

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

Gradientes, permeabilidad y balance de materia en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*

T E S I S

Para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

P R E S E N T A

M. en B. Eric Ortega Sánchez

Comité Tutorial:

Dr. Gustavo Viniegra González
Dr. Octavio Loera Corral
Dr. Enrique Galindo Fentanes

Noviembre del 2012

Iztapalapa, D.F. a 11 de Diciembre del 2012

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

Gradientes, permeabilidad y balance de materia en cultivos de *Aspergillus
niger*

Que presentó

M. en B. Eric Ortega Sánchez

Comité Tutorial:

Dr. Gustavo Viniegra González
Dr. Octavio Loera Corral
Dr. Enrique Galindo Fentanes

Jurado:

Presidente: Dr. Enrique Galindo Fentanes

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral

Vocal: Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Vocal: Dr. Saúl Tlecuítl Beristain

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

AGRADECIMIENTOS

Infinitas gracias al Dr. Gustavo Viniegra, por el acompañamiento que me brindó durante la realización de este trabajo, también por su apoyo económico y moral además por su ejemplo como ser humano e investigador.

A mi esposa Genoveva, que es mi mejor aliada y que me ha dado más de lo que soñé.

A mi hijo Yael, quien se ha convertido en mi alegría de vivir.

Al Dr. Octavio Loera por todo el apoyo proporcionado en su laboratorio, por su amistad e invaluable labor en la presente tesis.

Mil agradecimientos a mis revisores: Dr. Cristóbal Noé Aguilar, Dr. Enrique Galindo, Dr. Octavio Loera y Dr. Saúl Tlecuítl.

A mis hermanos: Manuel, Margarita, Laura, Concepción, Carlos y Yaneth por su apoyo moral, motivaciones y por su lucha diaria que me motiva.

Especialmente a mis padres: Manuel y Guadalupe, por todos los esfuerzos que hicieron para comprender y darme lo que necesitaba.

Agradecemos la labor del Dr. Alfredo Rodríguez por su importante participación en la parte de resonancia magnética nuclear de la presente tesis.

Para mis amigos de la UPTLAX: Ricardo, Daniel, Armando, Raquel, Alejandro, Jorge, Saúl y Miriam.

A todos mis alumnos que me enseñan tanto con su jovialidad y frescura.

A todos mis profesores que desde la primaria han contribuido en mi formación.

Para mis amigos: Eduardo, José Alfredo, Roberto y Misael por sus consejos y compañía.

De manera especial a mis suegros: Alejandro y Felipa por todo el apoyo que me han brindado durante estos años.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Generalidades del género <i>Aspergillus</i>	4
1.2 Importancia de <i>Aspergillus</i> en la Biotecnología.....	5
1.3 La difusión es proporcional al gradiente de concentración.....	7
1.4 Principios de imagenología de resonancia magnética nuclear.....	8
1.4.1 Inversión-recuperación y medición de T ₁	10
1.4.2 Medición de T ₁	11
II. ANTECEDENTES	14
2.1 La difusión simple es el mejor modelo para el transporte de glucosa en <i>Aspergillus niger</i>	14
2.2 Las condiciones de cultivo modifican la permeabilidad membranar, en cultivos fúngicos.....	14
2.3 Hipótesis sobre los bajos niveles de represión catabólica en fermentación en medio sólido.	16
2.4 Penetración de oxígeno en biopelículas fúngicas.	17
2.5 Importancia de las hifas aéreas en la transferencia de oxígeno en cultivos en medio sólido (CMS).....	18
2.6 La predicción de la formación de gradientes de oxígeno, depende de las consideraciones del modelo utilizado.....	20
2.7 Modelos de crecimiento fúngico superficial.	22
2.8 Función fisiológica de las hifas aéreas.....	26
III. OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos particulares.....	28
IV. HIPÓTESIS	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Rendimientos y espesores de biopelículas en cultivos superficiales.....	30
5.1.1 Unidades experimentales.....	31
5.1.2 Microorganismo.....	31
5.1.3 Conservación de la cepa.....	32

5.1.4 Composición del medio de cultivo.....	32
5.1.5 Origen del inóculo.	33
5.1.6 Determinación de biomasa en cultivos superficiales.....	33
5.1.7 Determinación de biomasa crecida sobre membranas de celofán.....	34
5.1.8 Modelo logístico.	35
5.1.9 Cuantificación de la glucosa residual en cultivos crecidos en agar.....	36
5.1.10 Medición del espesor de la biopelícula.	37
5.2 Estimación del <i>flux</i> y permeabilidad en cultivos en caja Petri.	38
5.2.1 Unidades experimentales en cultivos superficiales.	38
5.2.2 Medición del diámetro hifal.	38
5.2.3 Desarrollo teórico.	39
5.3 Medición de nutrientes por IRMN en caja Petri.	42
5.3.1 Unidades experimentales usadas en IRMN.	42
5.3.2 Determinación de T_1	42
5.3.3 Determinación de nitratos.	43
5.4 Tratamiento de la información y análisis estadístico.	44
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
6.1 Densidad volumétrica (ρ_v).....	44
6.2 El rendimiento, $Y_{x/s}$, como función de σ_0 en cultivos sólidos y superficiales.	49
6.3 Consideraciones para simular los cultivos sobre soportes porosos en caja Petri.	52
6.4 Tamaño óptimo de partícula para cultivos en soportes sólidos.....	52
6.5 Modelo matemático del crecimiento de hongos sobre superficies sólidas.	54
6.6 Estimación del flux y permeabilidad membranal en cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i>	59
6.6.1 Análisis semi-estructurado del metabolismo de los cultivos superficiales en función de sus rendimientos.	60
6.6.2 Diámetro hifal (d_H) en cultivos superficiales.	67
6.6.3 Estimación del flux de glucosa en cultivos superficiales.	68
6.6.4 Permeabilidad membranal calculada.	73
6.7 Gradientes de nutrientes por IRMN en cultivos superficiales de <i>A. niger</i>	74

6.7.1 Tiempo de recuperación (T_1) en caja Petri con diferentes niveles de nutrientes.	74
6.7.2 Tiempo de recuperación (T_1) en caja Petri con diferentes a_w	76
6.7.3 Intensidad de señal axial en el agar de cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i>	79
6.7.4 Curvas de nitratos y glucosa en caja Petri.	82
VII. CONCLUSIONES	84
VIII. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.	88
IX. BIBLIOGRAFÍA.	90
X. APÉNDICE	98

RESUMEN

En el presente trabajo se estudio la fisiología de *Aspergillus niger* cuando crece sobre superficies sólidas, particularmente, se exploraron tres aspectos: 1. El efecto de la disponibilidad de sustrato en el rendimiento $Y_{x/s}$, midiendo y considerando el espesor de la biopelícula como un factor que limita la eficiencia biosintética, 2. El cambio de la permeabilidad membranal como función de la concentración de sustrato, S_0 , y 3. Los gradientes de nutrientes en el agar.

A fin de entender mejor la fisiología del cultivo en superficie, se definió la variable σ_0 , como la disponibilidad de sustrato por unidad de área (mgcm^{-2}) que se puede calcular como el cociente: S_0/α , donde α es la relación A/V del soporte, de tal manera que σ_0 tiene dos fuentes de variación; el volumen del medio y S_0 . Entonces, se diseñó un experimento con un rango de σ_0 entre 6 y 63 mgcm^{-2} y se estimó el $Y_{x/s}$, el espesor de la biopelícula, h , y se construyeron las curvas de producción de biomasa y consumo de glucosa; con ello se realizó el balance de materia con ecuaciones empíricas y fue posible deducir 4 propiedades de los cultivos fúngicos en superficie: 1. La densidad volumétrica final del cultivo es independiente de la concentración del sustrato y de su disponibilidad por unidad de superficie del soporte, 2. El espesor final de la biopelícula, h , sigue una función de saturación con respecto a σ_0 . 3. El balance de materia indica que el rendimiento decrece conforme se aumenta σ_0 . 4. Hay una constante de eficiencia de la producción de la biomasa por unidad de superficie que está definida por el máximo espesor posible de la capa del micelio, con una densidad volumétrica dada.

La permeabilidad de la membrana al sustrato se estimó a partir de un modelo propuesto, para ello fue necesario medir, a diferentes concentraciones de sustrato (S_0), el diámetro hifal (d_H), la tasa específica máxima de crecimiento (μ_{max}), además se realizaron las cinéticas de producción de biomasa y consumo de sustrato, el modelo permite estimar la permeabilidad del sustrato a partir de variables fisiológicas. Los resultados indican que cuando se modifica S_0 de 12.5 a 100 gL^{-1} , la permeabilidad membranal disminuye aproximadamente un orden de magnitud. Este resultado podría explicar la baja sensibilidad a la represión catabólica observada en cultivos sólidos. También se observó que el d_H disminuye aproximadamente en un 65%, lo cual permite incrementar el área específica de acuerdo a la siguiente relación:

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

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. Tal respuesta se puede interpretar como una adaptación morfométrica para incrementar el consumo específico de sustrato.

Por otro lado, también se midió el tiempo de recuperación, T_1 (tiempo necesario para revertir el campo magnético original después de un pulso de inversión), y la intensidad de señal axial (el campo magnético generado por los nutrientes) a través de imagenología de resonancia magnética nuclear (IRMN), los resultados indican

que existen gradientes axiales en el agar, es decir, bajo condiciones de estudio la difusión pareciera ser un paso limitante para el metabolismo. Sin embargo, las imágenes también muestran que después de 72 horas de cultivo, las hifas penetran en el agar como una compensación a la baja disponibilidad de nutrientes en la superficie. También se concluyó que bajo las condiciones de estudio, las señales medidas por IRMN correspondían a todos los nutrientes y no eran exclusivas de la glucosa.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del género *Aspergillus*.

Los *Aspergillus* se han clasificado dentro de los *Deuteromycetes*. Se encuentran frecuentemente en frutas, vegetales u otros sustratos sólidos, muchas especies crecen sobre materia orgánica muerta, también se desarrollan en concentraciones altas de azúcar y sales, lo que indica que pueden tomar el agua que necesitan de sustancias relativamente secas (Pelczar, 1999). Son de gran importancia económica porque se les usa en la industria de la fermentación para la producción de diversos ácidos orgánicos, tales como: cítrico y glucónico.

Los *aspergillus* producen micelio tabicado, ramificado, con la parte vegetativa introducida en el nutriente. Las estructuras erectas de las hifas y que tienen terminación en forma de bulbo llamado vesícula, se llaman conidióforos. Los conidióforos pueden ser septados o no septados, en el ápice, los conidióforos se hinchan formando una vesícula, ésta a su vez da lugar al esterigma, que está formada por una o dos capas. Las conidias salen del esterigma y se mantienen en cadenas, son de varios colores y éstos son característicos de la especie, siendo más comunes negro, café y verde, tienen forma esférica y son unicelulares con polímeros rígidos en su corteza. Dado que los conidióforos y las conidias son producidos en abundancia, su color es el que predomina en toda la colonia, la composición del medio de cultivo tiene un fuerte efecto sobre el color de *Aspergillus*, se ha observado que el cobre le confiere al cultivo el color negro Mulder (1938), en ausencia de cobre se torna de color amarillo.

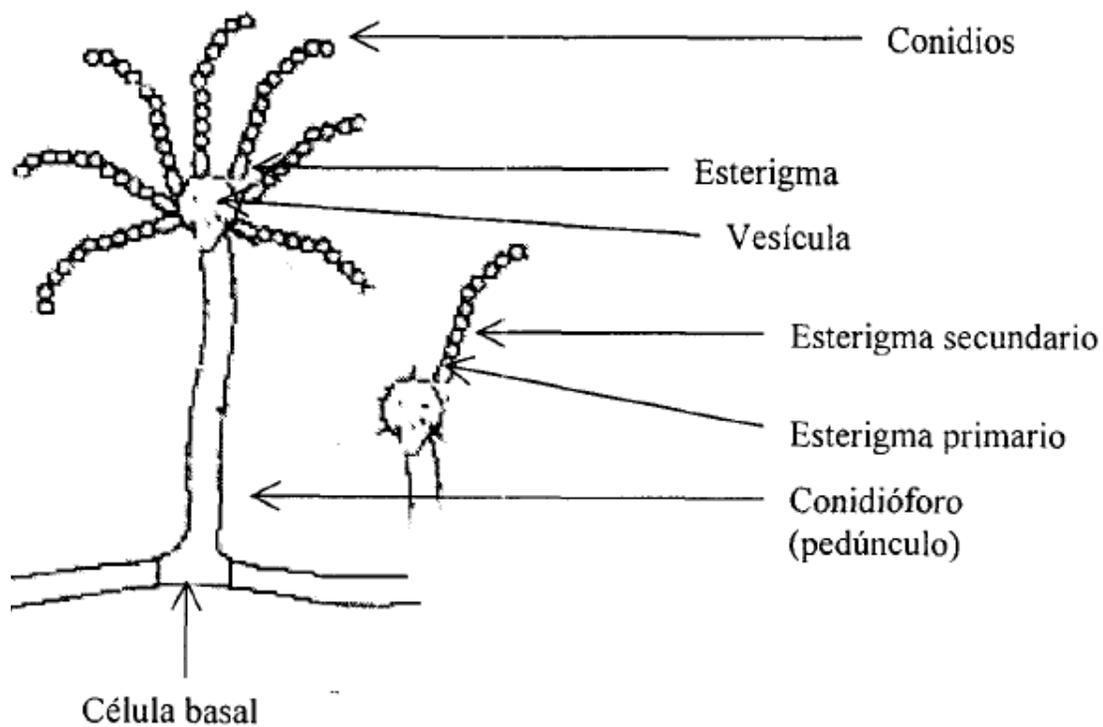


Figura 1. Representación de las estructuras de *Aspergillus niger* (Díaz- Godínez, 2011)

1.2 Importancia de *Aspergillus* en la Biotecnología

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).

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

Las cepas silvestres del género *Aspergillus* producen diferentes compuestos (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 *et al.*,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 *et al.*, 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 *et al.*,1997 y Juge *et al.*,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.

1.3 La difusión es proporcional al gradiente de concentración.

En múltiples fenómenos se puede observar que una sustancia volátil tiende a difundirse a favor de un gradiente de concentraciones, la difusión cesa cuando el gradiente ha sido eliminado. Por otra parte, la rapidez con la que el gradiente de concentración es eliminado está en función de las características propias de cada soluto, del medio en el que difunde y de la temperatura. Los factores antes mencionados son englobados en un coeficiente que se determina experimentalmente, el coeficiente de difusión, D , es particular para cada sustancia y es referido al medio y temperatura en que fue estimado.

Imaginemos un sistema en donde la concentración cambia con la posición z . Ahora J es el *flux* del soluto es decir, el número efectivo de moléculas que atraviesan un área por unidad de tiempo. La ley de Fick establece que el flux es proporcional al gradiente de concentración.

$$J = -D \frac{\partial n}{\partial z} \quad (1.1)$$

donde n es la concentración del soluto y D es el coeficiente de difusión que bien, se puede definir como una constante de proporcionalidad y z la distancia a recorrer por el soluto. En un elemento diferencial de volumen $A dz$, la acumulación de solutos estaría dada por la diferencia del flujo entrante con el saliente, J_e y J_s , respectivamente:

$$J_e A - J_s A = \frac{\partial J}{\partial z} A dz \quad (1.2)$$

La acumulación del soluto de n en la unidad de tiempo es:

$$=(A dz) \frac{\partial n}{\partial t} \quad (1.3)$$

donde: n es la concentración del soluto. Igualando las ecuaciones anteriores y utilizando la ecuación de Fick, obtenemos la siguiente expresión:

$$\frac{\partial}{\partial z} \left(D \frac{\partial n}{\partial z} \right) = \frac{\partial n}{\partial t} \quad (1.4)$$

Si el coeficiente de difusión no depende de la concentración, se puede obtener la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{D} \frac{\partial n}{\partial t} = \frac{\partial^2 n}{\partial z^2} \quad (1.5)$$

La ecuación anterior es una forma de la segunda ley de Fick, con la cual se puede calcular la posición de un soluto en un tiempo determinado.

1.4 Principios de imagenología de resonancia magnética nuclear.

El tiempo que tarda una muestra en recuperar su magnetización nuclear natural después de haber sido sometida a un campo magnético externo, se le conoce como

tiempo de recuperación (T_1), las muestras biológicas tienen distintos T_1 , las diferencias en valores de T_1 son explotadas en Imagenología de Resonancia Magnética Nuclear (IRMN) para producir imágenes con contraste ponderado por este parámetro. Por ejemplo, en una secuencia de pulsos Espín-Eco, el contraste ponderado por T_1 es obtenido con Tiempos de Repetición (TR) y Tiempos Eco cortos (TE) (por ejemplo, 500 y 10 ms, respectivamente).

Existe un método alternativo para crear el contraste de la imagen a partir de T_1 . En este método se aplica un pulso de inversión que desplaza la magnetización longitudinal del eje $+z$ al $-z$, antes de aplicar el pulso de excitación de radio frecuencia (RF) de la secuencia de pulso (SP) subsecuente, un tiempo de espera es proporcionado para permitir la recuperación de la magnetización invertida para llegar nuevamente a su estado de equilibrio. Los tejidos con diferentes valores de T_1 se recuperan a diferentes velocidades, creando un contraste de T_1 característico.

El pulso de excitación de radiofrecuencias (RF) convierte entonces las diferencias en la magnetización longitudinal en diferencias en la magnetización transversal. Esto produce señales que forman una imagen con contraste ponderado por T_1 , aunque se pueden introducir contrastes adicionales en el resto de la SP. Las SP con un pulso de inversión seguido de un tiempo de espera previo al pulso de excitación son conocidas como *secuencia de pulsos inversión recuperación (inversión recovery, IR)*. El tiempo de espera entre los pulsos de inversión y el de excitación es conocido como el *tiempo de inversión* (denotado por T_i).

1.4.1 Inversión-recuperación y medición de T_1 .

El Decaimiento Inducción Libre (FID, por sus siglas en inglés) y los experimentos con Espín Eco se utilizan para determinar las propiedades de T_2 (tiempo de recuperación transversal) de una muestra. Sin embargo, como experimentos únicos, éstos no son sensibles a T_1 . Como experimentos repetidos sus señales dependen de T_1 , y los parámetros de latencia-espín podrían, en principio, ser determinados realizando un número de secuencias repetidas con diferentes valores de TR. Sin embargo, tales experimentos toman largo tiempo.



Figura 2. Diagrama de inversión-recuperación, consiste de una combinación de dos pulsos de RF. El primer pulso invierte la magnetización longitudinal. El segundo pulso después del tiempo T_I desplaza la magnetización longitudinal al plano transversal para que una señal FID pueda ser medida.

Existe otro experimento, llamado "inversión recuperación", que es sensible a T_1 . Aunque este experimento puede ser empleado para obtener un valor exacto de T_1 , la determinación no puede hacerse con un solo experimento (Haacke *et al.*, 1999). La inversión recuperación es similar a un experimento FID, pero con un pulso adicional de 180° empleado para invertir la magnetización y definir un intervalo de tiempo T_I antes de un pulso de 90° . El diagrama de la secuencia se muestra en la

figura 2. El regreso de la componente longitudinal de la magnetización entre estos pulsos resulta en una señal intensa que depende de T_1 .

1.4.2 Medición de T_1 .

Para la medición de T_1 a través de inversión recuperación, es necesario realizar un seguimiento del componente longitudinal de la magnetización durante el periodo entre los pulsos 180° y 90° . La magnetización longitudinal después del pulso inicial de 180° es negativa respecto al valor de equilibrio.

El tiempo $t = T_1$ ha sido definido como el tiempo del pulso de 180° . La magnetización regresa a su valor de equilibrio en el intervalo entre los pulsos de acuerdo a:

$$M_z(t) = -M_0 e^{-t/T_1} + M_0 (1 - e^{-t/T_1}) = M_0 (1 - 2e^{-t/T_1}), \quad 0 < t < T_1 \quad (1.6)$$

Después de que la magnetización longitudinal es enviada al plano transversal para proporcionar la señal inicial, la magnitud de la magnetización transversal se comporta como:

$$M_z(t) = \left| M_0 (1 - 2e^{-T_1/T_1}) \right| e^{-\frac{t-T_1}{T_2^*}}, \quad t > T_1 \quad (1.7)$$

La magnitud de la señal medida es modulada por el factor exponencial dependiente de T_1 . El segundo factor de la ecuación 1.7 hace posible encontrar un valor finito de T_1 donde la señal es cero. Además, un camino exacto para determinar T_1 es el hecho de que la señal desaparece cuando:

$$T_{I,null} = T_1 \ln(2) \quad (1.8)$$

Esto implica que la señal es una función de T_1 y por lo tanto de T_1 como se ilustra en la figura 3. Para encontrar T_1 , T_1 es variado hasta llegar al cero. Los ceros de la señal pueden ser determinados, tal que T_1 , para una muestra uniforme, pueden ser medidos usando este método.

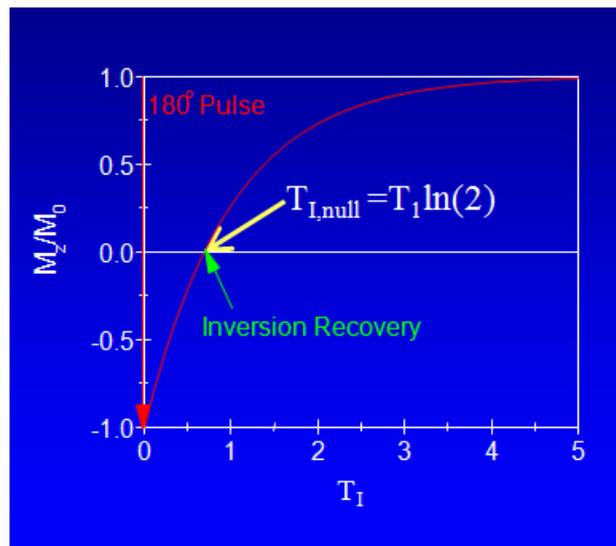


Figura 3. Magnitud de una señal para en una secuencia de inversión-recuperación en función de T_I , el tiempo entre dos pulsos de RF.

Existe una utilidad asociada con el cero de la señal. Si la muestra en estudio tiene dos sustancias o tejidos con diferentes valores de T_1 , entonces un experimento puede realizarse variando T_I tal que la señal de uno de los tejidos es cero. Este componente se dice ser anulada. En este sentido, los diferentes componentes de una muestra podrían ser estudiadas selectivamente.

Cada material magnetizable tiene un T_1 particular, la IRM explota esta propiedad para generar imágenes con contraste ponderado. La IRM es una técnica que no

invade ni destruye la muestra y que ha sido utilizada para estimar gradientes de glucosa en cultivos sólidos (Nagel *et al.*, 2002).

II. ANTECEDENTES

2.1 La difusión simple es el mejor modelo para el transporte de glucosa en *Aspergillus niger*.

El transporte de glucosa a través de la membrana se ha modelado bajo diversas hipótesis, consideraciones y ecuaciones. Se han comparado los consumos específicos experimentales reportados en la fermentación cítrica, con los estimados a partir de los modelos de difusión simple y transporte mediado, considerando que el área específica y coeficiente de permeabilidad son constantes e iguales en todos los sistemas de fermentación (Wayman y Matthey, 2000). En cultivos líquidos de *A. niger*, los modelos consideran al diámetro hifal como independiente de la concentración de glucosa, llegando a la conclusión de que el transporte se puede describir a través del modelo de difusión simple. (Papagianni y Matthey, 2004).

2.2 Las condiciones de cultivo modifican la permeabilidad membranal, en cultivos fúngicos.

Hay indicios de que las condiciones del medio de cultivo modifican la permeabilidad en la membrana. Se ha mostrado que cuando *Aspergillus niger* crece en medio sólido, sus membranas incrementan la concentración de ácido palmítico, esteárico y oleico en un 90 %, con respecto a cuando crece en cultivo sumergido, lo cual indica que hay cambios en la fluidez y permeabilidad membranal (Maldonado y Strasser de Saad, 1998). Los estudios del efecto de actividad de agua en la producción de pectinasas en cultivos sólidos de *Aspergillus niger*, muestran que la disminución de compuestos extracelulares se relacionan con limitaciones en el

transporte de nutrientes a nivel de membrana (Acuña-Argüelles *et al.*, 1994). Un modelo de la fermentación cítrica muestra que los pasos limitantes del proceso son la remoción del producto y el transporte del sustrato a nivel de membrana (Torres, 1994).

Por otra parte, en el género *Aspergillus* se han identificado dos tipos de transportadores para la glucosa: uno de alta y otro de baja afinidad (Mischak *et al.*, 1984); también se han identificado sus parámetros cinéticos y las condiciones bajo las cuales se expresan (Torres *et al.*, 1996), otros trabajos muestran que la expresión, actividad y afinidad de los transportadores dependen de las condiciones del medio de cultivo (Vankuyk *et al.*, 2004; Forment *et al.*, 2006; Jorgensen *et al.*, 2007).

Como se ha expuesto, la composición química de la membrana, los tipos y parámetros cinéticos de los transportadores dependen de las condiciones del medio de cultivo, pero inciden en la permeabilidad de la membrana a la glucosa, de tal manera que el transporte de glucosa a nivel de membrana se torna un fenómeno multifactorial, por lo tanto, es importante modelar el transporte de glucosa a partir de variables fisiológicas y morfológicas de fácil medición. En el presente trabajo se muestra una metodología sencilla para estimar la permeabilidad membranal a la glucosa, a través de una característica morfométrica (diámetro hifal) de *Aspergillus niger* y que ha sido utilizada para estimar el comportamiento fisiológico del cultivo (Loera y Viniegra-González, 1998).

2.3 Hipótesis sobre los bajos niveles de represión catabólica en fermentación en medio sólido.

La fermentación en medio sólido se define como el crecimiento de microorganismos sobre sustratos sólidos en la ausencia de agua libre. Este método de cultivo permite obtener mejores rendimientos de enzimas por gramo de sustrato, debido a la menor sensibilidad a la represión por carbono (Viniegra-González *et al.*, 2003). Para explicar este fenómeno se han propuesto dos hipótesis alternativas o complementarias (Viniegra-González y Favela-Torres, 2006). La primera sugiere que el microorganismo modifica la permeabilidad membranal de acuerdo a la concentración de sustrato en el medio y la segunda propone que se forman gradientes de sustrato dentro del soporte, lo cual impide la represión catabólica.

