



**“Estudio del metabolismo de
Aspergillus niger
crecido en superficie de agar”**

Tesis que PRESENTA:
M. en C. Inés Reyes Ocampo
Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias (Ingeniería Química)

Asesor:
Dr. Felipe López Isunza¹

Jurado calificador:
Presidente: Dr. Gustavo Viniegra González²
Secretario: Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda²
Vocal: Dr. Leobardo Serrano Carreón³
Vocal: Dr. Carlos Martínez Vera¹

México, D. F. Septiembre de 2013

¹ Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAMI
² Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Básicas y de la Salud, UAMI
³ Instituto de Biotecnología, UNAM



**“Estudio del metabolismo de
Aspergillus niger
crecido en superficie de agar”**

Tesis que PRESENTA:
M. en C. Inés Reyes Ocampo
**Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias (Ingeniería Química)**

Asesor:
Dr. Felipe López Isunza¹

Jurado calificador:
Presidente: Dr. Gustavo Viniegra González²
Secretario: Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda²
Vocal: Dr. Leobardo Serrano Carreón³
Vocal: Dr. Carlos Martínez Vera¹

México, D. F. Septiembre de 2013

¹ Departamento de Ingeniería de Procesos e Hidráulica, División de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAMI

² Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Básicas y de la Salud, UAMI

³ Instituto de Biotecnología, UNAM

Agradecimientos

Al **CONACyT** por la beca brindada para el desarrollo de esta tesis doctoral (Becario No. 188486).

Mi más sincero agradecimiento a mis sinodales, por la paciencia mostrada en la revisión de esta tesis y, porque los conocimientos a mi compartidos, me permitieron mejorar y enriquecer el trabajo desarrollado en estos años.

Dr. Gustavo Viniegra

Dr. Gerardo Saucedo

Dr. Carlos Martínez

Dr. Leobardo Serrano

Dr. Felipe López Isunza, gracias por contribuir a convertirme en una persona más fuerte.

Mi aprecio y reconocimiento a aquellas personas que contribuyeron en esta tesis con un granito de conocimiento.

Dra. Margarita González

Dr. Sergio Gómez

Dr. Armando González

Dr. Jaime Vernón

Dr. José Álvarez

M. en C. Guillermo Rivera

Dr. Francisco Valdez

Ing. Fernando Valderrama

Dr. Ernesto Favela

Dr. Sergio Huerta

A los profesores del área de Ingeniería Química, por compartir sus enseñanzas en las aulas y en la vida, ya que sin todo lo aprendido no hubiera llegado a este día.

A los que amo, mi familia, que sin ustedes y su amor,
mi día a día no tendría sentido.

A los que tengo la fortuna de llamar mis amigos, por
su cariño, entusiasmo y aliento, que me ayudan a no
decaer.

A todos aquellos de cierta forma me han apoyado.

Gracias a Dios, porque la fe, me ha permitido seguir
adelante.

Resumen

La manipulación del metabolismo de *Aspergillus niger* es un tema de investigación actual, debido a que éste microorganismo es ampliamente utilizado para la producción de metabolitos como el ácido cítrico, entre otros. A pesar de los esfuerzos presenta rasgos sin entender ya que no se cuenta con un análisis sistemático de las variables de diseño del proceso y de su impacto en la orientación del metabolismo de este organismo.

Esta manipulación del metabolismo de *A. niger* se puede dar gracias a cambios controlados en: la naturaleza de los sustratos y en los parámetros físicos de los sistemas. El Cociente Respiratorio (CR) permite de forma sencilla monitorear los cambios en este metabolismo. CR es un índice de fácil instrumentación y de monitoreo en línea, usando las técnicas disponibles de respirometría y, apoyado en otras mediciones químicas y físicas, y permite establecer métodos de control de proceso de este tipo de fermentaciones. Sí, se evalúan las repercusiones de los parámetros que influyen en el crecimiento se pueden establecer las relaciones causa-efecto que permitirán mejoras del crecimiento de estos microorganismos y optimización de la producción de metabolitos de interés comercial.

En este trabajo se presenta un estudio teórico-experimental del crecimiento superficial de *A. niger* en un medio enriquecido. Para lo cual se analizan; con base en las distintas vías del metabolismo del microorganismo, los resultados de las variables de respuesta: tasa de producción de CO₂, tasa de consumo de O₂, CR y concentración de biomasa, ante perturbaciones controladas en: la naturaleza de los sustratos, y parámetros físicos del sistema de reacción. El objetivo es analizar aspectos del comportamiento del microorganismo como un sistema abierto, ante perturbaciones. Para ello se revisó el estado del arte acerca del efecto de los diversos nutrientes del medio sobre el crecimiento de *A. niger*. Así también, se estudió el conocimiento previo de los eventos bioquímicos y fisiológicos que afectan el crecimiento y la producción de ácido cítrico por *A. niger*.

Experimentalmente, se hace uso de un sistema modelo de biorreacción, sencillo y barato, que facilita el análisis del metabolismo de hongos crecidos sobre superficies sólidas, a través de la medición en línea de O₂ y de CO₂. Éste permite el analizar el impacto en el consumo de algunos nutrientes (Mn²⁺) y fuentes de carbono empleadas (glucosa, glicerol, ácido cítrico y ácido oxálico), y la adición deliberada de metabolitos excretados al medio durante el crecimiento del microorganismo (glicerol, ácido cítrico y ácido oxálico), y de cambios en los parámetros físicos del sistema de reacción (temperatura, volumen del medio y uso de membranas permeables).

En los experimentos de crecimiento de *A. niger* se utilizó un sistema de biorreacción, basado en una caja Petri convencional, diseñado para llevar a cabo mediciones consumo de O₂ y generación de CO₂, en línea y además se llevo a cabo el seguimiento del peso seco de biomasa, en caja Petri convencional. No se realizaron mediciones de los productos excretados al medio sólido.

El análisis y discusión de los resultados se basa, tanto en el conocimiento previo de los eventos bioquímicos del crecimiento de *A. niger*, como en el uso de dos modelos matemáticos previamente publicados, uno un modelo estructurado del metabolismo del microorganismo y otro que describe de forma global al crecimiento superficial de *A. niger* y crecimiento radial y el transporte de nutrientes.

De los resultados obtenidos experimentalmente y el análisis soportado en el uso de los modelos se tiene que las diferentes variaciones realizadas sobre la naturaleza y parámetros físicos del sistema generan efectos en el crecimiento del microorganismo, así como en el grado de oxidación de las fuentes de carbono.

Se determinó que la variación en la concentración de glucosa en el medio de cultivo se tiene un máximo en la biomasa producida a una concentración de inicial de 200 g/L. Así también, se determinó que la adición deliberada de ácido oxálico, ácido cítrico o glicerol al medio como segunda fuente de carbono y el uso de estos como mismos como fuente de carbono, afecta el grado de oxidación de la

fuente de carbono principal y perturban el metabolismo del microorganismo modificando el requerimiento energético y la utilización del O₂.

Se determinó que variar la cantidad de manganeso en el medio, a pesar de que el manganeso es un metal requerido en el metabolismo para la asimilación de las fuentes de carbono y generación de ATP, para los casos de estudio no se presenta un efecto apreciable.

Aspectos físicos del medio como el uso de membranas semipermeables y la variación de la relación área/volumen de la placa de agar son condicionales del crecimiento del microorganismo. Para el caso del uso del papel celofán al sumar al sistema este componente se añade una barrera al libre crecimiento del microorganismo limitando el transporte de nutrientes como el O₂ hasta 3 veces. Modificar el área específica de la placa de agar, de 1.5 a 0.75, modifica la cantidad de sustrato disponible y, a pesar de que el microorganismo cuenta para su crecimiento con la misma área de contacto para el caso de mayor y menor volumen el transporte del sustrato al interior de las células se modifica cambiando el grado de oxidación del sustrato.

Se tiene como conclusión general de este trabajo que el metabolismo de *A. niger* crecido sobre superficies sólidas, caracterizado por la concentración de biomasa, puede manipularse mediante cambios en: la naturaleza de los sustratos y los parámetros físicos del sistema.

Ya que en este trabajo los resultados obtenidos son limitados se propone una experimentación más detallada en la que se monitoreen los metabolitos excretados al medio y como esta producción se afecta debido a las perturbaciones en el sistema de reacción, de esta forma se podrán establecer de manera más precisa los efectos de tales perturbaciones, y se podrá desarrollar un modelo matemático estructurado con mayor validez.

