



UN ANÁLISIS DEL METABOLISMO DE *Aspergillus niger* CRECIENDO SOBRE UN SUSTRATO SÓLIDO

AN ANALYSIS OF THE METABOLISM OF *Aspergillus niger* GROWING OVER A SOLID SUBSTRATE

I. Reyes-Ocampo¹, M. González-Brambila² y F. López-Isunza^{1*}

¹Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186 Col. Vicentina, Del. Iztapalapa, México D.F., C.P. 09340, MEXICO

²Departamento de Energía, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. Av. San Pablo 180, Col. Reynosa-Tamaulipas, Del. Azcapotzalco. México D.F., C.P. 02200, MEXICO

Recibido 13 de Noviembre de 2012; Aceptado 20 de Enero de 2013

Resumen

Se analiza el metabolismo de *Aspergillus niger* A10 creciendo sobre una placa de agar, utilizando un modelo estructurado que describe a las rutas de la glicólisis (EMP), pentosa-fosfatos (PF), el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT), y la producción de biomasa, e incluye la regulación de diferentes enzimas en EMP y CAT en términos de las concentraciones de ácido cítrico y ATP en el micelio. Las predicciones del modelo se apoyan en una serie de experimentos con diferentes concentraciones de glucosa en el medio sólido, así como mezclas binarias de sustratos como fuentes de carbono. Además de las mediciones de biomasa, el CO₂ producido y el O₂ consumido se miden en una caja Petri modificada. Se utiliza el concepto de disipabilidad de energía (Atkinson, 1969), para analizar la eficiencia del crecimiento a concentraciones de glucosa inicial en la placa de agar que van de 25 a 250 gL⁻¹.

Palabras clave: metabolismo de *Aspergillus niger*, sustrato sólido, modelo estructurado, rutas metabólicas, mediciones de biomasa, CO₂ y O₂, caja Petri modificada.

Abstract

The metabolism of *Aspergillus niger* A10 growing on agar plates is analyzed using a structured model that includes the pathways for glycolysis (EMP), pentose-phosphate (PP), the Krebs cycle (TCA), and mycelial biosynthesis; and takes into account enzyme regulation in EMP and TCA either due to low or high levels of citrate and ATP in cytosol. Model predictions are supported by a series of experiments measuring mycelial growth under different glucose concentrations in the agar plates, as well as the use of a two-carbon sources mixtures. Besides measurements of biomass, CO₂ production and O₂ consumption were also continuously measured in the gas-phase of a modified Petri dish. Atkinson's energy charge (1969) concept is used to analyze the growth efficiency under increasing glucose concentration in the agar plates in the range: 25 to 250 gL⁻¹.

Keywords: *Aspergillus niger* metabolism, structured model, continuous measurements of CO₂ and O₂, modified Petri dish, biomass growth on solid substrate.

1 Introducción

El hongo *Aspergillus niger* (*A. niger*) produce diversos compuestos de gran interés para las industrias farmacéutica y de alimentos (enzimas, ácidos orgánicos), y es el principal productor de ácido

cítrico a nivel industrial por cultivo líquido. Se ha observado que se obtiene un alto rendimiento de ácido cítrico cuando existe una alta acumulación de éste en el micelio, que puede estar asociada con una alta concentración de glucosa y de oxígeno disuelto en el

*Autor para la correspondencia E-mail: felipe@xanum.uam.mx
Tel. 58-04-46-00, Fax 58-04-46-49

medio líquido (Papagianni, 2007; Wolschek y col., 1999). Sin embargo, no es posible conocer aún todos los factores ambientales y fisiológicos que originan esta acumulación, ni saber como estos determinan la morfología del micelio, la cual podría, en principio, usarse como un indicador del nivel de producción del ácido, al realizar mediciones del diámetro promedio de las madejas formadas por las hifas en el medio líquido, que se cree corresponden a un medio con altas concentraciones de glucosa, O_2 y ácido cítrico, antes de que la difusión de sustrato y O_2 sea deficiente cuando la madeja alcance un tamaño crítico, de acuerdo con el criterio de Thiele (Thiele, 1939; Hellendoorn y col., 1998).

Por otro lado, puede ser más fácil estudiar la morfología y fisiología de *A. niger* en un medio sólido, y determinar el efecto de los diferentes nutrientes y de la concentración inicial de glucosa, ya que no existe la limitación del O_2 del aire. Sin embargo, es muy difícil realizar estudios dinámicos en este sistema, ya que no es posible lograr cambios rápidos en la entrada al sistema como en el caso de un cultivo líquido, ya que en éste no se presenta el proceso difusivo de nutrientes y sustrato como en un medio sólido. De estudios en medios sólidos se ha observado que los valores promedio de la longitud y del diámetro de las hifas distales varían en relación inversa con la concentración inicial de glucosa (Larralde-Corona y col., 1997; Reyes Ocampo, 2006), aunque es difícil diferenciar entre hifas aéreas, superficiales, y las que penetran la placa de agar (Rahardjo y col., 2005). Esto hace muy difícil obtener un modelo confiable que describa la morfología de *A. niger* y permita predecir la producción de ácido cítrico, ya sea éste modelo de tipo logístico, Monod o una combinación de ellos (Reyes Ocampo, 2006), que hasta ahora han sido usados para describir el crecimiento de la longitud promedio del micelio y su relación con la producción de ácido cítrico usando un modelo de tipo Luedeking-Piret (Luedeking y Piret, 1959). Ya que en un medio sólido el transporte de masa se da por la difusión de los diversos nutrientes a través de éste, los experimentos realizados no permiten conocer fácilmente el papel que juegan otros factores, como la concentración de diversos metales (Mn, Mg), de otras fuentes de carbono y del pH, por la dificultad de medir estas variables en el medio sólido durante el crecimiento, lo que no sucede en un medio líquido.

En el crecimiento en estado sólido, normalmente sobre una placa de agar en una caja Petri, es fácil medir la cantidad de biomasa producida para diversas concentraciones iniciales de glucosa, pero no es fácil

la determinación de los productos excretados, como en un medio líquido, por lo que solo se obtiene un conocimiento limitado acerca del metabolismo de *A. niger*. A la fecha, los estudios realizados en sustrato sólidos no han incorporado ninguna información basada, por ejemplo, en el conocimiento de las rutas metabólicas de este microorganismo, lo que nos permitiría describir el crecimiento de *A. niger* de una forma menos empírica, y tal vez facilitaría el análisis de los diversos procesos bioquímicos y ambientales que determinan el metabolismo de *A. niger*, así como la producción de ácido cítrico y otros metabolitos.

En este trabajo se estudia el crecimiento de *A. niger* sobre un sustrato sólido (agar y nutrientes) en caja Petri, midiendo la biomasa a lo largo del proceso, y esto se complementa con experimentos independientes donde se mide, de forma continua, el O_2 y CO_2 en la fase gaseosa en una caja Petri modificada (CPM), al incorporar detectores para la medición en línea de estos gases, que sabemos están relacionados directamente con el metabolismo de *A. niger*. Adicionalmente, se analiza su crecimiento con base en un modelo simplificado de las rutas metabólicas de este microorganismo, lo que nos permitirá estudiarlo como un sistema abierto, y medir su respuesta a cambios controlados en algunas de las variables que determinan el crecimiento y producción de metabolitos. Ya que el proceso de crecimiento ocurre en contacto con un medio sólido y un medio gaseoso, la cinética de crecimiento está acoplada a los fenómenos de difusión de masa en ambos medios, y estos procesos se incorporan en un modelo de difusión-reacción. Sin embargo, el modelo no incluye la descripción de la morfología del micelio, ya que esto resulta demasiado complicado en el estudio que aquí se presenta, debido a la diferenciación de funciones que existen en el micelio durante su crecimientos.

La red metabólica publicada para *A. niger*, está constituida por 1190 reacciones y 1045 metabolitos, distribuidos en tres compartimentos: extracelular, citoplasmático y mitocondrial (Anderser, 2008; Andersen y col., 2008) sin embargo, es realmente imposible poder medir simultáneamente a todas estas especies o conocer en detalle el funcionamiento regulatorio de las diversas enzimas, por lo que aquí se utiliza un esquema muy simplificado, que sin embargo toma en cuenta las principales rutas metabólicas que conforman la red (Schmidt, 1999), y contiene la información necesaria para describir cualitativamente a los experimentos realizados. Para obtener información del metabolismo de *A. niger*

como un sistema biológico abierto, es importante conocer como se lleva a cabo la asimilación de diversas fuentes de carbono (glucosa, glicerol), y cuando a una de éstas se les adiciona alguno de los metabolitos que se sabe son excretados al medio durante el crecimiento del microorganismo (ácidos cítrico y oxálico). El estudio se realiza entonces comparando las mediciones de consumo de oxígeno y producción de CO₂ en la fase gaseosa en la CPM, simultáneamente con las mediciones de peso seco de la biomasa producida en la caja Petri, analizando las respuestas de los diversos experimentos realizados, y comparándolas con las predicciones del modelo.