Un trabajo que sustenta las hipótesis anteriores es el de Villena y Gutiérrez-Correa (2007) quienes compararon la morfología de *Aspergillus niger* crecido en forma de biopelícula (cultivo en medio sólido) con la de los *pellets* (cultivo en medio líquido), para ello usaron microscopía electrónica y observaron la adhesión del microorganismo al soporte (poliéster). Las imágenes indican que las biopelículas presentan una matriz de hifas sobre la superficie, dentro de esta matriz hay canales, mientras que los *pellets* muestran en la superficie una red de hifas y en el centro una alta densidad de micelio, las diferencias morfológicas se relacionan con la mayor productividad enzimática en biopelículas de *Aspergillus*. Es probable que la fermentación en medio sólido sea un sistema de cultivo, cuyas diferencias morfológicas expliquen diversos resultados contrastantes respecto al cultivo líquido, entre ellas la sensibilidad a la represión catabólica.

2.4 Penetración de oxígeno en biopelículas fúngicas.

En un cultivo fúngico crecido sobre una superficie se pueden diferenciar 3 zonas (Figura 4): (a) Zona donde no existe limitación de oxígeno pues las hifas aéreas tienen suficiente espacio para permitir la difusión y convección gaseosa. (b) Zona de micelio que aunque está húmeda aún mantiene un metabolismo aerobio, debido a la difusión de oxígeno. (c) fracción de micelio húmedo en condiciones anaerobias, en donde el oxígeno ya no alcanza a difundir, debido al consumo de las biocapas superiores.

En cultivos de *Rhizopus oligosporus* crecidos en un modelo de cultivo sólido se han medido los gradientes de oxígeno en la zona b con un micro electrodo y se observó que el oxígeno se agota después de una profundidad de 60 μm (Oostra *et al.*, 2001). De tal manera, que la fracción aerobia del micelio húmedo es muy poca, a fin de incrementar la penetración de oxígeno en la biopelícula, se podría sugerir incrementar la presión parcial de oxígeno, sin embargo, realizar el incremento antes mencionado es costoso y puede inhibir el crecimiento (Onken y Liefke, 1989), otras alternativas serían el control del contenido de humedad y la reducción del tamaño de partícula del soporte para incrementar la relación área/volumen.



Figura 4. Zonas del micelio, en función de la disponibilidad de oxígeno. a) Zona aerobia, b) zona humeada con oxígeno y c) zona anaerobia

Para modelar los perfiles de oxígeno en una biopelícula, se han propuesto dos escenarios:

Uno en donde la densidad de la biomasa es constante, por lo tanto, el crecimiento se ve reflejado en un incremento en el espesor de la biopelícula. En un segundo escenario, se forma una primera lámina de baja densidad, posteriormente la biomasa crece dentro de esta misma lámina, por ende únicamente aumenta la densidad (Nopharatana *et al.*, 1998).

2.5 Importancia de las hifas aéreas en la transferencia de oxígeno en cultivos en medio sólido (CMS).

La transferencia de oxígeno es el factor más importante para el escalamiento y control de procesos a nivel industrial en hongos filamentosos, por dos razones:

1. La producción de calor es proporcional al consumo de oxígeno y es sabido que la remoción de calor es un problema para el escalamiento de fermentadores.
2. El suministro de oxígeno al micelio de la superficie o al interior del sustrato es limitado por fenómenos de difusión.

Por ello, algunos trabajos han estudiado el papel de las hifas aéreas en el transporte de oxígeno. Oostra *et al.* (2001) compararon el *flux* de oxígeno en cultivos de *Rhizopus oligosporous*, con y sin hifas aéreas. Concluyeron que las hifas aéreas no son importantes para la transferencia de oxígeno, por lo tanto, en

este tipo de cultivos la difusión de oxígeno es un proceso limitante, es decir, como el oxígeno no es transportado a través de las hifas aéreas, el único mecanismo por el que puede penetrar a la biopelícula es por difusión, y este mecanismo es insuficiente para mantener oxigenada una biopelícula fúngica pues, sólo llega a una profundidad de 60 μm (Oostra *et al.*, 2001).

En cultivos de *Aspergillus oryzae* en medio sólido, las hifas aéreas contribuyen hasta en un 75 % en el *flux* de oxígeno, debido a que este hongo forma abundante micelio aéreo y la difusión de oxígeno en los poros es lo suficientemente rápida para evitar la formación de gradientes. La concentración de oxígeno en la biopelícula cambia a una profundidad de 4.5 mm, justo donde terminan las hifas aéreas. Esto indica que *A. oryzae* forma hifas lo suficientemente largas para permitir el transporte de oxígeno hasta ésta profundidad. Por otra parte, al comparar los consumos de oxígeno entre *A. oryzae* y *R. oligosporous* es claro que los consumos de oxígeno son mayores en *A. oryzae*, debido probablemente, a la longitud de sus hifas. Sin embargo, la remoción de calor podría representar un problema ya que, como se ha mencionado, la producción de calor es proporcional al consumo de oxígeno. En resumen, la importancia de las hifas aéreas radica en su longitud, además se debe prestar atención a la remoción de calor en aquellos cultivos fúngicos donde las hifas aéreas son muy largas (Rahardjo *et al.*, 2001).

2.6 La predicción de la formación de gradientes de oxígeno, depende de las consideraciones del modelo utilizado.

La estimación de la difusión de oxígeno tiene una relación directa con los modelos de crecimiento. Los modelos de Rajagopalan y Modak (1995) y Thibault *et al.* (2000), consideran que los poros de la biopelícula están llenos de agua y modelan el crecimiento como una biopelícula sumergida. Basado en modelos simulados, estos autores concluyeron que la difusión, en combinación con el consumo de oxígeno, genera gradientes de oxígeno a nivel intrapartícula.

Por otro lado, Nopharatana *et al.*, (1998) consideran que los poros en la biopelícula están llenos de aire, por lo tanto en la biopelícula no hay limitación de oxígeno. En otras palabras, los modelos de crecimiento fúngico pueden sugerir que hay o no limitaciones de oxígeno, dependiendo del coeficiente de difusión que consideren en su modelo.

El modelo de difusión y consumo de oxígeno muestra que la penetración de oxígeno en la biopelícula es de 43 μm , comparable con el medido experimentalmente 82 μm (Oostra *et al.*, 2001).

Rahardjo *et al.*, (2001) calcularon el *flux* de oxígeno en una biopelícula con las siguientes ecuaciones:

$$\delta = \left(\frac{2DeCos}{-rO''} \right)^{0.5} \quad (2.1)$$

$$-rO'' = \frac{\mu\rho_x}{Y_{x/O}} \quad (2.2)$$

$$J_o = -r_o(\delta) \quad (2.3)$$

A continuación se presentan los datos y la nomenclatura del modelo:

δ Es la profundidad máxima de penetración del oxígeno

D_e Es el coeficiente de difusión efectivo del oxígeno en agua a 35 °C ($3.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$)

C_{os} Concentración de oxígeno saturado en el agua (0.22 mol m^{-3})

r_o'' Tasa de consumo de oxígeno

μ Tasa específica de crecimiento (0.3 h^{-1})

ρ_x Densidad del micelio seco (300 kgm^{-3})

$Y_{x/O}$ Rendimiento gramo de biomasa por gramo de oxígeno ($1.16 \text{ Cmol.mol}^{-1}$)

J_o'' Flux de oxígeno en la biopelícula ($\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$)

La δ calculada con los datos anteriores y con la ecuación 2.1 es de $4.3 \times 10^{-5} \text{ m}$, comparable con la que midieron experimentalmente ($8.2 \times 10^{-5} \text{ m}$). Por otro lado, el *flux* máximo que podría haber en una biopelícula cuyos poros están llenos de agua, calculado con la ecuación 2.3 es de, $3.8 \times 10^{-5} \text{ molm}^{-2}\text{s}^{-1}$, también es comparable al que midieron ($2.8 \times 10^{-5} \text{ molm}^{-2}\text{s}^{-1}$).

2.7 Modelos de crecimiento fúngico superficial.

Nopharatana *et al.*, (1998) presentan un modelo de crecimiento de hongos sobre superficie. Las consideraciones del sistema son las siguientes:

- El crecimiento es uniforme en toda la superficie.
- El crecimiento se puede representar como una línea vertical.
- Las hifas no pueden penetrar en la solución de glucosa.
- La glucosa es el único nutriente limitante.
- El rendimiento $Y_{x/s}$ es constante.
- La difusión de oxígeno no limita el crecimiento.
- El crecimiento se puede modelar con la ecuación logística.
- La biomasa está limitada, por una concentración máxima, la cual podría corresponder a la máxima densidad de empacamiento.

Una representación de algunas consideraciones del modelo se muestra en la figura 5, se observa que el micelio no puede penetrar en el soporte, es decir, hay una membrana sobre la superficie que lo impide. También se observa que el micelio ha crecido de manera uniforme sobre la superficie, la flecha vertical indica que el micelio crece uniformemente en esa dirección.

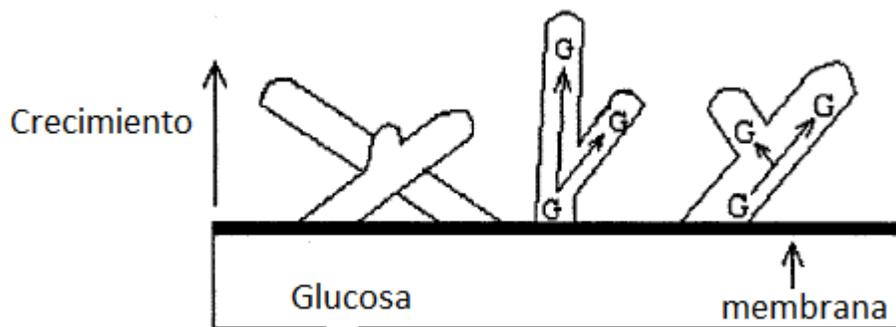


Figura 5. Representación de las consideraciones de un modelo de crecimiento fúngico en superficie (imagen modificada de Nopharatana *et al.*, 1998).

En el trabajo antes mencionado se sugiere que la velocidad de crecimiento (producción de vesículas, extensión apical, formación de membrana y pared celular) es dependiente de la concentración de sustrato, con base en los trabajos de Favela-Torres *et al.* (1998) la tasa de crecimiento no mostró diferencias al probar un amplio rango de glucosa ($12.5-100 \text{ gL}^{-1}$). Es probable que en concentraciones más bajas se pueda ver dicho efecto.

Por otro lado consideran (Nopharatana *et al.*, 1998) que la altura máxima a la que puede crecer el hongo es de 2 mm. Al respecto no se menciona bajo qué criterio se fijó la altura, ya que, en nuestro trabajo, encontramos alturas superiores a 2 mm. De igual manera, otros autores, con diferentes microorganismos, han encontrado que éstos pueden crecer a alturas superiores a 4 ó 5 mm sobre la superficie (Oostra *et al.*, 2001).

En la figura 6 se muestran los perfiles de un modelo de crecimiento fúngico, se observan dos fases de crecimiento bien diferenciadas: en la primera, aumenta la densidad de la superficie (en la altura cero), hasta alcanzar la máxima densidad de

empacamiento de la biomasa que, según la figura, podría ser 30 mg cm^{-3} . En la segunda fase, el incremento se observa en la altura, manteniéndose la densidad constante. En otras palabras, la capa de biomasa aumenta su altura una vez que alcanzó su densidad máxima y lo hace en capas con densidad constante.

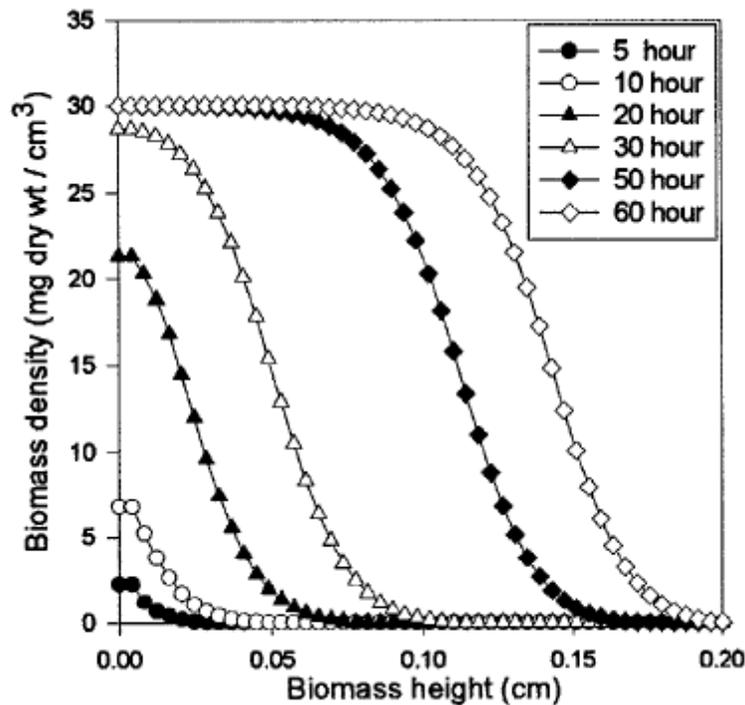


Figura 6. Densidad de la biomasa en función de la altura en un modelo de crecimiento fúngico en superficie (Nopharatana et al., 1998).

Rajagopalan y Modak (1995) sugieren que la biomasa desde el inicio crece con densidad constante, incrementando únicamente la altura. Esto implica que la glucosa puede difundir dentro de las hifas y también entre la biopelícula, y para el modelamiento, utilizan el coeficiente de difusión del oxígeno en agua, considerando al micelio como una película sumergida en agua, por lo tanto, se concluye que el

crecimiento está limitado por la difusión del oxígeno. Contrariamente, el modelo de Nopharatana *et al.* (1998) utiliza el coeficiente de difusión del oxígeno en aire, por lo que concluye que la difusión no es un paso limitante para el aumento de la biomasa que se encuentra en la superficie; sin embargo, lo podría ser para las hifas que penetran en el agar.

El trabajo de Nopharatana *et al.* (2003) muestra que *Rhizopus oligosporus*, crecido en PDA, penetra hasta 0.445 cm y que la máxima densidad medida a través de microscopía confocal es de 4.45 mgcm^{-3} , la cual se localiza a 0.075 cm por debajo de la superficie. Para la biomasa que crece sobre la superficie, se encontró que la densidad máxima fue de 39.54 mgcm^{-3} , la cual se encuentra sobre la superficie del agar. En ambos casos la densidad decae exponencialmente respecto a la altura (figura 7), la biomasa de la superficie tiene una altura de alrededor de 5 mm, y la mínima densidad se encuentra desde el primer milímetro. En el trabajo se sugiere que a partir de esta altura se encuentran las esporangiosporas.

Un decaimiento similar se observa en la densidad del micelio que penetra al agar. El trabajo anterior se justifica, considerando que las hifas aéreas contribuyen hasta en un 70 % del consumo de oxígeno (Rahardjo *et al.*, 2001), mientras que las hifas que penetran, son las encargadas de la liberación de enzimas, las cuales permitirán la hidrólisis de los polímeros que servirán como fuente de carbono.

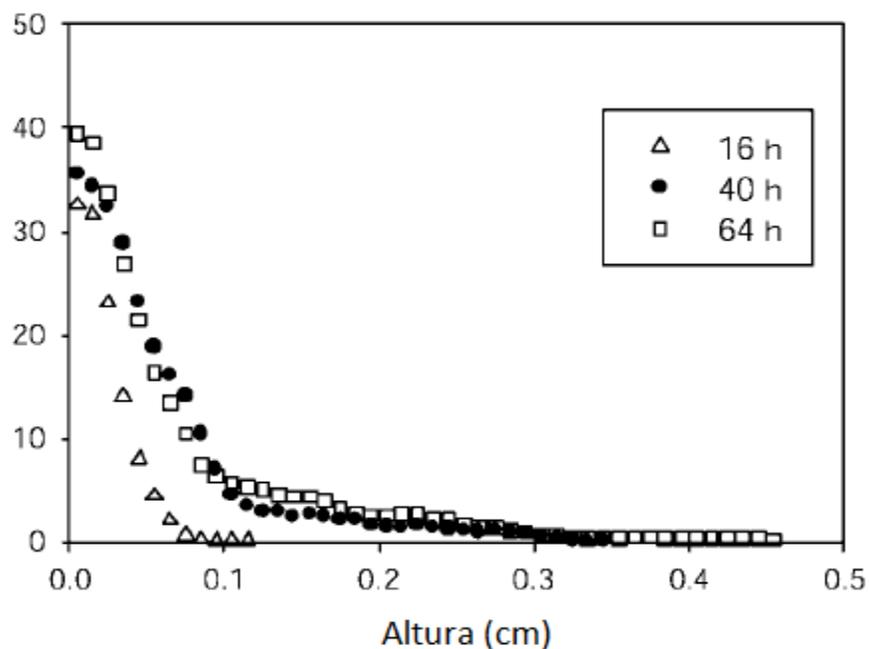


Figura 7. Densidad del micelio de *Rhizopus oligosporus* crecido en PDA en función de la altura (Figura modificada de Nopharatana et al., 2003).

2.8 Función fisiológica de las hifas aéreas.

Para el control de procesos en fermentación en medio sólido (FMS), la respiración de las hifas aéreas presenta un serio problema debido a que, como se ha mencionado, es proporcional a la producción de calor. La pregunta a resolver es ¿cuál es la función fisiológica de las hifas aéreas?, si son las productoras de los metabolitos, de las enzimas hidrolíticas o quizás suministran de oxígeno al micelio húmedo, la supresión de las hifas aéreas sería justificada si no tuviera alguna de las funciones antes mencionadas, ya que se disminuiría la producción de calor.

Rahardjo et al. (2005) muestran que la formación de hifas aéreas promueve la producción de α amilasa. Sus resultados sugieren que cuando se suprimió la

formación de hifas aéreas, la producción de biomasa y la actividad amilasa descendió a la mitad. Éste resultado indica que la función de las hifas es suministrar oxígeno al micelio vegetativo. Este hecho se reafirma con las mediciones que realizaron del *flux* de oxígeno. Se observa de manera muy clara que el *flux* en los cultivos con hifas aéreas de oxígeno es 4 veces mayor respecto a los cultivos sin hifas aéreas. Por lo tanto, es fiable decir que la función de las hifas aéreas es transportar oxígeno al micelio vegetativo y éste es quien produce las enzimas.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Identificar el comportamiento fisiológico de *Aspergillus niger*, respecto a la biosíntesis de biomasa, formación de gradientes y permeabilidad membranal, para mejorar el diseño de cultivos sobre superficies sólidas.

3.2 Objetivos particulares

Estimar la permeabilidad membranal en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*.

Identificar los gradientes de nutrientes axiales en cultivos de *Aspergillus niger* crecidos en superficie.

Evaluar el efecto de la disponibilidad de sustrato (mg de glucosa por cm² de superficie) sobre el rendimiento $Y_{X/S}$ en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*

IV. HIPÓTESIS

El cambio del diámetro hifal (d_H) observado en *Aspergillus niger* cuando crece con altas concentraciones de glucosa, permite calcular la permeabilidad membranal, quien regula el *flux* de sustrato.

En cultivos fúngicos en caja Petri, la imagenología obtenida por resonancia magnética nuclear permite estimar las diferencias axiales de nutrientes en el agar.

La eficiencia biosintética ($Y_{x/S}$) en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*, se correlaciona inversamente con la disponibilidad de sustrato, σ_0 , independientemente de que se modifique el volumen del medio o la concentración de sustrato.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el mejor entendimiento de este trabajo, la presente sección se ha dividido en tres apartados: 1. Espesores de biopelículas y rendimientos ($Y_{x/s}$) en cultivos superficiales, 2. Estimación del *flux* y permeabilidad en cultivos en caja Petri y 3. Medición de nutrientes por IRMN en caja Petri.

5.1 Rendimientos y espesores de biopelículas en cultivos superficiales.

Considerando el hecho de que en la biopelícula crecida sobre el agar, la glucosa y el oxígeno, migran en direcciones opuestas, planteamos la hipótesis de que el $Y_{x/s}$ es una función del espesor de la biopelícula, es decir, que las biopelículas delgadas tienen oxígeno y glucosa, por lo tanto, este tipo de cultivos tienen altos $Y_{x/s}$ (figura 8), contrariamente a lo que sucedería con biopelículas gruesas. Lo anterior sustentado con la evidencia de que la penetración de oxígeno en cultivos fúngicos es de alrededor de 80 μm (Oostra *et al.*, 2001).

Para ello, definimos la variable σ_o (mgcm^{-2}), es decir, la cantidad de materia por unidad de superficie de agar, la cual se puede modificar de dos maneras:

1. Aumentando la concentración de glucosa y manteniendo constante el volumen del medio.
2. Modificando el volumen del medio y fijando la concentración de glucosa S_0 ,

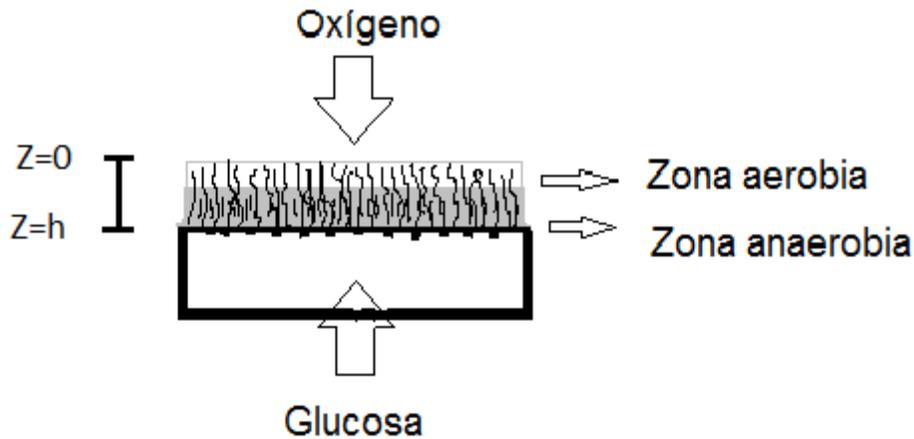


Figura 9. Difusión de oxígeno y glucosa en un cultivo fúngico crecido sobre una superficie sólida.

5.1.1 Unidades experimentales.

Se utilizaron cajas Petri de 9 cm de diámetro con el medio Kafert. Se diseñaron dos conjuntos de experimentos, en el primero el volumen fue constante (30 mL) y la fuente de variación para σ fue la glucosa (de 12.5 a 100 gL⁻¹), lo que equivale a una σ_0 de **6, 12, 24 y 48 mgcm⁻²**, respectivamente.

En el segundo conjunto de experimentos se modificó el volumen del medio: 10, 25 y 40 mL, manteniendo constante la glucosa a 100 gL⁻¹, para obtener σ_0 de **15, 40 y 63 mgcm⁻²**. De esta manera se abarcó un **rango de σ_0 entre 6 y 63 mgcm⁻²**.

5.1.2 Microorganismo.

En este trabajo se utilizó la cepa de *Aspergillus niger* C28eco3-13 reportada por Téllez-Jurado *et al.* (2006).

5.1.3 Conservación de la cepa.

La cepa fue conservada en sílica gel (Perkins, 1977; Loera-Corral *et al.*, 1999) para lo cual se propagó 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 Svelty 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 adicionaron 20 μL de suspensión de esporas (1×10^6 esporas mL^{-1}) 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.

5.1.4 Composición del medio de cultivo.

Para todos los experimentos se utilizó el medio propuesto por Kafert (1977). La única fuente de carbono en el medio fue glucosa de 12.5 a 100 gL^{-1} , la proporción de los demás componentes del medio, se adicionaron de manera proporcional a la concentración de glucosa, de tal manera que la proporción C/N se mantuvo constante (16 gC/gN), el pH inicial del medio fue de 6.5, como agente gelificante se

utilizó agar al 1.5 %. La composición química del medio para 100 gL⁻¹ de glucosa fue la siguiente: Sales (gL⁻¹): NaNO₃ (15), KCl (5.2), KH₂PO₄ (8.1), K₂HPO₄ (10.4), MgSO₄ · 7H₂O (5.2). Elementos traza (gL⁻¹): FeSO₄ · 7H₂O (0.052), EDTA (0.5), ZnSO₄ · 7H₂O (0.22), H₃BO₃ (0.11), MnCl₂ · 4H₂O (0.05), CoCl₂ · 6H₂O (0.016), CuSO₄ · 5H₂O (0.016), (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ · 4H₂O (0.1).

5.1.5 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 cambiara, por lo que, previo a su uso, se corroboró la velocidad de crecimiento radial (0.4 cm/día). Posteriormente, se extrajeron de las cajas Petri 4 circunferencias de agar con micelio (en condiciones de esterilidad), 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 10⁵ esporas/ mL de medio (alrededor de 200 µL).

5.1.6 Determinación de biomasa en cultivos superficiales.

Para la determinación de biomasa se vertió el agar de una caja Petri con 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 de intensidad 9 por 2 minutos, esto permitió fundir el agar y separar la biopelícula formada sobre el agar, después se filtró a través de membranas de celulosa Millipore (0.45 μm). El filtrado se recuperó en tubos Falcon. Posteriormente, se lavó la biomasa y la membrana 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.

5.1.7 Determinación de biomasa crecida sobre membranas de celofán.

Las mediciones de biomasa fueron corroboradas utilizando una membrana de celofán (figura 8), debido a la sospecha de que hubiera pérdidas de biomasa a causa del tratamiento térmico de la muestra.

Se utilizaron las unidades experimentales descritas anteriormente, se inoculó con la misma concentración de esporas pero, sobre una membrana de celofán adherida al agar, la cual se retiró a diferentes tiempos para medir la biomasa por gravimetría.

Previo a su uso, las membranas fueron lavadas con abundante agua tibia (aproximadamente 35°C), llevadas a peso constante y esterilizadas. Para adherirlas al agar fue necesario humedecerlas para que pudieran ser maleables, también se requirió utilizar una varilla de vidrio estéril para tender la membrana y evitar pliegues.