Índice

Agradecimientos	i
Resumen	iv
Índice	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tablas	xiii
Nomenclatura	xiii
Simbolos griegos	xv
Capítulo 1. Introducción y Antecedentes	1
1.1 Los hongos filamentosos.	1
1.1.1 El <i>Aspergillus niger</i>	2
1.2 Factores que afectan el crecimiento y la producción de metabolitos de interés.	3
1.2.1 El medio de cultivo y la fuente de carbono.....	3
1.2.2 Los minerales y los iones.	5
1.2.3 El transporte de masa y la productividad.	6
1.3. El metabolismo de <i>Aspergillus niger</i>	8
1.3.1 La glicólisis en el metabolismo de <i>Aspergillus niger</i>	9
1.3.2 El metabolismo del piruvato y la anaplerosis del TCA.	11
1.3.3 La respiración y la fosforilación oxidativa.....	12
1.3.4 La biosíntesis en el metabolismo de <i>Aspergillus niger</i>	13
1.3.5 El metabolismo y el desarrollo de modelos matemáticos.	15
Capítulo 2. La Hipótesis y la Justificación del Trabajo	18
2.1 La Hipótesis.	18
2.2 La Justificación	18

Capítulo 3. Los Objetivos del Trabajo.....	20
3.1 El objetivo general.	20
3.2 Los objetivos particulares.	20
Capítulo 4. Los Materiales y Métodos.....	21
4.1 El microorganismo de estudio.....	21
4.2 La conservación de la cepa.	21
4.3 La preparación del inóculo.....	22
4.4 El medio de cultivo para experimentación.	22
4.5 El sistema experimental.....	22
4.6 El inóculo.	23
4.7 La cuantificación del peso seco.....	24
4.8 Los ensayos analíticos.....	24
Capítulo 5. Los Modelos Matemáticos.	25
5.1 El modelo global de crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> en crecimiento superficial.....	25
5.1.1 Las ecuaciones del modelo.....	26
5.1.2 La solución numérica del modelo.....	27
5.2 El modelo estructurado del metabolismo de <i>Aspergillus niger</i> crecido en agar.....	28
5.2.1 Las ecuaciones del modelo.....	29
Capítulo 6. Los Resultados y la Discusión.	34
6.1 La evaluación de la evolución de la biomasa global.....	34
6.1.1 Las variaciones en la concentración de la fuente de carbono y su efecto sobre el crecimiento global de biomasa.	36
6.1.2 Las mezclas binarias de glucosa con metabolitos primarios y su efecto sobre el crecimiento global de biomasa.	38

6.1.3 Los cambios en la concentración de Mn^{2+} y su efecto sobre la producción global de biomasa.....	40
6.1.4 El análisis del crecimiento global de biomasa mediante un modelo matemático.....	42
6.2 Caracterización abiótica de la caja Petri modificada.	49
6.3 La evaluación del cociente respiratorio en el crecimiento superficial de <i>Aspergillus niger</i>	52
6.3.1 Las mezclas binarias de glucosa con metabolitos primarios y las variaciones de la fuente de carbono del medio y su efecto sobre el cociente respiratorio.	55
6.3.1.1 Un análisis del efecto de la mezcla de glucosa y glicerol sobre metabolismo de <i>Aspergillus niger</i>	59
6.3.1.2 Un análisis del efecto de la mezcla de glucosa y ácido oxálico sobre metabolismo de <i>Aspergillus niger</i>	62
6.3.1.3 Un análisis del efecto de la mezcla de glucosa y ácido cítrico sobre metabolismo de <i>Aspergillus niger</i>	63
6.3.2 Un análisis del crecimiento bajo diversas fuentes de carbono.....	65
6.3.3 Las variaciones en la concentración de iones de manganeso y su efecto sobre la producción de CO_2	68
6.4 El efecto de los cambios en los parámetros físicos del sistema experimental de reacción.	70
6.4.1 El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de <i>Aspergillus niger</i>	70
6.4.1.1 El crecimiento a temperatura controlada.....	70
6.4.1.2 El crecimiento a temperatura ambiente.....	71
6.4.2 El uso de membranas permeables y su efecto sobre la producción de CO_2	73
6.4.3 La variación del área específica de la placa de agar y su efecto sobre la producción de CO_2	76
6.5 El Resumen de Resultados	78
Conclusiones	81
Referencias	83

Índice de Figuras

Figura 1. Rutas metabólicas que se involucran en la síntesis de ácido cítrico por <i>Aspergillus niger</i>	10
Figura 2. Síntesis de ácido cítrico por <i>Aspergillus niger</i> , esquema simplificado de reacción descrito por Verhoff y Spradlin, 1976.	16
Figura 3. Caja Petri Modificada.	23
Figura 4. Colonia de <i>Aspergillus niger</i> que crece sobre agar.....	26
Figura 5. La red metabólica simplificada en la que se basa el modelo estructurado de <i>Aspergillus niger</i> . Esta incorpora al ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs (CAT), a la ruta de las pentosas fosfato (PF), a la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glicolisis y a las reacciones que producen biomasa.....	29
Figura 6. Evolución del peso seco de biomasa de <i>A. niger</i> A10 durante el crecimiento superficial en cultivo en caja Petri convencional en experimento control de 25 g/L de glucosa y 28°C.	35
Figura 7. Evolución del peso seco de biomasa durante el crecimiento en caja Petri tradicional de <i>A. niger</i> A10 a 25 (●), 50(■), 100 (◆), 150 (▲), 200 (▼) y 250 (×) g/L de glucosa inicial.....	36
Figura 8. Seguimiento de la evolución en la producción de biomasa durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 en caja Petri convencional a 28°C, con solo 25 g/L glucosa (●), con glucosa 25 g/L más ácido oxálico 5 g/L (■), ácido cítrico 5 g/L (◆) y glicerol 5 g/L (▲) respectivamente.....	39
Figura 9. Evolución del peso seco de biomasa durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 variando la concentración de iones de Mn^{+2} adicionados al medio, 0.05 (●), 0.07 (■), 0.10 (◆), 0.14 (▲) y 0.21 mg/L (▲).....	41
Figura 10. Evolución de la longitud del micelio a las diferentes condiciones de crecimiento.	43
Figura 11. Perfiles de concentración de glucosa en el agar y el micelio para una concentración de glucosa inicial de 150 g/L.....	45
Figura 12. Densidad máxima de biomasa de <i>A. niger</i> a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.	47

Figura 13. Rendimiento en función de la concentración de carbono inicial disponible.	48
Figura 14. Predicción de la variación de la carga energética durante el crecimiento de <i>A. niger</i> para diferentes valores de la concentración inicial de glucosa en la placa de agar.....	49
Figura 15. Efecto de los ciclos diurno y nocturno sobre la temperatura en el sistema experimental.	50
Figura 16. Efecto de los ciclos diurno y nocturno sobre las concentraciones de CO ₂ (●) y O ₂ (■) en la caja Petri modificada sin reacción.	50
Figura 17. Evolución del flujo de oxígeno en la caracterización abiótica del sistema experimental.....	52
Figura 18. Seguimiento de la evolución de las tasas de producción de CO ₂ (●) y consumo de O ₂ (■) durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 en caja Petri modificada a glucosa 25 g/L y 28°C.....	54
Figura 19. Diagrama de la reacción anaplerótica, (1) catalizada por la piruvato carboxilasa permite la reposición de intermediarios del ciclo de Krebs.	54
Figura 20. Seguimiento de la evolución en la tasa de producción de CO ₂ durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 a 28°C, solo glucosa 25 g/L (●), glucosa 25 g/L más ácido oxálico 5 g/L (■), ácido cítrico 5 g/L (◆) y glicerol 5 g/L (▲) respectivamente.	56
Figura 21. Seguimiento de la evolución de cociente respiratorio (CO ₂ /O ₂) durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 a 28°C, con glucosa 25 g/L (●); glucosa 25 g/L más ácido oxálico 5 g/L (■), ácido cítrico 5 g/L (◆) y glicerol 5 g/L (▲) respectivamente.	56
Figura 22. Evolución de la tasa de producción de CO ₂ producido durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 a 28 °C y 25 g/L de glucosa (●), 5 g/L de ácido oxálico (■), 5 g/L de ácido cítrico (◆) ó 5 g/L de glicerol (▲).....	57
Figura 23. Evolución del cociente respiratorio durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 a 28 °C y 25 g/L de glucosa (●), 5 g/L de ácido oxálico (■), 5 g/L de ácido cítrico (◆) y 5 g/L de glicerol (▲).....	57
Figura 24. Anabolismo de glicerol y metabolismo catabólico en <i>Aspergillus niger</i> . (Imagen tomada y modificada de Diano <i>et. al.</i> , 2006).....	60
Figura 25. Evolución de la tasa de producción (arriba) y acumulación de CO ₂ (abajo) durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 en caja Petri modificada a 25 g/L de glucosa (●), 25 g/L de glucosa más 5 g/L de glicerol (■) y 5 g/L de glicerol (◆).	61