2 Materiales y métodos

Uno de los problemas en el estudio de hongos filamentosos creciendo en un sustrato sólido es la medición de la biomasa, ya que como se observó en este trabajo, el micelio se adhiere y penetra a la matriz sólida, dificultando su separación. Para resolver este problema normalmente se coloca una hoja de celofán sobre la superficie del agar, para facilitar la separación del micelio del soporte sólido, posteriormente esta se seca y se obtiene el peso de biomasa seca, sin embargo esta práctica tiene una influencia importante en el crecimiento del hongo, como se reportará en un siguiente trabajo.

2.1 El microorganismo de estudio

En este trabajo se emplea *Aspergillus niger* A10 de la colección de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. La conservación de la cepa se lleva a cabo haciendo crecer hasta la esporulación un cultivo de esporas de ésta cepa en un medio sólido de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) a una temperatura controlada de 30°C. Al cabo de cinco días de crecimiento, se cosecharon las esporas de la superficie de la colonia con un agitador magnético en una solución Tween 0.1%(v/v). De la suspensión obtenida se tomó una concentración de esporas que se añadieron a un recipiente con un medio adecuado para el crecimiento del microorganismo. Una vez que el hongo esporuló, se añadió glicerol previamente esterilizado. El recipiente se conservan en refrigeración (5 -10°C), obteniéndose una cepa con viabilidad de un año.

2.1.1 Preparación del inóculo

Se depositó un volumen pequeño de la suspensión de esporas en la superficie de un medio PDA. De

aquí se obtiene un cultivo que, después de 5 días de incubación a 30°C, ya ha esporulado. Las esporas se recolectaron con un asa de siembra y se almacenaron en una solución Tween 0.1%(v/v). La concentración de esporas se ajustó a 1×10^6 esporas, utilizando para esto una cámara de Neubauer.

2.1.2 Medio de cultivo

Este consistió en 10 gL⁻¹ de glucosa; 0.98 gL⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0.5 gL⁻¹, KH₂PO₄; 0.6 gL⁻¹ MgSO₄•7H₂O; 0.1 gL⁻¹ extracto de levadura; 2.0 mL⁻¹ solución de oligoelementos: 2.5 gL⁻¹ FeSO₄•7H₂O; 11.0 gL⁻¹ ZnSO₄•7H₂O; 0.8 gL⁻¹ CuSO₄•5H₂O; 2.15 gL⁻¹ MnSO₄•H₂O; 5.5 gL⁻¹ H₃BO₃; 0.55 gL⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O; 25 gL⁻¹ NaEDTA; 0.80 gL⁻¹ CoCl₂•5H₂O. El medio se esterilizó durante 20 minutos a 121°C. En la preparación del medio de cultivo se agregó sulfato de amonio, suficiente para obtener una relación C/N de 12. Se agregó una concentración de elementos traza para evitar limitaciones de estas especies durante el crecimiento del hongo. Para los experimentos a diferentes concentraciones de glucosa, la proporción de los otros componentes varió dependiendo su relación con la glucosa inicial.

2.2 El sistema experimental

Para llevar a cabo la evaluación de los cambios en la producción de CO₂ y el consumo de O₂ durante el crecimiento de *A. niger*, se construyó una caja Petri modificada (CPM) de vidrio, de 12.5 cm de diámetro y 5 cm de altura, como se muestra en la Fig. 1. La tapa de la CPM soporta a los dos electrodos de medición de CO₂ y O₂, y cuenta con un pequeño tubo adicional (2.0 cm de longitud y 0.3 cm de diámetro) que permite el intercambio de estos gases con el medio ambiente externo. Para la medición del peso seco de *A. niger* se utilizan cajas Petri de 9 cm de diámetro con un volumen aproximado de 35 mL de sustrato sólido, formándose una placa de 0.6 cm de espesor sobre la cual se colocó una hoja de celofán que facilitó el desprendimiento y medición de la biomasa. En los experimentos con la CPM se utilizó un volumen de agar con glucosa de 150 mL.

2.2.1 Inóculo

En la inoculación de las cajas Petri se utilizaron esporas recién cosechadas, que se depositaron



Fig. 1. La caja Petri modificada que permite la medición en línea del oxígeno consumido y el dióxido de carbono producido durante el crecimiento de *Aspergillus niger* A10.

en el centro de la caja utilizando una punta de pipeta en un volumen pequeño de la suspensión de aproximadamente 20 μL , obteniéndose así una colonia circular.

2.2.2 Medición del peso seco.

Las esporas inoculadas en la caja Petri crecieron durante 5 días a una temperatura constante de 30°C. Para la medición del peso seco de la biomasa, se inoculó la misma concentración de esporas sobre la hoja de papel celofán en 15 cajas Petri que contenían al medio de cultivo. A diferentes tiempos se removió la hoja de celofán conteniendo al micelio de la superficie del agar, lo que permitió medir a la cantidad de biomasa a diferentes tiempos, para cada condición del medio de cultivo. La hoja de papel celofán, que había sido previamente tratada y pesada, y que contiene al micelio, se secó en una estufa a 60°C durante 24 horas, para después ser almacenada en un desecador por una noche y ser pesada en la balanza analítica. El peso seco de la muestra se obtuvo de la diferencia del peso seco y el resultado se reporta como gramos de peso

seco de biomasa.

2.2.3 Ensayos analíticos

La medición continua de la producción de CO_2 y del consumo de O_2 durante el crecimiento de *A. niger*, se realizó utilizando sensores Vernier para estos gases. El sensor de CO_2 mide los niveles de este gas en el intervalo de 0 a 10,000 ppm (ajuste de rango bajo) o de 0 a 100,000 ppm (ajuste de rango alto), controlando la cantidad de radiación infrarroja absorbida por las moléculas de dióxido de carbono. El sensor de O_2 mide la concentración de este gas en el intervalo de 0 a 27% en mol utilizando una celda electroquímica que contiene un ánodo de plomo y un cátodo de oro en un electrolito. Las moléculas de oxígeno que entran en la celda se reducen en el cátodo de oro; esta reacción genera una corriente que es proporcional a la concentración de oxígeno entre los electrodos. El registro de los datos en línea se llevó a cabo usando la interfase *LabPro* y el software *LoggerPro* de Vernier.

2.3 Diseño experimental

Los experimentos realizados tuvieron como objetivo obtener información acerca del metabolismo de *A. niger* cuando se utilizan diversas fuentes de carbono, que son adicionadas al agar que contiene a una cantidad constante de glucosa, así como cuando aquellas son la única fuente de carbono, midiéndose el peso seco de biomasa, la producción de CO_2 y el consumo de O_2 durante el crecimiento. Primero se compara la producción de biomasa utilizando diferentes concentraciones de glucosa, como única fuente de carbono, con el objeto de analizar el mecanismo de asimilación por el hongo, y saber si existe alguna limitación por inhibición. Luego, se llevan a cabo cuatro experimentos en los que se miden la biomasa, el CO_2 producido y el consumo de O_2 , para una concentración inicial de 25 gL^{-1} de glucosa como única fuente de carbono en el agar, y en los tres restantes se adicionan en cada uno: 5 gL^{-1} de ácido oxálico, 5 gL^{-1} de ácido cítrico y 5 gL^{-1} de glicerol: obteniéndose así tres mezclas binarias con diferente número de moles de segundo metabolito para la misma cantidad de glucosa inicial y otros nutrientes, en el mismo volumen de agar en la caja Petri clásica, donde únicamente se midió el peso seco de la biomasa. En la CPM se midió la evolución de CO_2 y O_2 en la fase gaseosa para las condiciones anteriormente descritas. Finalmente se presentan tres experimentos donde la única fuente de carbono fue: ácido oxálico

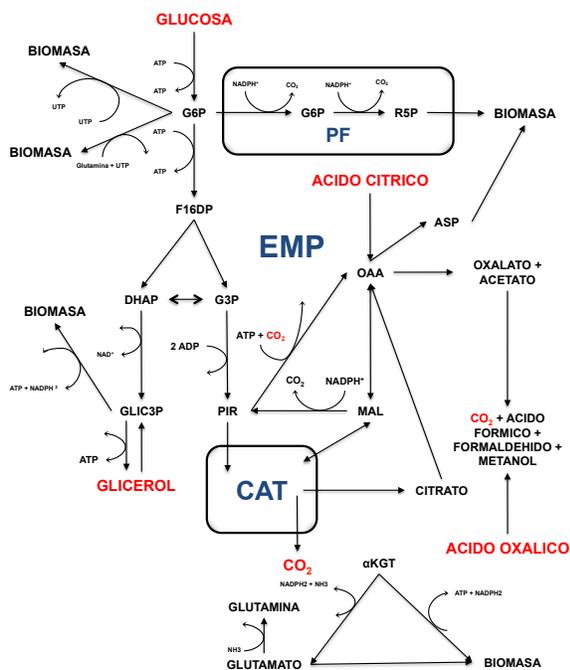


Fig. 2. La red metabólica simplificada en la que se basa el modelo estructurado de *Aspergillus niger*, que incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs (CAT), a la ruta de las pentosas-fosfato (PF), a la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glicólisis, y a las reacciones que producen biomasa, que han sido agrupadas.