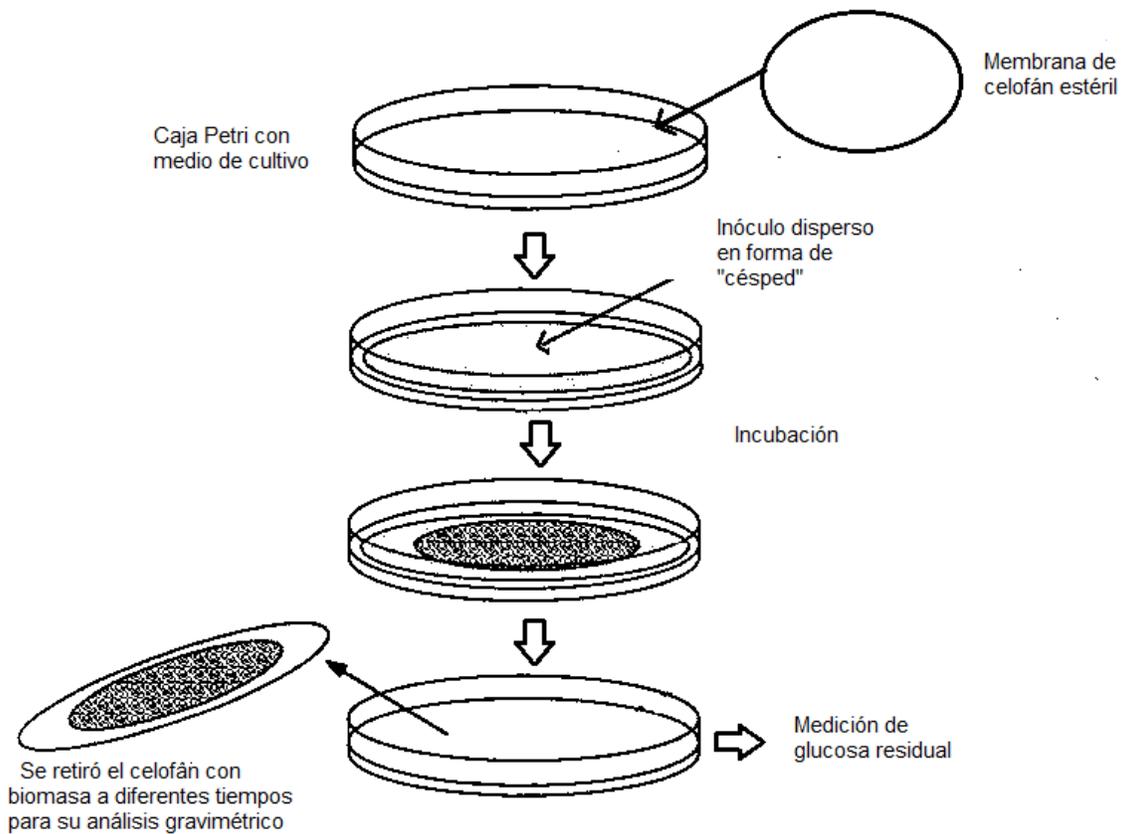


Figura 8. Representación de la metodología para cuantificar biomasa crecida sobre una membrana de celofán (Imagen modificada de Olsson, 1994)

5.1.8 Modelo logístico.

Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos se ajustaron con la ecuación logística (Gatto *et al.*, 1988).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} X \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) \quad (5.1)$$

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:

$$X = \frac{X_{\max}}{(1 + Ce^{-\mu t})} \quad (5.2)$$

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 Excel (MICROSOFT), a través de un procedimiento de minimización de las sumas de los errores.

5.1.9 Cuantificación de la glucosa residual en cultivos crecidos en agar.

El azúcar residual se midió a través de 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 mgL⁻¹ 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 en la determinación de biomasa) y 3 mL del reactivo de DNS, esta mezcla se llevó 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 (gL⁻¹ de glucosa), los promedios obtenidos, se ajustaron por la ecuación propuesta por Pirt (1967) que se muestra enseguida.

$$-\frac{ds}{dt} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dx}{dt} + mx \quad (5.3)$$

donde: S es la concentración de sustrato (gL^{-1}), $Y_{x/s}$ es el rendimiento ($\text{g} \times \text{g}^{-1}$) y m es el coeficiente de mantenimiento ($\text{g} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$), la solución de la ecuación anterior en función de X (biomasa gL^{-1}) es la siguiente:

$$S(t) = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_{x/s}} - \frac{mX_{\max}}{\mu_{\max}} \ln \left[\frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right] \quad (5.4)$$

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 $Y_{x/s}$.

5.1.10 Medición del espesor de la biopelícula.

Las mediciones de las biopelículas se realizaron a partir de los cultivos crecidos en “césped” con las σ_0 antes mencionadas. Se realizaron cortes perpendiculares a la biomasa con un bisturí. Se adquirieron imágenes de la biopelícula con una cámara OLYMPUS KP-D51/D50, incorporada a un microscopio OLYMPUS BX 40, las mediciones se realizaron a través del programa IMAGE J. Se hicieron aproximadamente 150 mediciones para cada σ_0 a partir de tres cajas Petri.

5.2 Estimación del *flux* y permeabilidad en cultivos en caja Petri.

Para calcular el *flux* de glucosa, se realizaron curvas de crecimiento y de consumo de glucosa las cuales fueron ajustadas con ecuaciones empíricas (Logística y Pirt), también fue necesario estimar el área de transferencia de nutrientes, para ello, se realizaron mediciones microscópicas de los diámetros hifales y estimaciones de la fracción de agua en la biomasa. Las mediciones de biomasa y azúcares se realizaron de acuerdo a lo descrito en las secciones 5.1.6-5.1.9

5.2.1 Unidades experimentales en cultivos superficiales.

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

5.2.2 Medición del diámetro hifal.

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 μ L de suspensión de esporas (la utilizada en las cinéticas de producción de biomasa) en el centro de la caja 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 identificar las puntas era muy complicado.

La adquisición de las imágenes se realizó directamente sobre la superficie de agar después de 32 h de haber inoculado (antes de la esporulación), ya que la esporulación impedía observar con claridad las hifas. Se utilizó el objetivo 40 X para enfocar la hifa (cerca de la punta), se digitalizaron 45 imágenes de diferentes hifas distales que se encontraban en la periferia de la colonia, éstas 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. La calibración se realizó con una cámara de Neubauer.

5.2.3 Desarrollo teórico.

Se calculó el *flux* de glucosa a partir de la siguiente ecuación:

$$J = \frac{q_s}{A_x} \quad (5.5)$$

donde: J es el *flux* de glucosa en el cultivo fúngico ($\text{gcm}^{-2}\text{s}^{-1}$), A_x es el área hifal por unidad de biomasa ($\text{cm}^2\text{g}_x^{-1}$), q_s el consumo específico de sustrato ($\text{g}_s\text{g}_x^{-1}\text{h}^{-1}$) y se calculó como el cociente $\mu_{\max} / Y_{x/s}$; ambos parámetros fueron obtenidos a partir de los ajustes realizados con los modelos empíricos. El A_x se obtuvo de la siguiente forma: Se planteó la posibilidad de estimar el área disponible de transferencia de nutrientes, a partir de medidas microscópicas de los diámetros

hifales, 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.

$$A_x = \frac{4}{d_H \rho (1 - X_{H_2O})} \quad (5.6)$$

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.

Por otro lado, 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.

$$J_s = -[S]U_s (d\bar{G}_s/dz) \quad (5.7)$$

donde J_s es el *flux* de S, z 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.

$$\Delta\bar{G}_s = RT \ln[S] \quad (5.8)$$

Cuando el soluto es una molécula sin carga eléctrica (glucosa, en este caso), $\Delta \bar{G}_S$ está dada por la ecuación 5.8 que al sustituir en la ecuación 5.7, la ecuación de Nernst-Planck, se reduce a la siguiente:

$$J_S = -D_S (d[S]/dz) \quad (5.9)$$

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 $d[S]/dz$.

Para una membrana de espesor z, la ecuación (5.9) se reduce aproximadamente a:

$$J_S = \frac{D_S}{z} ([S]_{fuera} - [S]_{dentro}) = P_S ([S]_{fuera} - [S]_{dentro}) \quad (5.10)$$

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 arreglar las ecuaciones 5.5, 5.6 y 5.10 se obtiene la siguiente:

$$P_S = \frac{d_H \rho \mu_{\max} (1 - X_{H_2O})}{4Y_{x/s} ([S]_{fuera} - [S]_{dentro})} \quad (5.11)$$

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. Con la ecuación anterior es posible calcular la permeabilidad aparente de la membrana

a diferentes S_0 , en términos de variables medibles como el $Y_{x/s}$ y μ_{max} , además de una variable fisiológica d_H , todas dependientes de S_0 .

5.3 Medición de nutrientes por IRMN en caja Petri.

A fin de comprender los factores que limitan el metabolismo en caja Petri, se planteó la posibilidad de medir la concentración axial de nutrientes en cultivos superficiales de *A. niger*. Para ello se midió el tiempo de recuperación (T_1) a través de imágenes obtenidas por resonancia magnética nuclear (IRMN). Previamente se realizó una curva con los T_1 , a diferentes concentraciones de nutrientes.

5.3.1 Unidades experimentales usadas en IRMN.

Se realizaron dos tipos de experimentos: en los primeros se midió el T_1 , en cajas Petri sin inocular, sólo modificando todos los nutrientes de manera proporcional a S_0 , con el objetivo de explorar la sensibilidad de T_1 a la concentración de glucosa, en los segundos se midió T_1 a una S_0 , pero con *Aspergillus niger* inoculado. Adicionalmente, se midió la intensidad de la señal.

Para todos los experimentos se utilizaron cajas Petri de 5 cm de diámetro con 10 mL de medio de cultivo, para obtener una profundidad aproximada de 0.5 cm. En los experimentos donde se inoculó, se realizó con una concentración 1×10^5 esporas mL^{-1} .

5.3.2 Determinación de T_1 .

Se obtuvo T_1 para cada concentración de glucosa (12.5, 25, 50 y 100 gL^{-1}), los experimentos se realizaron con un Sistema de Resonancia Magnética de 7 T marca

Varian del Centro Nacional de Investigación en Instrumentación e Imagenología Médica (CI3M) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM - I). Se obtuvieron las series de imágenes con los siguientes parámetros: Secuencia SEMS, corte coronal, TR = 3500 ms, TE = 14.52 ms, matriz de 128x128, FOV = 70x70 mm, arreglo de T₁: tamaño=15, inicio=0.007 s, fin=1.2 s, incremento=0.0852 s. Para cada serie de imágenes de distinta concentración se obtuvo una Región de Interés (ROI), de la cual el sistema genera un archivo que contiene los datos de la intensidad para cada una de las imágenes de una concentración. Las intensidades son graficadas como se mostró en la figura 3 (página 12).

Los puntos obtenidos con el sistema se aproximaron con una ecuación a través de un programa en MATLAB®, el cual ajusta los puntos correspondientes al par de datos considerando el tamaño del arreglo, el tiempo de inicio, fin y el incremento para obtener como salida el T₁, la gráfica con los puntos y la curva optimizada. Para aproximar la curva se utilizan los puntos correspondientes a la curva ascendente que permite obtener el cruce por cero.

5.3.3 Determinación de nitratos.

Fue necesario realizar una cinética de consumo de nitratos, para ello se utilizaron las unidades experimentales descritas en la sección 5.2.1. En intervalos de tiempos regulares se fundió el agar (como se describió en la sección 5.1.6) y se almacenaron 10 mL de muestra a 4°C en tubos Falcon, posteriormente, se midió la concentración de nitratos por UV a 220 nm. En todas las mediciones se corroboró que las interferencias por materia orgánica fueran menores al 10 %, para ello se realizaron mediciones a 270 nm (Standart Methods, 2005).

5.4 Tratamiento de la información y análisis estadístico.

De los datos provenientes de las cinéticas de biomasa y consumo de glucosa (se realizaron por triplicado) se obtuvieron los Yx/s y sus respectivas desviaciones estándar. A partir de los ajustes con la ecuación logística y de Pirt de cada serie de datos, se estimó la μ_{max} , los q_s se calcularon a partir de los promedios de las μ_{max} y de los Yx/s .

Los flux se obtuvieron a partir de los promedios de q_s y d_H . La permeabilidad aparente se calculó con los promedios anteriores y para cada d_H , por esta razón en la gráfica aparecen las desviaciones estándar. Las comparaciones de medias se realizaron por la prueba de Tukey ($p < 0.05$) con el software minitab 15.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Densidad volumétrica (ρ_V).

Para explicar los posibles mecanismos de crecimiento de la biomasa, se han propuesto dos escenarios teóricos (Nopharatana *et al.*, 1998):

- a) El primero, supone que la densidad de la biomasa (ρ_v) es prácticamente constante, por lo tanto, el aumento de la biomasa se debe a la superposición de biocapas muy delgadas que rápidamente alcanzan la densidad máxima.
- b) El segundo, supone que se forma una primera lámina de baja densidad. Posteriormente, la biomasa aumenta su densidad dentro de esta lámina hasta alcanzar su máxima capacidad de empacamiento. Después, la densidad por encima de la primera lámina no alcanza una densidad uniforme. Más bien, se extiende hacia arriba de la superficie sólida con una densidad que decrece como una función exponencial de la coordenada vertical (z).

Los trabajos experimentales de Nopharatana *et al.* (2003), Oostra *et al.* (2001) y Camacho-Díaz *et al.* (2010) usando cultivos de superficie de *Rhizopus oligosporus*, apoyaron el segundo modelo.

En la ordenada principal de la figura 10 se muestran los valores medidos de la densidad superficial ρ_A , cuando el sustrato se había agotado. La tendencia de esos valores siguió una relación hiperbólica bien definida ($R^2 = 0.9613$).

$$\rho_A = \frac{\varepsilon\sigma_0}{K_\rho + \sigma_0} \quad (6.1)$$

Dónde, ε , es el valor supremo, $\varepsilon = 14.7 \text{ mgcm}^{-2}$ y, K_ρ , es la constante de saturación, $K_\rho = 28.1 \text{ mgcm}^{-2}$. Al valor de, ε , se le llama supremo porque es el máximo de ρ_A para todos los experimentos y se obtiene cuando σ_0 es muy grande y el sustrato ha sido agotado. Este valor es cercano al medido por Larralde-Corona *et al.* (1997) $\varepsilon =$

13 mgcm⁻², con un valor estimado de $\sigma_0 = 70 \text{ mgcm}^{-2}$ ($S_0 = 0.3 \text{ gcm}^{-3}$ y $a/v \approx 4.2 \text{ cm}^{-1}$) usando otra cepa de *A. niger*.

En el eje secundario de las ordenadas, se muestran los valores finales del espesor de la biocapa (h) para cada experimento con valor inicial, σ_0 , que también siguió una relación hiperbólica similar a la de ρ_A . La explicación más simple de ambas tendencias es suponer que la densidad volumétrica promedio, $\rho_{Vav} = \rho_A/h$, fue aproximadamente constante. Para probar esa hipótesis se calcularon dichos cocientes y arrojaron un valor promedio $\rho_{Vav} = 48.4 \pm 6.05 \text{ mgcm}^{-3}$ (C.V. = 12%). Otra forma de ver la misma relación es considerar que la tendencia de h , se puede calcular, usando la siguiente ecuación (6.2).

$$\eta = \frac{(\varepsilon/\rho^*_V)\sigma_0}{K_\rho + \sigma_0} \quad (6.2)$$

Para que η siga los valores de h , se requiere estimar el valor de ρ_V^* que minimice la suma de los errores cuadrados $\mathfrak{F} = \sum(\eta_i - h_i)^2$. La tendencia obtenida se muestra como línea sólida en la Fig. 10 con $R^2 = 0.9448$. Los valores estimados fueron $\rho_V^* = 47.8 \text{ mgcm}^{-3}$ y $h_{sup} = 3.25 \text{ mm}$.

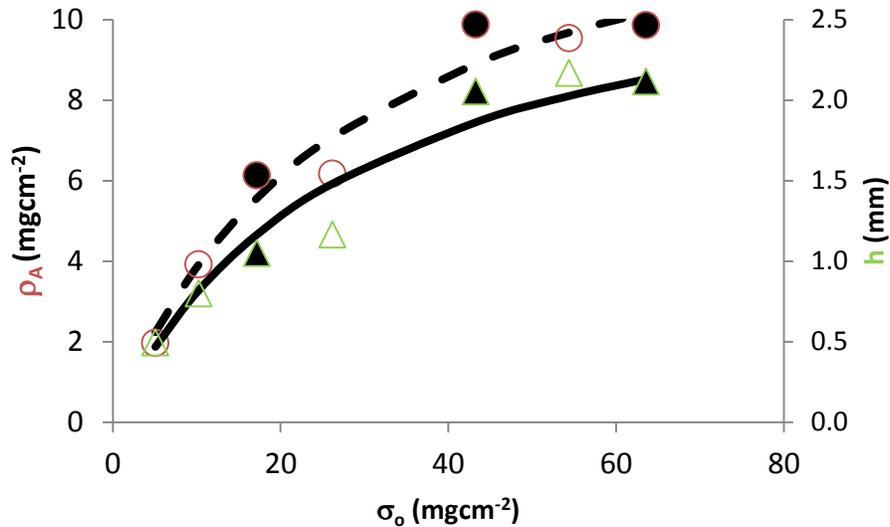


Figura 10. Valores finales de cada experimento en cultivos superficiales de *A. niger*, con valor inicial, σ_0 , para la densidad superficial de la biomasa máxima (ρ_A ; representado en eje vertical izquierdo por, \circ) y espesor de la biocapa (h ; representado en el eje vertical derecho, Δ). Los marcadores sólidos corresponden a los experimentos en donde la fuente de variación de σ fue V (10, 25 y 40 mL), los marcadores vacíos corresponden a los experimentos en donde la fuente de variación fue S_0 . La línea interrumpida corresponde a la ecuación 6.1 y la línea continua a la ecuación 6.2, con los valores indicados en el texto.

Por lo tanto, siguiendo el consejo de Occam¹, consideramos que $\varepsilon = \rho_{Vav}h_{sup} = 15$ mgcm⁻². Dicho de otra forma, *A. niger* crece sobre la placa de agar, con densidad volumétrica, ρ_V , aproximadamente uniforme hasta alcanzar un espesor máximo h , que es una función de saturación de σ_0 y que alcanza un valor supremo h_{sup} .

Los datos aquí presentados indican que *A. niger* tiene un modelo de crecimiento con densidad de micelio uniforme que es distinto al de *Rhizopus oligosporus* que estudiado ampliamente por otros autores (Nopharatana *et al.*, 2003; Oostra *et al.*,

¹ *Pluralitas non est ponenda sine necessitate* (la pluralidad no se debe postular sin necesidad). También se llama la ley de la parsimonia. Esto quiere decir que se debe preferir el modelo más simple que explique los fenómenos estudiados.

2001; Camacho-Díaz *et al.*, 2010) pero es el mismo del modelo de Nopharatana *et al.*, (1998). Esta discrepancia pudiera deberse al tipo de respiración de cada organismo. Según Oostra *et al.* (2001) *Rhizopus oligosporus* tiene una respiración preponderante por el micelio vegetativo y quizás por ello se ha adaptado a crecer con un micelio de baja densidad. Según Rahardjo *et al.* (2001, 2005), *Aspergillus oryzae* tiene una respiración preponderante por el micelio aéreo. Lo cual ha dado lugar a un crecimiento con mayor densidad de micelio, porque las hifas aéreas podrían tolerar una menor porosidad debido a que tienen hidrofobinas, que ayudan a solubilizar los gases que son más solubles en la fase lipídica, como el oxígeno. Este aspecto del metabolismo de los hongos filamentosos ya está siendo aplicado para optimizar la utilización de productos volátiles hidrofóbicos por cultivos de superficie de *A. niger* (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003) o de *Rhinoctadiella similis* (Vigueras *et al.*, 2009) y podría ser materia de futuros estudios comparativos de los cultivos de superficie de distintos hongos filamentosos. Pues según lo han mostrado (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2003) la fisiología de la respiración y el metabolismo de *A. niger* sobre superficies sólidas, permite degradar tres veces más rápido los hidrocarburos, a comparación de los cultivos sumergidos.

Queda por explicarse cómo se transporta el sustrato desde la superficie sólida hasta las hifas más externas, expuestas al aire. Este proceso ha sido estudiado por (Olsson *et al.* 1994) quienes demostraron que la glucosa, el fosfato y el nitrato radiactivos viajan por dentro de las hifas del micelio, siguiendo un proceso de difusión pasiva, puesto que las constantes de difusividad tuvieron un valor semejante al que se midió en el medio de cultivo sin micelio. De esta manera, el

micelio de las capas inferiores de la biocapa estaría formando una red de conducción difusiva de los nutrientes que son consumidos por las capas superiores más activas. En esta tesis no se midieron los productos alternativos del metabolismo pero es sabido que *A. niger* transforma la glucosa en ácido cítrico y otros polioles, cuando la tensión de oxígeno es baja (Diano *et al.*, 2006) o cuando la concentración de glucosa es alta (Gutiérrez-Rojas *et al.*, 1995). Esta consideración es de gran importancia para explicar la reducción de los rendimientos celulares cuando se producen capas relativamente gruesas como se verá en la siguiente sección.

6.2 El rendimiento, $Y_{x/s}$, como función de σ_0 en cultivos sólidos y superficiales.

Favela-Torres *et al.* (1998) compararon los rendimientos de *Aspergillus niger* cultivados en matraces agitados, placas de agar y en columnas con perlititas de Amberlita y con distintas concentraciones iniciales de glucosa ($30 \text{ gL}^{-1} < S_0 < 300 \text{ gL}^{-1}$). En todos los casos, el valor del rendimiento, $Y_{x/s}$, decreció con valores crecientes de glucosa, especialmente si $S_0 > 100 \text{ gL}^{-1}$. Pero para valores menores de S_0 , los rendimientos con Amberlita fueron mayores que los de las placas de agar y estos que los matraces agitados. En especial, llamó la atención que *A. niger* tuviese mayores rendimientos en una columna empacada que tiene restricciones de difusión entre las partículas, a comparación con las placas de agar que aparentemente no las tienen. Una posible explicación de estas diferencias entre distintos cultivos sobre superficies sólidas estaría ligada a las diferencias en el área específica, $\alpha = A/V$, de los soportes sólidos que fueron de $\alpha = 2.6 \text{ cm}^{-1}$ en agar ($78.5 \text{ cm}^2/30 \text{ cm}^3$) y de $\alpha = 100 \text{ cm}^{-1}$ para las perlas de Amberlita (6/0.06cm). Esto justifica el diseño presentado en Materiales y Métodos, en donde se varió S_0 (gL^{-1})

= 12.5, 25.0, 50.0, 100.0 con placas donde $\alpha = 2.2 \text{ cm}^{-1}$ y experimentos con $S_0 = 100 \text{ gL}^{-1}$ y $\alpha (\text{cm}^{-1}) = 1.59, 2.54, 6.36$.

Para analizar estos resultados conviene relacionarlos con los de la sección precedente a través del balance de materia y de la definición del rendimiento según se muestra en la siguiente ecuación.

$$Y_{X/S} = \frac{\rho_A}{f\sigma_0} \quad (6.3)$$

donde, f es la fracción del sustrato inicial (σ_0) que fue utilizado en el curso de cada experimento, según se indicó en Materiales y Métodos. Al sustituir ρ_A de (6.1) en 6.3 y suponiendo que $f \approx 1$, se obtiene 6.4

$$Y_{X/S} = \frac{\varepsilon}{K_p + \sigma_0} \quad (6.4)$$

Tomando los inversos de ambos lados de (6.4) se obtiene una expresión lineal en σ_0 , como se muestra:

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{K_p}{\varepsilon} + \frac{\sigma_0}{\varepsilon} \quad (6.5)$$

En la Fig. 11 se muestra la gráfica experimental con los valores, $R^2 = 0.9652$ y con los correspondientes valores de $\varepsilon K_p^{-1} = 0.516$, $\varepsilon = 15.55 \text{ mgcm}^{-2}$.

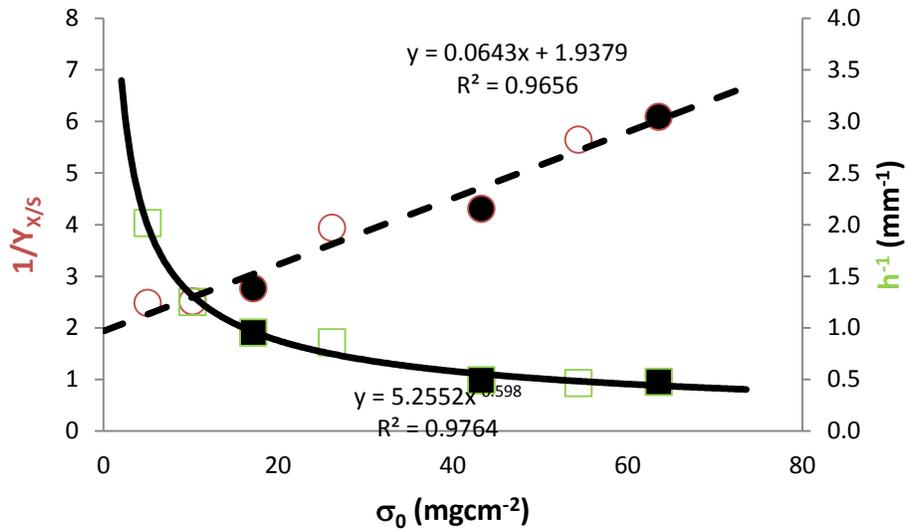


Figura 11. Inverso del rendimiento, $1/Y_{x/s}$ (-O-) en función de σ_0 en cultivos superficiales de *A. niger* a diferentes niveles de glucosa inicial, los símbolos \square corresponden al inverso del espesor de la biopelícula (h^{-1}). La notación de los símbolos llenos y vacíos es la descrita en la figura 10.

El valor del inverso del intercepto con las ordenadas se aproxima mucho al valor $Y_0 = 0.5$, que es el valor que se ha medido para los cultivos aeróbicos de distintos microorganismos cultivados con glucosa como fuente de carbono (Heijnen y Roels, 1981). Esto justifica identificar $Y_0 = \varepsilon K_p^{-1}$ y permite aprovechar este resultado para el balance del sustrato desarrollado en la siguiente sección.

