apuntó hacia la idea de que el eritrocito cuenta con mecanismos de transporte que

permiten transportar la glucosa hasta 100 000 veces más rápido que otros solutos.

2. 1.2. El flux tiene un perfil típico de una cinética de saturación

El flux de glucosa obedece a la siguiente relación (Stein,1967).

$$J_s = \frac{J_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

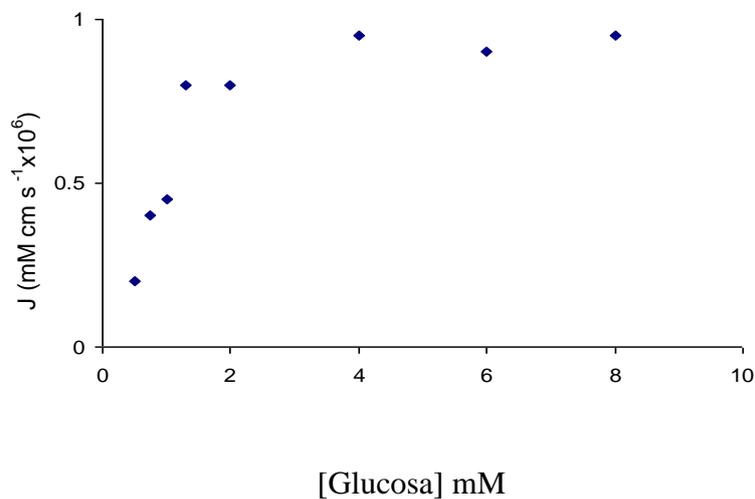


Figura 8. Variación del flux de glucosa en un eritrocito humano, en un medio externo a 5°C (basado en datos de Stein, W.D., *Movements of Molecules across Membranes*, p. 134, Academic Press,1967).

Esta función describe una cinética de saturación (figura 8), haciendo una analogía con el modelo de Michaelis-Menten, el valor de K_m , correspondería a la concentración de glucosa necesaria para alcanzar la mitad del J_{\max} ($J_{\max}/2$), el hecho de que el flux de glucosa describa este perfil hiperbólico, es una evidencia que sugiere un mecanismo de transporte, que en una primera etapa, obedece únicamente al gradiente de concentración, y que después de cierta concentración de glucosa, los mecanismos de transporte son saturados por la glucosa. Esto

también da indicios de que se trata de un transporte mediado por proteínas, cuya cantidad y especificidad limita el flux de glucosa.

Por lo tanto el transporte de glucosa obedece a una dinámica similar a la de los procesos enzimáticos que se pueden describir en las siguientes etapas:

1. Formación del enlace glucosa-transportador
2. Transporte de la glucosa a través de la membrana
3. Disociación del enlace glucosa-transportador
4. Recuperación de la estructura física del transportador

2.1.3. La difusión facilitada es susceptible a inhibición competitiva

En el trabajo de Barnett y col. (1975) se muestra que muchos compuestos estructuralmente similares a la glucosa, inhiben el transporte de este soluto. En la figura 9 se muestra una gráfica correspondiente a la doble recíproca de la expresión de saturación. En este trabajo (Barnett y col., 1975), se observa que el flux de glucosa en presencia de O-benzil d-galactosa, presenta una tendencia característica de inhibición competitiva.

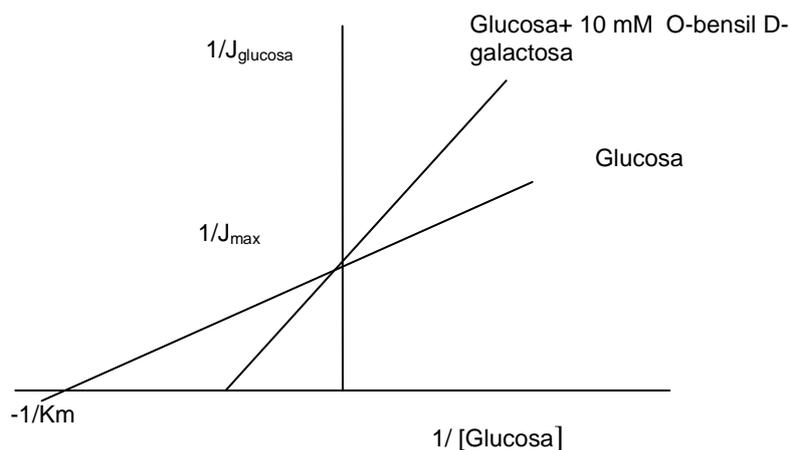
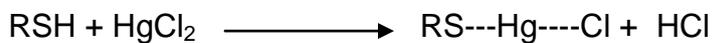


Figura 9. Doble recíproca para el flux de glucosa en un eritrocito, en presencia y ausencia de 6-o-benzil-d-galactosa. Este patrón es propio de una inhibición competitiva (Barnett y col. 1975).

Estos resultados indican que el número de sitios disponibles para el transporte de glucosa son limitados y que el transportador reconoce una estructura química específica, la cual establece una relación análoga a la enzima-sustrato.

2.1.4. La difusión facilitada es susceptible a inactivación química

Se sabe, que cuando las células son tratadas con HgCl_2 , compuesto que puede reaccionar con los grupos sulfhídrico de las proteínas, de acuerdo con la siguiente reacción.



las proteínas se inactivan, ya que se bloquean los sitios de enlace. Con este tratamiento, y en presencia de glucosa y manitol, se ha observado que el flux de glucosa se detiene, y el del manitol no se modifica, estas observaciones indican que el transporte de glucosa, al menos en los eritrocitos, es mediado por proteínas transportadoras, por lo tanto también está limitado por el número de transportadores disponibles.

2. 2. Transporte de glucosa en *Aspergillus niger*

2. 2.1. Difusión simple

De acuerdo con Burgstaller (1997) menos del 1% del número de especies fúngicas han sido investigadas, en torno al transporte de solutos de bajo peso molecular a nivel de membrana. Esto es sorprendente, si se considera la importancia que tienen los procesos que ocurren en las membranas de las células, puesto que son la barrera entre la célula y el ambiente.

En este capítulo, se presentan algunos trabajos que sugieren que el transporte de glucosa a través de la membrana obedece al fenómeno de difusión simple. Al

respecto, el trabajo de Wayman y Matey, (1999) reportó modelos que relacionan la concentración de glucosa con el respectivo consumo específico. Los resultados muestran una mejor correlación con el modelo de transporte de difusión simple. Derivado de estas observaciones, se concluye en el trabajo que el mecanismo primario de transporte de glucosa es regido por difusión simple (la difusión es proporcional al gradiente de concentración) ya que éste, es un fenómeno físico que no se puede detener. Sobre esta línea se dirigen otros trabajos (Charley, 1981; Krzystek, 1996; Kubicek y Rohr, 1997) en los que se muestran relaciones lineales entre la concentración inicial de glucosa y el consumo específico, sugiriendo que la pendiente es el coeficiente de difusión, por lo tanto el transporte de glucosa es controlado por un fenómeno de difusión simple. Puesto que el coeficiente de difusión se mantiene constante, estas mismas conclusiones se han obtenido en matraces y tanques agitados (Papagianni y Matthey, 2004). Todos los resultados anteriores han sido obtenidos en medios líquidos y en algunos casos probaron concentraciones de glucosa de hasta 150 g/L (Kubicek y Rohr, 1997); sin embargo, no existen trabajos que sugieran los mecanismos que rigen el transporte de glucosa en cultivo superficial lo cual es parte de los objetivos de este trabajo,

2.2.2. Difusión facilitada

Estudios relacionados con la glucólisis y el flujo de carbono en esta ruta, muestran que la presencia de un exceso de fuentes de carbono fáciles de metabolizar (por ejemplo glucosa), tienen como efecto un fuerte incremento en la concentración intracelular de fructosa 2,6 difosfato, un fuerte activador de la glucólisis (Kubicek, 1990). Esto sugiere que la célula se adapta para metabolizar tanta glucosa como la que entra a la célula. Lo anterior se ha confirmado en los procesos de producción de ácido cítrico, en donde se comprueba que la producción de este intermediario está relacionado con la concentración inicial de glucosa (Torres, 1994). Esto abre la posibilidad de que el paso limitante para el metabolismo sea el transporte a nivel de membrana. En este sentido el trabajo de Mischak y

col.,(1984) sugieren que existen proteínas embebidas en la membrana, que son las responsables del transporte de glucosa. Posteriormente, en el documento de Torres y col. (1996) presentan resultados que sugieren la presencia de dos tipos de transportadores para la glucosa, uno de alta afinidad ($K_m= 160 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}}=0.052 \mu\text{mols}^{-1}\text{g}^{-1}$) y otro de baja afinidad ($K_m=3700 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}}=0.75 \mu\text{mols}^{-1}\text{g}^{-1}$), además, cuando *Aspergillus niger* únicamente cuenta con el transportador de alta afinidad, cuando crece en un medio con concentraciones por debajo de 10 g/L , y que el transportador de baja afinidad se expresa cuando crece en concentraciones por arriba de 150 g/L. En cuanto a los parámetros cinéticos, reportados por Torres y col. (1996) se debe considerar, que las células provenían de un medio con pH 2, ya que en el trabajo de Vankuyk y col. (2004) se muestra que un transportador de alta afinidad, clonado en *Saccharomyces cerevisiae* de la genoteca de *Aspergillus niger* presentó vulnerabilidad en su capacidad como transportador cuando el medio de cultivo tenía diferentes valores de pH. Lo anterior da indicios de la presencia de un sistema simporte glucosa/ H^+ . En este mismo trabajo se dan evidencias suficientes, para suponer que en ausencia de este transportador, trabajan otros transportadores o mecanismos de transporte alternos, que pueden compensar la ausencia de este transportador. Así mismo el documento de Jorgensen y col. (2007) sugiere que cuando se interrumpe la transcripción del transportador de alta afinidad, se induce la expresión de un transportador de baja afinidad, esto podría explicar los resultados publicados por Vankuyk y col.(2004), en donde se observa que aun cuando no está presente al transportador de alta afinidad en *Aspergillus niger*, éste puede transportar la glucosa, manosa fructosa o xilosa , probablemente, por la expresión de los acarreadores de baja afinidad. Un caso contrario a este fenómeno fue publicado por Forment y col. (2006), cuyos resultados muestran que al interrumpir la expresión de un acarreador de baja afinidad, se expresan los acarreadores de alta afinidad, compensando de esta manera el transporte.