Figura 26. Evolución de la tasa de consumo de O ₂ durante el crecimiento en caja Petri modificada de <i>A. niger</i> A10 a 25 g/L de glucosa (●), 25 g/L de glucosa más 5 g/L de ácido oxálico (▲) y 5 g/L de ácido oxálico (◆).	63
Figura 27. Reacciones del ciclo de los ácido tricarboxílicos y del transporte y consumo de citrato en el citoplasma. (Imagen tomada y modificada de Andersen <i>et. al.</i> , 2008).	64
Figura 28. Densidad máxima de biomasa de <i>A. niger</i> en función de la cantidad de carbono inicial disponible.	66
Figura 29. Rendimiento en función de la concentración de carbono inicial disponible.	66
Figura 30. Densidad máxima de biomasa de <i>A. niger</i> en función del grado de oxidación del sustrato.....	67
Figura 31. Rendimiento en función del grado de oxidación del sustrato.....	68
Figura 32. Evolución de la tasa de producción de CO ₂ (arriba), y de la acumulación del CO ₂ (abajo) durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 variando la concentración de iones de Mn ⁺² adicionados al medio, 0.05 (■) y 0.21 mg/L (●), en caja Petri modificada a temperatura ambiente.	69
Figura 33. Evolución de la tasa de producción (arriba) y acumulación de CO ₂ (abajo) durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 a temperaturas de 23 (■) y 28°C (●), en caja Petri modificada.	71
Figura 34. Evolución de la tasa de producción de CO ₂ durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 a temperatura ambiente.....	72
Figura 35. Evolución del cociente respiratorio durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 a temperatura de 23 (■), 28°C (●) y ambiente (◆).	73
Figura 36. Evolución de la tasa de producción de CO ₂ durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 en caja Petri modificada con 150 mL de medio de cultivo y 250 g/Lde glucosa, sin usar (◆) y usando (◇) una membrana permeable de celofán.....	75
Figura 37. Evolución de la tasa de consumo de O ₂ durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 en 150 mL de medio de cultivo con 250 g/Lde glucosa, sin usar (◆) y usando (◇) una membrana permeable de celofán.	75
Figura 38. Comparación de la evolución tasa de producción de CO ₂ durante el crecimiento de <i>A. niger</i> A10 con 75 (A/V=1.5 cm ⁻¹) (■) y 150 (A/V=0.75 cm ⁻¹) (●) mL de medio de cultivo con 25 g/L de glucosa en caja Petri modificada.....	77

Figura 39. Comparación de la evolución tasa de producción de CO₂ durante el crecimiento de *A. niger* A10 con 75 (A/V=1.5 cm⁻¹) (■) y 150 (A/V=0.75 cm⁻¹) (●) mL de medio de cultivo con 250 g/L de glucosa en caja Petri modificada. 78

Índice de Tablas

Tabla 1 Composición de la biomasa de <i>Penicillium crysogenum</i> (Henrikensen, et. al., 1996).	14
Tabla 2. Los datos experimentales usados en la solución numérica del modelo..	28
Tabla 3. Datos del crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> en experimentos a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.	37
Tabla 4. La tasa específica de crecimiento a diferentes concentraciones de glucosa inicial.	46
Tabla 5. Datos del crecimiento de <i>A. niger</i> para experimentos con glucosa como sustrato principal más un segundo sustrato.	65

Nomenclatura

C_A	concentración del sustrato en el agar,
C_{A_0}	concentración inicial del sustrato en el agar,
C_M	concentración del sustrato en el micelio,
C_{M_0}	concentración inicial del sustrato en el micelio,
C_{n_c}	concentración de la especie n producida en la reacción j ,
C_{n_ψ}	concentración de la especie n en la fase ψ ,
C_{n_0}	concentración inicial de la especie n ,
d_h	altura de los tubos hifales,
D_{ef_A}	coeficiente efectivo de difusión del sustrato en el agar,

D_{ef_M}	coeficiente efectivo de difusión del sustrato en el micelio,
D_ψ	coeficiente efectivo de difusión de la fase ψ ,
E_A	espesor del agar,
E_M	espesor del micelio,
K_S	constante de afinidad del sustrato,
k_X	constante de reacción de la reacción X ,
K_X	constante de equilibrio de la reacción X ,
L_h	longitud de los tubos hifales,
l_M	longitud del micelio,
L_ψ	longitud de la la fase ψ
N_h	numero de tubos hifales
P_{n_ψ}	permeabilidad del componente n en la fase ψ ,
R_A	longitud del radio del agar,
r_A	posición radial en el agar,
r_M	posición radial en el micelio,
R_{n_j}	cantidad de moles de la especie n producida en la reacción j ,
r_X	velocidad de la reacción X ,
R_X	cantidad de biomasa producida,
t	tiempo, h
V_h	volumen de la colonia,
X	biomasa,
X_{MAX}	biomasa máxima,

Y_{XS} rendimiento biomasa/sustrato,

z_A posición axial en el agar,

z_M posición axial en el micelio,

z_ψ posición en la fase ψ ,

Simbolos griegos

ϵ_h Fracción volumétrica ocupada por la biomasa

μ velocidad específica de crecimiento de la biomasa, h^{-1}

μ_{MAX} velocidad específica de crecimiento de la biomasa, h^{-1}

ρ_X densidad de la biomasa del micelio,

Capítulo 1. Introducción y Antecedentes

El éxito de la aplicación de los hongos filamentosos para la obtención de productos de valor agregado ha dado lugar a la búsqueda del incremento en los niveles de producción empleando para ello diversos métodos que comprenden, desde la optimización de los bioprocesos, el desarrollo de nuevas cepas y la optimización de medios de cultivo, hasta el modelado matemático; en síntesis: se requiere de la ingeniería metabólica (Papagianniy Matthey, 2004, Gheshlaghi, *et. al.*, 2007). En este capítulo se presenta el estado del arte de la investigación sobre el crecimiento y metabolismo de *Asperigillus niger* y la forma en que éste se ve afectado ante variaciones en los sistemas de experimentación.

1.1 Los hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos son microorganismos de gran importancia en los procesos biotecnológicos industriales. Se emplean en la producción de antibióticos, ácidos orgánicos, vitaminas y enzimas (Pazouki y Panda, 2000). Los hongos filamentosos presentan un desarrollo morfológico complejo, que implica diferentes tipos de células; éstos van desde las conidias hasta las hifas (Martinelli y Kinghorn, 1994). El crecimiento de estos hongos presenta formación de ramificaciones, que macroscópicamente produce redes de hifas denominadas micelios (Goldberg, Rokem y Pines 2006; Gheshlaghi, *et. al.*, 2007; David, Akesson, y Nielsen, 2003); esta morfología permite el crecimiento de los hongos filamentosos en procesos de fermentación en cultivos sumergidos o en estado sólido o superficial (Papagianni y Matthey, 2004; Ooijkas, *et. al.*, 2000; Krishna, 2005).

Una de las razones de la diversidad morfológica en estos hongos es, sin duda, los diferentes factores que influyen en el proceso de crecimiento, como son: las condiciones de cultivo (las fuentes de carbono, las limitaciones de nitrógeno y fosfato, el pH, la aireación, la concentración de minerales y otros iones en el medio), la fisiología celular (el tipo de microorganismo, el crecimiento, el metabolismo y la secreción de productos metabólicos), y los fenómenos de

transporte (tipo y forma de cultivo, transporte de masa y calor, acumulación y absorción de los componentes del medio y los productos del metabolismo) (Pazouki y Panda, 2000; Papagianni, 2007). Estos factores afectan la apariencia, estructura y ramificación de las hifas; cambios morfológicos que tienen una relación directa con el requerimiento metabólico y la producción de metabolitos, y que, por otro lado, también se ven determinados por el transporte de los nutrientes en el sistema.

A la fecha se han realizado varios intentos por relacionar la morfología de crecimiento de los hongos filamentosos con la producción de algún metabolito de interés comercial; sin embargo, establecer la relación de cómo los parámetros morfológicos influyen o se ven afectados por la producción de ciertos metabolitos ha sido difícil (Grimm, *et. al.*,2005).

La operación y constitución de los sistemas experimentales representan un factor importante que afecta los cambios morfológicos en el microorganismo, ya que éstos presentan diversas variables a considerar como: los fenómenos de transporte. Para lograr una mejor comprensión del crecimiento de hongos filamentosos se requiere de un estudio en el que se relacione el comportamiento durante el crecimiento y el metabolismo celular. En este estudio se debe desarrollar un diseño experimental adecuado que permita obtener datos del comportamiento del microorganismo ante perturbaciones en el sistema y en el que sea posible evaluar la repercusión de los fenómenos de transporte en el crecimiento.

1.1.1 El *Aspergillus niger*.

Es difícil pensar en los hongos filamentosos sin pensar en *Aspergillus niger*. Ya que es el hongo filamentoso predilecto en investigación, sus aplicaciones van de la producción de ácido cítrico y glucónico, hasta la producción de enzimas industriales y proteínas, como la quimosina (Andersen, Nielsen y Nielsen 2008; Karaffa y Kubicek, 2003). *A. niger* ha desempeñado, desde sus comienzos, un importante papel en la biotecnología, siendo usado en fermentaciones industriales

por más de 80 años debido a su capacidad de acumular y secretar una enorme cantidad de metabolitos. A la fecha han sido presentados más de dos mil reportes científicos y cientos de patentes relacionadas con la explotación de este hongo.