La figura 11 Indica que la relación $A/V=1/h$ de la biopelícula sigue una tendencia contraria de la recta para, $1/Y_{x/s}$. Así, cuando el rendimiento es bajo ($1/Y_{x/s}$ elevado) la relación A/V de la biomasa es mínima, y viceversa. Esto permite ligar los dos procesos: una reducción del rendimiento, $Y_{x/s}$, y el aumento del metabolismo anaerobio (Diano *et al.*, 2006). Cabe mencionarse que, si bien el espesor de la biocapa ya ha sido medida (Oostra *et al.*, 2001; Nopharatana *et al.*, 2003) no se ha

prestado atención a sus implicaciones en el $Y_{x/s}$, incluso, en los modelos de crecimiento se ha considerado constante e independiente de la A/V de la biomasa (Nopharatana *et al.*, 1998).

6.3 Consideraciones para simular los cultivos sobre soportes porosos en caja Petri.

Una posible aplicación de los análisis realizados, es la simulación del cultivo sobre soportes porosos en caja Petri. Nuestra propuesta es igualar la disponibilidad de sustrato, σ_0 , para ello, es necesario considerar el espesor del medio de cultivo que se adhiere al soporte poroso. Por ejemplo, en un cultivo sólido realizado sobre espuma de poliuretano (PUF), el medio se adhiere al formando películas de un espesor de $L \sim 60 \mu\text{m}$ (Viniegra-González *et al.*, 2003). Si el medio de cultivo tiene una $S_0 = 50 \text{ gL}^{-1}$, entonces la disponibilidad de sustrato (σ_0) será:

$$\sigma_0 = \frac{S_0}{[A/V]} = \frac{S_0}{1/L} = 0.3 \text{ mgcm}^{-2} \quad (6.6)$$

Por lo tanto, para simular el cultivo sobre soportes porosos en caja Petri, L y S_0 del medio deben corresponder a la σ_0 calculada, que podría ser 3 mm y 1 gL^{-1} , respectivamente. En otras palabras, la simulación del cultivo sobre soportes porosos en caja Petri se puede realizar en la medida en que se iguale la disponibilidad de sustrato, definida en la ecuación 6.6.

6.4 Tamaño óptimo de partícula para cultivos en soportes sólidos.

En la sección 6.2 se mostró que existe una relación inversa entre la disponibilidad de sustrato, σ_0 , y la eficiencia de biosíntesis de biomasa ($Y_{x/s}$), también se explicó

que la densidad del micelio, ρ_v , se puede considerar constante por lo tanto, independiente de σ_0 . Derivado del balance de materia (apéndice 1) y de las propiedades anteriores, se obtuvieron 3 rectas (figura 12) que sirven para diseñar el tamaño de partícula óptimo para la biosíntesis de biomasa, cada recta corresponde a un soporte con geometría diferente (esferas o cubos, cilindros y placas). En la figura 12, la ordenada es la relación L/h_c . L representa la magnitud del radio, diámetro o espesor de la figura geométrica (esfera, cilindro o placa), h_c es el espesor crítico de la biopelícula para estar oxigenada, es decir, cuando el espesor de la biopelícula supera h_c , habrá fracciones del cultivo en condiciones de anaerobiosis. La abscisa es un valor adimensional $C = Y_{max} S_0/\rho_v$, Y_{max} , ρ_v , se pueden estimar en caja Petri, dicho de otra manera, es posible optimizar el rendimiento en cultivos en donde se utilicen soportes con diferentes geometrías, a través de las relaciones obtenidas a partir del balance de materia en caja Petri.

Por ejemplo, con algunos de nuestros resultados podríamos estimar el tamaño óptimo de los soportes para la biosíntesis. El Y_{max} podría ser 0.5 (discutido en la sección 6.2), en los cultivos en medio sólido suelen emplearse $S_0 = 0.1 \text{ g mL}^{-1}$ (Favela-Torres et al., 1998), en cuanto a la ρ_v , el trabajo de Nopharatana *et al.* (2003) sugiere un valor de 0.04 g cm^{-3} . Derivado de nuestro trabajo podemos sugerir 0.05 g cm^{-3} . Con estos valores se obtiene un valor para C de 0.25, luego, interpolando o usando las ecuaciones del apéndice 1 se obtienen los valores para $L h_c^{-1}$ (4, 8.5 y 13) por lo tanto: $L = 0.4 \text{ mm}$, $d = 0.85 \text{ mm}$, $r = 1.3 \text{ mm}$.

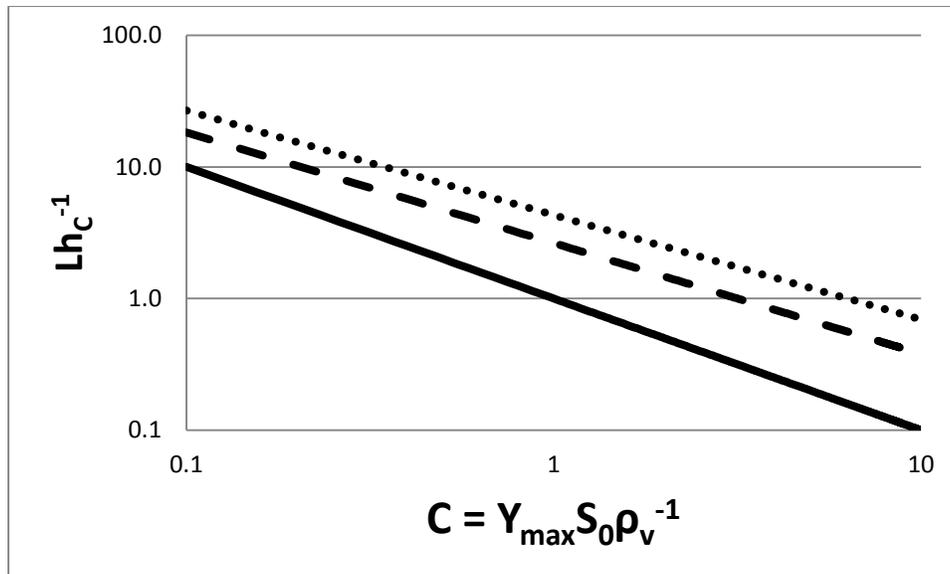


Figura 12. Módulo de longitudes, L/hC , en función del módulo de biomasa, $C = Y_{max}S_0/\rho_v$, para obtener el tamaño óptimo de partículas como soportes sólidos con diferentes geometrías: (---) Radio de un soporte esférico; (- - -) Diámetro de un cilindro y (—) Espesor de una placa.

6.5 Modelo matemático del crecimiento de hongos sobre superficies sólidas.

La ecuación 6.7 modela el cambio de biomasa, X , respecto al tiempo. Debe notarse que el balance de materia de la biomasa se realiza en términos de la biomasa X distribuida uniformemente en una superficie, A , lo cual se logra si se dispersan homogéneamente las esporas de un cultivo sincrónico. Por lo tanto: $X = A\rho_A$

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[1 - \frac{X}{X_M} \right] X \quad (6.7)$$

Por otro lado, el consumo de sustrato lo representamos con la ecuación 6.8. Aquí el sustrato está inicialmente distribuido homogéneamente en un volumen, V , con

una concentración inicial, S_0 . Por lo tanto, la cantidad total de sustrato es $Q_0 = VS_0$ y el consumo está dado por:

$$-\frac{dQ}{dt} = \frac{1}{Y_0} \frac{dX}{dt} + mX \quad (6.8)$$

Al dividir la ecuación de consumo de sustrato por la de crecimiento e integrando al final del experimento se obtiene una ecuación en la que se elimina el tiempo como variable.

$$(Q_0 - Q) = \frac{X - X_0}{Y_0} + \frac{\mu X_M}{m} \ln \left[\frac{1 - X_0/X_M}{1 - X/X_M} \right] \quad (6.9)$$

Por arreglo de la ecuación, se tiene

$$\frac{(Q_0 - Q)}{Q_0} = \frac{X - X_0}{Y_0 Q_0} + \frac{m X_M}{\mu Q_0} \ln \left[\frac{1 - X_0/X_M}{1 - X/X_M} \right] \quad (6.10)$$

Suponiendo $X_M > X \gg X_0$; y definiendo: $f = (Q_0 - Q)/Q_0$; $\zeta = X/X_M$

$$f = \frac{\zeta X_M}{Y_0 Q_0} + \frac{m X_M}{\mu Q_0} \ln \left[\frac{1}{1 - \zeta} \right] \quad (6.11)$$

Al final del experimento, cuando se produjo casi toda la biomasa posible, $\zeta = 0.99996$.

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{f Q_0}{X_M} = \frac{\zeta}{Y_0} + \frac{m}{\mu} \ln \left[\frac{1}{1 - \zeta} \right] = \frac{1}{Y_0} + 10 \frac{m}{\mu} \quad (6.12)$$

Este análisis muestra que el inverso del rendimiento aparente $Y_{X/S}^{-1} = f S_0/X_M$, al final del proceso ($\zeta \rightarrow 1$) depende del cociente, m/μ , pero no del valor absoluto de μ . Por ejemplo, de la proporción del metabolismo que se fue a biosíntesis o a

mantenimiento, pero no de la velocidad en que se llevó a cabo el proceso. Esto ocurre porque se está evaluando el resultado final y no el tiempo en que este proceso se llevó a cabo. Si las velocidades son similares, entonces el factor dominante que afecta al rendimiento será esa proporción. Si el grosor de la capa fúngica es mayor que el espesor de la penetración del oxígeno, la mayor parte del metabolismo será anaerobio, con un menor rendimiento de la biomasa.

En una caja Petri, el sustrato inicial está uniformemente distribuido en el volumen V del soporte y la biomasa sembrada por una distribución homogénea de esporas está dispersa en un área A . Llamando ρ_{MA} a la densidad superficial promedio de la biomasa (cantidad de biomasa entre el área), se obtiene:

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{fS_0V}{\rho_{MA}A} \approx \frac{1}{Y_0} + 3 \frac{m}{\mu} \quad (6.13)$$

Al definir, $\sigma_0 = S_0V/A$, se obtiene:

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{f\sigma_0}{\rho_{MA}} \approx \frac{1}{Y_0} + 3 \frac{m}{\mu} \quad (6.14)$$

Como empíricamente se observa que

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{f\sigma_0}{\rho_{MA}} = \frac{1}{Y_0} + \frac{\sigma_0}{E} \quad (6.15)$$

La cantidad, ρ_{MA} , medida al final del experimento se obtiene dividiendo la cantidad de la biomasa en gramos de sólidos, por el área de la placa de agar que está definida por la geometría de la placa.

Se puede deducir que el cociente, m/μ tiene las dimensiones de g_s/g_x , y de la definición de σ_0 (g_{scm}^{-2}), la constante ε deberá tener las dimensiones de $g_x \text{ cm}^{-2}$. En este caso el factor tiempo ya no está en la ecuación, pues se trata del resultado final del experimento.

La ecuación 6.15 es empírica y proviene de la correlación numérica entre siete experimentos con tres repeticiones en cada punto de cada experimento y ocho mediciones de biomasa y sustrato hechas en forma independiente (descritos en materiales y métodos). El coeficiente de correlación es alto ($R^2 = 0.96$, figura 11) y por lo tanto, se puede deducir que la tendencia lineal $1/Y_{X/S} \propto \sigma_0$, es confiable, pues con siete puntos bien alineados, es legítima la evaluación de dos parámetros.

La tendencia de h mostrada en la figura 10 también se puede modelar con la siguiente ecuación empírica.

$$h = \frac{h_M \sigma_0}{K_\sigma + \sigma_0} \quad (6.16)$$

Si se define una densidad volumétrica promedio de la biomasa, $\rho_M = \rho_{MA} h^{-1}$, al substituirse el valor de ρ_{MA} en la ecuación de balance se obtiene, suponiendo $f = 1$,

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{(K_\sigma + \sigma_0)}{h_M \rho_V} = \frac{1}{Y_0} + \frac{\sigma_0}{\varepsilon} \quad (6.17)$$

Para identificar términos se divide el lado izquierdo por K_σ y se obtiene:

$$Y_0 = h_M \rho_V / K_\sigma \quad (6.18)$$

$$\varepsilon = h_M \rho_V \quad (6.19)$$

$$Y_0 = \varepsilon/K_\sigma \quad (6.20)$$

Como el valor de Y_0 , depende de la fuente de carbono y la disponibilidad del oxígeno, se puede evaluar por separado para muchos tipos de microorganismos. Por ejemplo: con glucosa y en condiciones aerobias, $Y_0 = 1/2$. Esto indica que la constante, ε , define la máxima densidad de biomasa por unidad de superficie que podría obtenerse con una cepa microbiana dada y que la constante de saturación K_σ es proporcional a esa constante.

Estos resultados no son obvios sin tener en cuenta las mediciones aquí descritas y por lo tanto, permiten deducir propiedades fisiológicas del crecimiento de los hongos.

1. Debido a que las curvas de biomasa por unidad de superficie (ρ_A), es prácticamente paralela a la curva del espesor de la biopelícula (h), ambas respecto a la disponibilidad de sustrato inicial (σ_0) (datos mostrados en la sección 6.1), es posible deducir que: **la densidad volumétrica final es independiente de la concentración del sustrato y de su disponibilidad por unidad de superficie del soporte.**
2. Que el **espesor final** de la biopelícula se puede describir con una **función de saturación** con respecto a la disponibilidad del sustrato por unidad de superficie del soporte (figura 10).
3. El balance de materia, indica que el rendimiento se debe comportar como:

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_0} + \frac{\sigma_0}{\varepsilon}, \text{ lo cual es confirmado con los datos experimentales (figura 11).}$$

Esto quiere decir que la **eficiencia para la biosíntesis decrece conforme se aumenta la disponibilidad inicial del sustrato** por unidad de superficie del soporte.

4. El análisis de las ecuaciones empíricas (ecuación 6.20) indica que hay una constante de eficiencia de la producción de la **biomasa** por unidad de superficie que está definida por el **máximo espesor posible** de la capa del micelio, con una **densidad volumétrica** dada.

Esas cuatro propiedades de los micelios crecidos sobre una superficie sólida son de importancia para el diseño de sistemas de cultivo fúngico sobre superficie sólida. Aquí no se estudiaron las restricciones que habría entre partículas sólidas empacadas, pues se utilizaron placas de agar. Las restricciones asociadas con el empacamiento y ligadas a la difusión de calor y de materia en un reactor empacado, producirán otras restricciones que tendrán que investigarse en su momento.

6.6 Estimación del flux y permeabilidad membranal en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*.

En la presente sección presentaremos y analizaremos los resultados de los experimentos cuyo objetivo fue estimar el *flux* y la permeabilidad membranal en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*. Para lo cual se realizaron 4 cinéticas de crecimiento y consumo de sustrato a diferentes concentraciones de glucosa (12.5, 25, 50 y 100 gL⁻¹), además se midió el diámetro de las hifas (d_H). Con los datos anteriores, con los ajustes con la ecuación logística y Pirt y con el modelo de difusión simple de Fick, se calculó el *flux* de glucosa y la permeabilidad aparente del sustrato.

6.6.1 Análisis semi-estructurado del metabolismo de los cultivos superficiales en función de sus rendimientos.

Lo primero que analizaremos es el efecto de la concentración de glucosa (S_0) en el rendimiento $Y_{x/s}$. A fin de complementar los resultados de la sección 6.2, la cantidad de glucosa se presenta en unidades de concentración y de disponibilidad de sustrato, σ_0 (tabla 2).

Para iniciar el análisis, es preciso puntualizar que el sustrato metabolizado se puede dividir en tres grandes fracciones:

- a) Síntesis de biomasa ($Y_{x/s}$)
- b) Producción de CO_2 ($Y_{CO_2/s}$)
- c) Formación de otros productos. Por ejemplo: polioles o ácidos orgánicos ($Y_{p/s}$)

El balance para el sustrato consumido ($-\Delta S_T$) en un incremento de tiempo determinado es el siguiente:

$$-\Delta S_T = \left[\frac{1}{Y_{x/s}} + \frac{1}{Y_{CO_2/s}} + \frac{1}{Y_{p/s}} \right] \Delta X + mX\Delta t \quad (6.21)$$

Tabla 2. Efecto de la concentración de sustrato, S_0 , en el rendimiento $Y_{x/s}$ en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*. σ_0 se calculó como S_0/α , donde α es la relación A/V del agar en la caja Petri. El volumen de medio fue 30 mL y el área de la caja de 63 cm².

S_0 (gL ⁻¹)	σ_0 (mgcm ⁻²)	$Y_{x/s}$ (gxgs ⁻¹)
12.5	5.9	0.419 ^a

25	11.8	0.430 ^a
50	23.6	0.250 ^b
100	47.2	0.173 ^c

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

Para simplificar los cálculos podemos agrupar dos de las fracciones del sustrato metabolizado en una sola ligada a la síntesis de la biomasa.

$$\frac{1}{Y_0} = \left[\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{1}{Y_{CO/S}} \right] \quad (6.22)$$

Considerando las ecuaciones anteriores, la ecuación 5.4 (página36) se puede escribir de la siguiente forma:

$$-\Delta\sigma = \left[\frac{1}{Y_0} + \frac{1}{Y_p} \right] \Delta\rho_A + \frac{m\rho_{Amax}}{\mu} \ln \left[\frac{1-\rho_{A0}/\rho_{Amax}}{1-\rho_A/\rho_{Amax}} \right] \quad (6.23)$$

En la figura 13 se muestran los datos experimentales de una cinética de biomasa y consumo de sustrato realizada por triplicado (rombos, cuadrados y triángulos), la línea discontinua corresponde al modelo $\sigma(t) = \sigma_0 - \Delta\rho_A(t)/Y_{ap}$. Si el gráfico de $\Delta\sigma$ vs ρ_A produce una línea recta, se puede despreciar la función logarítmica asociada al mantenimiento, de acuerdo a la tendencia de los datos experimentales, el segundo término de la ecuación 18 se puede despreciar.

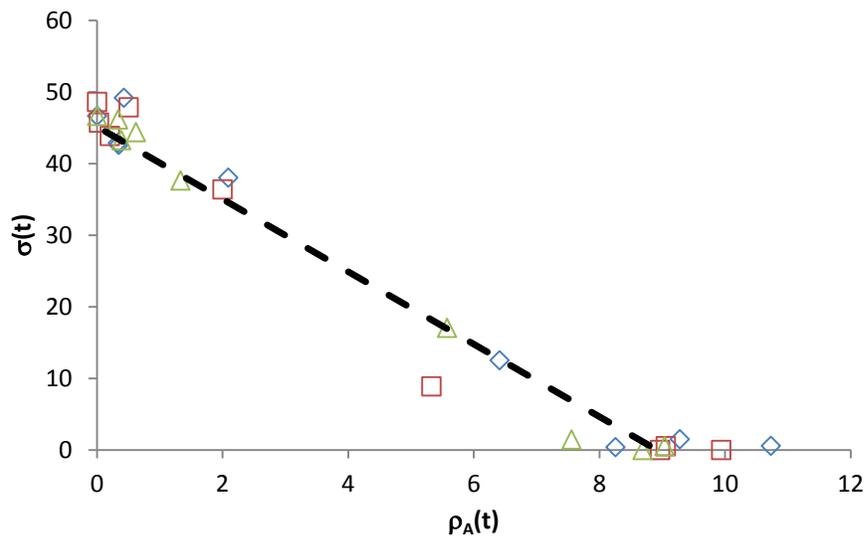


Figura 13. Evolución del sustrato residual (σ) en función de la producción de la biomasa ($\Delta\rho_A$) con un valor $\sigma_0 = 47.2 \text{ mg/cm}^2$ ($\alpha = 2.14/\text{cm}$). Los datos con diversos símbolos corresponden a tres experimentos independientes. La línea interrumpida corresponde al modelo $\sigma(t) = \sigma_0 - \Delta\rho_A(t)/Y_{ap}$; $Y_{ap} = 0.066$. Los ajustes individuales al modelo tuvieron $R^2 > 0.985$

Independientemente de que el mantenimiento se desprecie o no, es posible estimar los parámetros de la ecuación 6.18. Sólo es necesario conocer suficientes parejas de datos (S, X) y que de forma independiente se tenga una estimación de X_{\max} , X_0 y μ , tales parámetros se pueden obtener a través del ajuste con la ecuación logística.

En el caso presente, dónde el rendimiento se reduce por la producción de biopelículas gruesas, y se tiene una estimación independiente de $Y_0 = 0.5$ (discutida en la sección 6.2 y proviene de nuestros datos experimentales). En consecuencia, es posible desagregar el valor de Y_P mediante la siguiente relación:

$$\frac{1}{Y_P} = \frac{1}{Y_{ap}} - \frac{1}{Y_0} \quad (6.19)$$

Si llamamos, γ , a la fracción del sustrato que es metabolizado por la vía anaerobia, y Y_P se refiere a los productos asociados al metabolismo anaerobio. La estimación de γ se obtiene como sigue

$$\gamma = 1 - Y_{X/S}/Y_0 \quad (6.20)$$

Este parámetro siguió una función lineal del valor inicial, σ_0 , como se muestra en la figura 14. Esto indica que el metabolismo de las biocapas más gruesas (con mayor σ_0) tuvo un rendimiento cada vez menor y que se explica por un aumento de la producción de otros productos distintos de la biomasa (ácidos orgánicos o polioles) ya que las curvas siguieron un modelo lineal. Es decir, con muy poco efecto del cociente (m/μ). Por ejemplo, cuando $\sigma_0 = 6 \text{ mgcm}^{-2}$, el rendimiento, $Y_{X/S} = 0.42$, $\gamma = 0.16$ (predominantemente aerobio). Cuando, $\sigma_0 = 47 \text{ mgcm}^{-2}$, el rendimiento, $Y_{X/S} = 0.17$, $\gamma = 0.65$ (predominantemente anaerobio). Este resultado puede tener consecuencias prácticas, porque muestra cómo la condición inicial, σ_0 , es un factor de diseño de los cultivos fúngicos de superficie para modular el tipo de metabolismo. Aeróbico con bajos valores de σ_0 y anaeróbico con altos valores de σ_0 .

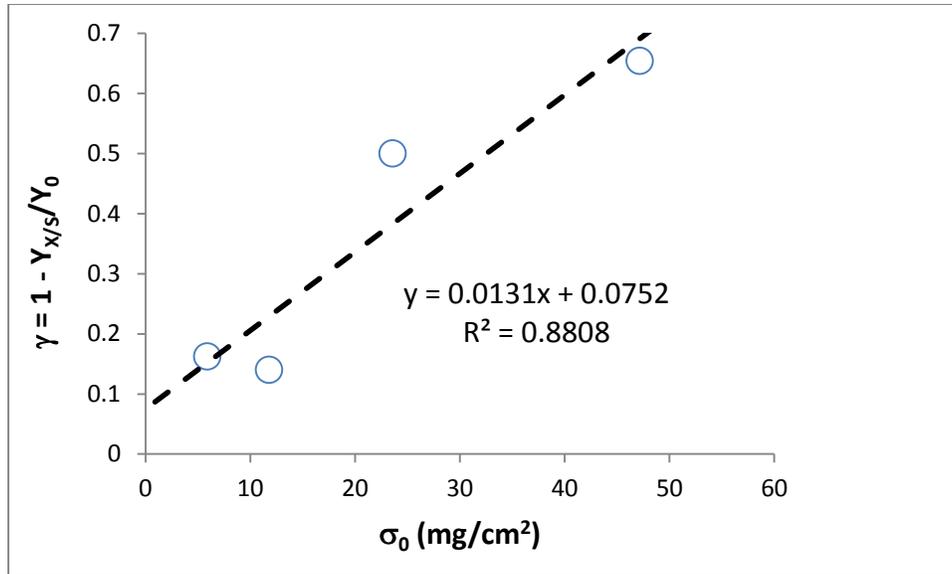


Figura 14. Correlación entre la proporción estimada para la formación de productos anaerobios $Y_{X/S} < Y_0$, en relación al metabolismo aerobio ($Y_0 = 0.5$) y la condición inicial, σ_0 . Los experimentos se realizaron según se indicó en Materiales y Métodos. El valor de $Y_{X/S}$, se calculó por el ajuste de las curvas a los modelos de la ecuación logística y de Pirt, según se indica en el Apéndice. Por medio de este ajuste se eliminó el posible efecto del coeficiente de mantenimiento que, en casi todos los casos, fue despreciable.

6.6.2 Tasa específica de crecimiento máximo

Se calculó un valor corregido, μ_{max}^* , definido de la siguiente manera:

$$\mu_{max}^* = \frac{Y_0 \mu_{max}}{Y_{X/S}}$$

donde: Y_0 es el rendimiento óptimo, que con base nuestros resultados presentados en la sección 6.2, es 0.5. La figura 15 muestra la tendencia creciente de, μ_{max}^* , y prácticamente constante para μ_{max} , como función de, σ_0 .

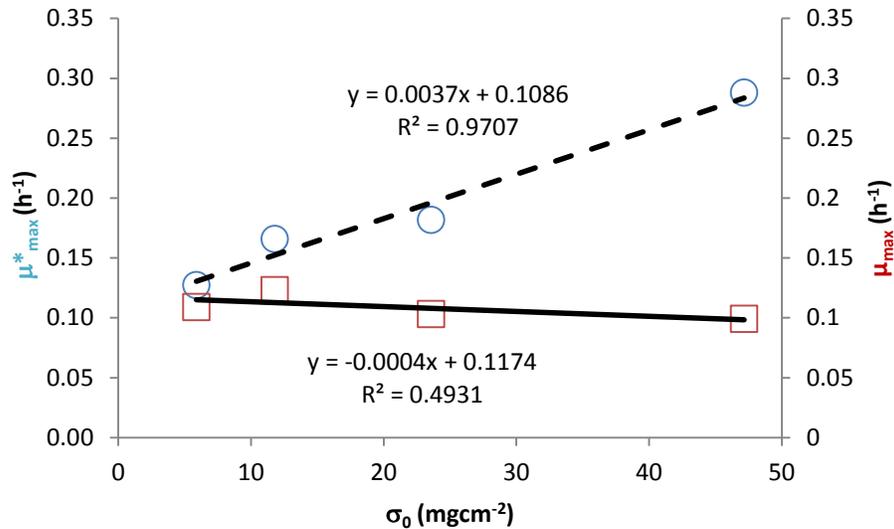


Figura 15. Valores para μ^*_{max} y μ_{max} en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*

Esta tendencia creciente para μ^*_{max} es congruente con la hipótesis de que sólo la lámina superior de la biocapa está creciendo, porque corresponde a la zona de penetración del oxígeno, de arriba hacia abajo. Este efecto positivo de, σ_0 , sugiere que el sustrato, transferido de la interfase entre la biocapa y el agar hasta la lámina superior del micelio, está llegando en función de un mecanismo de difusión que depende de los gradientes formados de abajo hacia arriba (en el soporte y en el micelio) (Olsson, 1994). El gradiente sería creado como consecuencia de la oxidación completa del sustrato en la lámina superior del micelio y de la liberación de dióxido de carbono hacia la atmósfera circundante. La demostración final de esta hipótesis dependerá de la medición de los gradientes microscópicos del sustrato y los productos a lo largo de la diapositiva axial. Este tema se abordó en forma preliminar en la sección final de la tesis, mediante el empleo de la Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Es posible que las concentraciones muy elevadas de

sustrato ($\sigma_0 > 50 \text{ mgcm}^{-2}$) den lugar a inhibiciones del metabolismo de *A. niger*. Esto ha sido explorado por medio de la respirometría (Oriol *et al.*, 1988). Este proceso inhibitorio ocurre cuando las concentraciones de sustrato son superiores a $S_0 = 100 \text{ gL}^{-1}$, lo cual no formó parte del diseño del presente trabajo.