2.3. Cultivo en medio sólido y transporte

La comparación de los niveles de represión catabólica que se han observado entre cultivos en medio sólido y cultivos en medio líquido (Ramesh y Lonsane,1991; Maldonado y Saad,1998) sugieren que en medio sólido la represión catabólica es menor. En este sentido, en el trabajo de Maldonado y Saad (1998) se observa una disminución del 90 % en la actividad de pectinesterasa , cuando se adiciona al medio una concentración de 20 g/L de glucosa, con respecto al cultivo con pectina como fuente de carbono. Contrariamente a esto, en medio sólido se observa una actividad de 600 UE para una concentración de 20 g/L de glucosa. Otra evidencia que sugiere el mismo fenómeno fue reportado por Téllez y col., (2006),quienes observaron incrementos en la síntesis heteróloga de una lacasa, con respecto a la concentración de glucosa (10 -100 g/L), mientras que en medio líquido se inhibe su expresión cuando se incrementa la concentración de 10 a 50 g/L de glucosa.

Aun cuando existen evidencias de que los niveles de represión catabólica en cultivos líquidos son mayores con respecto a los cultivos sólidos, no existe una explicación contundente para este fenómeno. Hay indicios que apuntan hacia la idea de que cambios estructurales y/o químicos a nivel de membrana que pueden explicar este fenómeno, En el trabajo de Maldonado y Saad (1998) se muestra que las membranas de las células crecidas en medio sólido tienen aproximadamente el doble de algunos ácidos grasos (palmitico, esteárico y oleico), con respecto a las células crecidas en medio líquido, esta diferencia es trascendente si se considera que la permeabilidad de un soluto está en relación con la fluidez de la membrana y que esta depende de su composición química

Para explicar los bajos niveles de represión catabólica en medio sólido, Viniegra y Favela (2006) han formulado dos hipótesis alternativas o complementarias, en la primera sugieren que existen cambios en la permeabilidad de la membrana, los cuales regulan el flujo de glucosa a través de ésta; y en la segunda proponen la existencia de microgradientes de sustrato en el soporte, los

cuales impiden que la célula esté en contacto con la concentración global de glucosa, si no únicamente con una fracción de ésta, por lo que las señales bioquímicas propias de la represión catabólica, no se manifiestan.

2.4. Morfometría de *Aspergillus niger*

Las hifas son las unidades de crecimiento y transporte de nutrientes en los mohos, estas estructuras son de geometría cilíndrica cuya longitud y diámetro son dependientes de la especie y del medio de cultivo (Larralde y col., 1994), presentan un crecimiento axial y tienen ramificaciones (Peberdy, 1980), Una hifa tiene claramente diferenciadas 3 secciones, con base en el tipo de organelos en el citoplasma (apical, subapical y distal) de acuerdo con la figura 10.

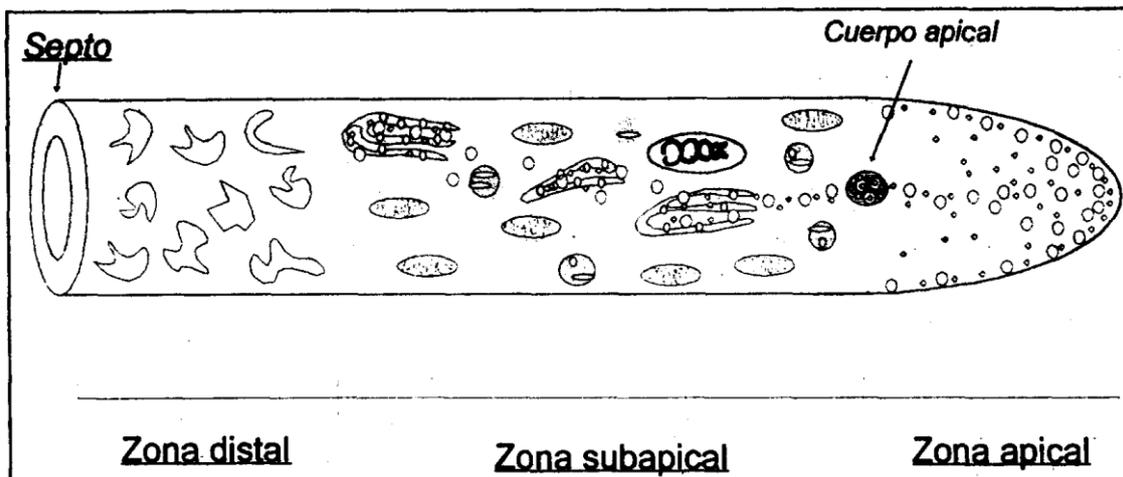


Figura 10. Secciones de una hifa, en base al tipo de organelos presentes (Larralde- Corona, 1996)

En la región apical se lleva a cabo el crecimiento de la hifa (Wonsten, 1991), El mecanismo propuesto para el crecimiento celular, de acuerdo con la teoría vesicular (Barnicki y Garcia, 1973) es el siguiente: En la zona subapical, se sintetizan y almacenan en pequeñas vesículas la quitina y las enzimas líticas, éstas son transportadas a la zona apical, en donde primero liberan las enzimas líticas, quienes despolimerizan a la quitina, permitiendo entonces que el citoplasma se expanda, posteriormente se libera la quitina y las enzimas que la

polimerizan, para restaurar la pared celular, y con esto se finaliza, el proceso de crecimiento. Existen evidencias que apoyan esta teoría; Jaklitsch, (1991) mostró que la excreción de enzimas se lleva a cabo precisamente por la punta de la hifa, esto sugiere que la pared celular en esta zona es más laxa, esto también explica el hecho de que el paso de moléculas de gran tamaño pasan a través de esta zona (Peberdy, 1994).

De acuerdo con Farkas (1990) la pared que recién se forma cuando la hifa está creciendo, es blanda, y a medida que pasa a ser parte de las paredes laterales se vuelve rígida, este fenómeno podría determinar el diámetro de la hifa, es decir, el diámetro de la hifa dependerá de qué tan rápido se vuelva rígida la pared, entre más lento sea el proceso, mayor será el diámetro, ya que una pared laxa, permite que el citoplasma se expanda.

Algunos trabajos han mostrado que existe un efecto inverso en el diámetro de las hifas, con respecto a la concentración de glucosa (Larralde y col, 1997; Wiebe y col., 1992; Mitchell y col., 1991;), esto se ha comprobado en un amplio rango de concentraciones de glucosa (10-300 g/L). Lo anterior da suficientes evidencias de que existen adaptaciones morfométricas de los hongos, cuando crecen en diferentes concentraciones de nutrientes, en el presente trabajo se midió el efecto de estos cambios en el flux de glucosa, los cuales no han sido cuantificados. Métodos con analizador de imágenes se han desarrollado, para realizar mediciones de los cambios morfométricos en hongos filamentosos (Larralde y col., 1997; Loera y Viniegra, 1998).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Objetivo general

Determinar el flux de glucosa en cultivo superficial, a partir de parámetros macroscópicos y microscópicos.

Objetivos particulares

Proponer una ecuación para estimar el flux de glucosa en *Aspergillus niger*, a través de parámetros filológicos y morfométricos del cultivo.

Evaluar el flux de glucosa a nivel de membrana, en cultivos superficiales de *Aspergillus niger* con diferentes concentraciones de glucosa inicial.

Estimar la permeabilidad de la glucosa a nivel de membrana en cultivos superficiales de *Aspergillus niger* con diferentes concentraciones de glucosa inicial.

Hipótesis

Es posible determinar, el flux de glucosa en cultivo superficial, a partir de parámetros microscópicos y macroscópicos.

Cuando *Aspergillus niger* crece en cultivos con altas concentraciones de glucosa, expresa cambios morfométricos, que disminuyen el flux de glucosa.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

Se buscó que las técnicas fueran de uso común en biotecnología, por lo que se optó por crecer el hongo directamente sobre el agar y después fundir el medio para separar la biomasa por filtración, ya que la biomasa formó una biopelícula que después de fundir el agar permaneció íntegra. Para el análisis de las imágenes fue importante establecer el tiempo preciso para digitalizar la imagen, ya que la claridad de esta dependía de que no hubiera esporulado el hongo, además se encontró que era más práctico tomar la imagen directamente al hongo sobre la placa de agar.

4.1. Microorganismo

En este trabajo se utilizó la cepa C28eco3-13 reportada por Téllez y col. (2006)

4.2. Conservación de la cepa

La cepa fue conservada en sílica gel (Perkins, 1977;Loera y col.,1999) para lo cual se propagó la cepa por 4 días en medio Kafert (1977), para preparar una suspensión de esporas en una solución de Tween 80 (al 0.05%) en leche descremada al 3 %, esta solución se esterilizó por 20 min a 10 psi para impedir la caramelización de los carbohidratos y que las proteínas no se desnaturalizaran. Previamente, se esterilizaron viales de vidrio de 3 cm con sílica gel (Mesh 60-200) hasta la mitad de su volumen, estos se secaron en una estufa a 60°C por 24 h, posteriormente, fueron llevados a un desecador hasta alcanzar la temperatura del ambiente (aproximadamente 1 h). En condiciones estériles se adicionó 20 µL de suspensión de esporas a cada vial, se preparó un control negativo con 20 µL de

la solución sin esporas y se trató como los demás. Los viales inoculados y etiquetados se regresaron al desecador por 12 h, después se sellaron con una capa de parafilm en la tapa y se guardaron en un desecador a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó una prueba de viabilidad incluyendo el control negativo.