(5 gL⁻¹), ácido cítrico (5 gL⁻¹) y glicerol (5 gL⁻¹), y nuevamente se midieron el CO₂ y O₂ en la fase gaseosa, pero no la cantidad de biomasa.

2.3.1 Análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* con un modelo estructurado

Si bien se han desarrollado modelos estructurados muy sencillos para describir el crecimiento de una hifa promedio y la producción de biomasa (López Isunza y col., 1997), éstos realmente no tienen ninguna capacidad predictiva para describir el metabolismo de *A. niger* durante su crecimiento. Otros modelos publicados, y que se derivan de lo originalmente publicado por Trinci (1974), contemplan el crecimiento en términos de ecuaciones de tipo Monod o Logística, usando los denominados parámetros morfométricos (Larralde Corona y col., 1997), en donde los aspectos bioquímicos relevantes están ausentes, así como en otros trabajos que por las mismas razones carecen de cualquier capacidad predictiva y no permiten obtener ningún

conocimiento fundamental acerca del crecimiento (Vergara Fernández y col., 2011). En el otro extremo están los modelos detallados que describen, por ejemplo, la respuesta transitoria de la ruta pentosa-fosfato *in vivo* a cambios en la concentración de glucosa en el líquido que alimenta a un cultivo sumergido con *S. cerevisiae* (Rizzi, 1997; Vaseghi, 1999), así como la descripción de la dinámica del metabolismo central del carbono en *E. coli* (Chasagnole, 2002). Otros modelos detallados, pero no directamente relacionados con el de este trabajo, son publicados por Ramkrishna y col. (2008) y por Torres y col. (2002). Finalmente, se han utilizado estrategias de modelos ensamblados que permiten generar familias de modelos para describir, por ejemplo, el metabolismo del cáncer en células, y que consideran una red metabólica como la descrita en este trabajo (Khazaei y col., 2012), resaltando así la relevancia de este tipo de modelos para describir el metabolismo celular.

El modelo que se utiliza en el análisis cualitativo del metabolismo *A. niger* considera a una pequeña parte de la red metabólica (Andersen, 2008), y reúne en un solo compartimento a la glicólisis (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas o EMP), y a la ruta de las pentosas-fosfato (PF), y se conectan, a través del transporte transmembrana mitocondrial, con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT), contribuyendo todas estas rutas a la producción de biomasa, que se describe de forma muy reducida. Esta red agrupa al gran número de reacciones enzimáticas en solo 82 reacciones, considerando sin embargo la participación de los cofactores (ATP, NAD⁺, NADPH₂, etc), así como el consumo de glucosa, glicerol, ácidos cítrico y oxálico, y la producción del ácido cítrico (ver la Fig. 2). El modelo también considera dentro del metabolismo de *A. niger* a la síntesis de ATP, NAD⁺ y NADP⁺. El valor de las constantes de velocidad de reacción y constantes de equilibrio de estas reacciones se encontró por ensayo y error usando diversos órdenes de magnitud dentro de cada una de las rutas de la red metabólica. Se consideran 48 especies, 19 cofactores y 2 especies gaseosas. El modelo del sistema de difusión-reacción formado por la CPM considera las fases sólida y gaseosa, que están en contacto con un micelio que crece sobre la superficie sólida, a través de cuya pared celular se transportan por difusión los diversos nutrientes y la glucosa del medio sólido, y el O₂ de la fase gaseosa. Se considera un sistema isotérmico donde la difusión en todos los casos sigue la ley de Fick, y la asimilación de la glucosa ocurre a través de la pared celular y se

da por un proceso de difusión pasiva en términos de un gradiente entre el exterior y la parte interna de la membrana, de acuerdo con la permeabilidad de esta pared para cada especie. El micelio crece de forma homogénea como una serie de N_h tubos hifales de igual longitud $L_h(t)$ y diámetro d_h , que permanece constante (Larralde, 1997), y los procesos difusivos en la CPM se dan solo en una dirección normal a la superficie de la placa de agar.

Los balances de masa para la especie n en la fase ψ (sólido o gas) pueden expresarse como sigue:

$$\frac{\partial C_{n\psi}}{\partial t} = \mathcal{D}_\psi \frac{\partial^2 C_{n\psi}}{\partial z_\psi^2} \quad (1)$$

Las condiciones de frontera nos indican que las paredes superior e inferior de la CPM (ver Fig.1) son impermeables, y esto corresponde a $z_\psi = 0$, (ψ = gas, sólido) por lo que

$$\frac{\partial C_{n\psi}}{\partial z_\psi} = 0 \quad (2)$$

Se considera que el intercambio de O_2 y CO_2 entre la CPM y el aire exterior, debido a la conexión con el pequeño tubo de la parte superior, determina que $C_{n\psi} \sim C_{n0}$, donde C_{n0} para el O_2 es prácticamente igual a la concentración del oxígeno del aire y para CO_2 , $C_{n0} \sim 0$. El micelio está en contacto con ambas fases en $z = L_\psi$, donde se considera que el transporte de masa a través de la membrana del citosol se da por un proceso de difusión pasiva y está dado por permeabilidad de ésta y la diferencia de concentraciones, y está expresada por el flux de masa, por lo que para ambas fases en contacto con el micelio se tiene, en $z = L_\psi$

$$-\mathcal{D}_\psi \frac{\partial C_{n\psi}}{\partial z_\psi} = P_\psi (C_{n\psi} - C_{nc}) \quad (3)$$

Donde \mathcal{D}_ψ y P_ψ son el coeficiente efectivo de difusión y la permeabilidad del componente n en la fase ψ , respectivamente. Consideramos ahora que el micelio crece radialmente, de forma simétrica y se agrupa a todas las hifas y sus ramificaciones en un tubo hifal cuya longitud promedio (que es igual al radio de la colonia), es una función del tiempo y cuyo diámetro promedio es siempre constante. Consideramos también que la densidad de la biomasa en el micelio, ρ_X , es siempre constante, y que el volumen de la colonia $V_h(t)$ está dado por el de un cilindro de radio $L_h(t)$ y altura d_h , y por la fracción volumétrica promedio ocupada por la biomasa, ϵ_X . También suponemos que $V_h(t)$ puede expresarse como

el volumen de un número N_h de tubos hifales cuyo diámetro es d_h y con longitud $L_h(t)$.

$$V_h = \pi L_h^2 d_h \epsilon_h = N_h \frac{\pi}{4} d_h^2 L_h \quad (4)$$

La cantidad de moles del metabolito n producido/consumido en la reacción j , y cuya concentración es C_{nc} (moles de n/g de biomasa), esta dada por:

$$\frac{d}{dt} (\rho_X V_h C_{nc}) = \rho_X [V_h \frac{dC_{nc}}{dt} + C_{nc} \frac{dV_h}{dt}] = V_h \sum_{j=1}^{NR_n} R_{nj} \quad (5)$$

Entonces, el balance de masa dentro del micelio para la especie n que participa en la reacción j , para un numero NR_n , está dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial C_{nc}}{\partial t} = \frac{1}{\rho_X} \sum_{j=1}^{NR_n} R_{nj} - \mu C_{nc} \quad (6)$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento de la biomasa total X (g), y esta dada por las siguientes expresiones (Fredrickson, 1976):

$$\mu = \frac{1}{V_h} \frac{dV_h}{dt} = \frac{2}{L_h} \frac{dL_h}{dt} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (7)$$

Algunos de los términos de reacción R_{nj} para la especie n que participan en la reacción j son del tipo Monod, sin embargo la mayor parte de éstos siguen la ley de acción de masas. En algunas de las reacciones se utilizan términos que toman en cuenta los aspectos inhibitorios de metabolitos o cofactores (Lehninger, 1975). Como ejemplo de esto, se dan dos expresiones de la velocidad de reacción: la primera es de la fosforilación de la glucosa 6 fosfato, [G6P], a fructosa 1,6 difosfato, [F16DP], ya que en el esquema de reacciones éstas han sido agrupadas en dos reacciones; así,

$$r_2 = \frac{k_2 [G6P][ATP][PFK]}{K_2 + [G6P]} \quad (8)$$

donde [PFK] es la expresión de la regulación de la enzima fosfofructokinasa, que depende del nivel de las concentraciones del citrato, [CIT], o [ATP] en el citosol, y está dada como

$$[PFK] = \frac{1}{1 + [CIT] + \frac{[ATP]}{K_{2-ATP}}} \quad (9)$$

La segunda reacción de formación de ácido cítrico en la mitocondria

$$r_{11} = k_{11} [Pir][OOA_m][ACoA_m][E_{11}] \quad (10)$$

donde $[E_{11}]$ es la expresión de la regulación de la enzima citrato-sintetasa en mitocondria y está dada como

$$[E_{11}] = \frac{1}{1 + \frac{[ATP]}{K_{11ATP}}} \quad (11)$$

Una cantidad importante que permite, de alguna forma, medir la capacidad del sistema biológico para crecer en un cierto medio, es la energía metabólica almacenada en el sistema ATP-ADP-AMP, denominada la carga de energía (Atkinson, 1969), que se define como:

$$E = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]} \quad (12)$$

Este parámetro se usará más adelante para comparar la carga energética cuando el micelio crece a diversos niveles de glucosa en el medio sólido, que van de 25 a 250 gL⁻¹ en el volumen de agar. El modelo considera entonces, de forma muy simplificada, el control en las rutas EMP y CAT cuando las concentraciones de ATP y ácido cítrico cambian de forma importante (Lehninger, 1975).