Adicional y complementario a lo anterior. Diversos estudios en distintos tipos de cultivos, muestran que, bajo las condiciones de sustrato utilizadas ($12.5\text{-}100 \text{ gL}^{-1}$), no existe correlación entre μ_{max} y la concentración de sustrato inicial (S_0), lo cual se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Variables de respuesta fisiológicas de cultivos superficiales de *Aspergillus niger* a diferentes niveles de glucosa.

Glucosa (gL^{-1})	μ_{max} (h^{-1})
12.5	0.109 ± 0.023^a
25	0.123 ± 0.021^a
50	0.103 ± 0.020^a
100	0.099 ± 0.009^a

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

En cultivos de *Aspergillus niger* crecidos en medio sólido, con S_0 de 12.5 y 100 gL^{-1} se han reportado valores para μ_{max} de 0.19 y 0.18 h^{-1} respectivamente (Aguilar *et al.*, 2001), esta ausencia de correlación entre μ_{max} y S_0 en cultivos de *Aspergillus niger*, también ha sido observada en cultivos en superficie (Favela-Torres *et al.*,

1998) (0.247 y 0.232 h⁻¹ en medios con 30 y 100 gL⁻¹ de glucosa respectivamente). Una posible explicación es lo que describe el modelo de saturación de Monod, es decir, la constante de saturación (K_s) es al menos 1000 veces menor a las S₀ probadas en los trabajos mencionados.

6.6.2 Diámetro hifal (d_H) en cultivos superficiales.

El diámetro promedio de las hifas distales, mostró una disminución con respecto al incremento en la concentración inicial de glucosa (Tabla 4). El efecto total (cuando se modificó S₀ de 12.5 a 100 gL⁻¹) fue una disminución del 65 % en el diámetro hifal y un incremento proporcional en el área específica (A_x). Este cambio morfométrico ha sido observado previamente y podría estar asociado a la presión osmótica que ejerce el medio de cultivo (Wiebe *et al.*, 1992; Larralde-Corona *et al.*, 1997).

Tabla 4. Diámetros promedio de las hifas, correspondientes a diferentes concentraciones de glucosa.

Glucosa gL ⁻¹	d _H μm	A _x m ² g _x ⁻¹
12.5	4.340 ± 0.18 ^a	4.3
25	3.753 ± 0.27 ^b	5.0
50	3.530 ± 0.35 ^b	5.3
100	2.830 ± 0.37 ^c	6.6

Las observaciones basadas en la teoría vesicular (Bartnicki-García *et al.*, 1989), indican que la pared celular que se forma durante el proceso de crecimiento es blanda y por lo tanto vulnerable a la presión osmótica (Farkas, 1990).

6.6.3 Estimación del flux de glucosa en cultivos superficiales.

Para cada concentración de glucosa se estimó el *flux* utilizando la ecuación 5.5 (página 37). Los resultados indican que a 100 g glucosa L⁻¹ el cambio en el diámetro hifal disminuye el *flux* de glucosa 35%, con respecto al *flux* calculado cuando se considera el diámetro hifal constante (Figura 16). Esto indica que la disminución del diámetro hifal permite al microorganismo incrementar el transporte de glucosa. Este efecto observado no ha sido considerado en los trabajos de modelamiento del transporte de glucosa a nivel de membrana (Wayman y Matthey, 2000; Papagianni y Matthey, 2004).

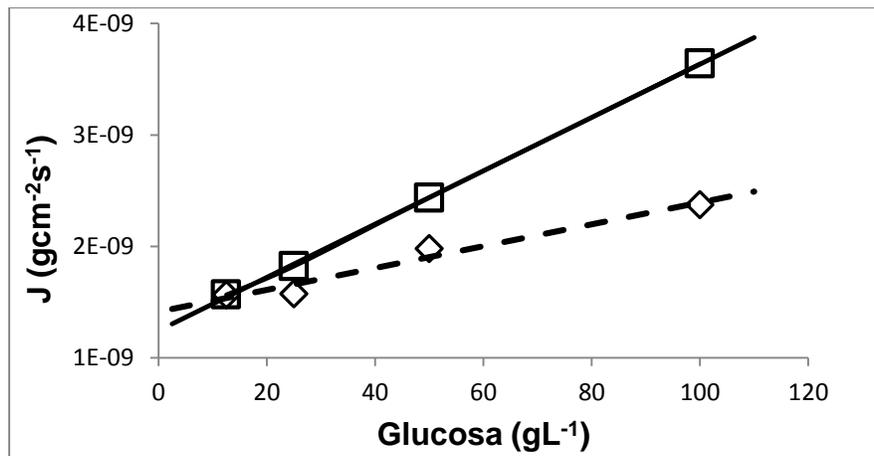


Figura 16. Comparación de los flux de glucosa, considerando que no existen cambios morfológicos (línea discontinua, d_H constante), con los flux de glucosa con d_H experimental (línea continua). En ambos casos el flux se estimó con la ecuación 5.5 (página 37).

Se calculó el *flux* de glucosa, de acuerdo con el modelo de difusión simple ecuación 5.10 (página 39). Para estos cálculos se consideró que el coeficiente de permeabilidad de la membrana para la glucosa es de 10^{-7} cms^{-1} (Burgstaller, 1997) y que es constante en todos los niveles de glucosa ($12.5\text{-}100 \text{ gL}^{-1}$). En la figura 17 se muestra que para $S_0 < 12.5 \text{ gL}^{-1}$, los valores de la tendencia del *flux* del modelo fisiológico son mayores a los del modelo de difusión simple, esto sugiere que bajo estas condiciones de sustrato ($S_0 < 12.5 \text{ gL}^{-1}$) existe un mecanismo de transporte que opera con mayor velocidad (difusión facilitada).

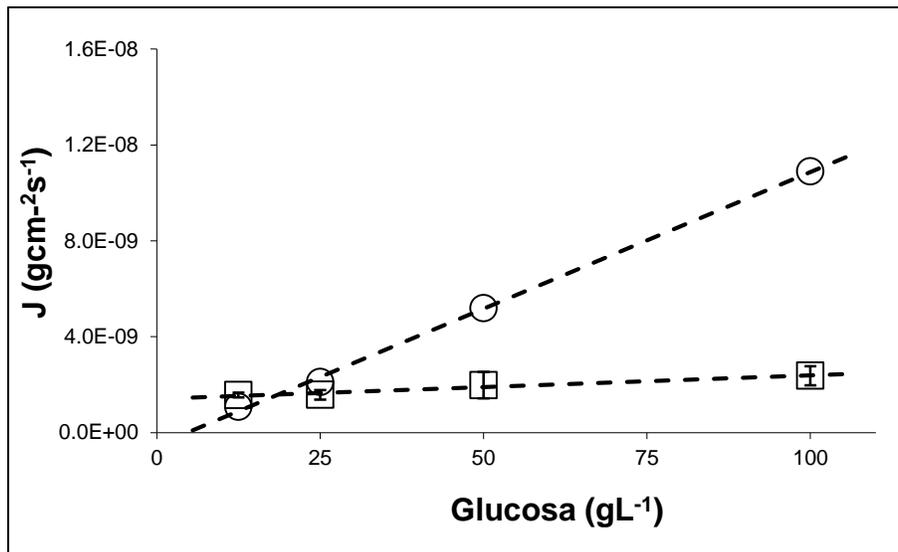


Figura 17. Flux de glucosa en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*, estimados a partir del modelo de difusión simple (-○-) y el modelo fisiológico (-□-).

Se ha mostrado que el consumo específico de glucosa en cultivos de *Aspergillus niger* con menos de 25 gL^{-1} , se puede describir con el modelo de difusión facilitada (Wayman y Matthey 2000). Los resultados mostrados en la figura también indican que a partir de 25 g glucosa L^{-1} los *flux* calculados con el modelo fisiológico son menores con respecto a los calculados con el modelo de difusión simple. Esto

se podría explicar si la difusividad de la glucosa en el medio (agar) fuera el paso limitante; sin embargo, el $D_{\text{glucosa, agar}}$ es del orden de $10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (López-Isunza *et al.* 1997), es decir 4 órdenes de magnitud mayor al $D_{\text{glucosa, membrana}}$ (considerando $P = 1 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ y $x = 10 \text{ nm}$), lo cual indica que la limitación del transporte es a nivel de membrana.

Sin embargo, la tendencia de los *flux* calculados con el modelo fisiológico no muestran una saturación absoluta de los transportadores, esto sugiere que además del mecanismo de difusión facilitada, existe un mecanismo de transporte que no es saturable y que opera como un proceso absolutamente físico y que no puede ser controlado por el microorganismo, al respecto, se ha mostrado que el mecanismo de difusión simple modela mejor el transporte de glucosa en *A. niger* (Wayman y Matthey 2000). El comportamiento del transporte antes descrito se puede deber a cambios en la expresión y/o afinidad de los transportadores de glucosa.

6.6.5 Modelo de difusión facilitada.

Se calculó el *flux* de acuerdo al modelo de difusión facilitada, asumiendo que los transportadores se comportan como una enzima, por lo tanto se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten, transformando las velocidades a *flux*.

$$J = J_{\text{max}} * S / (K_m + S) \quad (6.21)$$

donde: S es la concentración de glucosa en el medio, K_m es la constante de afinidad del transportador por el sustrato. Para la estimación de los *flux* se utilizaron los siguientes parámetros cinéticos, reportados por Torres *et al.* (1996).

Parámetros del transportador de alta afinidad.

$$V_{\max}=0.052 \mu\text{mol s}^{-1}\text{g DW}^{-1}$$

$$K_m= 260 \mu\text{mol}.$$

Parámetros del transportador de baja afinidad.

$$V_{\max}=0.75 \mu\text{mol s}^{-1}\text{g DW}^{-1}$$

$$K_m=3700 \mu\text{mol}.$$

Con los parámetros anteriores se pudieron construir dos perfiles del *flux* de glucosa, uno considerando que opera el transportador de baja afinidad y otro considerando que opera el transportador de alta afinidad. La ecuación 6.21 considera de manera implícita el diámetro promedio de las hifas correspondiente a cada concentración ya que el *flux* máximo se estimó con la siguiente ecuación.

$$J_{\max}= V_{\max}/A_x \quad (6.22)$$

donde: A_x es el área específica obtenida a partir de la ecuación 5.6 (página 38), la cual es dependiente del diámetro de las hifas (d_H).

En la figura 18 se muestran los perfiles de los *flux* (considerando los transportadores de alta afinidad, baja afinidad y el modelo fisiológico) en función de la concentración de sustrato, S_0 . La figura indica que si en el transporte de glucosa sólo participaran los transportadores de baja afinidad, los *flux* serían menores (de 8 a 17 veces) con respecto a los calculados con el modelo fisiológico. Sin embargo, el perfil que considera los parámetros cinéticos de los transportadores de alta afinidad es similar al del modelo fisiológico. Estos resultados son congruentes con

el trabajo de Torres *et al.*(1996) el cual sugiere que la expresión de los transportadores de baja afinidad sólo ocurre con altas concentraciones de glucosa (150 gL^{-1}).

Por otro lado, también hay evidencias de que cuando los transportadores de baja afinidad no se expresan, la expresión de los transportadores de alta afinidad aumenta, como un mecanismo compensatorio (Forment *et al.*, 2006). La curva que describe los *flux* calculados con el modelo fisiológico (figura 18), no describe una saturación absoluta, como ocurre con las curvas correspondientes al transporte de baja y alta afinidad, lo cual podría describir la actividad de un mecanismo de transporte alterno, que no es saturable, por ejemplo el mecanismo de difusión simple, el cual opera como un mecanismo absolutamente físico.

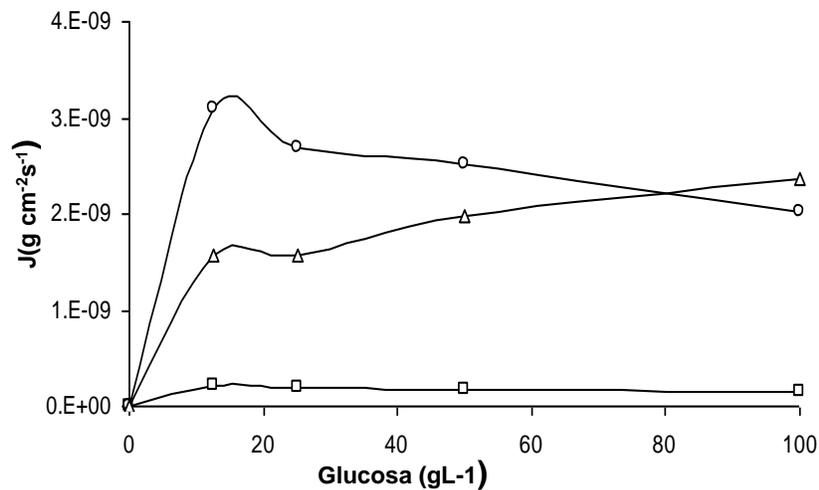


Figura 18. Comparación entre los perfiles del *flux* de glucosa calculados con el modelo fisiológico y el de difusión facilitada (---□--- Baja afinidad, ---O--- alta afinidad --Δ-- Modelo fisiológico), las constantes de los transportadores y los cálculos se realizaron como se indica en el texto.

6.6.4 Permeabilidad membranal calculada.

Debido a que el *flux* de glucosa calculado con el modelo fisiológico no se correlaciona con el mecanismo de difusión simple (propuesto por Papagianni y Mathey, 2004) ni con el modelo de difusión facilitada, considerando los parámetros cinéticos de los transportadores medidos experimentalmente por Torres *et al.* (1996).

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 19 se muestran los valores de permeabilidad calculados con la ecuación 5.11 (página 39), 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-González y Favela-Torres (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 Strasser de Saad (1998) reportaron cambios químicos (concentración de ácidos grasos saturados) en las membranas de las células en función del tipo de cultivo (líquido y sólido), lo cual da indicios de que existen cambios en la fluidez de membranal 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. Con base a lo expuesto, es posible sugerir que la permeabilidad membranal y los cambios en el d_H , regulan el transporte en *Aspergillus niger*

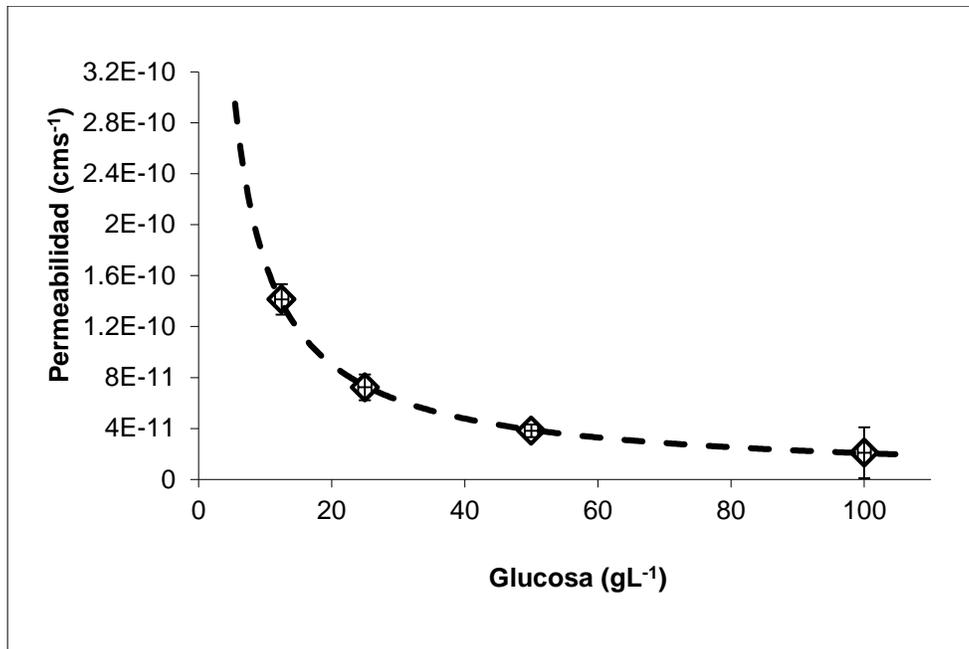


Figura 19. Permeabilidad aparente en cultivos de *A. niger* en caja Petri a diferentes concentraciones de S_0 . Los cálculos se realizaron de acuerdo a la ecuación 5.11.

6.7 Gradientes de nutrientes por IRMN en cultivos superficiales de *A. niger*.

6.7.1 Tiempo de recuperación (T_1) en caja Petri con diferentes niveles de nutrientes.

En la sección 6.6.2 se planteó la importancia de identificar durante el cultivo los gradientes axiales de glucosa en el soporte, ya que permitirían explicar la disminución de los $Y_{x/s}$ reportados en este trabajo. Entonces, a través de la IRMN intentamos medir tales gradientes, que a pesar, de no lograrlo de manera fehaciente, fue posible obtener indicios respecto a este fenómeno.

En la sección de materiales y métodos se muestran los detalles, por ahora, conviene recordar dos cosas:

- El tiempo de recuperación (T_1), es el tiempo necesario que le toma a una muestra recuperar su campo magnético natural después, de haber sido invertido por una secuencia de pulsos. Por lo tanto, es característico de cada muestra.
- En el medio de cultivo, la cantidad de sales minerales fue proporcional a la concentración glucosa.

En la figura 20 se muestran los resultados del $1/T_1$ de un medio de cultivo definido (descrito en materiales y métodos). Primero, se realizó el experimento con los medios de cultivo que usualmente preparábamos, lo cuales contenían **glucosa y sales minerales**, nuestra primera interpretación fue que el $1/T_1$ era sensible a la concentración de glucosa, por ello, repetimos el experimento pero, con únicamente **glucosa**, con el objetivo de valorar el efecto de las sales y despreciarlo en caso de no ser significativo. Sin embargo, observamos exactamente lo contrario, es decir, que la glucosa no tenía ningún efecto sobre el $1/T_1$. Ningún trabajo ha medido microscópicamente la concentración de glucosa en el agar pero, Nagel *et al.* (2002) la midieron en un medio de cultivo a base de harina de trigo por IRMN sin embargo; la calibración de T_1 la realizaron con solo tres concentraciones de glucosa, tampoco se corroboró que las sales minerales tuvieran un efecto sobre T_1 .

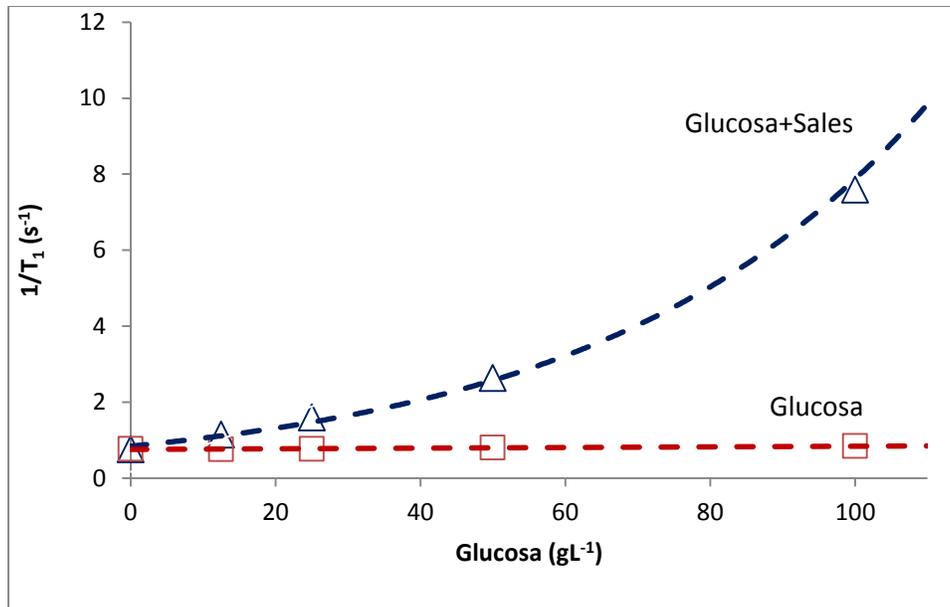


Figura 20. Inverso del tiempo de recuperación ($1/T_1$) en caja Petri a diferentes concentraciones de glucosa: (—□—) medio de cultivo con únicamente glucosa, (—Δ—) medio de cultivo con glucosa y sales minerales. La cantidad de sales minerales fue proporcional a la glucosa, como se describe en materiales y métodos.

6.7.2 Tiempo de recuperación (T_1) en caja Petri con diferentes a_w .

Se midió el T_1 en cajas Petri con actividad de agua (a_w) modificada con diferentes concentraciones de etilen glicol (5-20%). En la tabla 5 indica que contrariamente a lo que se esperaba el T_1 no tiene relación con la actividad de agua, no hay cambios en T_1 lo suficientemente grandes para sugerir alguna relación.

Tabla 5. Efecto de la presión osmótica y a_w sobre T_1 en medios con diferentes concentraciones de glucosa y de etilen glicol.

Glucosa (gL⁻¹)	T1 (S)	Presión Osmótica (mOsmL⁻¹)	Aw
0	1.31		1
12.5	0.87	176	1
25	0.62	352	0.998
50	0.38	704	0.994
100	0.13	1407	0.974
Etilen glicol(% v/v)			
5	0.91	887	0.989
10	0.59	1774	0.976
15	0.77	2661	0.953
20	0.72	3548	0.936

En la figura 21 se muestra que tampoco la cantidad de solutos se relaciona con $1/T_1$ cuando se utilizó etilen glicol.

De acuerdo con las evidencias anteriores es posible deducir que los cambios observados en T_1 , se deben al incremento en la concentración de las sales minerales, que por ser iones con diferentes valencias generan interacciones iónicas que disminuyen su movimiento rotacional y traslacional, por lo tanto absorben y emiten con mayor rapidez la energía. El etilen glicol y la glucosa no tienen efecto sobre $1/T_1$ lo cual sugiere que los puentes de hidrógeno que establecen con el agua no son lo suficientemente fuertes para disminuir el movimiento rotacional de los núcleos atómicos.

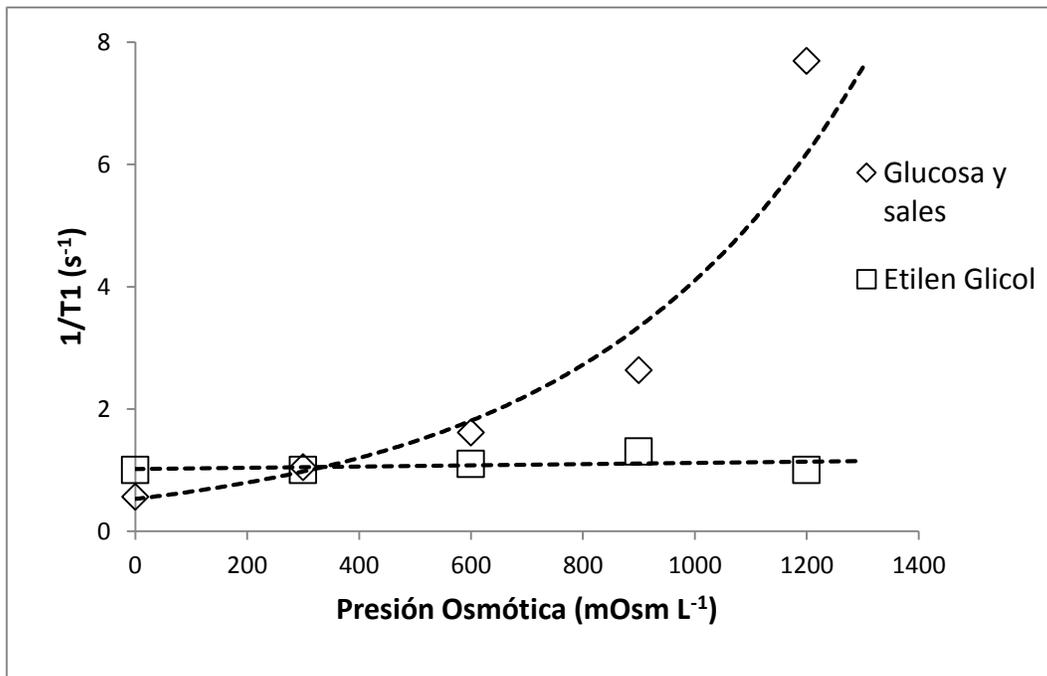


Figura 21. Relación de $1/T_1$ con la presión osmótica en medios con diferentes solutos.

6.7.3 Intensidad de señal axial en el agar de cultivos superficiales de

Aspergillus niger.

Ya que la respuesta ($1/T_1$) obtenida por IRMN en nuestro sistema experimental, sólo se debió a la concentración de sales minerales, se realizaron experimentos para medir la intensidad de señal axial en el agar (mide el campo magnético generado por los núcleos atómicos), en esta medición se tiene la ventaja de que es posible obtener mediciones puntuales, a diferencia del T_1 en donde las mediciones corresponden al promedio de un área. En la figura 22 se muestran los perfiles axiales de la intensidad de señal en agar a dos diferentes tiempos de cultivo (0, 48 h). Para $t=0$ h, se observa lo esperado es decir, que la intensidad de la señal es prácticamente igual en cualquier profundidad del agar, lo cual significa que la distribución de las sales minerales es uniforme, sin embargo, para $t=48$ h la intensidad de la señal presenta cambios considerables de $H=0$ a $H=0.25$ cm, esto indica que la tasa de consumo de nutrientes por *Aspergillus niger* es mayor que la de difusión. Nagel *et al.* (2002) con *Aspergillus oryzae*, usando como sustrato harina de trigo, encontraron que en el primer milímetro se forman gradientes similares a los observados en nuestro trabajo. Los trabajos difieren en la profundidad de los gradientes, lo cual se explica por diferencias relativas al transporte entre estos sistemas (caja Petri con agar y harina de trigo), tales como los coeficientes de difusión, las tasas de consumo, la producción y difusión de amilasas (utilizaron harina de trigo).