4.3. Unidades experimentales

Las unidades experimentales fueron cajas de Petri de 9 cm de diámetro (de plástico) con 30 mL de medio, con lo que se obtenía una profundidad de 0.5 cm aproximadamente, inoculadas con 10^5 esporas/mL de medio, esparcidas en forma de “césped” con una varilla de vidrio en forma de “L” previamente esterilizada. Para realizar cada cinética se prepararon 33 cajas de Petri (1 L de medio), cada punto de la cinética se realizó por triplicado.

4.4. Composición del medio de cultivo

Para los estudios de crecimiento se utilizó el medio propuesto por Kafert (1977), La única fuente de carbono en el medio fue glucosa de 12.5 a 100 g/L, la proporción de los demás componentes del medio, se adicionaron de manera proporcional a la concentración del medio, de tal manera que la proporción C/N se mantuvo constante (16 gC/gN), el pH inicial del medio fue de 6.5, se utilizó agar al 1.5 % como agente gelificante.

La composición química del medio para una concentración de 100 g/L de glucosa fue la siguiente:

Sales (g/L): NaNO_3 (15), KCl (5.2), KH_2PO_4 (8.1), K_2HPO_4 (10.4), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (5.2).

Elementos traza (g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.052), EDTA (0.5), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22), H_3BO_3 (0.11), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.05), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.016), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.016), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.11)

4.5. Origen del inóculo

La cepa fue propagada en el medio Kafert (1977) en caja Petri, a partir de los viales en los que se conservó, debido a que se trataba de una cepa transformante fue necesario corroborar que su fenotipo no cambiará, por lo que previo a su uso se corroboró su velocidad de crecimiento radial (0.4 cm/día). Posteriormente, se extrajeron en condiciones estériles 4 circunferencias de agar con micelio de las cajas Petri, para llevarlas a un matraz de 250 mL con 50 mL de Tween 80 (0.05%) , donde se agitaron vigorosamente con un agitador magnético, después se procedió a determinar la concentración de esporas en una cámara de Neubauer; finalmente, se calculó el volumen necesario para tener una concentración 10^5 esporas/ mL de medio (alrededor de 200 μ L)

4.6. Determinación de la Biomasa

Para la determinación de biomasa se vertió el agar de una caja Petri con el micelio en un vaso de precipitados de 1 L con 200 mL de agua acidificada con HCl (pH 3). El agua acidificada se utilizó para impedir que gelificara el agar, sin embargo análisis finales mostraron que el pH únicamente cambiaba de 6.5 a 6, debido al sistema amortiguador del medio. Posteriormente, se metió el vaso de precipitados con el agar en un horno de microondas (Panasonic NV-950B) en el nivel 9 de intensidad por 2 minutos, esto permitió fundir el agar y separar la biopelícula formada sobre el agar, después se filtró a través de un papel Whatman # 1 a peso constante. El filtrado se recuperó en tubos Falcon. Posteriormente, se lavó la biomasa y el papel con abundante agua caliente, ya que en algunos casos se formaban pequeños grumos de agar, después se metió el papel en un horno a 60 °C hasta peso constante (aproximadamente 24 h). Finalmente, se pasó a un desecador por 24 h y se calculó la biomasa seca por diferencia de peso. Los resultados se expresaron en g de biomasa/L de medio.

Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se ajustaron con la ecuación logística (Okasaki, 1980).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)$$

Donde: μ_{\max} es la tasa específica de crecimiento máxima (h^{-1}), X es la biomasa en un tiempo (t) y X_{\max} es la biomasa máxima que alcanza el cultivo, cuando $dx/dt=0$

La solución de la ecuación logística para $X>0$ es la siguiente:

$$X = \frac{X_{\max}}{(1 + Ce^{-\mu t})}$$

Donde: $C = \frac{(X_{\max} - X_0)}{X_0}$

Para estimar μ_{\max} se utilizó el programa llamado “solver” presente en la hoja de cálculo de excell (MICROSOFT), a través de un procedimiento de minimización de las sumas de los errores.

4.7. Cuantificación de la glucosa residual

El azúcar residual se midió por la oxidación de azúcares reductores por el ácido 3,5-dinitrosalicílico (Miller, 1959), para lo cual se realizó una curva patrón de 0 a 500 mg/L de glucosa. Las determinaciones se realizaron por triplicado de la siguiente manera: en tubos de ensayo (10x100 mm) se pusieron 2 mL de la muestra (el filtrado recuperado de la determinación de biomasa) y 3 mL del reactivo de DNS, esta mezcla se puso a baño maría por 15 minutos, después se enfriaron los tubos con agua a temperatura ambiente y se procedió a leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 640 nm.

Las absorbancias obtenidas fueron transformadas a unidades de concentración (g/L de glucosa), los promedios obtenidos, se ajustaron por la ecuación propuesta por Pirt (1967) que se muestra en seguida.

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} + mx$$

Donde: S es la concentración de sustrato (g/L), $Y_{x/s}$ es el rendimiento (g_x/g_s) y m es el coeficiente de mantenimiento (g_s/g_x h), la solución de la ecuación anterior en función de X es la siguiente:

$$S(t) = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{x/s}} - \frac{mX_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left[\frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right]$$

Donde: S_0 es la condición inicial para la concentración de sustrato en el medio y X_{\max} es la biomasa máxima que alcanza el cultivo. A través de un procedimiento de minimización de errores con el programa “solver” (MICROSOFT) se estimó el $Y_{x/s}$.

4.8. Medición del diámetro de las hifas

El análisis de imágenes digitalizadas permitió estimar el diámetro de las hifas, a continuación se explica la metodología utilizada en este trabajo: Se inoculó con 5 µL de suspensión de esporas (la utilizada en las cinéticas de producción de biomasa) en el centro de la caja de Petri en condiciones estériles, la caja Petri contenía 30 mL del medio propuesto por Kafert (1977), se eligió esta manera de inocular debido a que se podían observar las hifas distales de forma individual, por lo tanto la medición se facilitaba, la siembra en forma de “césped” dificultaba la observación de las hifas individuales, además era muy complicado identificar las puntas.

La captura de las imágenes se realizó directamente sobre la superficie de agar después de 32 h de haber inoculado (antes de la esporulación), ya la esporulación impedía observar con claridad las hifas. Se utilizó el objetivo 40 X para enfocar la hifa (cerca de la punta), se digitalizaron 15 imágenes de diferentes hifas distales que se encontraban en la periferia de la colonia, estas imágenes fueron

analizadas con el programa IMAG J, en donde a través del “mouse” se seleccionó la distancia a medir (diámetro de la hifa) y a partir de una calibración previa el programa proporcionó la equivalencia de la distancia seleccionada en píxeles. La calibración se realizó con una cámara de Neubauer (191 píxeles= 200 μm)

CAPÍTULO 5

DESARROLLO TEÓRICO

La parte central de este trabajo fue establecer una metodología que permitiera estimar el flux de glucosa en cultivos superficiales, a través de relaciones que considerarán los cambios morfométricos y las variables de respuesta fisiológicas de los cultivos.

Para ello se planteó la posibilidad de estimar el área disponible de transferencia de nutrientes, a partir de medidas microscópicas de los diámetros de las hifas, considerando que las hifas tienen una geometría cilíndrica, sin embargo esta área debería estar relacionada con un parámetro macroscópico para ello se estableció la relación área/volumen de la hifa, para que la expresión final estuviera en términos de la densidad de la biomasa, derivado de lo anterior se obtuvo la siguiente ecuación.

$$A_x = \frac{4}{d_H \rho (1 - X_{H_2O})}$$

Donde: A_x es el área por gramo de micelio seco, d_H es el diámetro promedio de las hifas y ρ es la densidad del micelio húmedo. El flux de un soluto se puede estimar con la siguiente ecuación.

$$J = \frac{q_s}{\mu_{\max}}$$

Donde: q_s es el consumo específico de glucosa y μ_{\max} es la tasa específica de crecimiento, con base en las dos ecuaciones anteriores y junto con la ecuación logística, la propuesta por Pirt y la primera ley de Fick se obtuvo una ecuación que permitió relacionar el flux de glucosa a través de la membrana a partir de

parámetros fisiológicos y microscópicos, la ecuación que se obtuvo fue la siguiente:

$$J_A = \frac{d_H \rho \mu_{\max} (1 - X_{H_2O})}{4Y_{x/s}}$$

La ecuación anterior relaciona parámetros microscópicos con variables fisiológicas propias del cultivo que además se pueden estimar con técnicas comunes en biotecnología.

5.1. Estimación del flux de glucosa a partir de un modelo fisiológico

En este capítulo se presentan las ecuaciones que se utilizaron para estimar el flux de glucosa, así como también las consideraciones bajo las cuales se realizaron los cálculos.

Las ecuaciones que se abordan en este documento se sustentan en el hecho de que el transporte de nutrientes se da a través de las hifas, y que es posible determinar el flux de glucosa, considerando que el área disponible para la transferencia de solutos, puede ser modelada por un cilindro, como se muestra en la figura 11.