En la solución numérica del modelo se utilizó colocación ortogonal (Finlayson, 1972) para discretizar las ecuaciones que describen a la difusión en los medios sólido y gaseoso (7 puntos interiores, con $\alpha=\beta=0$), y el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias resultante se resolvió con el método clásico de Runge-Kutta de 4° orden (Collatz, 1966).

3 Resultados y discusión

El análisis cualitativo que a continuación se presenta se basa en la descripción cinética de la red metabólica de la Fig. 2, y los resultados de la solución numérica del modelo tuvieron por objeto predecir cualitativamente la evolución de los diversos cofactores y metabolitos durante el crecimiento en el sustrato sólido, de acuerdo con el caso experimental considerado.

3.1 Glucosa como fuente de carbono y la posible inhibición del metabolismo por altas concentraciones

En la Fig. 3 se muestran la predicción de biomasa obtenida en la caja Petri tradicional y la producción de CO₂ en la caja Petri modificada, para una concentración inicial de glucosa de 25 gL⁻¹ y mismos contenidos en el medio sólido en ambos casos.

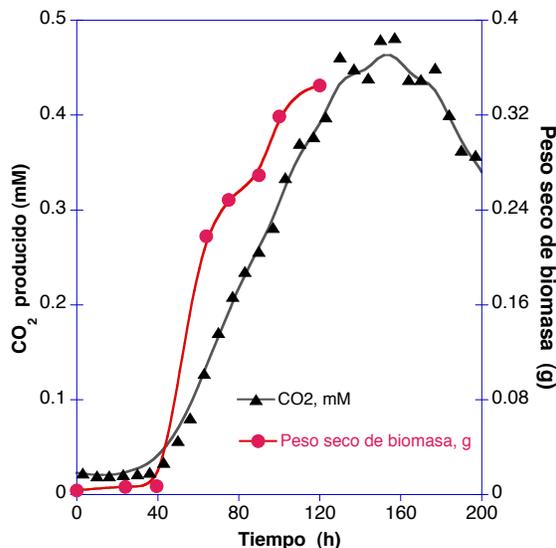


Fig. 3. Evolución conjunta de la biomasa y CO₂ para el crecimiento de *Aspergillus niger* con 25 g L⁻¹ de glucosa inicial como único sustrato.

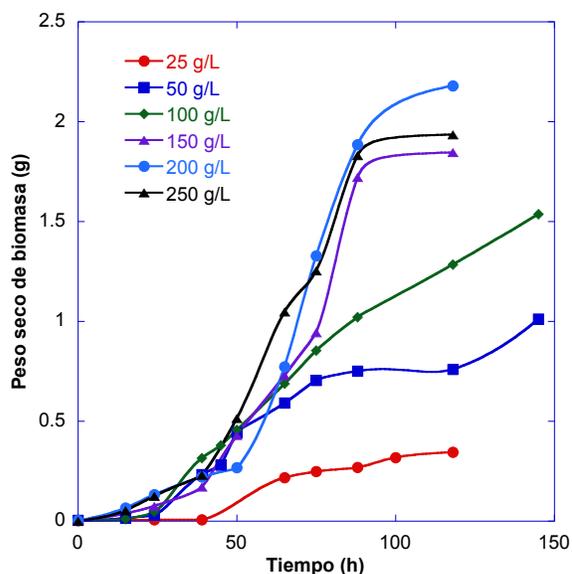


Fig. 4. Evolución del peso seco de biomasa durante el crecimiento de *Aspergillus niger* a diferentes concentraciones iniciales de glucosa en el medio sólido.

Aunque el volumen de sustrato es mayor de en la CPM, se observa que la producción de CO₂ está acoplada directamente con la producción de biomasa. La Fig. 4 presenta las mediciones de la evolución del peso seco de la biomasa para diferente concentración inicial de glucosa en el medio sólido. Como se

observa, en este rango de concentración la máxima cantidad de biomasa producida corresponde a 200 gL⁻¹ de glucosa, sin embargo no es posible con esta información concluir si existe o no un proceso inhibitorio debido a restricciones de disponibilidad de energía como ATP y de otros cofactores durante el crecimiento, lo cual en este trabajo se evalúa en terminos de la carga de energía disponible, dada por la Ec. (12). Por otro lado, se observa que la cantidad de biomasa producida no es proporcional a la cantidad de glucosa inicial después de los 100 gL⁻¹, y que esto a su vez depende de la disponibilidad de ATP y NADPH, entre otros factores. En este trabajo no se considera ningún aspecto relacionado con la represión catabólica como lo reporta Viniegra-González y col. (2006), ya que esto no está considerado en el modelo.

Existen diversos factores ambientales que determinan el crecimiento en un sustrato sólido, y uno puede estar relacionado con la viscosidad de la mezcla de agar y glucosa, que aumenta cuando la cantidad de ésta última aumenta. Si consideramos que la concentración inicial de glucosa puede variar entre 25 y 250 gL⁻¹, se puede esperar que el coeficiente efectivo de difusión de la glucosa (y de otros nutrientes en el medio sólido) disminuya. Por otro lado, algo aún no resuelto en el caso de *A. niger* es la forma de cómo el micelio asimila la glucosa, y si bien se ha sugerido que el proceso a través de la membrana es por difusión pasiva (Nielsen, 1995; Legisa y col., 2007), es posible que esto se lleve a cabo por un proceso de difusión facilitada, como en el caso reportado para *S. cerevisiae* (Rizzi y col., 1996). Si éste es el caso podemos esperar que el metabolismo de *A. niger* se vea afectado cuando la concentración de glucosa se incrementa de 25 a 250 gL⁻¹ debido al incremento en el gradiente de glucosa entre el medio externo y la membrana del citosol. Por ejemplo, la alta concentración de glucosa en el medio de cultivo ha sido señalada como un factor de estrés osmótico en los cultivos de levaduras, lo que conduce a mayor gasto energético para mantenimiento y por ende a un menor crecimiento. Finalmente, es necesario considerar la regulación del metabolismo en las rutas EMP, PF y TCA cuando existen cambios grandes en la concentración de glucosa en la placa de agar, ya que sí la glucosa aumenta, los niveles de ácido cítrico aumentarán y de ATP disminuirán, como lo predice el modelo.

Las figs. 5a y 5b muestran la predicción del modelo para la producción de biomasa cuando la concentración de glucosa va de 25 a 250 gL⁻¹ en el medio sólido. En la Fig. 5a se ha considerado que no hay cambios en los valores de los coeficientes de

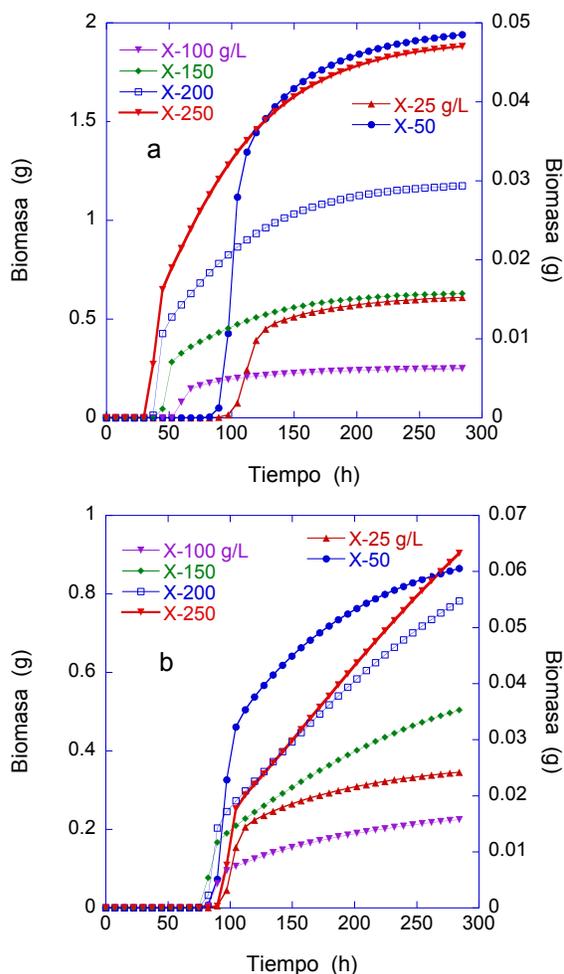


Fig. 5. Predicción del modelo donde se compara la producción de biomasa para diferentes concentraciones de glucosa inicial en la placa de agar, que va de 25 a 250 g L⁻¹.