1.2 Factores que afectan el crecimiento y la producción de metabolitos de interés.

1.2.1 El medio de cultivo y la fuente de carbono.

El medio de cultivo utilizado para lograr un crecimiento favorable en una fermentación industrial, ya sea en cultivo líquido o en sustrato sólido, requiere de diversos componentes como: agua, oxígeno, una fuente de carbono y de energía metabólica, de una fuente de nitrógeno y de otros elementos (Currie, 1917; Papagianni y Matthey, 2004). Durante mucho tiempo, la única forma de obtener información sobre la generación de metabolitos de interés fue la modificación en la composición de los medios de cultivo. Existen numerosos trabajos (Matthey, 1992; Torres, *et. al.*, 1996, Martinelli y Kinghorn, 1994, Papagianni, 2007), sobre la influencia de la concentración de diversos nutrientes sobre la productividad de metabolitos específicos, desde un punto de vista de ingeniería en términos de los sistemas de fermentación. Las azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa) son los compuestos orgánicos usados con mayor frecuencia como fuente de carbono en el crecimiento de hongos filamentosos, debido a su rápida absorción (Matthey, 1992; Martinelli y Kinghorn, 1994). Los hongos pueden usar también como fuentes de carbono algunos polisacáridos, aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos, proteínas, alcoholes e hidrocarburos, ya que solo requieren de una pequeña cantidad de carbono para su crecimiento y mantenimiento (Deacon, 1993; Papagianni, 2007).

Carter y Bull (1971) publicaron resultados del primer análisis del efecto de factores ambientales, y del transporte del oxígeno hacia el microorganismo, sobre las rutas del catabolismo en hongos. Ellos relacionaron la actividad la ruta Pentosa-Fostato (PF) con la demanda de oxígeno, y encontraron que un incremento en la actividad en la ruta PF durante el período exponencial del crecimiento del hongo se presenta ante bajos valores de la demanda de oxígeno disuelto. Otros estudios

realizados en *A. niger*, describen que la tasa de crecimiento depende de cambios en las enzimas de las rutas de la glicólisis, PF y en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), ya que bajo condiciones de limitación de glucosa, las enzimas del TCA modifican su actividad, dando como resultado el decaimiento en la producción de ácido cítrico (Xu, *et. al.*, 1989; Papagianni, *et. al.*, 1999).

Otro ejemplo de cómo la concentración del sustrato en el medio modifica el crecimiento es el estudio realizado por Larralde y colaboradores (1997). En este estudio se llevaron a cabo experimentos a 10, 40, 70, 120 y 300 g/L de glucosa. Larralde observó que el crecimiento de *A. niger* en medios líquidos se encuentra limitado a un máximo en la concentración de glucosa alimentada de 50 g/L, ya que a concentraciones mayores el hongo experimenta una inhibición en su crecimiento. Por otra parte, demostró que para medios sólidos la inhibición al crecimiento del hongo se presenta a concentraciones máximas de 200 g/L en la concentración inicial de glucosa. Como parte de este estudio se observó que cambios en los niveles de glucosa del medio modifican la longitud media y el diámetro de las hifas, ya que un aumento en la concentración inicial de glucosa provocó una disminución en estas longitudes hifales. Un comportamiento similar para el crecimiento de *A. niger* sobre un medio sólido fue observado por Reyes (2006), en donde se encontró que, en crecimiento en medio sólido y concentraciones mayores a 200 g/L, el microorganismo es afectado por un proceso de inhibición debido a la alta concentración de glucosa. Lo anterior podría estar relacionado con el requerimiento energético del hongo; ya que a concentraciones menores de glucosa, éste cuenta con los recursos energéticos suficientes para llevar a cabo la generación de biomasa, pero a medida que se incrementa la concentración requiere de un mayor consumo de las fuentes energéticas del metabolismo (ATP, ADP y NADH⁺), que el microorganismo no es capaz de generar, ocasionando una disminución en la generación de biomasa o también con la capacidad del hongo de la asimilación de la glucosa. Pero poder hacer un análisis a ciencia cierta del comportamiento del hongo cuando el medio cuenta con una mayor o menor concentración de fuente de carbono, es casi imposible. La alternativa empleada hasta la fecha que permite describir el comportamiento del crecimiento, efectos

inhibitorios en el crecimiento, o la evolución temporal de las poblaciones microbianas bajo determinadas condiciones ambientales, es el uso de expresiones empíricas, las cuales en general solo describen el crecimiento global de biomasa por medio de la estimación de tasas específicas de crecimiento con base en mediciones del peso seco de la biomasa total, o del incremento total en la longitud hifal, o del promedio del número de hifas, pero estos parámetros son específicos para cada experimento.

1.2.2 Los minerales y los iones.

El crecimiento de los hongos filamentosos requiere de ciertos minerales esenciales. Existe una amplia información sobre el efecto de los minerales y otros iones sobre el crecimiento fúngico y la producción de metabolitos (Papagianni y Matthey, 2004). Específicamente en el crecimiento de *A. niger* y la producción de ácido cítrico, algunos iones y minerales tienen un efecto sobre la morfología y su producción. Por ejemplo, los niveles de zinc y hierro en el medio están relacionados con la conversión de las fuentes de carbono a biomasa o ácido cítrico (Matthey, 1992). Los iones de cobre por su parte afectan la morfología de este hongo, ya que inducen a la formación de agregados miceliales, reducen los niveles de biomasa e incrementan la productividad de ácido cítrico (Haq, *et. al.*, 2002). Por su parte el aumento de las concentraciones del ion fosfato causa un cambio en la producción del ácido cítrico y un crecimiento excesivo del hongo (Papagianni, *et. al.*, 1999). Bajo condiciones de alta concentración del ion fosfato, se genera un aumento en la tasa específica de crecimiento y una morfología no deseada. Cualquier aumento en la concentración de manganeso reduce la obtención de ácido cítrico (Clark, *et. al.*, 1966), debido a que los iones de manganeso tienen una influencia directa en la síntesis de proteínas. La deficiencia en Mn^{2+} genera un rompimiento de proteínas que da como resultado una concentración alta de NH_4^+ intracelular, que a su vez inhibe a la enzima fosfofructoquinasa (enzima esencial en la conversión de la glucosa y fructosa a piruvato) permitiendo la formación de ácido cítrico y una aportación activa de la glicólisis (Kubicek y Röhr, 1977). La ausencia de iones de manganeso en el medio

provoca el crecimiento morfológico anormal del hongo ya que se incrementa la producción de quitina y la formación de hifas (Kisser,*et. al.*, 1980).

Estos estudios demuestran que existe una relación entre la morfología y la naturaleza del medio de cultivo, donde los cambios en la morfología y producción o inhibición de metabolitos de interés son el resultado de los efectos en el metabolismo de los microorganismos debidos a los cambios en el medio de cultivo.

1.2.3 El transporte de masa y la productividad.

En el cultivo de hongos filamentosos la morfología se encuentra determinada por el organismo cultivado. Para entender el comportamiento de un microorganismo en un cultivo fúngico diversos autores han llevado a cabo el seguimiento de los fenómenos de transporte que ocurren en el fermentador, así como del metabolismo celular, el cual está determinado por el consumo de sustrato (Papagianni,*et. al.*, 1994; Papagianni, 2007).

El tipo de fermentador y el tipo de cultivo que normalmente se utiliza en estudios de crecimiento de hongos filamentosos han mostrado ser una limitante para entender el comportamiento fisiológico de estos hongos, debido a que los distintos fenómenos de transporte que tienen lugar interactúan de forma compleja en el suministro de sustrato, oxígeno y otros nutrientes. A nivel industrial, el crecimiento de hongos filamentosos en medios líquidos debe considerar la transferencia de masa en la interface líquido-sólido entre la superficie celular y el medio y al interior de la madeja formada por las hifas; ya que las resistencias interfaciales en conjunto con el crecimiento de la biomasa representan un obstáculo para el transporte del sustrato, así como un aumento en la densidad de la biomasa implica una reducción de la porosidad lo que contrarresta la penetración de los nutrientes (Cui, *et. al.*, 1997; Escamilla Silva, *et. al.*, 2001). De igual manera que la concentración de sustrato se encuentra limitada por la densidad de biomasa, la concentración de oxígeno presenta el mismo efecto, y esta limitación, afecta al crecimiento (Olsvik y Kristiansen, 1992).