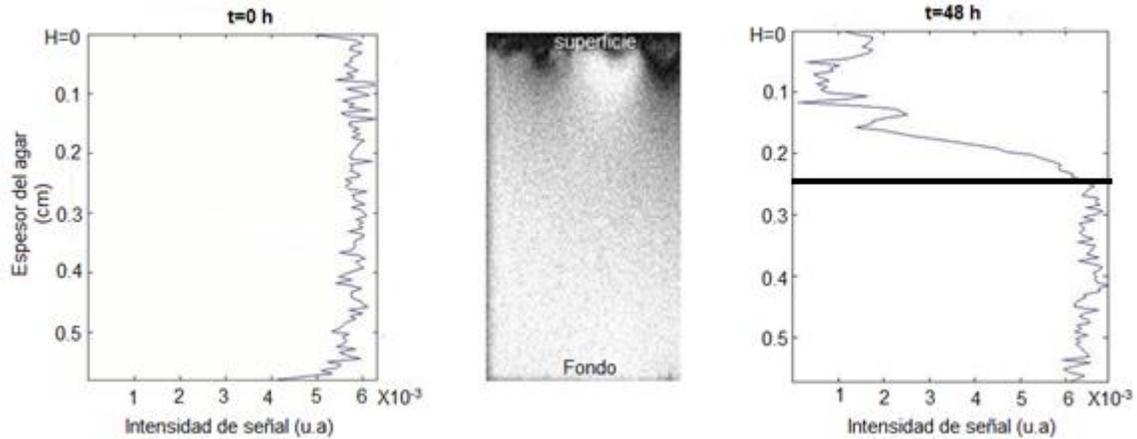


Figura 22. Perfiles axiales de intensidad de señal en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*, en un medio con 50 gL⁻¹ de glucosa (la concentración de sales es proporcional a la concentración de glucosa, tal como se describió en materiales y métodos)

Se pretendió obtener los perfiles de intensidad de señal para un mayor número de tiempos, sin embargo, a las 72 horas de cultivo se observó que las hifas habían penetrado al agar (figura 23), por lo que no fue posible obtener un perfil representativo del sistema. El crecimiento del micelio por debajo de la superficie ya ha sido estudiado y se ha reportado que en *Rhizopus oligosporus* puede crecer hasta 0.4 cm por debajo de la superficie (Nopharatana *et al.*,2003), a este micelio se le considera como el responsable de la liberación de hidrolasas, en este caso se puede interpretar como una respuesta compensatoria del gradiente de concentración formado en el agar debido al consumo.

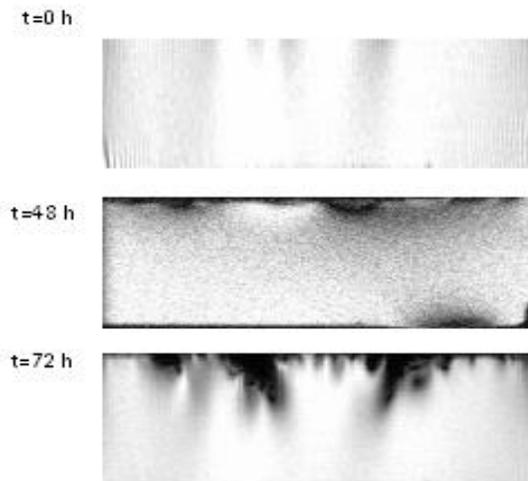


Figura 23. Imágenes del agar a diferentes tiempos de cultivo, en un medio con 50 gL⁻¹ de glucosa y sales minerales proporcionales a la concentración de glucosa.

En la figura 24 se observa el perfil axial obtenido de la posición B, se observa que los gradientes se encuentran hasta los 3 mm de profundidad y que la intensidad de la señal disminuyó a 4.5 u.a. lo anterior debido al consumo de nutrientes. Otro perfil obtenido de la misma imagen pero en la diferente posición A, se muestra que las diferencias de la señal en función de la profundidad no son tan grandes a pesar de que en ambas posiciones no han penetrado las hifas, lo anterior sugiere que existen consumos y difusiones diferenciales es decir, que después de 48 h se forman microambientes con características fisiológicas propias, es un resultado importante pues con frecuencia se asume que el cultivo en superficie es homogéneo en todos los sentidos.

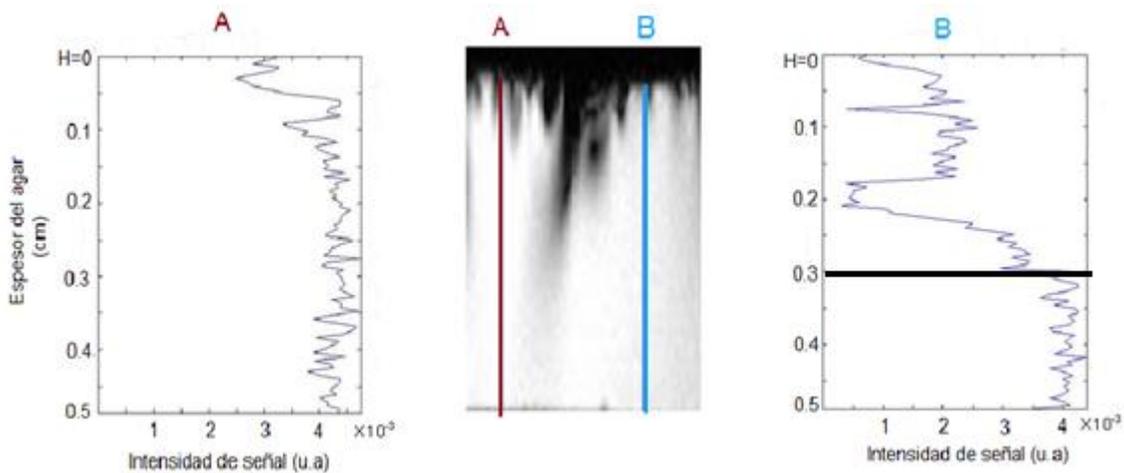


Figura 24. Perfil axial de intensidad de señal en un cultivo de *Aspergillus niger*, en un medio con 50 gL⁻¹(como se menciona en la sección de materiales y métodos, la concentración de sales es proporcional a la cantidad de glucosa).

6.7.4 Curvas de nitratos y glucosa en caja Petri.

En los apartados anteriores se mostró que la señal obtenida por IRMN (T_1) no es sensible a la concentración de glucosa, de hecho se debe a la concentración de las sales minerales del medio, es decir, es una señal dependiente de muchos compuestos. En los perfiles axiales mostrados en la sección anterior se mostró que existen gradientes en la señal, tales gradientes podrían ser de todos los nutrientes, lo cual implicaría que todos los nutrientes se consumen en la misma proporción. Para comprobar lo anterior se realizó una cinética en donde medimos el consumo de glucosa y nitratos. Si encontráramos que el consumo era paralelo, entonces tendríamos elementos para argumentar que los gradientes son de todos los nutrientes, incluyendo a la glucosa.

En la figura 25 se observa que el consumo de glucosa y nitratos es paralelo hasta alrededor de las 65 horas de cultivo, lo cual indica que los nutrientes se

consumen de manera simultanea. Por lo tanto, es muy probable que los gradientes de sales mostrados también sean de glucosa.

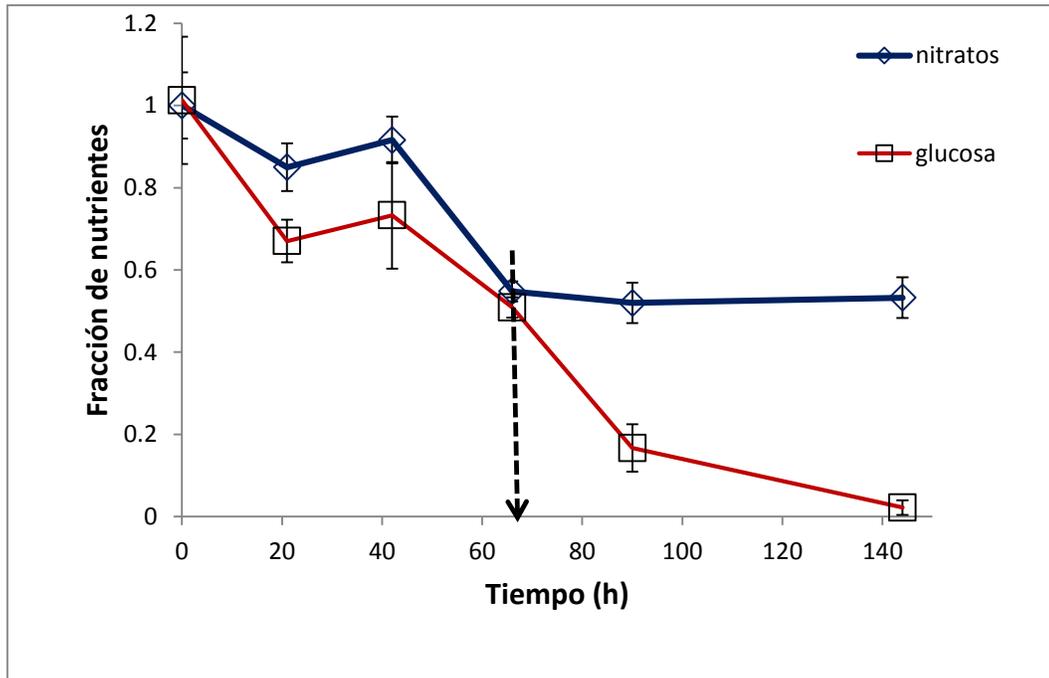


Figura 25. Consumo de nitratos y glucosa en cultivos superficiales de *Aspergillus niger*, en un medio con 50 gL^{-1} de glucosa.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados mostrados en el presente trabajo, permiten deducir algunas propiedades del crecimiento fúngico sobre superficies sólidas:

1. Que la densidad volumétrica final es independiente de la concentración del sustrato y de su disponibilidad por unidad de superficie del soporte.
2. Que el grosor final de la capa de micelios sigue una función de saturación con respecto a la disponibilidad del sustrato por unidad de superficie del soporte.
3. Que el balance de materia, indica que el rendimiento decrece conforme se aumenta la disponibilidad inicial del sustrato por unidad de superficie del soporte.
4. Que hay una constante de eficiencia de la producción de la biomasa por unidad de superficie que está definida por el máximo espesor posible de la capa del micelio, con una densidad volumétrica dada.
5. Que la permeabilidad membranal disminuye aproximadamente un orden de magnitud cuando se aumentó S_0 de 12.5 a 100 gL⁻¹.
6. Que se forman gradientes de sales minerales en los primeros milímetros por debajo de la superficie del cultivo.

VIII NOMENCLATURA

A	Área	cm^2
A_x	Superficie específica (por unidad de biomasa)	$\text{cm}^2 \text{g}_x^{-1}$
C	Concentración de un soluto dentro de un elemento diferencia	g cm^{-3}
C_{os}	Concentración de oxígeno	mol m^{-3}
d_H	Diámetro de la hifa	μm
D_s	Difusividad del sustrato	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
D_e	Coeficiente de difusión efectivo	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
$D_{\text{glu, mem}}$	Difusividad de la glucosa en la membrana	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
$D_{\text{glu, agar}}$	Difusividad de la glucosa en el agar	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
F	Fracción de sustrato consumido	
H	Espesor de una biopelícula	cm
h_c	Espesor critico donde se agota el oxígeno	cm
h_m	Espesor máximo que puede alcanzar una biopelícula	cm
I	Cociente h_c/R	
J	<i>Flux</i> de un soluto	$\text{g s}^{-1}\text{cm}^{-2}$
J_e	<i>Flux</i> de entrada en un elemento diferencial	$\text{g s}^{-1}\text{cm}^{-2}$
J_o''	<i>Flux</i> de oxígeno en la biopelícula	$\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$
J_s	<i>Flux</i> de salida en un elemento diferencia	$\text{g s}^{-1}\text{cm}^{-2}$
K_σ	Disponibilidad de sustrato necesario para obtener $h_m/2$	mg cm^{-2}
L	Altura del medio en caja Petri	cm
M_0	Magnetización inicial	T
M_z	Magnetización en el plano z	T

M	Coeficiente de mantenimiento	$g_s g_x^{-1} h^{-1}$
N	Concentración de un soluto	$g L^{-1}$
P_s	Coeficiente de Permeabilidad al sustrato	$cm s^{-1}$
q_s	Consumo específico de sustrato	$g_s g_x^{-1} s^{-1}$
r_o''	Tasa de consumo de oxígeno	$g cm^{-3} s^{-1}$
Q_0	Cantidad de biomasa total inicial	g
Q	Cantidad de biomasa	g
R	Radio de un soporte esférico	cm
R	Constante de los gases	$J mol^{-1}K$
S_{ext}	Concentración de sustrato fuera de la célula	$g cm^{-3}$
S	Concentración de sustrato	$g cm^{-3}$
T	Tiempo	S
TE	Tiempo eco de una secuencia	s
Ti	Tiempo necesario para invertir el campo magnético	s
TR	Tiempo de repetición entre secuencias	s
T1	Tiempo de recuperación	s
Us	Movilidad por unidad de fuerza	W
Vs	Volumen del medio de cultivo	
Vx	Volumen de la biomasa	
X	Biomasa	$g L^{-1}$
X_0	Biomasa al inicio del cultivo	$g L^{-1}$
X_{max}	Biomasa máxima del cultivo	$g L^{-1}$
X_{H_2O}	Fracción de agua en el micelio	
$Y_{x/O}$	Rendimiento, g de biomasa por g de oxígeno	$g_x g_{O_2}^{-1}$
$Y_{x/s}$	Eficiencia biosintética	$g_x g_s^{-1}$

Z	Distancia a recorrer por un soluto debido a un gradiente de concentraciones	cm
---	---	----

Letras griegas

μ	Tasa específica de crecimiento	h^{-1}
δ	Profundidad máxima de penetración del oxígeno	μm
ρ_v	Densidad volumétrica de la biomasa	$g\ cm^{-3}$
E	Factor de eficiencia	$g\ cm^{-2}$
Z	Cociente $X\ X_{max}^{-1}$	
ρ_x	Densidad del micelio seco	$g\ cm^{-3}$
Δ	Incremento	
σ_0	Disponibilidad inicial de sustrato	$mg\ cm^{-2}$
Λ		$L\ hc^{-1}$

VIII. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.

Figura 1. Representación de las estructuras de <i>Aspergillus niger</i> (Díaz- Godínez, 2011).....	5
Figura 2. Diagrama de inversión-recuperación, consiste de una combinación de dos pulsos de RF. El primer pulso invierte la magnetización longitudinal. El segundo pulso después del tiempo T_I desplaza la magnetización longitudinal al plano transversal para que una señal FID pueda ser medida.....	10
Figura 3. Magnitud de una señal para en una secuencia de inversión-recuperación en función de T_I , el tiempo entre dos pulsos de RF.....	12
Figura 4. Zonas del micelio, en función de la disponibilidad de oxígeno.....	18
Figura 5. Representación de las consideraciones de un modelo de crecimiento fúngico en superficie (imagen modificada de Nopharatana et al., 1998).	23
Figura 6. Densidad de la biomasa en función de la altura en un modelo de crecimiento fúngico en superficie (Nopharatana et al., 1998).	24
Figura 7. Densidad del micelio de <i>Rhizopus oligosporus</i> crecido en PDA en función de la altura (Figura modificada de Nopharatana et al., 2003).....	26
Figura 8. Representación de la metodología para cuantificar biomasa crecida sobre una membrana de celofán (Imagen modificada de Olsson, 1994)	35
Figura 9. Difusión de oxígeno y glucosa en un cultivo fúngico crecido sobre una superficie sólida. 31	
Figura 10. Valores finales de cada experimento en cultivos superficiales de <i>A. niger</i> , con valor inicial, σ_0 , para la densidad superficial de la biomasa máxima (ρ_A ; representado en eje vertical izquierdo por, O) y espesor de la biocapa (h ; representado en el eje vertical derecho, Δ). Los marcadores sólidos corresponden a los experimentos en donde la fuente de variación de σ fue V (10, 25 y 40 mL), los marcadores vacíos corresponden a los experimentos en donde la fuente de variación fue S_0 . La línea interrumpida corresponde a la ecuación 6.1 y la línea continua a la ecuación 6.2, con los valores indicados en el texto.	47
Figura 11. Inverso del rendimiento, $1/Y_{x/s}$ (-O-) en función de σ_0 en cultivos superficiales de <i>A. niger</i> a diferentes niveles de glucosa inicial, los símbolos \square corresponden al inverso del espesor de la biopelícula (h^{-1}). La notación de los símbolos llenos y vacíos es la descrita en la figura 10.	51
Figura 12. Módulo de longitudes, L/hC , en función del módulo de biomasa, $C = Y_{max}S_0/\rho_v$, para obtener el tamaño óptimo de partículas como soportes sólidos con diferentes geometrías: (---) Radio de un soporte esférico; (- - -) Diámetro de un cilindro y (—) Espesor de una placa.	54
Tabla 2. Efecto de la concentración de sustrato, S_0 , en el rendimiento $Y_{x/s}$ en cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i> . σ_0 se calculó como S_0/α , donde α es la relación A/V del agar en la caja Petri. El volumen de medio fue 30 mL y el área de la caja de 63 cm ²	60
Los datos con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente ($P < 0.05$, prueba de Tukey).....	61
Figura 13. Evolución del sustrato residual (σ) en función de la producción de la biomasa ($\Delta\rho_A$) con un valor $\sigma_0 = 47.2$ mg/cm ² ($\alpha = 2.14$ /cm). Los datos con diversos símbolos corresponden a tres experimentos independientes. La línea interrumpida corresponde al modelo $\sigma(t) = \sigma_0 - \Delta\rho_A(t)/Y_{ap}$; $Y_{ap} = 0.066$. Los ajustes individuales al modelo tuvieron $R^2 > 0.985$	62
Figura 14. Correlación entre la proporción estimada para la formación de productos anaerobios $Y_{x/s} < Y_0$, en relación al metabolismo aerobio ($Y_0 = 0.5$) y la condición inicial, σ_0 . Los experimentos se realizaron según se indicó en Materiales y Métodos. El valor de $Y_{x/s}$, se calculó por el ajuste de las curvas a los modelos de la ecuación logística y de Pirt, según se indica en el Apéndice. Por medio de este ajuste se eliminó el posible efecto del coeficiente de mantenimiento que, en casi todos los casos, fue despreciable.....	64
Figura 15. Valores para μ^*_{max} y μ_{max} en cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i>	65

Tabla 3. Variables de respuesta fisiológicas de cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i> a diferentes niveles de glucosa.	66
Los datos con letras iguales en la misma columna no difieren significativamente ($P < 0.05$, prueba de Tukey).....	66
Tabla 4. Diámetros promedio de las hifas, correspondientes a diferentes concentraciones de glucosa.	67
Figura 16. Comparación de los flux de glucosa, considerando que no existen cambios morfológicos (línea discontinua, d_H constante), con los flux de glucosa con d_H experimental (línea continua). En ambos casos el flux se estimó con la ecuación 5.5 (página 37).	68
Figura 17. Flux de glucosa en cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i> , estimados a partir del modelo de difusión simple (-o-) y el modelo fisiológico (-□-).	69
Figura 18. Comparación entre los perfiles del flux de glucosa calculados con el modelo fisiológico y el de difusión facilitada (--□-- Baja afinidad, ---O-- alta afinidad --Δ--Modelo fisiológico), las constantes de los transportadores y lo cálculos se realizaron como se indica en el texto.	72
Figura 19. Permeabilidad aparente en cultivos de <i>A. niger</i> en caja Petri a diferentes concentraciones de S_0 . Los cálculos se realizaron de acuerdo a la ecuación 5.11.	74
Figura 20. Inverso del tiempo de recuperación ($1/T_1$) en caja Petri a diferentes concentraciones de glucosa: (--□--) medio de cultivo con únicamente glucosa, (--Δ--) medio de cultivo con glucosa y sales minerales. La cantidad de sales minerales fue proporcional a la glucosa, como se describe en materiales y métodos.	76
Tabla 5. Efecto de la presión osmótica y a_w sobre T_1 en medios con diferentes concentraciones de glucosa y de etilen glicol.	77
Figura 21. Relación de $1/T_1$ con la presión osmótica en medios con diferentes solutos.....	78
Figura 22. Pefiles axiales de intensidad de señal en cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i> , en un medio con 50 gL ⁻¹ de glucosa (la concentración de sales es proporcional a la concentración de glucosa, tal como se describió en materiales y métodos)	80
Figura 24. Perfil axial de intensidad de señal en un cultivo de <i>Aspergillus niger</i> , en un medio con 50 gL ⁻¹ (como se menciona en la sección de materiales y métodos, la concentración de sales es proporcional a la cantidad de glucosa).	82
Figura 25. Consumo de nitratos y glucosa en cultivos superficiales de <i>Aspergillus niger</i> , en un medio con 50 gL ⁻¹ de glucosa.	83

IX. BIBLIOGRAFÍA.

- Acuña-Argüelles M.E., Gutiérrez-Rojas M., Viniegra-González G. y Favela-Torres E. (1994). Effect of water activity on exo-pectinase production by *Aspergillus niger* CH4 on solid state fermentation. *Biotechnology Letters*. 16:23–28.
- Aguilar C.N., Augur C., Favela-Torres E. y Viniegra-González G. (2001). Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid state fermentations: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 26:296–302.
- Bartnicki-García S., Hergert F. y Gierz G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma*. 153:46-57.
- Berka R.M., Kodama K.H. y Rey M.W. (1991). The Development of *Aspergillus niger* var *awamori* as a host for the expression and secretion of heterologous gene-products. *Biochemical Society Transactions*. 19:681-685.
- Berka R.M., Schneider P. y Golightly E.J. (1997). Characterization of the gene encoding and extracellular laccase of *Mycelium thermophyla* and analysis of the recombinant enzyme express in *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environment Microbiology*. 63:3151-3157.
- Burgstaller W. (1997). Transport of small ions and molecules through the plasma membrane of filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology*. 23: 1-46.

- Camacho-Díaz B.H.C., Aparicio A.J., Chanona-Pérez J.J., Calderón-Domínguez G., Alamilla-Beltrán L., Hernández-Sánchez H. y Gutiérrez-López G.F. (2010). Morphological characterization of the growing front of *Rhizopus oligosporus* in solid media. *Journal Food Engineering*. 101:309-317.
- Diano A., Bekker-Jensen S., Dynesen J. y Nielsen J. (2006). Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*. 94:99-108.
- Díaz-Godínez G. (2001). Comparación de la producción de enzimas exopectinasas de *Aspergillus niger* obtenidas por fermentación sólida y sumergida. Tesis de doctorado, Departamento de Biotecnología UAM-I, México.
- Farkas V. (1990). Fungal cell walls: their structure, biosynthesis and biotechnological aspects. *Acta Biotechnologica*. 10: 225-238.
- Favela-Torres E., Córdova-López J., García-Rivero M. y Gutiérrez-Rojas M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*. 33:103-107.
- Forment J., Flipphi M. y Ramón D. (2006). Identification of the *mstE* gene encoding glucose-inducible, low affinity glucose transporter in *Aspergillus niger*. *Journal of Biology Chemistry*. 282:8339-8346.
- Gatto M., Muratori S. y Rinaldi S. (1988). A functional interpretation of the logistic equation. *Ecological Modelling*. 42:155–159.

- Gutiérrez-Rojas M., Cordova J., Auria R., Revah S. y Favela - Torres E. (1995). Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support. *Biotechnology Letters*. 17:219- 224.
- Haacke E.M., Brown R.W., Thompson M.R. y Venkatsen R. (1999). *Magnetic Resonance Imaging, Physical Principles and Sequence Design*, Wiley-Liss, New York. pp.606-6010.
- Heijnen J.J. y Roels J.A. (1981). A macroscopic model describing yield and maintenance relationships in aerobic fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*. 23:739–763.
- Jorgensen T.R., Vankuyk P.A., Poulsen B.R., Ruijter G.J., Visser J. y Iversen J.J. (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 V. y Williamson G. (1998). Secretion, purification, and characterization of barley alpha amylase produced by heterologous gene expression in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49: 385-392.
- Kafert E. (1977). Antranilate synthetase enzyme complex and trifunctional TRPC, gene of *Aspergillus*. *Canadian Journal of Genetic Cytology*. 19:723-738.

- Larralde-Corona C.P., López-Isunza F. y Viniegra-González G. (1997). Morphometric evaluation of the specific growth rate of *Aspergillus niger* grown in agar plates at high glucose levels. *Biotechnology and Bioengineering*. 56: 287-294.
- Loera O. y Viniegra-Gonzalez G. (1998). Identification of growth phenotypes in *Aspergillus niger* pectinase overproducing mutants using image analysis procedures. *Biotechnology Letters*. 12:801-804.
- Loera-Corral O., Aguirre J. y Viniegra-González G. (1999). Pectinase production by a diploid construct from two *Aspergillus* overproducing mutants, *Enzyme in Microbial Technology*. 25: 103-108.
- López-Isunza F., Larralde-Corona C.P. y Viniegra-González, G. (1997). Mass - transfer and growth kinetics in filamentous fungi. *Chemical Engineering Science*. 52: 2629-2639.
- Mischak H., Kubicek C.P. y Röhr M. (1984). Citrate of glucose uptake in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*. 6:425–30.
- Maldonado M.C. y Strasser de Saad A.M. (1998). Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state systems. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20:34-38.
- Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31:426-428.