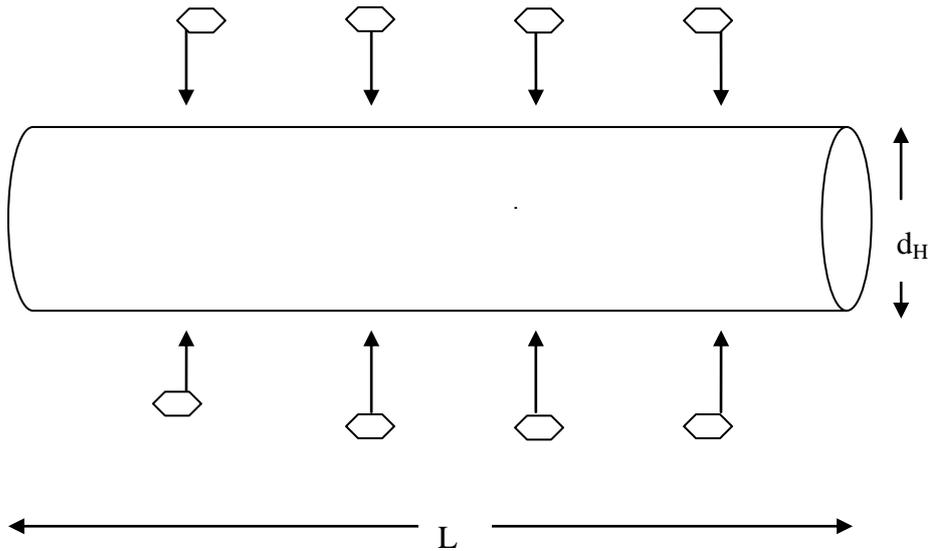


Figura 11. Simulación de la geometría de una hifa, con un diámetro (d_H) y una longitud (L). Las flechas indican que el transporte de glucosa se lleva a cabo por las paredes laterales.

De acuerdo con la consideración anterior, el área de transferencia de nutrientes, estaría dada, por el área del cilindro de la figura 11.

$$A = \pi d_H L \dots\dots\dots(1)$$

Donde: d_H y L es el diámetro promedio de las hifas y la longitud promedio de las hifas respectivamente, el volumen de la hifa sería aproximadamente el volumen del mismo cilindro.

$$V = \frac{\pi d_H^2}{4} L \dots\dots\dots(2)$$

Con el objetivo de cuantificar el área en términos de la densidad del micelio, se dividió el área entre el volumen.

$$\frac{A}{V} = \frac{4}{d_H} \dots\dots\dots(3)$$

Por otro lado: $V = m / \rho$, donde m es la masa del micelio húmedo y ρ es la densidad del micelio húmedo.

$$\frac{A}{m} = \frac{4}{d_H \rho} \dots\dots\dots(4)$$

Debido a que experimentalmente se mide la biomasa seca, entonces se resta la fracción de agua en el micelio (X_{H_2O}).

$$A_x = \frac{4}{d_H \rho (1 - X_{H_2O})} \dots\dots\dots (5)$$

Donde: A_x es el área por unidad de masa seca. Con la ecuación 5, es posible estimar el área específica de un cultivo, a partir de un parámetro microscópico (d_H) y un macroscópico (ρ).

El flux de sustrato se puede obtener a partir de la siguiente ecuación:

$$J_s = \frac{q_s}{A_x} \dots\dots\dots(6)$$

Donde: J_s es el flux de sustrato, q_s es el consumo específico de sustrato, el q_s se puede obtener de parámetros fisiológicos con la siguiente ecuación.

$$q_s = \frac{\mu_{max}}{Y_{x/s}} \dots\dots\dots(7)$$

Donde: μ_{max} es la tasa específica de crecimiento máximo y $Y_{x/s}$ es el rendimiento biomasa/sustrato, μ_{max} se puede estimar a partir de la ecuación logística (ecuación 8) (Okasaki, 1980) a partir de un proceso de minimización de errores.

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \dots\dots\dots(8)$$

El $Y_{x/s}$ se puede obtener a partir de la ecuación (9) propuesta por Pirt (1967) a través de un proceso de minimización de errores.

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} + mx \dots\dots\dots(9)$$

De la sustitución de la ecuación 5 y 7 en la ecuación 6 se obtiene la siguiente ecuación, con la cual se puede estimar el flux de glucosa a partir de parámetros microscópicos y fisiológicos.

$$J_s = \frac{d_H \rho \mu_{\max} (1 - X_{H_2O})}{4Y_{x/s}} \dots\dots\dots(10)$$

5.2. Modelo de difusión simple

El transporte de una sustancia a través de un medio, es consecuencia de un gradiente electroquímico. Esta relación esta expresada por la ecuación de Nernst-Planck.

$$J_s = -[S]U_s (d\bar{G}_s/dx) \dots\dots\dots(11)$$

Donde J_s es el flux de S, x es el espesor de la barrera que atraviesa el soluto, $d\bar{G}_s/dx$ es el gradiente electroquímico de S, y U_s es la movilidad (velocidad por unidad de fuerza) en el medio.

La energía libre varia con la concentración de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\Delta \bar{G}_S = RT \ln[S] \dots\dots\dots(12)$$

Cuando el soluto es una molécula sin carga eléctrica (glucosa, en este caso), $\Delta \bar{G}_S$ esta dado por la ecuación 12 que al sustituir en la ecuación 11, la ecuación de Nernst-Planck, se reduce a la siguiente ecuación..

$$J_S = -D_S (d[S]/dx) \dots\dots\dots(13)$$

La ecuación anterior, corresponde a la primera ley de Fick, Donde $D_S = RTU_S$ es el coeficiente de difusión de S en el medio de interés, que difunde para eliminar el gradiente de concentración $d[S]/dx$.

Para una membrana de espesor x , la ecuación (13) se reduce aproximadamente a:

$$J_S = \frac{D_S}{x} ([S]_{fuera} - [S]_{dentro}) = P_S ([S]_{fuera} - [S]_{dentro}) \dots\dots\dots(14)$$

Donde D_S es el coeficiente de difusión de glucosa en la membrana y $P_S = D_S/x$, es el coeficiente de permeabilidad de glucosa en la membrana. Al igualar la ecuación 14 con la ecuación 10 se obtiene la siguiente ecuación, con la cual es posible estimar el coeficiente de permeabilidad.

$$P_S = - \frac{d_H \rho \mu_{\max} (1 - X_{H_2O})}{4Y_{x/s} ([S]_{fuera} - [S]_{dentro})} \dots\dots\dots(15)$$

Si se considera que la glucosa es fosforilada lo suficientemente rápido para que no se acumule dentro de la célula, entonces $[S]_{dentro}$ es aproximadamente cero

5.3. Modelo de difusión facilitada

Se construyó un modelo de difusión facilitada, asumiendo que los transportadores se comportan como una enzima que sigue el comportamiento de una cinética de saturación, por lo tanto se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten,

$$J_s = \frac{J_{\max} [S]}{K_m + [S]} \dots\dots\dots(16)$$

Donde: S es la concentración de glucosa en el medio, Km es la constante de afinidad del transportador por el sustrato. Para la estimación de los flux se utilizaron los siguientes parámetros cinéticos encontrados por Torres y col.(1996).

Parámetros del transportador de baja afinidad.

$$V_{\max}=9.36 \times 10^{-6} \text{ g s}^{-1}\text{g DW}^{-1}$$

$$K_m= 6.7 \times 10^{-4} \text{ g/L}$$

Parámetros del transportador de alta afinidad.

$$V_{\max}=1.35 \times 10^{-4} \text{ g s}^{-1}\text{g DW}^{-1}$$

$$K_m=4.7 \times 10^{-5} \text{ g/L}$$

De esta manera se pudieron construir dos perfiles de flux de glucosa, uno cuando opera el transportador de baja afinidad y otro cuando opera el transportador de alta afinidad. La ecuación 16 considera el diámetro promedio de las hifas correspondiente a cada concentración ya que el flux máximo se estimó con la siguiente ecuación.

$$J_{\max} = \frac{V_{\max}}{A_x} \dots\dots\dots(17)$$

Donde: A_x es el área específica obtenida a partir de la ecuación 5, la cual es dependiente del diámetro de las hifas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la ecuación 10 y las consideraciones que ésta implica (capítulo 5), es posible estimar el flux de glucosa, a partir de variables que describen el comportamiento macroscópico (X_{max} , μ_{max} y $Y_{x/s}$) y microscópico (d_H) del cultivo. Para estimar las primeras, se siguió la cinética de producción de biomasa y consumo de glucosa en el tiempo (en cajas con inoculación tipo césped) y para la segunda, se midió el diámetro de las hifas a un tiempo fijo (32 horas).

En este capítulo se presentan las curvas de producción de biomasa correspondientes a cada concentración de glucosa, ajustadas con la ecuación logística, de las cuales se obtuvieron las variables de respuesta X_{max} y μ_{max} , después, se muestran los valores de los $Y_{x/s}$ obtenidos a partir de los ajustes realizados con la ecuación propuesta por Pirt (1967). Posteriormente, se muestran los resultados obtenidos de las mediciones de los diámetros de las hifas para cada concentración y finalmente, los resultados de los flux obtenidos para cada concentración de glucosa.

6.1. Estimación de la velocidad máxima de crecimiento específico (μ_{max}) y biomasa máxima (X_{max})

En la figura 12 se muestran las curvas de producción de biomasa, ajustadas con la ecuación logística (ecuación 8), de donde se obtuvieron los valores de μ_{max} y X_{max} . La producción de biomasa inició para todos los cultivos alrededor de las 20 h después de inocular, la concentración máxima de biomasa se alcanzó a las 74, 64, 82 y 92 h para las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 g/L respectivamente. De acuerdo con esto, es evidente que existió una tendencia a

prolongarse la fase de crecimiento con respecto a la concentración glucosa, para concentraciones superiores a 25 g/L, estos resultados concuerdan con los observados por Favela y col.(1998), donde utilizaron el mismo tipo de cultivo (superficial) y la cepa silvestre (C28B25) como inóculo.