permeabilidad de la membrana ni de difusión efectiva en el medio, mientras que en la Fig. 5b se considera una disminución de estos coeficientes al multiplicarlos por los términos de permeabilidad $(1 - C_{g0}/C_{gmax})^n$ y de difusión $[1 - (C_{g0}/C_{gmax})^m]$ y donde $n=2$ y $m=3$, respectivamente; C_{g0} es la concentración inicial de glucosa en el medio y se supone una concentración máxima de glucosa en el agar de $C_{gmax} = 500$ gL⁻¹. La comparación de las figs. 5a y 5b sugiere que es necesario incluir, de forma empírica, la variación de estos coeficientes de transporte al aumentar la concentración de glucosa en el medio para obtener una mejor predicción cualitativa de lo observado, sin embargo esto tiene un impacto importante en el crecimiento como lo muestra la Fig. 5b donde la

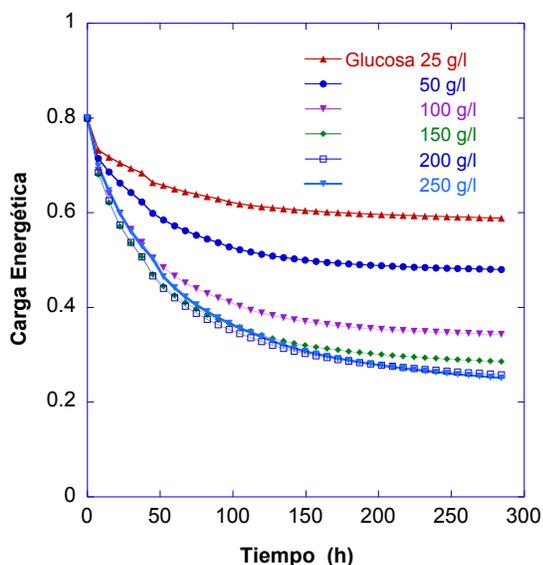


Fig. 6. Predicción de la variación de la carga energética durante el crecimiento de *Aspergillus niger* para diferentes valores de la concentración inicial de glucosa en la placa de agar.

predicción de la cantidad de biomasa producida es de casi la mitad de la que se muestra en la Fig. 5a. Lo anterior no quiere decir que el proceso por el cual *A. niger* asimile la glucosa en un medio sólido sea por difusión pasiva, sino que el modelo en su forma actual así lo considera.

La Fig. 6 compara la disponibilidad energética del micelio durante su crecimiento cuando la concentración de glucosa en la placa de agar varía de 25 a 250 gL⁻¹, mostrando que existen diferencias importantes entre los niveles energéticos de las respuestas entre 25 y 250 gL⁻¹, ya que en el segundo casi se dispone solamente del 40% de la carga energética que se tiene en el primero, para consumir diez veces más glucosa, como lo predice el modelo de acuerdo con el esquema cinético de la red metabólica de la Fig. 2.

Las figs. 7a y 7b muestran las predicciones de la cantidad de biomasa y de ácido cítrico producidos para 25 y 50 gL⁻¹ de concentración inicial de glucosa, mientras que la Fig. 8 presenta los niveles de concentración de los diferentes cofactores considerados en el modelo para el caso del crecimiento con 25 g^l de glucosa, y que complementa la información de la Fig. 6 para este caso. En la Fig. 8 se observa como las respuestas dinámicas de NADP⁺ y NADPH en el citosol están directamente ligadas con la producción de biomasa en la fase exponencial, y

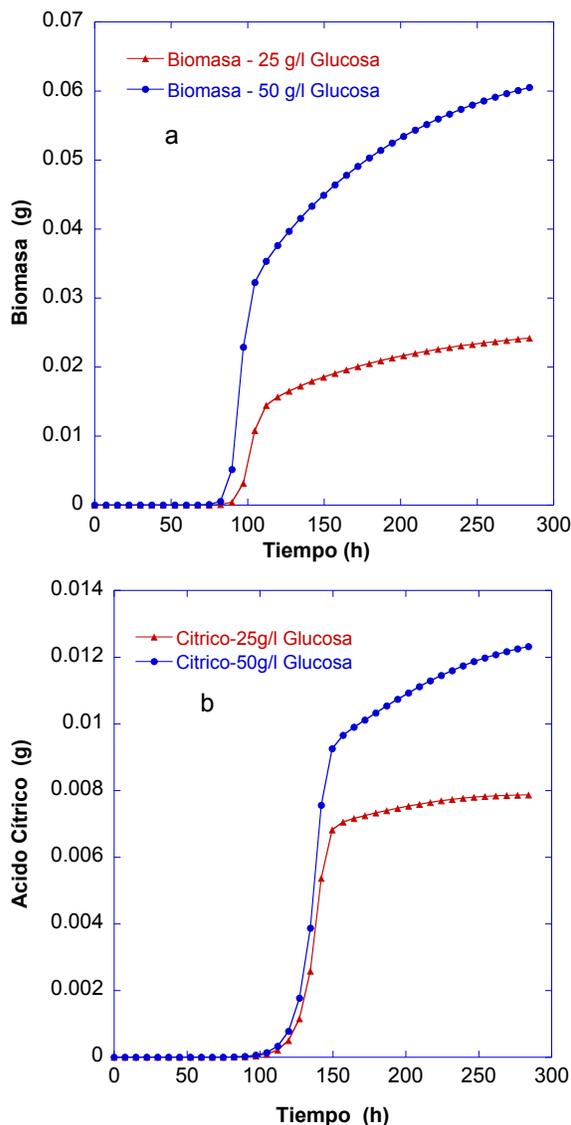


Fig. 7. Predicción del modelo donde se compara la producción de biomasa y ácido cítrico para concentraciones de glucosa de 25 y 250 gL⁻¹ en la placa de agar.

como NAD⁺ y NADH en el citosol disminuyen en la fase final del crecimiento de biomasa, mientras que los niveles de ATP no cambian prácticamente. Por otro lado, si consideramos que la concentración de NAD⁺ es proporcional a la cantidad de producto oxidado, y la concentración de NADH es proporcional a la cantidad de sustrato reducido, obtenemos la siguiente relación (Canelas y col., 2008):

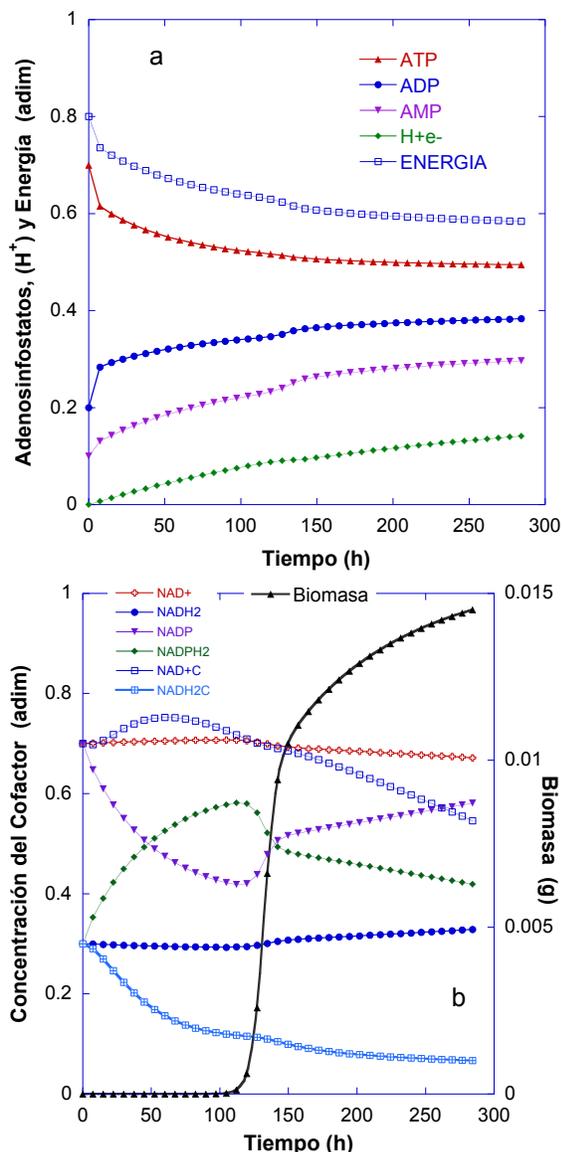


Fig. 8. Predicción de la evolución de los diferentes cofactores durante el crecimiento de *Aspergillus niger* con 25 gL⁻¹ de glucosa como única fuente de carbono: a) ATP, ADP, AMP, [H⁺ e⁻] es la concentración de protones usados en la fosforilación oxidativa, y la carga energética; b) reductores: NAD⁺ y NAD_C⁺ son las concentraciones adimensionales de la nicotinamida adenina dinucleótido en su forma oxidada en mitocondria y citosol, respectivamente, NADP es la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma oxidada en el citosol, y se incluye el crecimiento de biomasa.

$$\gamma_{RED} = \frac{[NAD^+]}{[NADH]} = \frac{\text{producto oxidado}}{\text{sustrato reducido}} \quad (13)$$

Podemos observar, tanto en citosol como en mitocondria, que durante todo el proceso de crecimiento, $\gamma_{RED} > 1$. Canelas y col. (2008) encuentran valores de γ_{RED} que varían entre 4 y 7 para *S. cerevisiae*.