- Mulder M.E.G. (1938). Sur influence du cuivre sur le croissance des microorganismes. *Annal Fermentations*. IV: 513-533.
- Nagel J.F., As V.H., Tramper J. y Rinzema A. (2002). Water and glucose gradients in the substrate measured with NMR imaging during solid state fermentation with *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 79: 653-663.
- Nopharatana M., Howes T. y Michell D. (1998). Modelling fungal growth on surfaces. *Biotechnology Techniques*.12:313-318.
- Nopharatana M., Mitcell D.A. y Howes T. (2003). Use of confocal scanning laser microscopy to mesure the concentration of aerial and pentrative hyphae during growth of *Rhizopus oligosporus* on a solid surface. *Biotechnology and Bioengineering*. 84:71-77.
- Olsson S. (1994). Uptake of glucose and phosphorous growing colonies of *Fusarium oxisporous* as quantified by image analysis. *Experimental Mycology*. 18:33-47
- Onken U. y Liefke E. (1989). Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*. 40:137-169.
- Oostra J., Le comte E.P., van den Heuvel J.C., Tramper J. y Rinzema A. (2001). Intra-particule oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 75:13-23.

- Oriol E., Schettino B., Viniegra-Gonzalez G. y Raimbault M. (1988). Solid state culture of *Aspergillus niger* on support. Journal of Fermentation Technology. 66:57-62.
- Papagianni M. y Matthey M. (2004). Modeling the mechanisms of glucose transport through the cell membrane of *Aspergillus niger* in submerged citric acid fermentation processes. Biochemical Engineering Journal. 20:7-12.
- Pelczar, Jr. M. J., Chain, E. C. S., Krieg, N. R., "Microbiology, Concepts and Applications", McGraw-Hill, 1999.
- Perkins D. (1977). Detail for preparing silica stoks. Neurospora Newsletter. 24: 16-17.
- Pirt S.J. (1967). A kinetic study of the mode of growth of surface cultures of bacteria and fungi. Microbiology. 47:181-197.
- Pirt S.J. (1975). Principles of Microbe and Cell Cultivation, Blackwell Scientific Publications, Cambridge.
- Rajagopalan S. y Modak J.M. (1995). Modeling of heat and mass transfer for solid state fermentation process en tray bioreactor. Bioprocess and Biosystems Engineering. 3:161-169.
- Rahardjo Y.S.P., Weber F.J., le comte P.E., Tramper J. y Rinzema A. (2001). Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model

solid-state fermentation system. *Biotechnology and Bioengineering*. 78:539-544.

Rahardjo Y.S.P., Weber F.J., Haemers S., Tramper J. y Rinzema A. (2005). Aerial mycelia of *Aspergillus oryzae* accelerate α -amylase production in a model solid-state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 900–902.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (2005). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation. 21ed.

Téllez-Jurado A., Arana-Cuenca A., González Becerra A.E., Viniegra-González G. y Loera O. (2006). Expression of a heterologous laccase by *Aspergillus niger* cultured by solid-state and submerged fermentations. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:665-669.

Thibault J., Acuña-Leiva G., Pérez-Correa R., Jorquera H., Molin P. y Agosin E. (2000). A hybrid representation approach for modelling complex dynamic bioprocesses. *Bioprocess Engineering*. 22:547-556.

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 and Bioengineering*. 44:104-111.

Torres N.V., Riol-Climas J.M., Wolschek M. y Kubicek C.P. (1996). Glucose transport by *Aspergillus niger*. The low affinity carrier is only formed during

growth on high glucose concentrations. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 44:790-794.

VanKuyk P. A., Diderich J. A., MacCabe A. P., Hererro O., Ruijter G. J. G. y Visser J. (2004). *Aspergillus niger* mstA encodes a high affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH. *Biochemistry Journal*. 379:375–383.

Villena G.K. y Gutiérrez-Correa M. (2007). Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Letters Applied Microbiology*. 45:231-237.

Volke-Sepúlveda T.L., Gutiérrez-Rojas M. y Favela-Torres E. (2003). Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 87: 81-86.

Vigueras G., Arriaga S., Shirai K., Morales M. y Revah S. (2009). Hydrophobic response of the fungus *Rhinochlamydomonas* *similis* in the biofiltration with volatile organic compounds with different polarity. *Biotechnology Letters*. 31: 1203-1209.

Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C.N., Romero-Gómez S.J., Díaz-Godínez G. y Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 157–167.

Viniegra-González G. y Favela-Torres E. (2006). Why does solid-state fermentation seem to be resistant to catabolite repression?. *Food Technology and Biotechnology*. 44:397-406.

Wayman F.M. y Matthey M. (2000). Simple diffusion is the primary mechanism for glucose uptake during the production phase of the *Aspergillus niger* citric acid process. *Biotechnology and Bioengineering*. 67:451-456.

Wiebe M.G., Robson G.D. y 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.

X. APÉNDICE

ARTÍCULO PUBLICADO

3 **THE EFFECT OF THE RATIO BETWEEN SUBSTRATE CONCENTRATION AND**
4 **SPECIFIC AREA OF THE SUPPORT ON THE BIOMASS YIELD OF FUNGAL**
5 **SURFACE CULTURES**

6 **EFFECTO DE LA PROPORCIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DEL SUSTRATO Y**
7 **EL ÁREA ESPECÍFICA DEL SOPORTE SOBRE EL RENDIMIENTO DE CULTIVOS**
8 **FÚNGICOS SUPERFICIALES**

9 E. Ortega-Sánchez^{1,2}, O. Loera² and G. Viniegra-González^{2*}

10 ¹*Universidad Politécnica de Tlaxcala, Departamento de Biotecnología, Av. Universidad Politécnica #1, Col. San*
11 *Pedro Xalcaltzinco 90180, Tlaxcala, Tlax. Mexico.*

12 ²*Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Av. San Rafael*
13 *Atlixco # 186, Col. Vicentina 09340, México, D.F. Mexico.*

14 Received 24 of July 2012; Accepted 10 of September 2012

15 **Abstract**

16 A parameter, $\sigma_0 = S_0\alpha^{-1}$ (gcm^{-2}), is defined. Where, S_0 , (gcm^{-3}) is the initial substrate concentration and α is the specific area
17 of the solid support. This parameter helps comparing the biomass yields, $Y_{X/S}$, of fungal superficial cultures either with a fixed
18 S_0 value and variable α or with fixed α and variable S_0 . *A. niger* cultures followed the logistic equation with maximal surface
19 density ρ_{AM} (gcm^{-2}). Final average thickness, h , was measured by image analysis. The values of h , followed a saturation function
20 of σ_0 ($R^2 = 0.965$) with extrapolated value $h_{MAX} \approx 0.4$ cm. But the volumetric density $\rho_V = \rho_{AM}h^{-1}$ was nearly constant $\rho_V \approx$
21 0.046 ± 0.005 (gcm^{-3}). The regression $Y_{X/S}^{-1} = Y_0^{-1} + \sigma_0\varepsilon^{-1}$ ($R^2 = 0.95$) in the range, $5.9 \text{ mgcm}^{-2} < \sigma_0 < 62.8 \text{ mgcm}^{-2}$ indicated,
22 $Y_0 = 0.5$, as the maximal biomass yield, and $\varepsilon = \rho_V h_{MAX} \approx 0.02 \text{ gcm}^{-2}$, as a measurement of the biosynthetic efficiency. This
23 approach could be useful for the normalization and comparison of screening tests of fungal surface cultures with a variety of
24 solid supports and culture conditions. For example, cultures with different S_0 values but, similar yield coefficient $Y_{X/S}$.

25 **Keywords:** fungal surface cultures, mass balance, specific area, biomass yield, *Aspergillus niger*.

26 **Resumen**

27 Se define, $\sigma_0 = S_0\alpha^{-1}$ (gcm^{-2}). Donde, S_0 , (gcm^{-3}) es la concentración inicial del sustrato y α , (cm^{-1}) es el área específica del
28 soporte sólido. Dicho parámetro ayuda a comparar los rendimientos de la biomasa, $Y_{X/S}$, de cultivos fúngicos superficiales, sea
29 con un nivel fijo S_0 , y diversos valores de α , o con un valor fijo de α , y diversos valores de S_0 . Las curvas de crecimiento fueron
30 seguidas por la ecuación logística con una densidad superficial máxima ρ_{AM} (gcm^{-2}). Su espesor final, h , se midió por análisis de
31 imágenes que siguieron una función de saturación en σ_0 ($R^2 = 0.965$) con un valor extrapolado $h_{MAX} \approx 0.4$ cm. Pero, la densidad
32 volumétrica, $\rho_V = \rho_{AM}h^{-1}$ fue casi constante $\rho_V \approx 0.046 \pm 0.005$ (gcm^{-3}). La regresión $Y_{X/S}^{-1} = Y_0^{-1} + \sigma_0\varepsilon^{-1}$ ($R^2 = 0.95$) en el
33 intervalo, $5.9 \text{ mgcm}^{-2} < \sigma_0 < 62.8 \text{ mgcm}^{-2}$, indicó, $Y_0 = 0.5$, y $\varepsilon = \rho_V h_{MAX} \approx 0.02 \text{ gcm}^{-2}$, ambos como medida de la eficiencia
34 bio-sintética. Este enfoque puede ser útil para normalizar y comparar ensayos de selección de cepas fúngicas en diversos tipos
35 de soportes y condiciones de cultivo. Por ejemplo, diferentes valores de S_0 , pero similares valores de $Y_{X/S}$.

36 **Palabras clave:** cultivos fúngicos superficiales, balance de materia, área específica, rendimiento de la biomasa,
37 *Aspergillus niger*.

*Corresponding author. E-mail: vini@xanum.uam.mx

1 Introduction

Fungal surface cultures on agar plates have been used for more than a century as laboratory models of the growth of filamentous fungi, and, could be seen as simplified models of Solid State Fermentations (SSF). For example, without the problems of inter particle diffusion barriers that affect SSF systems. However, cultures of *Aspergillus niger* grown on packed beds of small Amberlite beads imbibed with sugar broths showed higher biomass yields than similar cultures on agar plates (Favela-Torres *et al.*, 1998) when the comparison was made on terms of the initial substrate concentration. But, an important difference between those systems was the specific area, α (Area/Volume, ratio), of the solid support, with a value $\alpha \approx 2 \text{ cm}^{-1}$ for agar plates and $\alpha \approx 100 \text{ cm}^{-1}$ for small Amberlite beads, estimated from data published by Auria *et al.* (1990). Furthermore, Rahardjo *et al.* (2005) found that the yield of α -amylase and total oxygen consumption, per gram of initial substrate, of cultures of *A. oryzae* grown on round flat cakes of wheat grains, was proportional to the specific area of those cakes. However, to the best of our knowledge, there are no quantitative accounts about the combined effect of substrate concentration and specific area of the solid support on the biomass yield of fungal surface cultures.

Thus, this work is related to the effect of the ratio¹ $\sigma_0 = S_0\alpha^{-1}$, on biomass yield ($Y_{X/S}$) where S_0 (gcm^{-3}) is the bulk substrate concentration, and α (cm^{-1}) is the specific area of the solid support. This definition helps to explore the effects of changing the specific area, α , on $Y_{X/S}$ having a fixed value of S_0 , as compared to the effect of changing S_0 , with a fixed α value. The purpose of this study is to show that σ_0 is an important parameter affecting fungal biomass yield. This goal is achieved by showing that surface *A. niger* cultures follow a linear regression model between the measured values of $Y_{X/S}^{-1}$ (g of substrate consumed/g biomass produced) with respect to σ_0 . Also, the correlation between final superficial biomass production ρ_{AM} (gcm^{-2}) and the measured thickness of the fungal layer, h , tries to test whether the estimated volumetric density, calculated as, $\rho_V = \rho_{AM} \cdot h^{-1}$, is constant for different values of σ_0 . Such results would be helpful to define the constraints of *A. niger* layers with different thicknesses as a result of using different σ_0 values. All those results seem useful for the rational design of fungal surface cultures that are

commonly utilized in mass screening procedures for strain selection.

2 Materials and methods

2.1 Microorganism

The *Aspergillus niger* strain C28eco3-13 used in this study was previously reported by Téllez-Jurado *et al.* (2006) and is a laccase transformant derived from a wild strain studied by Antier *et al.* (1993). It belongs to the UAM (Universidad Autónoma Metropolitana) fungal collection. Such strain was propagated in Potato Dextrose Agar (PDA) at 30°C and the spores were preserved in vials with silica gel. For the present experiments, a few grains of silica gel were spread onto the surface of 25 mL of PDA medium within 9 cm diameter Petri dishes, followed by incubation at 30°C until black spores were formed (usually at 5 days). The resulting spores were harvested by pouring 100 mL of a sterile Tween-80 0.5% (v/v) solution into the dish and gently stirring the agar surface with a magnetic bar for 5 min. The resulting spore suspension was poured into a sterile Erlenmeyer flask. Spore concentrations were measured with a Neubauer chamber.

2.2 Medium composition

The culture medium was similar to one reported by Kafert (1977), but the only carbon source was glucose labeled as S_0 (gL^{-1}). The salt composition was proportional to $S_0 = 100$: (gL^{-1}): 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), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (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). The, C/ N, ratio was maintained at a constant level (16 gC/ gN). The initial pH value of the medium was adjusted to 6.5 and 1.5% agar was used in all experiments.

2.3 Experimental units

The experimental units were 9 cm Petri dishes ($A = 63.62 \text{ cm}^2$) with different volumes of culture medium (see Table 1). Inoculation was performed with 1 mL containing 10^5 spores and scattered evenly over the surface (lawn pattern). Dishes were stored in a stove at 30°C for different periods of time.

¹The ratio $\sigma_0 = S_0\alpha^{-1}$ can be defined as the initial amount of substrate, $Q = S_0V$, within a solid support with volume, V , divided by the area, A , of the surface culture of the same solid support. This comes from the usual definition $\alpha = A/V$.

Table 1. Specific growth rates (μ), average volumetric density ($\rho_V = \rho_{AM}h^{-1}$) and degree of glucose utilization (f) of *Aspergillus niger* grown on agar plates with indicated σ_0 , S_0 and α , values.

Exp. No.	σ_0 (gcm^{-2})	S_0 (gcm^{-3})	α (cm^{-1})	μ (h^{-1})	ρ_V (mgcm^{-3})	f (%)
1	0.0059	0.0125	2.12	0.107±0.002 ^a	0.039	97±1.6
2	0.0118	0.0250	2.12	0.125±0.031 ^a	0.049	98±0.2
3	0.0157	0.1000	6.36	0.098±0.009 ^a	0.054	98±0.9
4	0.0236	0.0500	2.12	0.082±0.003 ^a	0.051	93±0.8
5	0.0394	0.1000	2.54	0.127±0.007 ^a	0.047	98±0.9
6	0.0472	0.1000	2.12	0.090±0.041 ^a	0.043	99±0.5
7	0.0629	0.1000	1.59	0.102±0.008 ^a	0.044	88±7.9
Average				0.104±0.017	0.046±0.005	96±3.8

Specific growth rates (μ) were estimated from equation (1), the values of ρ_{AM} , h and f , were measured as it is indicated in Materials and Methods (see also Fig. 1). Rows with the same superscript do not differ significantly (Tukey comparison test, $p < 0.05$). All experiments in Petri dishes with surface area $A = 63.617 \text{ cm}^2$. The value of specific area, $\alpha = A/V$ ratio.

2.4 Experimental design

The experiments were performed with different values of σ_0 , obtained in two different ways: a) Changing S_0 (gcm^{-3}) = 0.0125, 0.025, 0.050 and 0.100, with a fixed agar volume $V = 30 \text{ mL}$ ($\alpha = 2.12, \text{cm}^{-1}$) or b) changing V (mL) = 10, 25 and 40, ($\alpha = 6.36, 2.54, 1.59, \text{cm}^{-1}$) with a fixed $S_0 = 0.100, \text{gcm}^{-3}$. This experimental design is shown in Table 1 numbering the rows with increasing values of $\sigma_0 = S_0\alpha^{-1}$.

2.5 Analysis

The dry weight of the biomass was measured after melting the agar medium. The biomass, together with the agar, was introduced into a baker containing 200 mL of acidified water with HCl (pH 3), which was placed in a microwave oven (Panasonic NV-950B) at level 9 for 2 minutes. The resulting liquid was then filtered through a tared Millipore filter membrane (nominal pore size $0.45 \mu\text{m}$), washing through the filter with distilled water and placing it at 60°C until a constant weight was obtained. The total amounts of biomass, X , per agar plate were determined by the dry weight difference, and were expressed as average surface densities ρ_A (gcm^{-2}). Growth curves were obtained using triplicate values of ρ_A at eight regular intervals over approximately 96 hours. The experimental values were followed by the logistic equation (1) and the asymptotic values (for $t \rightarrow \infty$) were calculated as, ρ_{AM} .

$$\rho_A(t) = \frac{\rho_{AM}}{1 + Ce^{-\mu t}} \quad (1)$$

where, $C = (\rho_{AM} - \rho_0)/\rho_0$ is an integration constant and the parameters ρ_{AM} , ρ_0 , and μ can be estimated from the least value of the sum of squared residuals between the experimental data and the calculated data points. Calculations were performed with the program Solver (Marquardt algorithm) of an Excel spread sheet.

Residual glucose present in the filtrate was measured by the DNS method (Miller, 1959). The thicknesses, h (cm), of fungal layers were measured at the end of each run ($\rho_A \approx \rho_{AM}$). Vertical random sections of such layers were made with a conventional scalpel. Every section was observed under a microscope (OLYMPUS KP-D51/D50) adapted with a camera (OLYMPUSKP-D51/D50). Illumination source was the halogen bulb of the microscope (6V/30W) with intensity 4 in a scale from 0 to 7. Measurements were performed using commercial image analysis software (Image J, USA); the images were displayed as a gray images having 512×512 pixels, the thickness of interest was selected manually and measured with a predetermined software function (analyze and measure). For each experiment, 100 independent measurements were made in three separate Petri dishes.

2.6 Statistical analysis

Analysis of variance and multiple average Tukey's comparison tests were performed, with a level of statistical significance $p < 0.05$. The Minitab 15.0 (Pennsylvania, USA) statistical software was used.

3 Results

Table 1 shows that the average degree of substrate depletion was $f = 0.96 \pm .04$ and the average specific growth rate was, $\mu = 0.10 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, both without statistical significance ($p > 0.05$) with respect to changes in σ_0 . Hence biomass production was measured when practically all the substrate was utilized by the fungal mat and with growth rates comparatively similar in all the experiments. The yield coefficient, $Y_{X/S}$, was calculated from the mass balance ($Y_{X/S} V f S_0 = A \rho_{AM}$) as follows:

$$Y_{X/S} = \frac{\alpha \rho_{AM}}{f S_0} \quad (2)$$

It is worth noticing that all quantities on the second term of Eq. (2) are experimental values measured as indicated above. If $\rho_V = \rho_{AM} h^{-1}$, is the average volumetric density of the mycelium, h , is the thickness of the mycelium mat and recalling the definition $\sigma_0 = S_0 \alpha^{-1}$, the following relationship follows:

$$Y_{X/S} = \frac{\rho_V h}{f \sigma_0} \quad (3)$$

Figure 1 shows the trends of experimental values of, h and ρ_{AM} , vs. σ_0 . Both dispersions of experimental data are quite similar to each other. The dispersion of thickness, h , was followed very closely ($R^2 = 0.965$) by the hyperbolic Eq. (4)

$$h = \frac{h_{max} \sigma_0}{K_h + \sigma_0} \quad (4)$$

where, $h_{max} = 0.386 \text{ cm}$, is the extrapolated value for very large σ_0 and $K_h = 0.0431 \text{ gcm}^{-2}$ is the σ_0 value when $h = h_{max}/2$. Table 1 shows that the estimated average of quotient $\rho_{AM} h^{-1}$ was $\rho_V = 0.048 \pm 0.004 \text{ gcm}^{-3}$ with low correlation with respect to σ_0 ($R^2 = 0.046$). Also, the dispersion of experimental values of ρ_{AM} can be followed by Eq. (4) multiplied by a fixed value of, $\rho_V = 0.049 \text{ gcm}^{-3}$ (see Fig. 1). This supports the model where the final value, ρ_V , is approximately constant for all experiments and the main source of biomass increase, with respect to σ_0 , is related to the thickness of the fungal mat. The published

discrepancies with this model will be discussed in the following section.

Substitution of Eq. (4) into Eq. (3) leads, after some rearrangement and assuming that $f \approx 1$, to

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_0} + \frac{\sigma_0}{\varepsilon} \quad (5)$$

where, the physiological interpretation of parameters, Y_0 (maximal yield for small σ_0) and $\varepsilon = \rho_V h_{max}$ (maximal biomass surface density for large σ_0), are derived in the Appendix A and commented in the Discussion. The calculated values, corresponding to Fig. 2 were, $Y_0 = 0.50$; $\varepsilon = 0.0149 \text{ gcm}^{-2}$; $R^2 = 0.950$. Therefore, there is consistency between, the saturation model given by Eq. (4) and the empirical biomass yield equation (5), supporting a simple model where *A. niger* grows with approximately constant volumetric density, ρ_V , having a maximal thickness, h_{max} . It is worth noticing that the maximal yield $Y_0 \approx 0.5$ with glucose, is limited by the thermodynamic efficiency of biosynthesis (Heijnen and Roels, 1981).

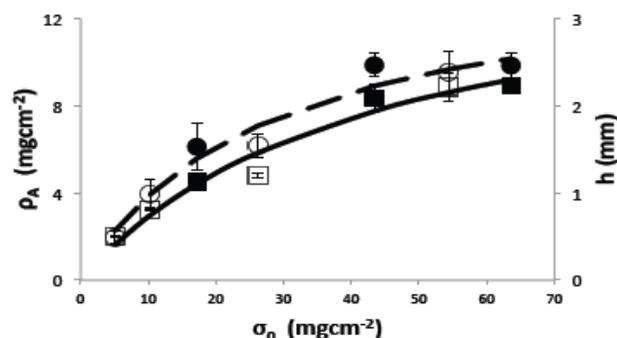


Fig. 1. Correlations between surface density (ρ_{AM} , circles) and bio-film thickness (h , squares) in relation to surface availability (σ_0) of *Aspergillus niger* grown as lawn culture in 9 cm Petri dishes. Open symbols correspond to $S_0 = (\text{gcm}^{-3})$ 0.0125, 0.025, 0.050, 0.100 and $\alpha = 2.12 \text{ cm}^{-1}$. Closed symbols correspond to $S_0 = 0.100 \text{ gcm}^{-3}$ and $\alpha (\text{cm}^{-1}) = 1.59, 2.54$ and 6.36 . Continuous curve was drawn as the least square fit of the saturation equation (4) of h as a function of σ_0 . Interrupted line was drawn as the product of values estimated by equation (4) multiplied by $\rho_V = 0.049 \text{ gcm}^{-3}$.

4 Discussion

As indicated at the Introduction, Rahardjo et al. (2005) studied the effect of changing the value of α

of flat rounded cakes made of wheat grains, on the pattern of total oxygen consumption and α -amylase production by *R. oligosporus*. They found a linear correlation of such variables in the range from $\alpha = 1 \text{ cm}^{-1}$ to $\alpha = 12.9 \text{ cm}^{-1}$. This is indirect evidence that $Y_{X/S}$ is proportional to α , as indicated by the mass balance in equation (2) because *R. oligosporus*, should hydrolyze starch in order to grow on wheat grains and most of oxygen consumption is also linked to the growth process. Present results show in a more precise way how, α and S_0 affect $Y_{X/S}$. This can be done combining eqs. (4) and (5) to become Eq. (6)

$$Y_{X/S} = \frac{Y_0 \varepsilon}{\varepsilon + Y_0 \sigma_0} \quad (6)$$

From Eq. (6) it can be derived that for very low σ_0 ($Y_0 \sigma_0 \ll \varepsilon$), biomass yield will be maximal ($Y_{X/S} \rightarrow Y_0$). But for large σ_0 ($Y_0 \sigma_0 \gg \varepsilon$), biomass yield will be a decreasing function of σ_0 ($Y_{X/S} \approx \varepsilon \sigma_0^{-1}$). Appendix A shows the final mass balance of substrate uptake based on the rates of biosynthesis (μ) and maintenance (m). The combination of such balance with the logistic equation of growth, produces two yield factors, a maximal biomass yield, Y_0 , and another term proportional to the ratio, m/μ . This ratio seems to be an indication of how much substrate was used by non-productive metabolism. For example, when the ratio, m/μ , is small, the yield coefficient is Y_0 . This helps to interpret the physiological meaning of ε as the productivity of the surface culture that is large when the ratio, m/μ is small. The parameter ε has the dimensions of biomass surface density since, according to Appendix A, $\varepsilon = \rho_V h_{MAX}$, is the maximal biomass production on the surface of the solid support.

Our calculations yielded, $\varepsilon = 0.033 \text{ gcm}^{-2}$ from biomass yield data published by Favela-Torres et al. (1998), obtained on agar plates with a wild strain of *A. niger*. This result shows that our mutant strain was two times less productive ($\varepsilon = 0.015 \text{ gcm}^{-2}$) when cultured on agar plates than the wild strain studied by them. However, the maximal yield values were quite similar ($Y_0 \approx 0.5$) for both sets of data. Again, our calculations from previous data (Favela-Torres et al., 1998) obtained in columns packed with small beads of Amberlite, we obtained, $\varepsilon = 0.009 \text{ gcm}^{-2}$. This is a smaller value than the aforementioned values of ε obtained on agar plates. It should be noted that the range of initial substrate concentration, S_0 , was quite similar in all those experiments ($0.01 \text{ gcm}^{-3} < S_0 < 0.45 \text{ gcm}^{-3}$) but the values for σ_0 of Amberlite columns were quite different because of large difference in the specific area, since the specific

area of agar plates is small ($\alpha \approx 1 \text{ cm}^{-1}$) as compared to the large value of Amberlite beads ($\alpha \approx 100 \text{ cm}^{-1}$) with diameter close to 0.06 cm. Such comparisons help to conclude that, a) The maximum yield, Y_0 , of *A. niger*, seems to concur with the usual biomass yield of aerobic microbial cultures when using glucose as the main source or carbon (Heijnen and Roels, 1981) and, b). The value of ε depends both on the fungal strain (wild type vs. mutant) and the culture medium (Petri dish vs. Amberlite beads). The importance of such comparison is that yield values should not be compared in terms of bulk substrate concentrations, S_0 , but on the basis of parameter $\sigma_0 = S_0 \alpha^{-1}$. In other words, to compare the yield of different fungal strains, grown on different kinds of solid supports, it is necessary to normalize such comparisons with similar σ_0 values. Otherwise the importance of ε will not be appreciated.