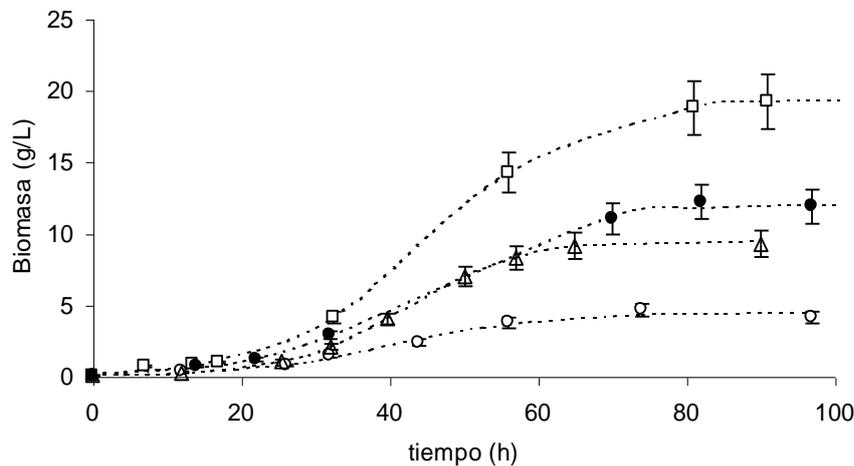


Figura 12. Curvas de producción de biomasa, a diferentes concentraciones de glucosa ajustadas con la ecuación logística, las líneas interrumpidas corresponden al modelo y los puntos a los datos experimentales: - O --12.5 ($R^2=0.98$); -- Δ --25 ($R^2=0.99$); - \bullet - 50 ($R^2=0.99$); - \square -- 100 ($R^2=0.99$) g/L

Por otro lado los valores de μ_{max} , que se muestran en la tabla 2, no presentan alguna tendencia, que pudiera sugerir alguna relación entre esta variable y la concentración de glucosa. Al respecto Favela y col.(1998), estimaron los valores de μ para *Aspergillus niger* en cultivo superficial, a diferentes concentraciones de glucosa, y encontraron que μ no se correlaciona con la concentración de glucosa (tabla 2), los resultados anteriores apuntan hacia la idea de que bajo las condiciones de estudio el valor de μ es independiente de la concentración de glucosa. La dependencia de μ con la concentración de sustrato es descrita por la ecuación de Monod, al respecto la constante de saturación (K_s) para el género *Aspergillus* cuando utiliza como sustrato a la glucosa es de 0.005 g/L (Pirt, 1975), lo cual explica la independencia de μ a la concentración de glucosa en el medio.

Tabla 2. Valores de μ_{max} en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*, a diferentes concentraciones de glucosa.

Este trabajo		Favela y col, (1998)	
Glucosa (g/L)	μ_{max} (h^{-1})	Glucosa (g/L)	μ_{max} (h^{-1})
12.5	0.109±0.023 ^a	30	0.247
25	0.123±0.021 ^a	50	0.222
50	0.103±0.020 ^a	100	0.232
100	0.099±0.009 ^a		

Los datos con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente ($P < 0.05$, prueba de Tukey)

6.2. Rendimiento biomasa/sustrato $Y_{x/s}$

La obtención de $Y_{x/s}$, fue resultado de las cinéticas de consumo de glucosa, ajustadas con la ecuación propuesta por Pirt (ecuación 2), los datos de la tabla 3 muestran una disminución en el rendimiento $Y_{x/s}$, con respecto al incremento en la concentración de glucosa, una tendencia similar fue reportada por Favela y col. (1998) (tabla 3), los resultados anteriores podrían sugerir que los cultivos con altas concentraciones de glucosa (100 g/L), presentaron una disminución en la síntesis de biomasa, hasta de 2.5 veces con respecto a los cultivos con bajas concentraciones de glucosa (12.5 g/L), sin embargo este efecto no se debe a la concentración de glucosa en el medio, si no a la formación de gradientes de oxígeno por el incremento en la biomasa por unidad de superficie (tabla 3). Oostra y col. (2001) mostraron que la concentración de oxígeno en el micelio es dependiente de la profundidad y que hay zonas donde es cero, esto indica que existen zonas del micelio en donde el carbono es metabolizado por vía anaerobia.

En la tabla 3 se observa que en la proporción con que disminuye el $Y_{x/s}$ aumenta el q_s sin embargo, el incremento en el q_s es una consecuencia de la concentración de glucosa en el medio, así lo sugieren algunos trabajos (Kubicek-Rohr, 1977; Charley, 1981; Krzystek y col., 1996).

Las curvas de glucosa residual (figura 13) indican que prácticamente toda la glucosa fue consumida (> 95%) en todas las concentraciones de glucosa probadas, este resultado indica que no hubo nutrientes que limitarán el consumo de glucosa, ya que la proporción de todos los componentes del medio se mantuvo constante con respecto a la concentración de glucosa.

Tabla 3. Datos de $Y_{x/s}$, calculados a partir de la ecuación propuesta por Pirt (ecuación 2), y consumo específico de glucosa (q_s), obtenido, como el cociente $\mu_{max}/Y_{x/s}$.

Este trabajo				Favela y col. (1998)	
Glucosa (g/L)	X_{max} (mg/cm ²)	$Y_{x/s}$ (g _x /g _s)	q_s (g _s /g _x h)	Glucosa (g/L)	$Y_{x/s}$ (g _x /g _s)
12.5	1.9±0.14	0.419	0.246	30	0.466
25	4.0±0.39	0.430	0.285	50	0.366
50	5.1±0.31	0.250	0.382	100	0.272
100	8.2±0.56	0.173	0.571		

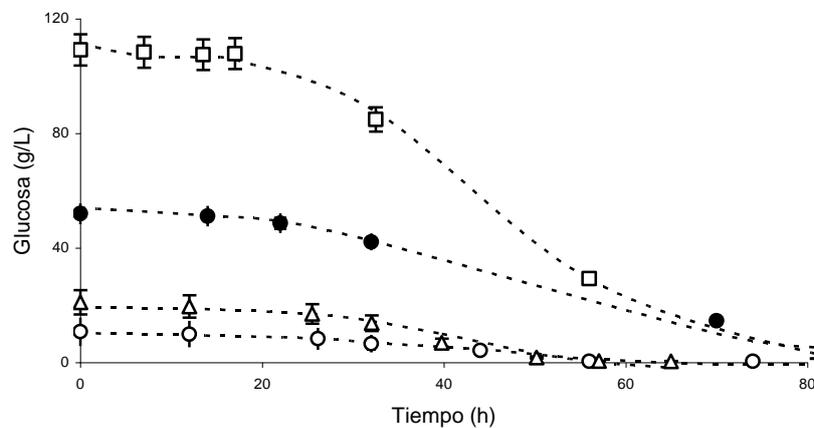


Figura 13. Cinéticas de concentración de glucosa, las líneas discontinuas corresponden al modelo (Pirt, 1967) y los puntos a los datos experimentales (- O --12.5 (R²= 0.99); -- Δ--25 (R²=0.98); - ●- 50 (R²=0.99); - □ - 100 (R²=0.97) g/L)

6.3. Diámetro promedio de las hifas (d_H)

Los diámetros de las hifas se obtuvieron de 15 mediciones de la periferia de la colonia. Se observó una disminución en el diámetro de las hifas con respecto al incremento en la concentración de glucosa (figura 14), para todas las concentraciones de glucosa. El efecto global (cuando se cambió la concentración de 12.5 a 100 g/L de glucosa) fue una disminución del 65 % en el diámetro y un incremento del 55 % en el área específica (tabla 4), este fenómeno ha sido observado en el mismo tipo de cultivo por Larralde y col. (1997), quienes observaron una clara disminución del diámetro de las hifas con respecto al incremento en la concentración de glucosa inicial (tabla 4), la cual representó una disminución del 48 % en el diámetro y un incremento del 80 % en el área disponible para la transferencia de nutrientes. Este fenómeno también ha sido observado previamente por Mitchell (1991) y Wiebe (1992), en rangos de concentración similares a los probados en este trabajo (menores a 100 g/L de glucosa). La causa de estos cambios morfométricos aún no es clara, pero de acuerdo con las observaciones de Farkas (1990), basadas en la teoría vesicular (Barnicki, 1973), la pared que recién se forma durante el proceso de crecimiento hifal es blanda, y a medida que pasa a ser parte de las paredes laterales se vuelve rígida. Esto indica que la pared celular es vulnerable a la presión osmótica que ejerce el medio de cultivo, por lo tanto el diámetro de las hifas (d_H) estaría determinado por la presión osmótica que ejerza el medio, es decir que cuando la hifa se encuentra en un medio con una presión osmótica mayor a la interna, la hifa disminuye su diámetro, debido a la presión que ejerce el medio sobre ésta, esto podría explicar la disminución del d_H con respecto al incremento en la composición química del medio (la presión osmótica es proporcional a la concentración de solutos).

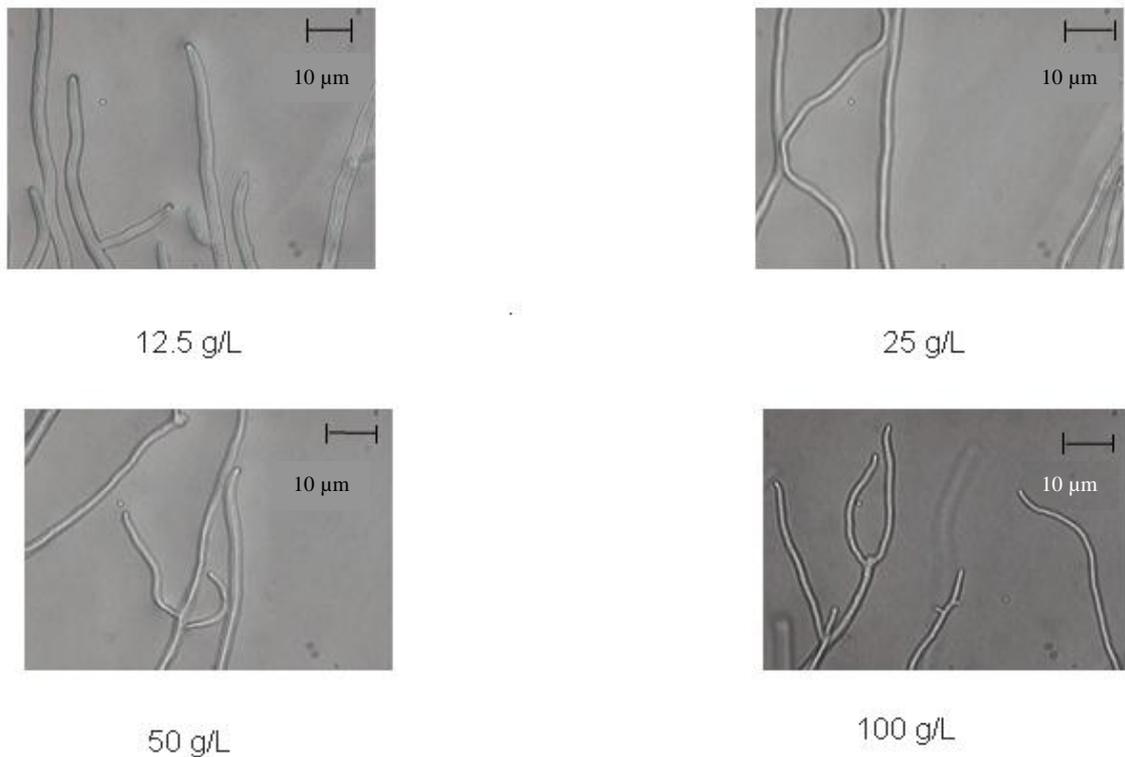


Figura 14. Cambios en el diámetro de las hifas con respecto a la concentración de glucosa.