La comparación de las observaciones con las predicciones del modelo de los casos anteriores muestra que si bien las predicciones son solo del tipo cualitativo, la cantidad de biomasa predicha no siempre es del mismo orden de magnitud en cada caso, y las velocidades de crecimiento en la región exponencial están sobrevaloradas por el modelo. Por otro lado, la predicción de la cantidad de CO₂ producido es muy pequeña y está muy lejos de describir lo observado. Aún así, el modelo predice cualitativamente bien el metabolismo de *A niger* de acuerdo con el esquema de la Fig. 2.

3.2 Mezclas binarias de glucosa con los ácidos oxálico y cítrico, y el glicerol

Considerando a *A. niger* como un sistema abierto, es posible estudiar, de forma cualitativa, los cambios en su metabolismo en términos de la producción de biomasa y CO₂, y del consumo de O₂, cuando se utilizan diferentes entradas al sistema, siendo una de ellas solamente glucosa, y en otros casos las mezclas binarias de glucosa con un metabolito que se sabe es excretado por este microorganismo. Para comparar y analizar estas respuestas, se realizaron experimentos de dos tipos: el primero consistió de cuatro experimentos, uno de ellos utiliza solamente 25 gL⁻¹ de glucosa, y en cada uno de los tres restantes se adicionaron a los 25 gL⁻¹ glucosa: 5 gL⁻¹ de ácido oxálico, 5 gL⁻¹ de ácido cítrico y 5 gL⁻¹ de glicerol, respectivamente. En el segundo tipo se realizaron tres experimentos independientes en los cuales solo se utiliza como única fuente de carbono 5 gL⁻¹ de cada uno de los sustratos: ácido oxálico, ácido cítrico y glicerol, respectivamente. Es importante destacar que el uso de diferentes fuentes de carbono y de las mezclas binarias modifica tanto la textura del medio sólido (y probablemente su viscosidad), así como su pH, y es difícil saber el impacto que esto tiene durante el crecimiento del micelio. En la Fig. 9 se muestra el crecimiento del micelio como biomasa seca, para los cuatro primeros experimentos, y la Fig. 10a presenta la evolución del cociente respiratorio correspondiente

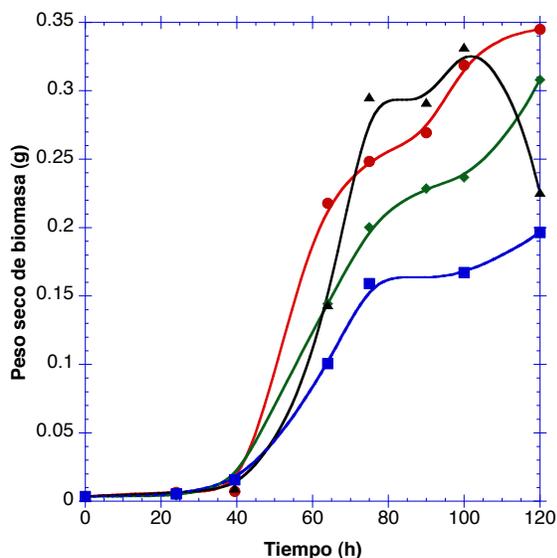


Fig. 9. Evolución del peso seco de biomasa durante el crecimiento de *Aspergillus niger* A10 para diversas fuentes de carbono: (●) 25 gL⁻¹ de glucosa; (■) 25 gL⁻¹ de glucosa y 5 gL⁻¹ de ácido oxálico; (◆) 25 gL⁻¹ de glucosa y 5 gL⁻¹ de ácido cítrico; (▲) 25 gL⁻¹ de glucosa y 5 gL⁻¹ de glicerol.

a un proceso aeróbico (vinculado con la producción de ATP), calculado a partir de las mediciones de la producción de CO₂ gaseoso y el consumo de O₂ correspondientes. No se midió la producción de biomasa para los tres últimos casos en que se usa solamente una fuente de carbono que no es glucosa, sin embargo para estos casos se presenta el cociente respiratorio en la Fig 10b. Aquí si bien se observa una pequeña actividad respiratoria, solo se observó un pequeño crecimiento del micelio en la CPM, ya que además la cantidad molar de cada sustrato no es equivalente entre ellos, ni a los 25 gL⁻¹ de glucosa que se ha usado como referencia en este estudio.

La Fig. 9 muestra que la cantidad de biomasa producida es mayor cuando se usa glucosa y su mezcla con glicerol, y en los casos de dos de las mezclas binarias que contienen a los los ácidos cítrico y oxálico (metabolitos excretados), la producción de biomasa en menor, lo que sugiere que la asimilación de estos metabolitos interfiere con la de glucosa, o que la cantidad asimilada perturba realmente al metabolismo de la glucosa, que es lo que se quiere estudiar. Ambos ácidos son metabolitos con baja reductividad (e⁻/C) en tanto que el glicerol lo tiene del mismo valor que la glucosa. Sin embargo, no es fácil conocer como esto afecta al metabolismo. En todos los casos el modelo describe de la misma forma la asimilación de dos

sustratos que compiten, es decir por difusión pasiva, aunque utilizan diferentes valores de la permeabilidad de cada sustrato. Esto también plantea el problema no solo de la selectividad en la asimilación sino también el de los posibles mecanismos por medio de los cuales estos compuestos son asimilados y excretados (difusión pasiva, facilitada, activa). La idea de utilizar mezclas binarias con estos metabolitos fue sugerido en parte por la aparente diauxia que se observa en la Fig. 9 para el caso de 25 gL⁻¹ de glucosa, que parece que cuando ésta se agota el micelio metaboliza a algunos de los productos excretados.

3.2.1 Glucosa y su mezcla con glicerol

Lo primero que se observa en la figs. 9 y 10a cuando se comparan las velocidades de crecimiento de la biomasa para glucosa y la mezcla glucosa-glicerol, es que la adición de glicerol incrementa eventualmente ésta velocidad después de las 60 horas, y la producción de CO₂ y la respiración aparecen anticipadamente. Esto se puede explicar de acuerdo con la Fig. 2, si observamos que la asimilación de glicerol no requiere de la misma cantidad de ATP para llegar a la formación de G3P que alimenta al CAT donde se produce CO₂ y se consume O₂; y ésta asimilación es tal vez parecida a la de glucosa (el glicerol se ha utilizado también como sustrato para producir ácido cítrico). Por otro lado, la ruta que sigue el glicerol está vinculada con la producción de biomasa, la cual se observa en la Fig. 9 que es un poco mayor entre las 70 y 100 horas. Salazar y colaboradores (2009) mediante análisis genómico encuentran que el control del metabolismo del glicerol se encuentra a nivel de la transcripción, y señalan que el papel de éste es como osmoregulador para contrarrestar el estrés por la alta concentración de solutos en el entorno. Melzer y colaboradores (2009) usando un modelamiento *in silico* simulan la operación de la ruta metabólica para la producción de fructofuranosidasa por *A. niger*, encontrando que con el glicerol tienen el mayor rendimiento.