The constancy of the volumetric density, ρ_V , of *Aspergillus niger* found in this work is somewhat different to the reports of Nopharatana et al. (2003) and Camacho-Díaz et al. (2010) with surface cultures of *Rhizopus oligosporus*. They found a decreasing function of volumetric density, ρ_V , on the thickness, h , in lawn cultures (Nopharatana et al., 2003) or on the radius of circular colonies (Camacho-Díaz et al., 2010). In the present work the variation of ρ_V was found to be small for different values of h in the range, $0.05 \text{ cm} < h < 0.22 \text{ cm}$. One explanation for those differences could be a sharper upper boundary in *Aspergillus niger* as compared to a loose defined boundary of the fungal mat of *Rhizopus oligosporus*.

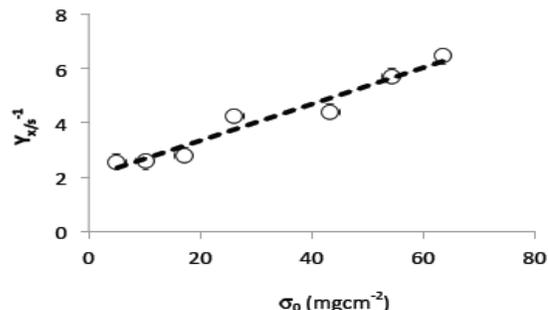


Fig. 2. Correlation between $Y_{X/S}^{-1}$ (estimated as $\sigma_0 \rho_A^{-1}$) vs. σ_0 . Data points indicated as (O). The linear equation, indicated as interrupted line, was defined as, $Y_{X/S}^{-1} = Y_0^{-1} + \sigma_0 \varepsilon^{-1}$. Estimated parameters: $Y_0 = 0.50$, $\varepsilon = 0.0149 \text{ gcm}^{-2}$, $R^2 = 0.950$.

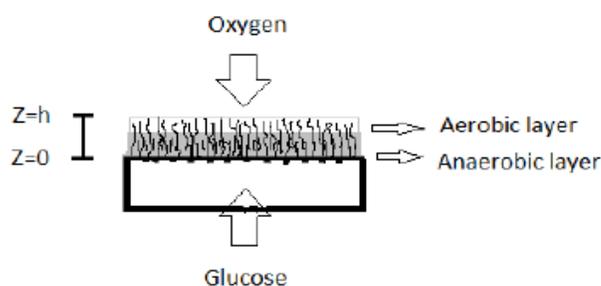


Fig. 3. Diagram of a fungal layer growing on top of an agar plate. Oxygen diffuses downwards (from the air into the mycelium) and glucose moves upwards (from the agar to the top of the fungal layer). Oxygen penetration depth is smaller than the total depth, h , of the mycelium. Axial coordinate, z , is taken from the air interface ($z = 0$) to the agar surface ($z = h$).

This point requires further analysis. For example, it seems worth looking in future work, at biomass density distributions of different fungal species grown on solid surfaces.

Hill (1929) and Pirt (1966, 1967) proposed the concept of oxygen penetration depth, here labeled as h_C , for different kinds of biomass surface cultures. Measurements of h_C done by Rahardjo *et al.* (2002) with microelectrodes inserted in the fungal mat of *Aspergillus oryzae*, reported $h_C = 0.0082$ cm, and $h_C = 0.0060$ cm for *Rhizopus oligosporus*, reported by Oostra *et al.* (2001). Those results indicate that biomass with depth higher than h_C is deprived from oxygen. Oxygen limitation of *Aspergillus niger* was found related to polyol production and reduction of $Y_{X/S}$ to values close to 0.25 (Diano *et al.*, 2006). This phenomenon has been studied in solid-state fermentations by Gutiérrez-Rojas *et al.* (1995) and Ruitjer *et al.* (2004). Also, Olsson and Jennings (1991) described the phenomenon of substrate translocation in fungal cultures. Hence, thick layers of *A. niger*, seem to be made of an uppermost and thin aerobic layer ($h < h_C$) with $Y_{X/S} \approx 0.5$ and a deep anaerobic layer ($h > h_C$) with lower $Y_{X/S}$, producing secondary metabolites and trans-locating the excess substrate from the agar plate to the top aerobic layer (Fig. 3). The optimal value $\sigma_0 = 0.001$ gcm^{-2} can be estimated using Eq. (3) when, $f \approx 1$; $H \approx 0.01$ cm; $Y_{X/S} = 0.5$, and $\rho_V = 0.05$ gcm^{-3} . For example, most recipes for microbial cultures recommend $S_0 = 0.01$ gcm^{-3} , and the corresponding optimal specific area would be $\alpha = 10$ cm^{-1} . That is, an agar plate of height 0.1 cm (see Appendix B). This means that cultures using thicker agar plates could

have a mixture of aerobic and anaerobic metabolism.

Appendix B provides a way to estimate the optimal characteristic length λ for different shapes of solid support, plates ($\lambda = H$), cylinders ($\lambda = R$) or spheres ($\lambda = R$). Such calculations help to choose the geometry and size of particles supporting the growth of thin fungal layers having maximal biomass yield for a given substrate concentration, S_0 , and physiological conditions (Y_0 , h_C , and ρ_V values). This result could be important for the design of screening procedures requiring a specific kind of metabolism. In example, the use of very thin agar plates for aerobic metabolism and thick plates for different mixtures of aerobic and anaerobic metabolism. Furthermore, hypertonic syrups ($S_0 \approx 0.1$ gcm^{-3}), require small solid particles with α values higher than 100 cm^{-1} in order to maximize biomass yields. For example, spherical particles with diameter smaller than $d = 0.06$ cm. Therefore, the proper selection of σ_0 seems to be an important parameter to orient biomass yield (and fungal metabolism) of surface cultures.

Conclusions

Mass balance of surface fungal cultures is a direct way to study how the biomass yield, $Y_{X/S}$, is affected by the combined effect of specific area, α (cm^{-1}), of the support and the bulk initial substrate concentration, S_0 (gcm^{-3}), using the composite parameter, $\sigma_0 = S_0\alpha^{-1}$. Measurements of the final surface density, ρ_{AM} (gcm^{-2}) and the final thickness, h (cm), with changes of S_0 or α , independent from each other, led to the conclusion that the estimated volumetric density, $\rho_V = \rho_{AM}h^{-1}$ was nearly constant for all studied values of σ_0 whereas the thickness, h , was hyperbolic on σ_0 . This supports that fungal mats of *Aspergillus niger* grow mainly at the expense of the thickness, h , which is bounded to a maximal value, h_{max} . Linear correlation between $Y_{X/S}^{-1}$ and σ_0 , indicated that fungal surface cultures have a maximal biomass yield, $Y_{X/S} = Y_0$ when the parameter, σ_0 , is very low. This linear correlation has a slope, $1/\varepsilon$, where, ε is the maximal productivity of the fungal culture. Maximal biomass yield is obtained with fungal layers thinner than the reported oxygen penetration depth ($h_C \approx 0.01$ cm). Conversely, when σ_0 is large (large amounts of substrate available per unit area) fungal mats will be thicker than the oxygen penetration depth. That is, thicker than 0.01 cm and according the experimental results of Oostra *et al.* (2001) and Rahardjo *et al.* (2002) implying that the cells below

oxygen penetration depth will be anoxic. The fact that biomass reaches a maximal density ($\rho_V < 0.05 \text{ g cm}^{-3}$) could be taken as an indication of a constraint between the porosity of the fungal mat, higher than 75%, and the rate of oxygen consumption. Namely, for lower porosities (higher densities), oxygen transfer rate will be lower than oxygen demand. A practical consequence of this analysis is the importance of the combined parameter $\sigma_0 = S_0\alpha^{-1}$ affecting the biomass yield, $Y_{X/S}$, in a reproducible way. This parameter seems important for the optimization of strains, under normalized conditions, using fungal surface cultures.

Nomenclature

A	area of the agar plate (cm^2)
A_S	surface area of the solid support (cm^2)
C	oxygen concentration (mg cm^{-3})
D	diffusion coefficient ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
H	height of the agar plate (cm)
h	thickness of the fungal layer (cm)
h_{max}	maximal thickness of the fungal layer (cm) for very large σ_0
h_C	oxygen penetration depth in the fungal layer (cm)
K	saturation constant, σ_0 value to reach $h_{max}/2$ (g cm^{-2})
L	length of cylindrical particles (cm)
M	$= Y_0 S_0 / \rho_V$ relative biomass yield (dimensionless)
m	maintenance coefficient ($\text{g S gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Q_0	$= S_0 V_S$ initial amount of substrate within the solid support (g)
q_s	specific metabolic rate ($\text{g O}_2 \text{ gX}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
R	radius of spherical or cylindrical particles (cm)
S_0	initial substrate concentration (g cm^{-3})
t	time (s or h)
V_S	support volume (cm^3)
V_X	volume occupied by the fungal layer (cm^3)
X	total amount of biomass (g)
Y_0	maximal biomass yield (g X gS^{-1})
$Y_{X/S}$	biomass yield (g X gS^{-1})
z	depth within the fungal layer (cm)
<i>Greek letters</i>	
α	$= A/V$ specific area of the solid support (cm^{-1})
ε	$= \rho_V h_{max}$ efficiency factor (g cm^{-2})
Λ	relative thickness (h_C/L , dimensionless)
λ	characteristic length of solid supports (cm)
μ	specific growth rate (h^{-1})

ρ_A	biomass surface density (g cm^{-2})
ρ_{AM}	maximal biomass surface density (g cm^{-2})
ρ_V	dry mass volumetric biomass density (g cm^{-3})
ρ_0	initial biomass surface density (g cm^{-2})
σ_0	quotient S_0/α (g cm^{-2})

Acknowledgements

Most of the experimental part of this work was done at and financed by the Universidad Autónoma Metropolitana with the collaboration of Universidad Politécnica de Tlaxcala. One co-author (GVG) was granted a sabbatical leave of absence during 2010 at Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Brazil) and was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil). Criticism and important suggestions are thanked to Professors, Denise Freire (UFRJ), Ernesto Favela-Torres (UAM), Felipe López-Isunza (UAM) and Enrique Galindo-Fentanes (Universidad Nacional Autónoma de México). Eric Ortega-Sánchez thanks to CONACYT for the scholarship granted (Reg. No. 202357).

References

- Antier P., Minjares A., Roussos S., Raimbault M., and Viniegra-González G. (1993). Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 254-260.
- Auria R., Hernández S., Raimbault M., and Revah S. (1990). Ion exchange resin: a model support for solid growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering* 6, 391-396.
- Camacho-Dfáz B.H.C., Aparicio A.J., Chanona-Pérez J.J., Calderón-Domínguez G., Alamilla-Beltrán L., Hernández-Sánchez H. and Gutiérrez-López G.F. (2010). Morphological characterization of the growing front of *Rhizopus oligosporus* in solid media. *Journal of Food Engineering* 101, 309-317.
- Diano A, Bekker-Jensen S, Dynesen J, and Nielsen J. (2006). Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotech Bioeng* 94, 899-908.

- 494 Favela-Torres E., Córdova-López J., García-Rivero
495 M. and Gutiérrez-Rojas M. (1998). Kinetics of
496 growth of *Aspergillus niger* during submerged,
497 agar surface and solid state fermentations.
498 *Process Biochemistry* 33, 103-107.
- 499 Gutiérrez-Rojas M., Córdova J., Auria R., Revah
500 S. and Favela-Torres E. (1995). Citric acid
501 and polyols production by *Aspergillus niger*
502 at high glucose concentration in solid-state
503 fermentation of inert support. *Biotechnology*
504 *Letters* 17, 219-224.
- 505 Heijnen J.J., and Roels J.A. (1981). A macroscopic
506 model describing yield and maintenance
507 relationships in aerobic fermentation processes.
508 *Biotechnology and Bioengineering* 23, 739-763.
- 509 Hill AV. 1928. The diffusion of oxygen and lactic
510 acid through tissues. *Proc R Soc Lond B*
511 104,39-96.
- 512 Kafert E. (1977). Antranilate synthetase enzyme
513 complex and tri-functional TRPC, gene of
514 *Aspergillus*. *Canadian Journal of Genetics and*
515 *Cytology* 19, 723-738.
- 516 Miller G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid
517 reagent for determination of reducing sugar.
518 *Analytical Chemistry* 31, 426-428.
- 519 Nopharatana M., Mitchell D.A. and Howes T. (2003).
520 Use of confocal scanning laser microscopy
521 to measure the concentrations of aerial and
522 penetrative hyphae during growth of *Rhizopus*
523 *oligosporus* on a solid surface. *Biotechnology*
524 *and Bioengineering* 84, 71-77.
- 525 Olsson S. and Jennings D.H. (1991). A glass fiber
526 filter technique for studying nutrient uptake by
527 fungi: the technique used on colonies grown
528 on nutrient gradients of carbon and phosphorus.
529 *Experimental Mycology* 15, 292-301.
- 530 Oostra J., le Comte E.P., van den Heuvel
531 J.C., Tramper J. and Rinzema A. (2001).
532 Intra-particle oxygen diffusion limitation in
533 solid-state fermentation. *Biotechnology and*
534 *Bioengineering* 75, 13-24.
- 535 Pirt S.J. (1966). A theory of the mode of growth
536 of fungi in the form of pellets in submerged
537 culture. *Proceeding of the Royal Society of*
538 *London B* 166, 369-373.
- 539 Pirt S.J. (1967). A kinetic study of the mode of
540 growth of surface colonies of bacteria and fungi.
541 *Journal of General Microbiology* 47, 181-197.
- 542 Rahardjo Y.S.P., Weber F.J., le Comte E.P., Tramper
543 J. and Rinzema A. (2002) Contribution of aerial
544 hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration
545 in a model solid-state fermentation system.
546 *Biotechnology and Bioengineering* 78, 539-544.
- 547 Rahardjo Y.S.P., Jolink F., Haemers S., Tramper
548 J. and Rinzema A. (2005) Significance of
549 bed porosity, bran and specific surface area
550 in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*.
551 *Biomolecular Engineering* 22, 133-139.
- 552 Ruijter G.J.G., Visser J. and Rinzema A. (2004).
553 Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at
554 low water activity in solid-state fermentation.
555 *Microbiology* 150, 1095-1101.
- 556 Téllez-Jurado A., Arana-Cuenca A., González-
557 Becerra E., Viniestra- González G. and Loera O.
558 (2005). Expression of a heterologous laccase
559 by *Aspergillus niger* cultured by solid-state
560 and submerged fermentations. *Enzyme and*
561 *Microbial Technology* 38, 665-669.

Appendix A

Mathematical model of mold growth on solid surfaces

It is assumed that a mycelial fungus grows over a solid surface with area, A , producing quantity, X (grams in dry basis) according to the logistic equation, as follows

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[1 - \frac{X}{X_M} \right] X \quad (\text{A.1})$$

Where, μ (h^{-1}), is the initial rate of growth when, $0 < X \ll X_M$, and X_M is the maximal biomass quantity to be produced on that solid surface. The limiting substrate, i.e. the carbon source, is distributed evenly within the solid support with volume, V , at initial concentration, S_0 . Hence the initial amount of substrate is $Q_0 = S_0V$. The rate of substrate uptake is given by the following expression.

$$-\frac{dQ}{dt} = \frac{1}{Y_0} \frac{dX}{dt} + mX \quad (\text{A.2})$$

where, Y_0 , is the maximal yield (g of X per g of S) and m (g $S/\text{g}X \cdot \text{h}$), is the maintenance coefficient.

578 Combining Eqs. (A.1) and (A.2) and after integration,
579 the following expression is obtained

$$(Q_0 - Q) = \frac{X - X_0}{Y_0} + \frac{\mu X_M}{m} \ln \left[\frac{1 - X_0/X_M}{1 - X/X_M} \right] \quad (\text{A.3})$$

580 After some rearrangement, assuming that, $X_0 \ll X <$
581 X_M , and defining, $\phi = X/X_M$, it is possible to estimate
582 the decrease of the substrate, $-\Delta Q = Q_0 - Q$, as
583 follows

$$-\Delta Q = \frac{X}{Y_0} + \frac{mX_M}{\mu} \ln \left[\frac{1}{1 - \phi} \right] \quad (\text{A.4})$$

584 After a very long period of time, $\phi \rightarrow 1$, $X \rightarrow X_M$, and
585 $Q \rightarrow 0$

$$Q_0 \approx \frac{\phi X_M}{Y_0} + \frac{mX_M}{\mu} \ln \left[\frac{1}{1 - \phi} \right] \quad (\text{A.5})$$

586 Assuming, $\phi = 0.99996$, an approximate estimate of
587 $Y_{X/S}^{-1} = Q_0/X_M$, is obtained

$$\frac{1}{Y_{X/S}} \approx \frac{1}{Y_0} + \frac{m}{\mu} \ln \left[\frac{1}{1 - 0.99996} \right] = \frac{1}{Y_0} + 10 \frac{m}{\mu} \quad (\text{A.6})$$

588 Equation (A6) shows that the inverse of the apparent
589 yield, $Y_{X/S}^{-1}$, increases with the ratio, m/μ , which is an
590 indication of how much substrate was used to make
591 other products different from biomass. When the ratio,
592 m/μ is very small, the yield is maximal ($Y_{X/S} \rightarrow Y_0$)

593 The experimental evidence shows that the inverse
594 yield is proportional to σ_0 , according to Eq. (A.7) that
595 can be compared to Eq. (A6)

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_0} + \frac{\sigma_0}{\varepsilon} \quad (\text{A.7})$$

596 Therefore, $1/\varepsilon$, is an index of the efficiency of biomass
597 production because it is proportional to the ratio, m/μ .
598 Furthermore, if the volumetric biomass density, ρ_V , is
599 almost constant, the total amount of biomass over the
600 surface is given by

$$X = A\rho_{AM} = A\rho_V h \quad (\text{A.8})$$

601 Where, h , is the average thickness of the fungal
602 layer distributed with final average surface density,
603 ρ_{AM} . Again, experimental evidence shows that Eq. (4)
604 holds, and for the sake of clarity is repeated as

$$h = \frac{h_{max}\sigma_0}{K + \sigma_0} \quad (\text{A.9})$$

605 When $\sigma_0 \gg K$, the thickness reaches its maximal
606 value $h \approx h_{max}$, and from Eq. (3) and assuming

607 complete substrate utilization ($f \approx 1$), Eq. (A.10) is
608 obtained

$$\frac{1}{Y_{X/S}} \approx \frac{\sigma_0}{\rho_V h_{max}} \quad (\text{A.10})$$

609 From Eq. (A.7) for large values of σ_0 , Eq. (A.11) is
610 obtained

$$\frac{1}{Y_{X/S}} \approx \frac{\sigma_0}{\varepsilon} \quad (\text{A.11})$$

611 Hence, comparing eqs. (A10) and (A11), the following
612 identification is obtained, $\varepsilon = \rho_V h_{MAX}$. Therefore, the
613 parameter ε is the maximal amount of biomass per unit
614 area. For example, a mutant strain that is diverting
615 most of the substrate to collateral products will be
616 less productive than a wild type that has evolved to be
617 highly productive with little diversion of the substrate
618 in collateral products. Also, a column of packed bed
619 particles could have more hindrance for the growth of
620 the fungal layer than an open surface of a Petri dish.
621 This is analyzed in the Discussion.

622 Appendix B

623 *Optimal size of supports for solid state* 624 *fermentation*

625 Fungal cultures growing on the surface of solid
626 support will have optimal dimensions when the initial
627 amount of the substrate, Q_0 , is just enough to support
628 a fungal layer that is fully oxygenated. In order to
629 calculate the size of the solid support it is necessary to
630 make an analysis of mass transfer of oxygen through
631 the fungal mat. This should consider the fact that there
632 are two inter-phases, a) A lower inter-phase with the
633 solid support where the nutritive liquor is embedded
634 and b) An upper inter-phase with air from which
635 oxygen diffuses in a passive way following the Fick's
636 law as follows. The mass resulting mass balance is
637 given in (B1) and is illustrated in Fig. 3.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - q_S \rho_V \quad (\text{B.1})$$

638 Where, $z = 0$, corresponds to the aerial inter-phase,
639 and $z = h$, corresponds to the inter-phase with the solid
640 substrate. The steady-state solution of Eq. (B1) yields
641 the following equation

$$\frac{\partial C}{\partial t} = 0 \rightarrow C = C_0 \left[1 - \frac{z}{h_C} \right]^2 \quad (\text{B.2})$$

642 This equation is consistent with the boundary
643 condition, $C = C_0$, for $z = 0$, and also with $C \approx 0$,

for $z = h_C$, as indicated by Hill (1929) and Pirt (1966, 1967). The value of $h_C = 0.006$ cm has been reported by Oostra *et al.* (2001) for *Rhizopus oligosporus*, and $h_C = 0.0082$ cm by Rahardjo *et al.* (2002) for *Aspergillus oryzae*. Thus, if $h > h_C$, oxygen will be practically absent (anaerobic layer) as suggested in Fig. 3.

If ρ_V is the average volumetric density, the following mass balance holds

$$\rho_V V_X = Y_{X/S} S_0 V_S \quad (\text{B.3})$$

Where, V_X is the volume of the fungal layer and V_S is the volume of the solid support. An important restriction on fungal growth is to assume that the amount of initial substrate, $Q_0 = S_0 V_S$, is just enough to support the growth of an aerobic fungal layer with uniform thickness h_C and $Y_{X/S} = Y_0$. Therefore, the optimal ratio, V_X/V_S , can be derived from Eq. (B.3) yielding

$$\frac{V_X}{V_S} = \frac{Y_0 S_0}{\rho_V} \quad (\text{B.4})$$

Restrictions for a flat solid support of fungal cultures

Assuming that the solid support is a slab (agar plate), with area, A , and height H , ($V_S = AH$) and recalling that the final surface fungal density is $\rho_{AM} = \rho_V h_C$, the following relation holds

$$\frac{h_C}{H} = \frac{Y_0 S_0}{\rho_V} \quad (\text{B.5})$$

Defining, $\Lambda = h_C/H$ and $M = Y_0 S_0/\rho_V$, the following equation is obtained

$$\Lambda = M \quad (\text{B.6})$$

This simple equation indicates that the optimal height, H_{opt} , of the solid support is proportional to the product of the oxygen penetration depth, h_C , times the ratio between the average biomass density over the optimal yield as shown by

$$H_{opt} = h_C \left[\frac{\rho_V}{Y_0 S_0} \right] \quad (\text{B.7})$$

For example, for a fungal culture, with $h_C = 0.01$ cm, supplied with initial glucose concentration, $S_0 = 0.01$ gScm⁻³, maximal yield, $Y_0 = 0.5$ gX/gS, and biomass density, $\rho_V = 0.05$ gXcm⁻³, the optimal height of the agar plate will be $H_{opt} = 0.1$ cm. For cultures with $H > H_{opt}$, the apparent yield will be lower than Y_0 because part of the biomass will be anaerobic. This

calculation can have implications for the design of culture media with different values of biomass yields, but with the same initial substrate concentrations, by choosing different heights of the agar plate.

Restrictions for solid supports of fungal cultures with cylindrical and spherical geometries

The fungal layer can be considered as a shell with external radius, $R + h_C$, and with internal radius, R , length, L , and volume, $V_X = (4\pi/3)[(R + h_C)^2 - R^2]L$. Also, the solid support has a volume $V_S = (4\pi/3)R^2L$. Hence, the mass balance Eq. (B.3) leads to

$$\rho_C [(R + h_C)^2 - R^2] = Y_{X/S} S_0 R^3 \quad (\text{B.8})$$

Solving for, $\Lambda = h_C/R$, as a function of M , the following equation is obtained.

$$\Lambda = (M + 1)^{1/2} - 1 \quad (\text{B.9})$$

In a similar fashion, the mass balance of Eq. (B.3) yields Eq. (B.8) for solid support particles with spherical geometry.

$$\Lambda = (M + 1)^{1/3} - 1 \quad (\text{B.10})$$

The corresponding optimal radius, R_{opt} , for cylindrical or spherical particles are given by eqs. (B.9) and (B.10), respectively

$$R_{opt} = \frac{h_C}{(M + 1)^{1/2} - 1} \quad (\text{B.11})$$

$$R_{opt} = \frac{h_C}{(M + 1)^{1/3} - 1} \quad (\text{B.12})$$

For example, for a fungal culture grown on the surface of small spherical particles, with $h_C = 0.01$ cm, supplied with initial glucose concentration, $S_0 = 0.1$ gScm⁻³, maximal yield, $Y_0 = 0.5$ gX/gS, and biomass density, $\rho_V = 0.05$ gXcm⁻³, the optimal particle radius will be $R_{opt} = 0.038$ cm. This calculation indicates that fungal cultures with hypertonic syrups can have maximal biomass yield if they grow on small solid particles embedded with the hypertonic broth. It is worth noticing that reported values of oxygen penetration depths ($h_C < 0.01$ cm) and measured biomass density $\rho_V = 0.05$ gcm⁻³, give an approximate superficial density, $\rho_{AM} = 0.005$ gcm⁻², which is lower than the parameter $\varepsilon = 0.009$ gcm⁻² discussed in Appendix A and calculated from data published by Favela-Torres *et al.* (1998).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00112
Matricula: 205383065

GRADIENTES, PERMEABILIDAD Y
BALANCE DE MATERIA EN
CULTIVOS SUPERFICIALES DE
Aspergillus niger

En México, D.F., se presentaron a las 18:00 horas del día 11 del mes de diciembre del año 2012 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ENRIQUE GALINDO FENTANES
DR. SAUL TLECUITL BERISTAIN
DR. CRISTOBAL NOE AGUILAR
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

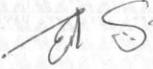
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: ERIC ORTEGA SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

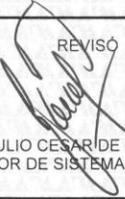
Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

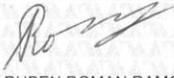
ERIC ORTEGA SANCHEZ
ALUMNO

REVISÓ



LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS



DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE



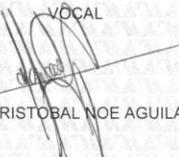
DR. ENRIQUE GALINDO FENTANES

VOCAL



DR. SAUL TLECUITL BERISTAIN

VOCAL



DR. CRISTOBAL NOE AGUILAR

SECRETARIO



DR. OCTAVIO LOERA CORRAL