A diferencia de la fermentación en cultivo líquido, en el crecimiento de hongos filamentosos en medios sólidos, los fenómenos de transporte no presentan tales complicaciones ya que tanto el sustrato como el oxígeno se transportan al micelio sin obstáculos debido a que el microorganismo se encuentra en contacto directo con el oxígeno del aire y el sustrato presente en el medio de cultivo interactúa de forma directa con la biomasa microbiana, (Hölker, *et. al.*, 2004; Krishna, 2005). Sin embargo, se observa la generación y acumulación de productos del metabolismo en el medio de cultivo que puede llegar a afectar el crecimiento de los hongos (Olsson, 1994; Robson, *et. al.*, 1987).

El estudio del crecimiento de los hongos, su morfología y comportamiento en un determinado sistema experimental es una tarea difícil. Un ejemplo de esto es la atribución dada a la tasa de agitación del medio de cultivo, sobre la producción de penicilina y el crecimiento celular, en el cultivo de la *Penicillium chrysogenum* (Makagiansar, *et. al.*, 1993); o el estudio desarrollado sobre el crecimiento de colonias de *Rhizoctonia cerealis* y *Penicillium chrysogenum* en medios sólidos con glucosa (Olsson, 1994; Robson, *et. al.*, 1987), donde el crecimiento de estos microorganismos generó la acumulación de algunos metabolitos secundarios al centro de la colonia microbiana, lo cual según los autores, ocasionó la reducción de la tasa de crecimiento radial del micelio. Es imposible decir si los resultados en la producción de los metabolitos derivados de *Rhizoctonia cerealis* y *Penicillium chrysogenum* se debe precisamente a la variación de la morfología hifal ocasionada por la agitación, a la acumulación de los metabolitos secundarios o por cambios en el metabolismo celular. Lo cierto es que las reacciones llevadas a cabo dentro de la célula fúngica son responsables, en gran medida, del nivel de productividad obtenido durante el cultivo.

Para tener una mejor entendimiento de los distintos fenómenos involucrados en el crecimiento de los hongos filamentosos, se requiere del desarrollo de modelos que describan tanto los fenómenos que tienen lugar en el fermentador, así como también el metabolismo celular, ya que ambos permitirían entender y explicar el comportamiento morfológico de cada microorganismo ante variaciones en diversos

parámetros del sistema, de modo que se pueda definir la manera en que el crecimiento y la producción de metabolitos se modifican, ya sea por la acción de agentes inhibitorios del metabolismo producidos durante el mismo, que tienen algún efecto sobre una ruta del metabolismo en particular o por la deficiencia de algún nutriente que influya sobre el funcionamiento de otras rutas del metabolismo, de las cuales se derive la producción de biomasa o la generación de algunos productos.

1.3. El metabolismo de *Aspergillus niger*.

Actualmente, las mejoras en el estudio de *A. niger* han sido dirigidas al entendimiento de su metabolismo, con el fin de poder manipular la biología molecular del microorganismo y redireccionar de manera efectiva los flujos metabólicos hasta la obtención del producto deseado. Desde 1930, han sido propuestas varias teorías por medio de las cuales se pretende dar explicación a la forma en que se lleva a cabo la acumulación de los diferentes metabolitos en *A. niger*, como por ejemplo la acumulación de ácido cítrico que, solo se lleva a cabo si éste crece en un medio con una alta concentración de fuente de carbono (ej. sacarosa) y niveles adecuados de otros nutrientes (ej. nitrógeno, fosfato y algunos metales) (Álvarez-Vázquez, *et. al.*, 2000).

La ruta bioquímica que da lugar a la sobreproducción de ácido cítrico fue descubierta hace más de 50 años. Según Torres y Voit (2002), la biosíntesis del ácido cítrico se debe a un conjunto de diversos eventos bioquímicos que se resume en los siguientes cinco procesos metabólicos, y que juegan los principales roles en la producción de ácido cítrico (Figura 1): (1) la glicólisis, durante la cual se lleva a cabo el rompimiento de las hexosas a piruvato (PYR) y acetyl-CoA; (2) la formación de oxaloacetato (OA) a partir de PYR y CO₂; (3) el TCA, donde se produce el ácido cítrico; (4) el proceso de transporte a través de las membranas plasmáticas y citoplasmáticas; y (5) el consumo de oxígeno. Karaffa y Kubicek (2003) por su parte observaron que cuando el rendimiento de ácido cítrico excede a 66%, el CO₂ liberado en la reacción de la piruvato deshidrogenasa, no se pierde,

ya que el CO₂ liberado en la conversión del PYR a Acetil Coenzima A, se recupera al fijarse en la síntesis de oxalato, ambos precursores del ácido cítrico.

1.3.1 La glicólisis en el metabolismo de *Aspergillus niger*.

La glicólisis es una secuencia en el metabolismo en la que los azúcares son convertidos a moléculas empleadas en la biosíntesis. Las principales rutas metabólicas que se llevan a cabo en la glicólisis son las rutas: Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), la de las pentosas fosfato (PF) y de Entner-Doudoroff (ED) (Leninger, 1982). Los hongos filamentosos son en su mayoría microorganismos aeróbicos por lo que emplean las rutas EMP y PF para el rompimiento de los carbohidratos. La ruta EMP es usada para la conversión de las hexosas a piruvato y para la obtención de moléculas empleadas en la síntesis de polímeros derivados de las hexosas (Smith y Berry, 1978; Gottschalk, 1979).

El papel principal de la ruta PF es la obtención de NADPH que es empleado en las reacciones de biosíntesis. Un estudio teórico y experimental de los flujos metabólicos de *Aspergillus oryzae* demostró que no incluir los balances de NADH/NADPH de la ruta PF en el análisis de los flujos metabólicos, puede generar estimaciones erróneas de las distribuciones de los flujos intracelulares (Schmid y Harold, 1998).

En la ruta PF, la glucosa-6 fosfato (G6P) es oxidada a gluconato-6 fosfato (Gu6P) para después ser convertida a ribulosa-5 fosfato (Ru5P) y CO₂. En estas reacciones, se consume 1 mol de G6P para sintetizar 1 mol de NADPH. La Ru5P obtenida es convertida de forma no oxidativa a xilulosa-5 fosfato (Xu5P) o ribosa-5 fosfato (R5P), las cuales son precursores en la biosíntesis de macromoléculas, como aminoácidos o nucleótidos. La R5P formada puede convertirse a fructosa-6 fosfato (F6P) y gliceraldehído-3 fosfato (GA3P) y reintegrarse a la ruta EMP (Alvarez-Vázquez, *et. al.*, 2000; Papagianni, 2007; Gheshlaghi, *et. al.*, 2007).