3.2.2. Mezcla con glucosa y ácido cítrico

Aquí la velocidad de crecimiento de la biomasa en la fase exponencial es menor para la mezcla, de casi 65% del caso de la glucosa, y su cociente respiratorio es el menor. Si consideramos el esquema reducido de la red metabólica de *A. niger* (Fig. 2) vemos que la producción de CO₂ tiene tres contribuciones principales: en la ruta de la pentosa-fosfato (PF), en el ciclo de Krebs (CAT) y en el citosol (EMP) donde

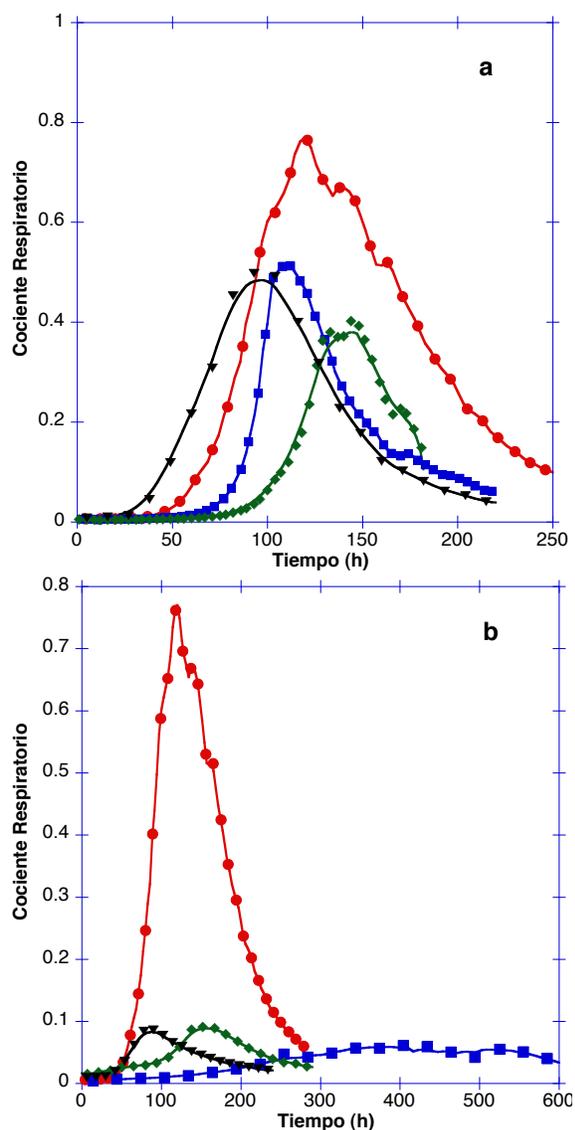


Fig. 10. Mediciones del cociente respiratorio para los casos de las Figuras 9 y 11, respectivamente: a) (●) 25 gL⁻¹ de glucosa; (■) 25 gL⁻¹ de glucosa y 5 gL⁻¹ de ácido oxálico; (◆) 25 gL⁻¹ glucosa y 5 gL⁻¹ de ácido cítrico; (▲) 25 gL⁻¹ de glucosa y 5 gL⁻¹ de glicerol. b) Una fuente de carbono: a) (●) 25 gL⁻¹ de glucosa; (■) 5 gL⁻¹ de ácido oxálico; (◆) 5 gL⁻¹ de ácido cítrico; (▲) 5 gL⁻¹ de glicerol.

es consumido o producido según la interacción entre fosfoenol piruvato, piruvato, malato y oxaloacetato, y el derivado de la hidrólisis y oxidación del ácido oxálico (Raistrick, 1919). Ahora, el consumo de ácido cítrico en el citosol no participará en la ruta PF y por lo tanto no producirá el NADPH necesario para

la biosíntesis, sin embargo formará oxaloacetato, el cual tiene tres posibles rutas a seguir: formar malato (que puede reingresar al CAT), formar aspartato (para formar biomasa), y producir acetato (necesario para formar acetil-CoA) y ácido oxálico. Todo esto requiere, dependiendo de cada caso, de diferentes cantidades de ATP, NAD⁺, NADP⁺, ACoASH y de la liberación y/o consumo de CO₂, que participan en diversas reacciones, y el consumo de O₂, como se describe en la Fig. 2. Sin embargo, es necesario medir la cantidad de ácido cítrico en el medio sólido para tener la certeza de su asimilación por *A. niger*, y poder estimar su participación en los esquemas de reacción en el citosol y CAT como se ha mencionado, aunque se observa que la presencia de este metabolito en el medio sólido, que ha sido asimilado en una cierta cantidad, no produce la misma cantidad de biomasa que en el caso de usar solo glucosa.

3.2.3. Mezcla con glucosa y ácido oxálico

El metabolismo del ácido oxálico, ya sea derivado de la hidrólisis del oxaloacetato o el adquirido del medio sólido, produce principalmente CO₂, formaldehído, ácido fórmico y metanol (Andersen, 2008; Jakobym 1958; Raistrick, 1919), y cuando éste se usa como un segundo sustrato se observa que existe un aumento en el cociente respiratorio con respecto al de la mezcla glucosa-ácido cítrico, lo que debe reducir la cantidad de ATP disponible y reducir así la formación de biomasa, como se observa en al Fig. 9. Asimismo tanto el ácido oxálico como el fórmico son metabolitos tóxicos, Aquí la velocidad de crecimiento de la biomasa en la fase exponencial es la menor, de menos del 50% que en el caso de la glucosa. Es importante mencionar que los experimentos realizados con un medio que contiene glucosa y ácido oxálico se realizaron utilizando esporas de *A. niger* que nunca estuvieron expuestas a este medio, y que tal vez las esporas que se cosechen de esta mezcla binaria presenten otro comportamiento.

3.2.4 Crecimiento con ácido oxálico, ácido cítrico y glicerol

La Fig. 10b muestra el cociente respiratorio cuando se utiliza solamente como fuente de carbono a los ácidos cítrico y oxálico, y al glicerol, y se observa que éstos son metabolizados en diferente grado cuando se comparan con el caso de glucosa. Lo que se destaca aquí es que la ausencia de glucosa, que permite operar a la ruta PF y generar NADPH para las reacciones

3.2.5 Predicciones del modelo

La figs. 11a y 11b muestran las predicciones del crecimiento de biomasa y la producción de CO₂ por el modelo cuando se utilizan dos sustratos, y que corresponden a los resultados mostrados en la Fig 9, donde se observa que la predicción del crecimiento de biomasa para tres de los casos es idéntica, exceptuando la de la mezcla glucosa-glicerol, donde se predice una mayor producción de ésta. Con respecto a la producción de CO₂ se observa que la que corresponde a la mezcla glucosa-ácido oxálico es la mayor, y esto deriva del hecho de que el metabolismo del ácido oxálico produce principalmente CO₂ (Jacoby, 1958; Raistrick, 1919). De lo anterior, se ve claramente que los valores de los parámetros cinéticos usados deberán ser modificados para lograr una mejor predicción, y que su estimación solo será posible si se realizan mediciones de productos en el sustrato sólido. Por otro lado, no fué posible obtener ninguna respuesta del modelo para la predicción de los casos mostrados en la Fig. 10b.

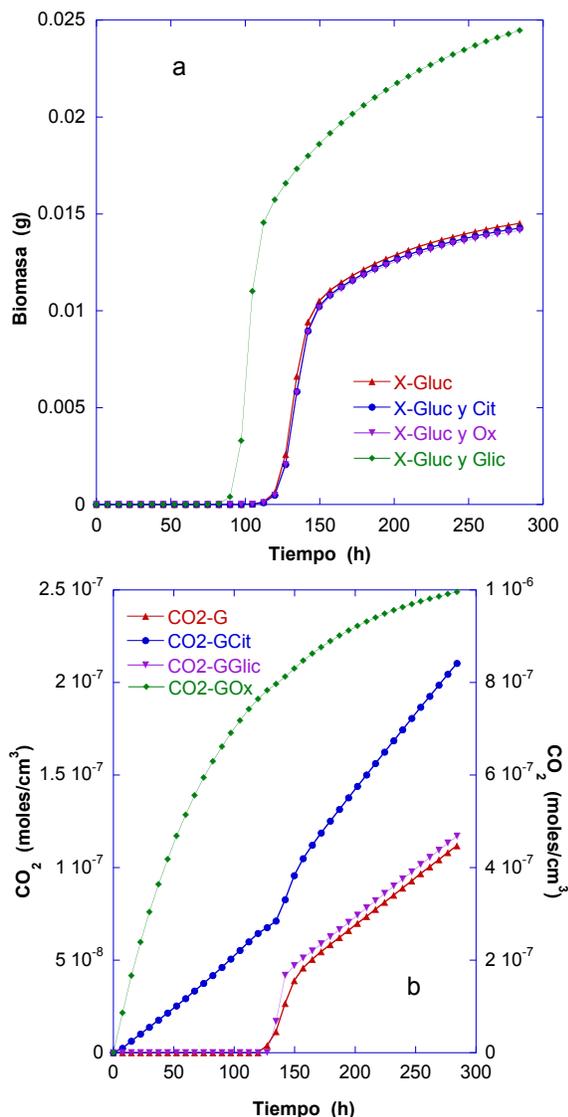


Fig. 11. Predicción del crecimiento de *Aspergillus niger* correspondiente a los datos de la Fig. 9 donde se usan diferentes fuentes de carbono: a) Biomasa y b) CO₂ producido en la fase gaseosa.

anabólicas de producción de biomasa esta ausente, y que solamente el glicerol y en menor proporción el ácido cítrico pueden producir biomasa, pero no así el ácido oxálico (Andersen, 2008; Raistrick, 1919). Por lo anterior no es posible comparar directamente las respuestas mostradas en las figs. (10a) y (10b), y lo único que se puede decir es que *A. niger* tiene la capacidad de asimilar, en cierto grado, a estas tres fuentes de carbono.