Asociado a la disminución en el diámetro de las hifas, se derivan dos consecuencias. La primera, es una disminución de la presión generada por los solutos disueltos, al respecto Larralde y col. (1997), mencionan que los cambios morfométricos observados se deben a una adaptación a un medio de alta presión osmótica, aunque no lo menciona, pero podría estar implícito, es que derivado de la expresión $P = F/A$, la presión es inversamente proporcional al área, luego entonces un incremento en el área de transferencia, permite disminuir la presión que ejercen los solutos sobre las hifas. La otra consecuencia es la disminución del flux, debido al mismo fenómeno (incremento en el área específica), Este efecto no se ha considerado, por quienes han estimado el flux en cultivos con diferentes concentraciones de glucosa, por ejemplo en el trabajo de Papagianni y Matthey (2004), se muestra un modelo similar para estimar el flux de glucosa, sin embargo consideran que el área de transferencia es constante, aceptando que el diámetro de las hifas es constante en todas las concentraciones

de glucosa. De acuerdo a la tabla 4 se puede concluir que el área no es constante, y que puede tener un efecto importante de acuerdo a estos resultados, (el área se incrementó hasta un 55%) en los cálculos del flux.

Tabla 4. Diámetros promedio de las hifas, correspondientes a diferentes concentraciones de glucosa. A_x se calculó a partir de la ecuación 5.

Este trabajo			Larralde y col. (1997)	
Glucosa (g/L)	d_H (μm)	A_x (m^2/g)	Glucosa (g/L)	d_H (μm)
12.5	4.340 ± 0.18^a	4.3	10	6.32 ± 0.69
25	3.753 ± 0.27^b	5.0	40	5.44 ± 0.90
50	3.530 ± 0.35^b	5.3	70	4.95 ± 0.64
100	2.830 ± 0.37^c	6.6	120	4.85 ± 0.84
			300	3.37 ± 0.36

Los datos con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente ($P < 0.05$, prueba de Tukey)

6.4. Estimación del flux de glucosa

Para cada concentración de glucosa se estimó el flux de acuerdo a la ecuación 10. En la figura 15 se muestra una comparación entre los flux calculados con la ecuación 10 y los calculados con la misma ecuación pero asumiendo que el diámetro de las hifas se mantiene constante, esto se realizó para observar el efecto que tienen los cambios morfométricos en el flux de glucosa. El resultado de esta comparación indica que el efecto de la disminución en el diámetro de las hifas en el flux, aumenta conforme la concentración de glucosa en el medio aumenta (de 25 a 50 g/L y de 50 a 100 g/L). Por ejemplo cuando la concentración de glucosa fue de 25 g/L, el flux obtenido con $d_{H\text{exp}}$ fue 14 % menor con respecto al calculado con $d_{H\text{const}}$, este porcentaje aumentó a un 35 % cuando la concentración en el medio fue de 100 g/L. Esto sugiere que el flux de glucosa puede ser modificado por el decremento de d_H , y que éste depende de la

concentración de solutos en el medio, de acuerdo a los resultados de la sección anterior.

Otro aspecto a considerar es que la tendencia de los flux cuando se consideró d_H constante, es lineal ($r^2=0.999$), lo cual indica que el mecanismo de transporte obedece a un modelo de difusión simple, sin embargo los cambios de d_H , modifica este comportamiento, tal como se observa en la figura 15.

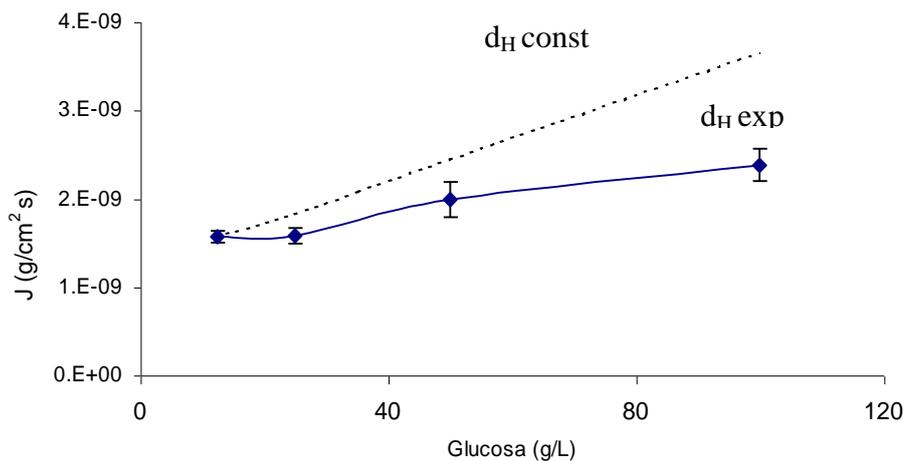


Figura 15. Comparación de los flux de glucosa, considerando que no existen cambios morfométricos (d_H const), con los flux de glucosa con d_H exp. En ambos casos el flux se estimó con la ecuación 10.

6.5. Comparación con el modelo de difusión simple

Se calcularon los flux de glucosa, considerando que el mecanismo de transporte de glucosa es descrito por el fenómeno de difusión simple, los datos se obtuvieron a partir de la ecuación 14, para estos cálculos se asumió que el coeficiente de permeabilidad (p), es de 1×10^{-7} cm/s (Burgstaller ,1997), y que este coeficiente se mantiene constante en todos los niveles de glucosa probados (12.5-100 g/L). En la figura 16 se muestra la comparación entre los flux estimados con el modelo fisiológico (ecuación 10) y los calculados a partir del modelo de difusión simple, la figura indica que los flux calculados con el modelo fisiológico se correlacionan con el modelo de difusión simple hasta

concentraciones de 25 g/L de glucosa, esto es congruente con lo reportado por Wayman y Matthey (1999), quienes describen del consumo de glucosa por *Aspergillus niger* con el modelo de difusión simple, para concentraciones de glucosa menores de 33 g/L. De acuerdo con estos autores el modelo de difusión facilitada, no describe el fenómeno, debido a que los transportadores no se encuentran en condiciones de saturación, por lo tanto el fenómeno de difusión simple puede describir el flujo de glucosa bajo estas condiciones. Estas evidencias conducen a la idea de que el fenómeno de difusión simple en *Aspergillus niger*, no puede ser regulado cuando se encuentra en un medio con concentraciones de alrededor de 25 g/L de glucosa, es probable que bajo estas condiciones de concentración de glucosa, la difusión simple opere en *Aspergillus niger*, como un fenómeno absolutamente físico.

La ausencia de correlación observada, entre el modelo de difusión simple y el modelo fisiológico, para concentraciones de glucosa mayores a 25 g/L, se le pueden dar dos explicaciones, una de ellas se abordará en la siguiente sección, donde se compara el modelo fisiológico, con los modelos de difusión facilitada. Otro fenómeno que podría explicar estos resultados es una disminución en el gradiente de concentración de glucosa, es decir que la concentración de glucosa en el interior de la célula, sea mayor a cero, sin embargo, las evidencias sugieren que bajo las condiciones de estudio la concentración de glucosa en el interior de la célula es cero, pues se ha mostrado que incrementos en la concentración de glucosa en el medio, provoca un aumento en la concentración de fructosa 1-6 difosfato, un fuerte activador de la glucólisis (Kubicek y col., 1990), esto sugiere, que la célula se adapta para metabolizar la glucosa que se encuentre en el medio. También sobre esta línea se conduce el trabajo de Torres y col. (1996), que muestra a través de un análisis bioquímico de la síntesis de ácido cítrico, llevada a cabo por *Aspergillus niger*, que los pasos limitantes del proceso son el transporte de la fuente de carbono y la remoción del producto (ácido cítrico). Lo anterior sugiere que *Aspergillus niger* metaboliza rápidamente la glucosa, por lo que esta no se acumula en la célula, sin embargo parece ser que la rapidez con la que actúa la hexoquinasa de *Aspergillus niger*, no es suficiente cuando

las concentraciones de glucosa son superiores a 80 g/L (Kubicek y col., 1990), De acuerdo con las concentraciones de glucosa que se probaron en este estudio (12.5-100 g/L), y a las evidencias antes mencionadas no hay acumulación de glucosa en la célula, por lo que no resulta ser una explicación satisfactoria, para los flux de glucosa observados.