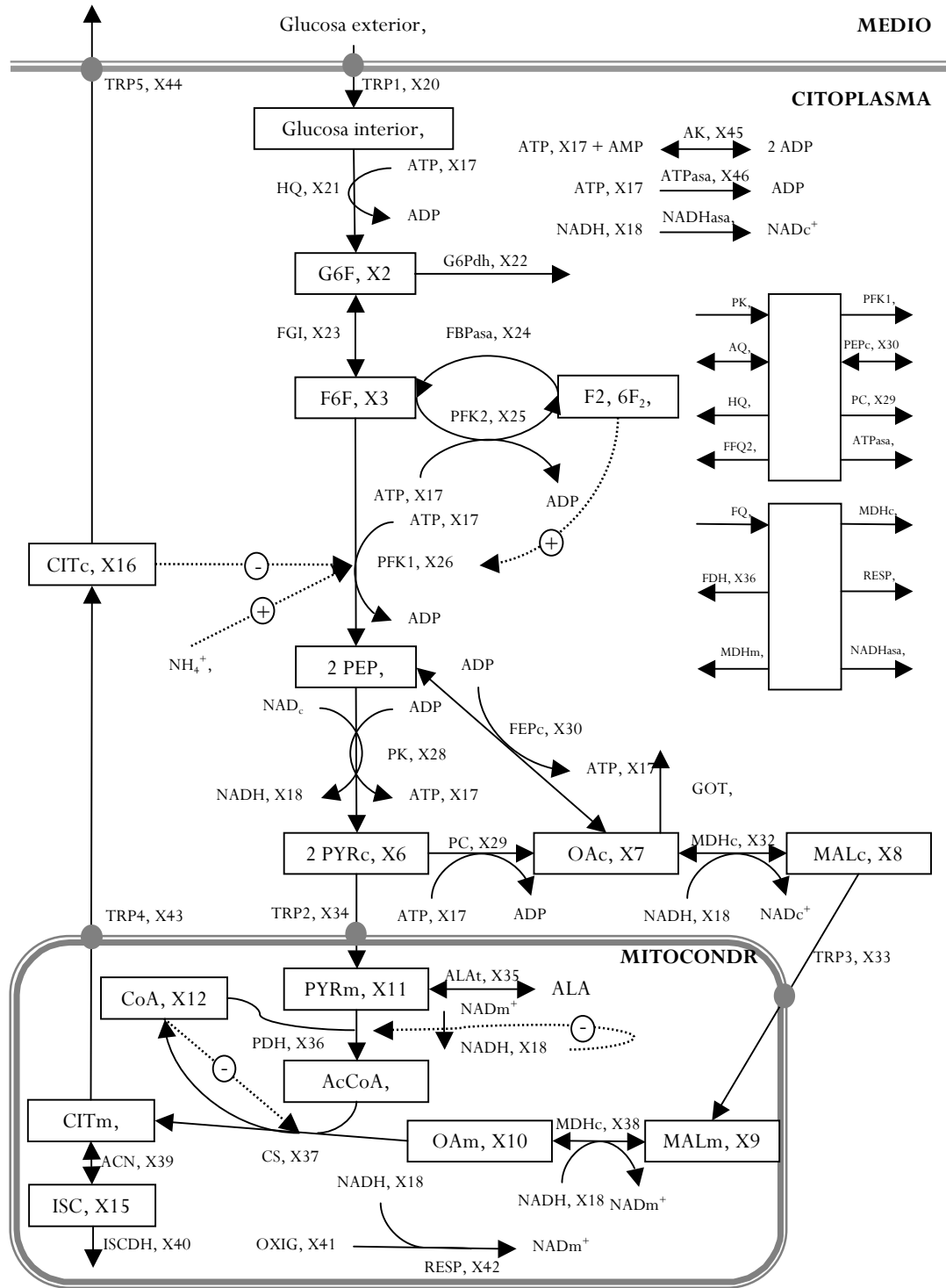


Figura 1. Rutas metabólicas que se involucran en la síntesis de ácido cítrico por *Aspergillus niger*.

1.3.2 El metabolismo del piruvato y la anaplerosis del TCA.

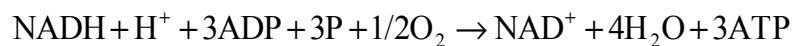
En la mayoría de los microorganismos aerobios, incluyendo los hongos filamentosos, el piruvato obtenido de la glicólisis sufre una descarboxilación oxidativa a Acetil Coenzima A (AcCoA) por acción del complejo piruvato deshidrogenasa. La acción combinada de este complejo de enzimas y las enzimas de la ruta EMP permite la degradación de la glucosa a CO_2 y a AcCoA, proporcionando 2 moles de ATP por cada mol de glucosa (Gottschalk, 1979). La AcCoA formada en este paso se transporta al TCA donde en combinación con oxaloacetato lleva a cabo la formación de ácido cítrico, esto se lleva a cabo por la acción de enzimas como la aconitasa y las isocitrato deshidrogenasas. En *A. niger* existen tres diferentes isocitrato deshidrogenasas, estas enzimas se enlazan a NADP^+ y a NAD^+ formando las isocitrato deshidrogenasas dependientes. Las enzimas dependientes de NADP^+ y NAD^+ solo existen en la mitocondria y su regulación depende del paso de isocitrato a α -cetoglutarato y de su intermediario el oxalosuccinato, lo cual requiere de la presencia de los iones metálicos Mg^{2+} y Mn^{2+} . Estos metales tienen la función de activar ciertos sitios de esta enzima y estabilizar la reacción de producción de oxalosuccinato; variaciones en las concentraciones de estos iones tienen efectos inhibitorios en la enzima dependiente de NADP^+ y benefician la acumulación de ácido cítrico (Gupta y Sharma, 2002; Papagianni, 2007).

Algunos estudios establecen que la acumulación de ácido cítrico se debe a un proceso que tiene lugar fuera del TCA, es decir fuera de la mitocondria, en competencia con la descarboxilación oxidativa del piruvato a oxaloacetato (Smith y Berry, 1978). Este paso se considera crítico en la sobreproducción del ácido cítrico por la acción de la piruvato carboxilasa (PC) en la fijación del dióxido de carbono, ya que esta enzima requiere para su acción de un ion monovalente, normalmente K^+ así como de un ion divalente, como Mn^{2+} o Mg^{2+} (Martinelli y Kinghorn, 1994). Esta reacción enzimática se conoce como metabolismo anaplerótico. En los hongos filamentosos la anaplerosis ocurre en las reacciones de fijación del CO_2 que sucede durante la producción de oxaloacetato, a partir del piruvato o del

fosfoenolpiruvato (PEP), por acción de la PC y la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) respectivamente (Smith y Berry, 1978).

1.3.3 La respiración y la fosforilación oxidativa.

La respiración celular es un proceso del metabolismo en el que la energía contenida en distintas biomoléculas, es liberada de manera controlada. En la respiración se hace uso del O₂ como último aceptor de los electrones desprendidos de las sustancias orgánicas. El oxígeno atraviesa sin obstáculos las membranas biológicas hasta el interior de la mitocondria, donde se une a electrones y protones formando agua, proveyendo la energía necesaria para la fosforilación del ATP. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo gracias a un conjunto de enzimas complejas, ubicadas en la membrana interna de la mitocondria. El NADH (+H⁺), molécula donadora de electrones que "fue reoxidada" durante el TCA, se utiliza en un mecanismo en el que se permite a los protones pasar la membrana mitocondrial para generar la energía necesaria para la producción del ATP. Cada molécula de NADH contribuye a generar la fuerza motriz de un protón que produce (teóricamente) 3 moléculas de ATP. La ecuación global de la fosforilación en la cadena respiratoria puede escribirse como sigue:



A pesar de las diversas investigaciones efectuadas no se ha logrado establecer el mecanismo detallado por el cual la energía de óxido-reducción del transporte electrónico se convierte en la energía del enlace fosfato del ATP (Lehninger, 1982).

Diversos estudios sobre el tema sugieren que la regeneración de ATP, a partir de ADP, es una de las mayores funciones del metabolismo. Las concentraciones de estas moléculas en la célula están inversamente relacionadas, es decir, altas concentraciones de ADP (o de AMP) en la célula corresponden, en términos metabólicos, a bajas concentraciones de ATP (Atkinson, 1965). La inhibición de ATP y estimulación de ADP juegan un papel importante en la regulación de la energía metabólica y en el metabolismo, pues se sabe que las enzimas PFK, isocitrato deshidrogenasa y citrato sintetasa están asociadas con la regeneración

de ATP, de modo que la regeneración de estas enzimas actúa sobre el mantenimiento de las tasas de utilización de sustratos implicados en cada uno de los pasos a dichas enzimas, y a su vez colabora en la regeneración de ATP (Atkinson, 1965).

Otros estudios establecen que al tener altas concentraciones de ATP, la concentración de AMP es baja y la enzima isocitrato deshidrogenasa, asociada a su producción, también se encuentra en bajos niveles; en este caso las subsiguientes reacciones del TCA son afectadas, dando como resultado un exceso en la concentración de citrato y disminución de isocitrato (Karaffa y Kubicek, 2003). Esto corrobora el hecho de que en la acumulación de ácido cítrico por *A. niger*, algunos estudios establecen que este proceso requiere de 1 mol de ATP y de 3 moles de NADH, lo que da lugar a la generación de NADH re-oxidado sin la formación de ATP por una cadena respiratoria alterna (Alvarez-Vazquez, *et. al.*, 2000; Papagianni 2007).

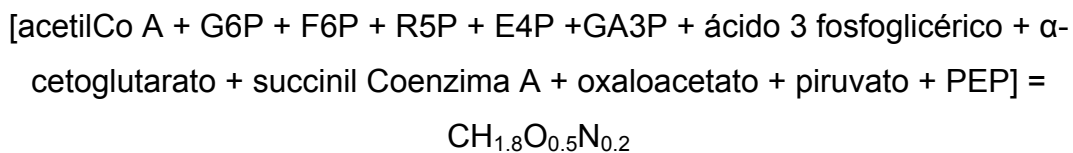
1.3.4 La biosíntesis en el metabolismo de *Aspergillus niger*.

Paralelamente a la síntesis de diversos ácidos orgánicos, los hongos filamentosos llevan a cabo la producción de la masa celular para su crecimiento y desarrollo hifal. Henriksen y colaboradores (1996) establecen la composición de biomasa de un hongo filamentoso, *Penicillium crysogenum*. La composición atómica de la biomasa microbiana es notablemente constante, las mayores variaciones se deben a cambios en las condiciones de cultivo, mas que a diferencias entre las diversas especies. En los hongos filamentosos la quitina se presenta como un componente de la biomasa. La quitina, es un componente importante en la estructura micelia (Gooday, 1995).

Tabla 1 Composición de la biomasa de *Penicillium crysogenum* (Henrikensen, *et. al.*, 1996).