Conclusiones

Se analiza el metabolismo de *Aspergillus niger* A10 con un modelo estructurado que predice cualitativamente el crecimiento en un sustrato sólido cuando se utilizan diferentes fuentes de carbono. Si bien éste es un modelo simplificado, retiene las características importantes de las rutas EMP, PF, CAT, y de las producciones de ATP, NAD⁺ y NADP⁺, así como de la biomasa. Los experimentos realizados donde se miden conjuntamente la cantidad de biomasa y CO₂ producidos y el consumo de O₂ en una caja Petri modificada, permitieron una comparación cualitativa con las predicciones del modelo, pero es claro que en éste tipo de experimentos también se deben medir los productos excretados al medio sólido, aunque esto no sea fácil. Lo anterior es indispensable para estimar algunos de los parámetros cinéticos fundamentales, asociados con las diferentes rutas metabólicas que conforman el modelo. La presencia de otra fuente de carbono, que tiene un grado de reducción diferente al de la glucosa, perturba el metabolismo normal cuando se usa conjuntamente con ésta, y en ausencia de ésta se observa un crecimiento muy pequeño. Por otro lado, es muy importante determinar el mecanismo de asimilación de la glucosa por el micelio, y creemos que ésta es una de las partes importantes que ha tocado esta investigación, además del uso novedoso de una caja Petri modificada.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Hugo Velasco Bedrán (ENCB, IPN) sus importantes comentarios y observaciones a este trabajo, así como al Dr. Ascensión Montoya de la Fuente por facilitar la construcción de la caja Petri modificada. El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología la beca otorgada (No. 188486) para cursar el Doctorado en Ingeniería Química dentro del Posgrado de Excelencia en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Nomenclatura

C_{nc}	concentración molar de la especie n en el citosol, $g L^{-1}$
$C_{n\psi}$	concentración molar de la especie n en la fase ψ , $g L^{-1}$
C_{n0}	concentración molar inicial de la especie n , $g L^{-1}$
d_h	diámetro de las hifas, μm
D_ψ	coeficiente de difusión, $cm^2 h^{-1}$
e^-	carga energética
k_j	constante de velocidad de la reacción j
K_j	constante de equilibrio de la reacción j
L_h	longitud del tubo hifal promedio, cm
L_ψ	longitud de la fase ψ , cm
N_h	número de tubos hifales
$P_{n\psi}$	permeabilidad del componente n en la fase ψ , $cm h^{-1}$
R_{n_j}	velocidad de reacción j que consume/produce a la especie n
r_j	velocidad de la reacción j
t	tiempo, h
V_h	volumen total del micelio, cm^3
X	biomasa, g
z_ψ	coordenada axial en la fase ψ , cm
Símbolos griegos	
ρ_X	densidad del micelio, $g cm^{-3}$
ϵ_h	fracción volumétrica ocupada por la biomasa
μ	velocidad específica de crecimiento de la biomasa, h^{-1}
ψ	fase gaseosa o sólida

Metabolitos

6PG	6 fosfogluconato
α KGT	alfa-cetoglutarato
ACoA	acetil coenzima A

ADP	adenosin difosfato
AMP	adenosin monofosfato
ASP	aspartato
ATP	adenosin trifosfato
Cit	citrato
DHAP	dihidroxiacetona fosfato
E_{11}	termino de regulación de la enzima
F16DP	fructosa 1, 6 difosfato
G3P	gliceraldehído 3 fosfato
G6P	glucosa 6 fosfato
GLIC3P	glicerol 3 fosfato
NAD^+	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
$NADP^+$	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NH_3	amoníaco
OAA	oxaloacetato
PFK	termino de regulación de la enzima fosfofructoquinasa
Pir	piruvato
R5P	ribosa 5 fosfato
UTP	uridina trifosfato

Referencias

- Andersen M. R. (2008). Systems biology studies of *Aspergilli* from sequence to science. Tesis Doctoral, Universidad Técnica de Dinamarca, Dinamarca.
- Andersen M. R. , Nielsen M. L. y Nielsen J. (2008). Metabolic model integration of bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*. *Molecular Systems Biology* 4, 1-13 (material adicional en www.nature.com/msb).
- Atkinson D. E. (1969). Regulation of enzyme function. *Annual Review of Microbiology* 24, 47-68.
- Canela A.B., van Gulik W.M. y Heijnen J.J., (2008). Determination of the cytosolic free NAD/NADH ratio in *Saccharomyces cerevisiae* under steady-state and highly dynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 734-743.
- Collatz, L. (1966). *The numerical treatment of differential equations*. 3ª Edición, Editorial Springer-Verlag, Berlín.

- Chassagnole Ch., Noisommit-Rizzi N., Schmid J. W., Mauch K. y Reuss M. (2002). Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 79, 53-73.
- Fredrickson A. G., (1976). Formulation of structured growth models. *Biotechnology and Bioengineering* 18, 1481-1486.
- Finlayson B. A. (1972). *The method of weighted residuals and variational principles*. Academic Press, Nueva York.
- Hellendoorn L., Mulder H., van den Heuvel J. C. y Ottengraf S.P.P. (1997). Intrinsic kinetic parameters of the pellet forming fungus *Aspergillus awamori*. *Biotechnology and Bioengineering* 58, 478-485.
- Jakoby W.B. y Bhat J.V. (1958) Microbial metabolism of oxalic acid. *Bacteriological Reviews* 22, 75-80.
- Khazaei T., McGuigan A. y Mahadevan R. (2012) Ensemble modeling of cancer metabolism. *Frontiers in Physiology - Computational Physiology and Medicine* 3, 1-14.
- Larralde-Corona C.P., López-Isunza F. y Viniestra-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.
- Legisa M. y Mattey M. (2007). Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters* 29, 181-190.
- Lehninger A. L. (1975) *Biochemistry*. 2ª Edición, Editorial Worth Pub. Inc., Nueva York.
- López-Isunza F., Larralde-Corona P. y Viniestra-González G., (1997) Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi. *Chemical Engineering Science* 52, 2629-2639.
- Luedeking R. y Piret E. L. (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1, 393-412.
- Melzer G., Esfandabadi M.E., Franco-Lara E. y Wittmann Ch. (2009) Flux design: *In silico* design of cell factories based on correlation of pathway fluxes to desired properties. *BMC Systems Biology* 3, 1-16.
- Nielsen J. (1995). Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum*. Polyteknisk Forlag, Denmark.
- Papagianni M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances* 25, 244-263.
- Rahardjo Y. (2005) Fungal mats in solid-state fermentation. Tesis Doctoral, Universidad de Wageningen, Holanda.
- Raistrick H. y Clark A. B. (1919). On the mechanism of oxalic acid formation by *Aspergillus niger*. *Biochemistry Journal* 33, 329-334.
- Reyes Ocampo I. (2006). Difusión y crecimiento microbiano de *Aspergillus niger* sobre un medio sólido. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Rizzi M., Theobald U., Querfurth E., Rohrsch T. Baltes M. y Reuss M. (1996). *In vivo* investigations of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 316-327.
- Rizzi M., Baltes M., Theobald U. y Reuss M. (1997). *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II Mathematical model. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 592-608.
- Salazar M., Vongsangnak W., Panagiotou G., Anders M.R. y Nielsen J. (2009). Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data analysis. *Molecular Genetics and Genomics* 282, 571-586.
- Schmidt K., Norregaard L. C., Pedersen B., Meissner A., Duus J. O., J. Nielsen, J. Villadsen (1999). Quantification of intracellular metabolic fluxes from fractional enrichment and ¹³C-¹³C coupling constrains on the isotopomer distribution in labeled biomass components. *Metabolic Engineering* 1, 166-179.

- Thiele E. W. (1939). Relation between catalytic activity and size of particle. *Industrial and Engineering Chemistry* 31, 916-926.
- Torres N.V., Voit E.O., (2002) Pathway analysis and optimization in metabolic engineering. Cambridge Univ. Press.
- Trinci A.P.J. (1974) A study of the kinetics of hyphal extension and branch initiation of fungal mycelial. *Journal of General Microbiology* 81, 225-236.
- Vaseghi S., Baumeister A., Rizzi M., Reuss M. (1999). *In vivo* dynamics of the pentose phosphate pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering* 1, 128-140.
- Vergara Fernández A., Hernández S., San Martín Davison J., Revah S. (2011) Morphological characterization of aerial hyphae and simulation growth of *Fusarium solani* under different carbon source for application in the hydrophobic VOC's biofiltration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 10, 225-233.
- Viniegra González G. y Favela Torres E. (2006). Why solid-state fermentation seems to be resistant to catabolic repression?. *Food Technology and Biotechnology* 44, 397-406.
- Wolschek M. F., Kubicek Ch. P. (1999) Biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. En: *Citric Acid Biotechnology* (B. Kristiansen, M. Mattey y Linden J, eds), Pp. 11-32. Taylor & Francis, London.
- Young J.D., Henne K.L., Morgan J.A., Konopa A.E. y Ramkrishna D. (2008). Integrating cybernetic modeling with pathway analysis provides a dynamic, systems-level description of metabolic control. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 542-559.