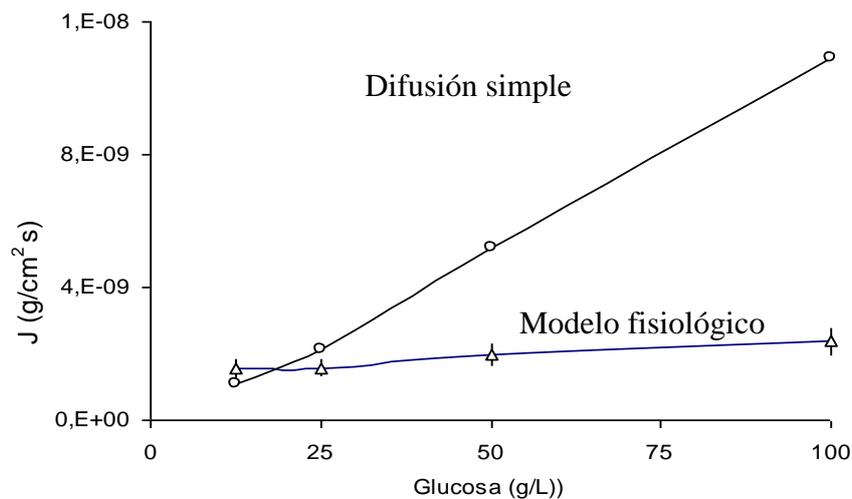


Figura 16. Diferencias entre los flux calculados con el modelo fisiológico (ecuación 10) y el modelo de difusión simple.

6.6. Cambios en la permeabilidad de *Aspergillus niger*

Con el objeto de explicar los resultados obtenidos con el modelo fisiológico, se abordaron dos aspectos en la sección anterior: el primero es que la difusión simple es un fenómeno físico, que no puede ser controlado por *Aspergillus niger* a concentraciones menores de 25 g/L, y el segundo es que las diferencias entre los flux calculados con el modelo fisiológico con respecto a los calculados con el modelo de difusión simple, no se pueden explicar en términos de una disminución en el gradiente de concentración de glucosa, con base en lo anterior se propone como una posible explicación a este hecho, que existen cambios en el coeficiente de permeabilidad (P) de las membranas de *Aspergillus niger*, los cuales permiten

controlar el flux de glucosa. En la figura 17 se muestran los valores de permeabilidad calculados con la ecuación 15, se observan disminuciones en la permeabilidad (73%) cuando se incrementó la concentración de glucosa de 12.5 g/L a 50 g/L, este fenómeno ha sido propuesto por Viniegra y Favela (2006) a partir de un modelo matemático que explica los bajos niveles de represión catabólica observados en cultivos sólidos en función de adaptaciones en la permeabilidad al sustrato. Así mismo, Maldonado y Saad (1998) reportarán cambios químicos (concentración de ácidos grasos saturados) en las membranas de las células en función del tipo de cultivo (líquido y sólido) (Maldonado y Saad, 1998), lo cual da indicios de que existen cambios en la fluidez de la membrana en función de las condiciones del cultivo, algunos trabajos sugieren que los cambios en la fluidez y como consecuencia en la permeabilidad se deben a la actividad de agua en el medio de cultivo (Lesage, 1993), sin embargo los análisis realizados en este trabajo no permiten explicar los cambios en la permeabilidad.

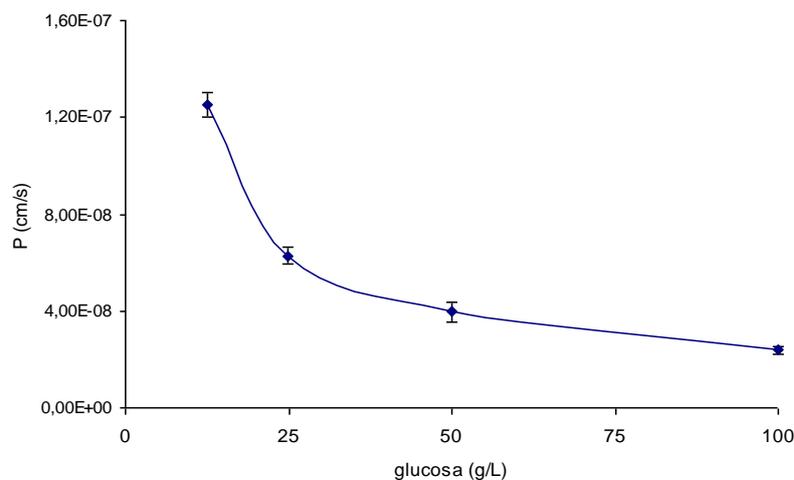


Figura 17. Perfil de la permeabilidad de la membrana, calculado con la ecuación 15.

El valor más alto de permeabilidad que se encontró en este trabajo (1.2×10^{-7} cm/s) es comparable con los reportados para *Aspergillus niger* y para otros

microorganismos (tabla 5). Esta similitud muestra que la metodología que se utilizó en este trabajo podría ser utilizada en trabajos posteriores.

Tabla 5. Coeficientes de permeabilidad (P) reportados para algunos microorganismos.

Tipo de membrana	Coeficiente de permeabilidad (cm/s)	Referencia.
<i>Spinacia plasmalemma</i>	2×10^{-7}	Glimmler y col. (1998)
<i>Nitella</i>	5×10^{-7}	Collander (1954)
Membrana fúngica	1×10^{-7}	Burgstaller (1997)
<i>Aspergillus niger</i>	1.2×10^{-7}	Este trabajo

6.7. Comparación con el transporte por difusión facilitada (alta y baja afinidad)

Los flux de glucosa calculados con el modelo fisiológico fueron comparados con el modelo de difusión facilitada, en la figura 18 se muestra que si únicamente los transportadores de baja afinidad participaran en el transporte de glucosa, los flux serían menores (de 8 a 17 veces) con respecto a los calculados con el modelo fisiológico. Lo anterior da indicios de que bajo las condiciones de estudio, los transportadores de alta afinidad fueron los responsables del transporte de glucosa. De acuerdo a lo que se observa en la figura 18, no se puede deducir, la ausencia de los transportadores de baja afinidad, debido a que el efecto que tiene sobre el flux total es muy poco (alrededor del 5%), estos resultados son congruentes con el trabajo de Torres y col.(1996) el cual sugiere que la expresión de los transportadores de baja afinidad se lleva a cabo cuando en el medio existen altas concentraciones de glucosa (alrededor de 150 g/L), en otras condiciones, los transportadores de alta afinidad son los encargados del transporte de glucosa.

Por otro lado, también hay evidencias de que cuando los transportadores de baja afinidad no se expresan, la expresión de los acarreadores de alta afinidad aumenta, como un mecanismo compensatorio (Forment y col., 2006). La curva que describe los flux calculados con el modelo fisiológico (figura 18), no describe una saturación lo cual sugiere un mecanismo de transporte alterno, por ejemplo el de difusión simple que opera como un mecanismo absolutamente físico, o bien diferentes niveles de expresión de los transportadores. Las curvas de baja y alta afinidad muestran una disminución en el flux de glucosa debido al incremento del área específica (A_x).

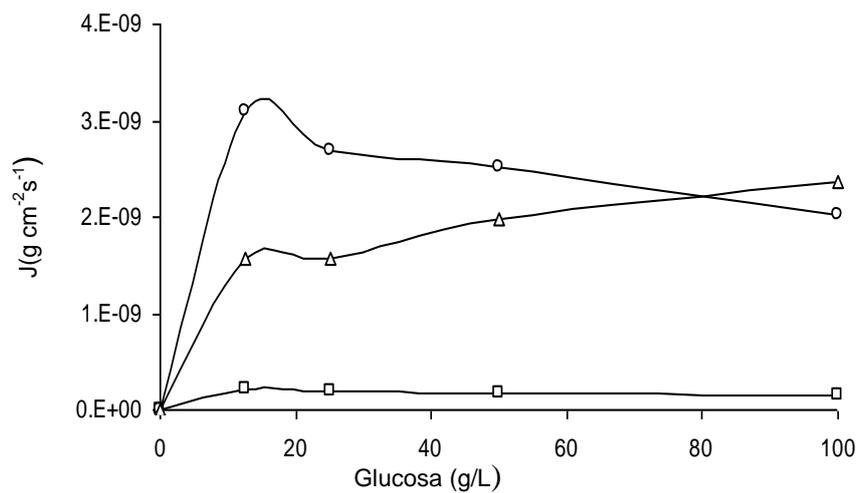


Figura 18. Comparación entre los perfiles del flux de glucosa calculados con el modelo fisiológico (ecuación 10) y el de difusión facilitada (se utilizaron los parámetros cinéticos publicados por Torres y col. , (1996) (-- □ -- Baja afinidad, --- O – alta afinidad --Δ --Modelo fisiológico)

CONCLUSIONES

Los estudios realizados en caja Petri con glucosa como única fuente de carbono demostraron que existen cambios morfométricos y de permeabilidad en las hifas que regulan el flux de glucosa a nivel de membrana.

El flux de glucosa en *Aspergillus niger* para concentraciones de 12.5 a 25 g/L ocurre como un proceso absolutamente físico.

El modelo fisiológico propuesto en este trabajo, por considerar parámetros microscópicos y fisiológicos propios del cultivo tiene gran sensibilidad y validez para los cultivos crecidos en superficie, también permite estimar cambios en la permeabilidad a la glucosa.

El modelo de difusión facilitada mostró que los sistemas de transporte son saturables para concentraciones superiores a 25 g/L.

Los flux calculados con el modelo fisiológico no mostraron represión en los transportadores de alta afinidad.

.

RECOMENDACIONES

Finalmente, se escriben algunas inquietudes surgidas durante la realización de este trabajo que podrían ser consideradas para la realización de trabajos posteriores.

Un fenómeno que podría ser de interés resolver, es la causa de los cambios observados en el diámetro de las hifas, pues si bien el trabajo de Larralde y col. (1997) y éste, sugieren que la presión osmótica del medio podría determinar el diámetro de las hifas, sustentándose en la teoría vesicular, también es probable que los cambios morfométricos observados se deban a un fenómeno regulado por la concentración de glucosa y no por la presión osmótica, por ello se deben realizar trabajos que permitan separar estas dos variables.