Componentes de la biomasa	Fuente de nitrógeno:	
	NH ₄ ⁺ , % peso	NO ₃ ⁻ , % peso
Cenizas	9.8	10.5
Quitina	7.7	9.0
DNA	0.9	0.9
RNA	5.2	4.1
Glicerol	0.6	0.2
Carbohidratos	25.3	26.8
Lípidos	6.8	7.3
Manitol	3.7	9.2
Proteínas	40.0	32.0
Rendimiento a biomasa (g _{PS} /g _{glucosa})	0.47	0.40

Análisis de diversas células microbianas han demostrado que más del 95% del material celular, consiste de macromoléculas como: proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos. La composición atómica promedio de la biomasa puede ser escrita como: CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} (Nielsen, *et. al.*, 2003). Se ha encontrado que doce compuestos son los comúnmente empleados para sintetizar todas las moléculas de la célula microbiana. Estos compuestos son: la acetilCoA, las hexosas, pentosas, trealosas y triosas fosfatadas (G6P, F6P, R5P, eritrosa-4-fosfato (E4P), GA3P, ácido 3 fosfoglicérico), el α-cetoglutarato, la succinil Coenzima A, el oxaloacetato, el piruvato y el PEP. La descripción de las rutas catabólicas anteriormente descritas señala cómo éstas desembocan en la síntesis de la mayoría de estos precursores del crecimiento. De una manera simplificada se puede decir que:



La serie de eventos que describen el metabolismo de producción de ácido cítrico por *A. niger* es compleja, ya que se requieren de diversos pasos considerando la formación de productos intermedios, además de la generación y consumo de energía, para la conversión final de los sustratos a productos deseados.

Actualmente es posible la modificación directa de los microorganismos por medio de técnicas de recombinación del ADN, las cuales son capaces de bloquear una ruta del metabolismo. Sin embargo, para lograr esto, el problema es la localización específica y el nivel de modificación enzimática en la ruta metabólica. *A. niger* presenta algunas limitaciones en el desarrollo de cepas mejoradas para la producción de proteínas y/o enzimas activas que aumentan la producción de ácido cítrico (Karaffa y Kubicek, 2003). Por lo que, otra aproximación con la cual se puede ganar conocimiento importante hacia la mejora de los procesos de producción, es el desarrollo de modelos metabólicos para este microorganismo, ya que el análisis de los flujos metabólicos puede proporcionar información importante, como rendimientos máximos de producción en presencia de un sustrato, reconocimiento de cuellos de botella en la sobreproducción de compuestos deseados y la identificación de parámetros energéticos. El análisis de flujos metabólicos está basado en la estequiometría de la red y la conservación de masa y no requiere información con respecto a la cinética enzimática (Gheshlaghi, et al. 2007).

1.3.5 El metabolismo y el desarrollo de modelos matemáticos.

A menudo los esquemas metabólicos son complicados (Figura 1), ya que se requieren de diversos caminos y la producción de productos intermedios para la conversión final de los sustratos a productos deseados, por esto las técnicas biológicas se deben complementar con las estrategias matemáticas del análisis de los sistemas que pueden establecer claramente los pasos más relevantes para la obtención del producto objetivo. Una alternativa al uso de las rutas complejas es el presentado por Verhoff y Spradlin (1976). En esta variación a la ruta de producción de ácido cítrico, se consideran los eventos mas representativos de su producción por *Asperillus niger* (Figura 2), obteniendo un esquema reducido y, que según un análisis de los balances de materia y energía, tiene una mayor probabilidad de ocurrencia.

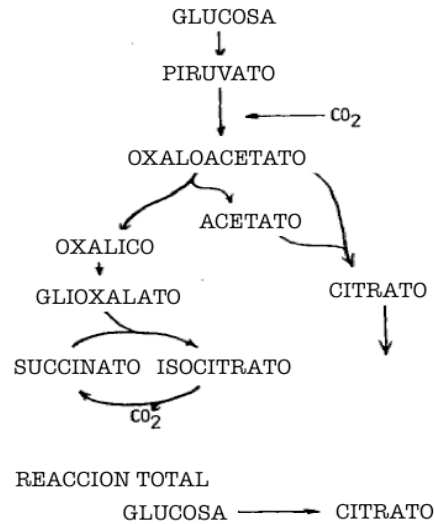


Figura 2. Síntesis de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, esquema simplificado de reacción descrito por Verhoff y Spradlin, 1976.

Como parte de la optimización de los procesos de producción de metabolitos de interés se han desarrollado diversos modelos matemáticos con los que se pretende describir el comportamiento del crecimiento de los hongos filamentosos. Algunos de estos modelos emplean expresiones empíricas de tipo logística, exponencial o de Monod, que describen el crecimiento global de biomasa, efectos inhibitorios en el crecimiento, o la evolución temporal de las poblaciones microbianas bajo determinadas condiciones ambientales, por medio de la estimación de tasas específicas de crecimiento con base en mediciones del peso seco de la biomasa total, o del incremento total en la longitud hifal, o del promedio del número de hifas.

Otros modelos, sin embargo, se basan en la ingeniería de las rutas metabólicas para dar las primeras deliberaciones en la optimización en la producción de ácido cítrico por *A. niger*. Pero debido a que los esquemas metabólicos son complicados, las técnicas biológicas se deben complementar con las estrategias matemáticas de análisis de los sistemas que pueden establecer claramente los pasos más relevantes para la obtención del producto objetivo.

Hay algunos aspectos metabólicos por estudiar, ya que no se cuenta con el conocimiento detallado de la mayoría de las enzimas, características cinéticas, y flujos de metabolitos que juegan un papel clave en el proceso de acumulación. Como consecuencia de esto en la actualidad los esfuerzos de investigación se han dedicado a desentrañar los principales rasgos del metabolismo de *A. niger* con el fin de manipular su biología molecular, y redireccionar de manera efectiva los flujos metabólicos. Se han desarrollado técnicas analíticas que permiten descubrir las funciones genéticas, bioquímicas y moleculares de la célula, además de que permiten la cuantificación de los procesos moleculares con lo que se puede describir el metabolismo. Por ejemplo se ha construido un red metabólica de *A. niger* que abarca 284 metabolitos y 335 reacciones; o la red de reacciones enzimáticas publicada por Andersen y colaboradores (2008) que se encuentra constituida por 1190 reacciones y 1045 metabolitos distribuidos en tres compartimentos: extracelular, citoplasmático y mitocondrial de *A. niger*.

Como se puede observar, el análisis del crecimiento de los hongos filamentosos, y en especial del *A. niger*, es un tema de investigación actual y a pesar de los esfuerzos aún existen rasgos sin entender, tales como los efectos de la fisiología del microorganismo y las condiciones de cultivo en la productividad y crecimiento de estos microorganismos.

Capítulo 2. La Hipótesis y la Justificación del Trabajo

2.1 La Hipótesis.

Es posible manipular el metabolismo de *Aspergillus niger*, crecido sobre una superficie sólida mediante cambios controlados en: la naturaleza de los sustratos, y parámetros físicos, como, la temperatura, las barreras físicas para la expansión del micelio en el sustrato y el área específica del soporte sólido. Siendo el Cociente Respiratorio (CR) la principal variable de respuesta ya que es un indicador indirecto de la orientación del metabolismo que es fácil de medir en línea, usando una caja de Petri como unidad experimental.

2.2 La Justificación

La manipulación del metabolismo de *Aspergillus niger* es una variable muy estudiada, debido a que éste es un organismo ampliamente utilizado para la producción de más de un millón de toneladas anuales de ácido cítrico que, a su vez, es un ingrediente importante para la elaboración de alimentos y bebidas. Aún cuando hay estudios muy antiguos de la producción de ácido cítrico sobre superficies líquidas o sólidas, se carece de un análisis sistemático de las variables de diseño del proceso y de su impacto en la orientación del metabolismo de este organismo. El CR es un índice de fácil instrumentación y de monitoreo en línea, usando las técnicas disponibles de respirometría y, apoyado en otras mediciones químicas y físicas, permite establecer los métodos de control de proceso de este tipo de fermentaciones.

El uso de las fermentaciones sobre superficies sólidas puede ser útil porque sería un modelo inicial para considerar nuevos reactores de sustratos sólidos, ya sea empacados en capas someras o en sistemas agitados. Pero para la optimización de estos sistemas se necesita tener información básica sobre el impacto de las variables de diseño sobre el metabolismo microbiano.

En este sentido este es un estudio preliminar que permitirá el uso de un sencillo sistema experimental, consistente en una caja Petri modificada y medidores en línea de oxígeno y dióxido de carbono.

Capítulo 3. Los Objetivos del Trabajo

3.1 El objetivo general.

El objetivo general de este proyecto de investigación es determinar, con base en el estudio y análisis de las distintas vías del metabolismo, el efecto sobre la producción de biomasa y cociente respiratorio de *Aspergillus niger*, creciendo sobre una superficie sólida, de algunos cambios controlados en el medio de cultivo y los parámetros físicos del sistema.