Este trabajo no explica los cambios observados en la permeabilidad a la glucosa, por lo que trabajos relacionados con la composición química a nivel de membrana, niveles de expresión de los transportadores de alta y baja afinidad y estudios cinéticos de los transportadores (saturación de los sistemas de transporte) podrían explicar los cambios en la permeabilidad observados en este trabajo.

Los estudios de respirometría en cultivos sólidos podrían sugerir si existe alguna relación entre la permeabilidad a la glucosa y la disponibilidad de oxígeno, es decir si los cultivos sólidos regulan el flux de glucosa en función de la disponibilidad de oxígeno, esto junto con estudios relacionados con los niveles de expresión de enzimas inducibles, podrían explicar los bajos niveles de expresión catabólica observados en cultivos sólidos y el hecho de que la eficiencia biosintética ($Y_{x/s}$) sea independiente de la concentración de glucosa inicial en este tipo de cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

Barnett J.G., Holman G.D., Chalkley R.A. (1875). Evidence for two adymetric conformacional states in the human erytrocite sugar transport system. *Journal Biochemistry* 145, 417-429.

Barnicki-Garcia S., Hergert F. Giertz, G., (1989). A novel computer model for generating cell shape: Application to fungal morphogenesis. in *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi*. Ed. Kuhn et al. Springer-Verlag.

Berka Rm, Kodama KH, Rey MW. (1991).The development of *Aspergillus niger* var awamori as a host for the expression and secretion of heterologous gene-products. *Biochemical Society Transactions* 19 (3): 681-685.

Berka RM, Schneider P, Golightly EJ, (1997), Characaterizacion of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliohthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (8): 3151-3157.

Burgstaller W. (1997). Transport of small ions and molecules through the plasma membrane of filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 23 (1): 1-46.

Charley RC. (1981). Phd thesis, University of Strathclyde, Glasgow, UK.

Collander R. (1954). The permeability of *Nitella* cells to non electrolytes. *Physiol Planta* 7:420-445.

Couri S., Mercés E.P., Neves B.C., Senna L.F. (2006). Digital image processing as a toll to monitor biomas growth in *Aspergillus niger* 3T5B8 solid-state fermentation: preliminary results. *Journal of Microscopy*. Vol. 224. Pt 3, pp. 290-297

Díaz –Godínez. G. (2001), Comparación de la producción de enzimas exopectinasas de *Aspergillus niger* obtenidas por fermentación sólida y sumergida, Tesis de Doctorado. UAM-I, México D.F.

Farkas V. (1990). Fungal cell walls: Their structure, biosynthesis and biotechnological aspects. *Acta Biotechnol.* 10 (3): 225-238.

Favela-Torres E., Córdoba-López J., García-Rivero M., Gutiérrez-Rojas M.(1998) . Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations, *Process Biochemistry*, Vol 33 No. 2; 103-107.

Forment J., Flippi M., Ramón D. (2006), Identificación de the mstE gene encoding glucose-inducible, low affinity glucose transporter in *Aspergillus niger* .*Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282: 13. 8339-8346.

Gimmler H., Heilmann B., Demming B., Hartung W., (1981). The permeability coefficients of the *plasmalemma* and chloroplast envelope of spinach mesophyll cells for phytohormones. *Z Naturforsch* 36 C: 672-678.

Herrera T., Ulloa M. (1990) Hongos verdaderos, division eumycota. En el reino de los hongos. UNAM y fondo de Cultura Económica S.A de C.V, México.

Jorgensen T.R., Vankuyk P.A., Poulsen B.R., et al. (2007). Glucose uptake and growth of glucose-limited chemostat cultures of *Aspergillus niger* and a disruptant lacking MstA, a high-affinity glucose transporter. *Microbiology*. 153: 1963-1973.

Juge N., Svensson B., Williamson G. (1998). Secretion, purification, and characterisation of barley alpha-amylase produced by heterologous gene expression in *Aspergillus niger* *Applied microbiology and biotechnology* 49 (4): 385-392.

Jung, C. Y., in Surgenor, D. (1975)., The Red Blood Cell, Vol.2, p 709, Academic Press.

Kafert E. (1977).Antranilate synthetase enzyme complex and trifuntional trpc gene of *Aspergillus*. Canadian Journal Genetic Cytol; 19:723-38.

Krzytek L, Gluszez p, Ledakowicz S. (1996). Determination of yield and maintenance coefficients in citric acid production by *Aspergillus niger*. Chemistry Engineering Journal 62:215-222.

Kubicek CP, Rohr M. (1977). Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation in *Aspergillus niger*. Journal Applied Microbiology 4: 167-175.

Kubicek-Pranz, M. Mozelt M., Rohr. (1990). Changes in the concentration of fructose-2, 6-bisphosphato in *Aspergillus niger* during stimulation of acidogenesis by elevated sucrose concentrations. Biochimica. Biophysica. Acta 1033: 250-255.

Larralde-Corona P., González-Blanco C., Viniegra-González G. (1994). Comparison of alternative kinetic models for stimating the specific growth rate of *Gibberella fujikuroi* by image análisis techniques. Biotechnology Techniques: 261-266.

Larralde- Corona, C.P. (1996). Cinética de crecimiento de hongos filamentosos, Tesis de Doctoraso. UAM-I, México D.F.

Larralde-Corona, C.P., López –Isunza, F., Viniegra-González, G., (1997), Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plate at high glucose levels. Biotechnology And Bioengineering. 56: 287-294.

Lesage L., Genot C., Record E., Richard-Molard D. (1993). Fatty acid composition and molecular order of phospholipids from *Euromtium chevalieri* in response to changes in water activity. *Journal Genetic Microbiology* 1653-1661.

Loera-Corral O., Aguirre J. Viniegra-González G., (1999), Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus* averproducing mutans, *Enzyme in Microbial Technology*, 25 (1-2): 103-108.

Loera-Corral O, Viniegra-Gonzalez G. (1998), Identification of growth phenotypes in *Aspergillus niger* pectinase over-producing mutants using image analysis procedures, *Biotechnology Techniques* Vol 12, no 11.

Maldonado M.C, Saad A.M. (1998). Production of pectinesterase and poligalacturonase by *Aspergillus niger* in sumerged and solid state systems. *Journal of industrial microbiology and Biotechnology* 20, 34-38.

Miller Gail L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31 (3): 426-428.

Mischak H, Kubicek CP, Rohr M. (1984). Citrate inhibition of glucose uptake in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 6:435-30.

Mitchell D.A, Doelle D., Grennfield P. (1991). A semi-mechanism mathemataical model for growth of *Rhizopus oligosporus* in a model solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineerin*. 38:353-362.

Muller C, Anders B, Nielsen J. (2000). Role of Substrate Concentration in mitosis and Hyphal Extension of *Aspergillus*. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 67, No 4.

Okasasaki N., Sugarama S. Tanaka T.(1980), Mathematical model for surface culture of koji mold. *Journal of Fermentation Technology*. 58, 471-476.

Olsson S. (1994) Uptake of glucose and phosphorus by growing colonies of *Fusarium-oxysporum* as quantified by image-analysis. *Experimental mycology* 18 (1): 33-47.

Papagianni M, Mattey M. (2004), Modeling the mechanisms of glucose transport through the cell membrane of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation processes. *Journal Biochemistry Engineering* ; 20:7-12.

Peberdy J.f. (1994). Protein secretion in filamentous fungi-truing to understand a highly productive black box. *Trends in biotechnology* !2 (2): 50-57.

Perkins D.(1977). Detail for preparing silica stoks, *Neurospora Newslett*, 24: 16-17.

Pirt, S.J. (1967). A Kinetic study of the mode of growth of surface cultures of bacteria and fungi. *Journal Genetic Microbiology*. 47:181-197.

Ramesh MV, Lonsane BK. (1991). Regulation of alpha-amylase production in *Bacillus-licheniformis* m27 by enzyme end-products in submerged fermentation and its overcoming in solid-state fermentation system. *Biotechnology letters* 13 (5): 355-360 .

Stein W.D. (1967), *Movements of Molecules across Membranes*, p. 134, Academic Press.

Téllés-Jurado A., Arana-Cuenca A.,Viniestra-González G. Loera-Corral O. (2006), Expresion of heterologous lacase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations *Enzyme and Microbial Technology* 38 (5):

Torres N.V, (1994), Modeling approach to control of carbohydrate metabolism during citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. 1. Model definition and stability of the steady state. *Biotechnology Bioengineering* 44:104-111

Torres N.V., Riiol-climas J.M., Wolschek M, Kubicek C.P. (1996). Glucose transport by *Aspergillus niger*: the low affinity carrier is only formed during growth on high glucose concentrations. *Applied Microbiology Biotechnology* 44:790-794.

Vankuyk. P, Diderich J, Maccabe A. (2004). *Aspergillus niger* mstA encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH: *Biochemistry*. 375-383.

Viniegra-Gonzalez G, Favela-Torres E, (2006). Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolite repression? . *Food Technology and Biotechnology* 44 (3): 397-406.

Ward M., Kodama K., Wilson. (1989). Transformation of *Aspergillus awamori* and *A. niger* by electroporation. *Experimental mycology* 13 (3): 289-293.

Wayman F. Matthey M, (1999). Simple Diffusion is the primary mechanism for glucose uptake during the production phase of the *Aspergillus niger* citric acid process. *Biotechnology and bioengineering*, vol. 67, No 4.

Wiebe M.G., Robson G.D., Trinci, A:P:J (1992). Evidence for the independent regulation of hyphaeal extension and branch initiation in *Fusarium graminearum* A3/5 . *FEMS Microbiology. Letters*. 90: 179-184.

Wonsten H.A.B., Moukha S.M., Sietsma J.H., Wessels J.G.H. (1991). Localization of growth and secretion of proteins in *Aspergillus niger*. *Journal of General Microbiology* 137, 2017-2023.