3.2 Los objetivos particulares.

- Desarrollar un sistema experimental que permita el análisis del comportamiento del *Aspergillus niger* durante su crecimiento en un cultivo superficial y la evaluación del efecto de cambios en el mismo.
- Evaluar y establecer el efecto de perturbaciones controladas al medio de cultivo y sistema experimental sobre el crecimiento de *Aspergillus niger* y cambios en el cociente respiratorio.
 - Establecer el efecto de la concentración de la fuente de carbono.
 - Establecer el efecto de añadir una segunda fuente de carbono.
 - Establecer el efecto del uso de algunos metabolitos que el microorganismo excreta como fuente de carbono.
 - Establecer el efecto de la variación en la concentración de iones.
 - Establecer el efecto de la variación en parámetros ambientales, tales como, la temperatura del sistema, el volumen del medio y el uso de membranas permeables.

Capítulo 4. Los Materiales y Métodos.

El trabajo experimental de este proyecto consistió: en la evaluación de los efectos de perturbaciones en la naturaleza del medio, como son: el efecto de la variación de la concentración de la fuente de carbono (glucosa), el efecto del uso de una segunda fuente de carbono (glicerol, ácido oxálico y ácido cítrico), el efecto de la utilización de metabolitos primarios como fuente de carbono (glicerol, ácido cítrico y oxálico), el efecto de la variación en la cantidad añadida de sales de manganeso y en la evaluación de los efectos de cambios físicos en el sistema, como son: el cambio en el volumen del medio, la temperatura del sistema y el uso de membranas permeables. La mayoría de los experimentos realizados se llevaron a cabo empleando un sistema experimental que consiste en una caja Petri modificada en la que se midieron, en línea, las emisiones de CO₂ y consumo de O₂; de forma tal que, se monitorearon los cambios durante el crecimiento del cociente respiratorio. Además en algunos de los experimentos se llevó a cabo el seguimiento del peso seco de biomasa en caja Petri convencional.

4.1 El microorganismo de estudio.

En este trabajo se emplea *Aspergillus niger* A10 como microorganismo modelo, de la colección fúngica de la UAM-Iztapalapa, con la finalidad de estudiar el efecto de diferentes medios de cultivo en el crecimiento.

4.2 La conservación de la cepa.

La conservación de la cepa se lleva a cabo haciendo crecer hasta la esporulación un cultivo monospórico de la cepa de *A. niger* A10 en un medio sólido Papa-Dextrosa-Agar (PDA) a temperatura controlada de 30°C. Al cabo de cinco días de crecimiento se cosechan las esporas de la superficie de la colonia, con un agitador magnético y solución Tween 0.01% (v/v). De la suspensión obtenida se toma un volumen de la suspensión de esporas (100 µL) que es añadida a recipientes con medio PDA para el crecimiento del microorganismo. Una vez esporulado el hongo, se añade, glicerol estéril a los recipientes que contienen las esporas, con la

finalidad de mantenerlas humectadas. Los recipientes se conservan en refrigeración (entre 5 y 10°C), éstos tienen una viabilidad de la cepa de un año.

4.3 La preparación del inóculo.

Se deposita un volumen de la suspensión de esporas (100 µL) en la superficie de un medio PDA. De aquí se obtiene un cultivo que, después de 5 días de incubación a 30°C, ha esporulado. Las esporas se recolectan con un asa de siembra y se almacenan en una solución Tween 0.01% (v/v). La concentración de esporas se mide utilizando una cámara Neubauer.

4.4 El medio de cultivo para experimentación.

El medio de cultivo utilizado durante los experimentos consiste en una solución con: 25 g/L de glucosa, 2.45 g/L (NH₄)₂SO₄, 1.25 g/L, KH₂PO₄, 1.5 g/L MgSO₄•7H₂O, 0.25 g/L extracto de levadura, 5.0 ml/L solución de oligoelementos: 2.5 g/L FeSO₄•7H₂O, 11.0 g/L ZnSO₄•7H₂O, 0.8 g/L CuSO₄•5H₂O, 2.15 g/L MnSO₄•H₂O, 5.5 g/L H₃BO₃, 0.55 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄•4H₂O, 25 g/L NaEDTA, 0.80 g/L CoCl₂•5H₂O. El medio se esteriliza durante 20 minutos a 121°C. En la preparación del medio de cultivo se agrega sulfato de amonio, suficiente para obtener una relación C/N de 12. Con la solución de oligoelementos se agrega una concentración de elementos traza de forma tal que no haya limitaciones debido a estos componentes durante el crecimiento del hongo. Para los experimentos usando una membrana permeable de celofán (250 g/L) y diferentes concentraciones de glucosa (25, 50, 100, 150 y 250 g/L), la proporción de los demás componentes varía dependiendo su relación con la glucosa.

4.5 El sistema experimental.

Para llevar a cabo la evaluación de los cambios en la producción de CO₂ y consumo de O₂ durante el crecimiento de *A. niger* A10 se diseñó y construyó un reactor circular de vidrio de 12.5 cm de diámetro y 5 cm de profundidad, basado en una caja Petri convencional (Figura 3). La tapa de la caja Petri modificada (CPM) se encuentra acondicionada de forma tal que permite la instrumentación con los electrodos de monitoreo de CO₂ y O₂; además tiene con un orificio

adicional en el que se tiene un flujo de aire de 21.25 $\mu\text{L/h}$ y permite la salida de los gases producidos durante el crecimiento, además de la instrumentación de un termopar para el seguimiento de la temperatura en el sistema de experimentación. A esta CPM se añadieron 250 mL de medio sólido de aproximadamente 2 cm de profundidad.



Figura 3. Caja Petri Modificada.

El crecimiento de biomasa se llevó a cabo haciendo crecer *A. niger* A10 en cajas Petri convencionales, de 9 y 15 cm de diámetro con aproximadamente 35 y 75 ml de medio de cultivo sólido respectivamente, de aproximadamente 6 mm de profundidad.

4.6 El inóculo.

Para el inóculo de las cajas Petri modificada y convencional, se utilizan esporas recién cosechadas que se depositan con una punta de pipeta en un volumen bajo de la suspensión (aproximadamente 20 μL , 1×10^4 esporas) en el centro de la caja, cuidando de no dispersar la gota. Con este inóculo se obtiene una colonia circular por caja.

4.7 La cuantificación del peso seco.

Se inoculó la misma concentración de esporas en 15 cajas con medio de cultivo, con la finalidad de realizar la remoción del micelio de la superficie del soporte sólido a diferentes tiempos, y así, evaluar la evolución del crecimiento variando las condiciones del medio de cultivo. Con la finalidad de obtener una colonia circular el microorganismo se inocula en el centro del medio, dejándolo crecer a una temperatura constante de 30°C hasta por 5 días. Una vez que el hongo ha crecido sobre el soporte sólido separado por una lámina de papel celofán previamente tratada y pesada, el micelio que crece sobre el celofán se separa del agar con unas pinzas de disección. La lámina con biomasa se seca en una estufa a 40°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 obtiene de la diferencia del peso seco de la lámina de celofán antes y después del crecimiento del micelio. El resultado se reporta en gramos de peso seco por cm² de superficie.

4.8 Los ensayos analíticos.

Se lleva a cabo el seguimiento de la producción de CO₂ y consumo de oxígeno durante el crecimiento de *A. niger* A10, para lo que se utilizan sensores de gases de CO₂ y O₂ Vernier. El sensor de gas de CO₂ Vernier mide los niveles de dióxido de carbono gaseoso 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 gas O₂ Vernier mide la concentración de oxígeno en el intervalo de 0 a 27% 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. La colección de los datos en línea se llevó a cabo usando la interfase LabPro y el software LoggerPro de Vernier.

Capítulo 5. Los Modelos Matemáticos.

Si bien se han desarrollado modelos estructurados desde muy sencillos para describir el crecimiento de una hifa promedio y la producción de biomasa (López Isunza y col, 1997) hasta muy detallados que describen, por ejemplo, la respuesta transitoria de la ruta de la pentosa-fosfato *in vivo* por cambios en la concentración de glucosa en el líquido externo de un cultivo sumergido con *S. cerevisiae* (Rizzi, 1997; Vaseghi, 1999), éstos realmente no tienen ninguna capacidad predictiva para describir el metabolismo de *A. niger* durante su crecimiento. Por lo anterior, en este trabajo de tesis se utilizan dos modelos que sirven como herramienta para el análisis cualitativo del metabolismo de *A niger* crecido sobre una placa de agar.

5.1 El modelo global de crecimiento radial de *Aspergillus niger* en crecimiento superficial.

Este modelo predice el crecimiento radial de una colonia de hongo de *Aspergillus niger* (Figura 4). El modelo considera que el microorganismo crece superficialmente sobre un medio poroso (agar) enriquecido con glucosa. El transporte de los nutrientes en el medio sólido de los nutrientes al microorganismo se da por difusión. Los nutrientes que son transportados a la superficie del medio sólido que esta en contacto con el micelio en crecimiento, una vez ahí se transporta por difusión a través de los intersticios del micelio. La reacción de los nutrientes para generar el crecimiento se lleva a cabo en el micelio y en la frontera del micelio que se encuentra en movimiento.

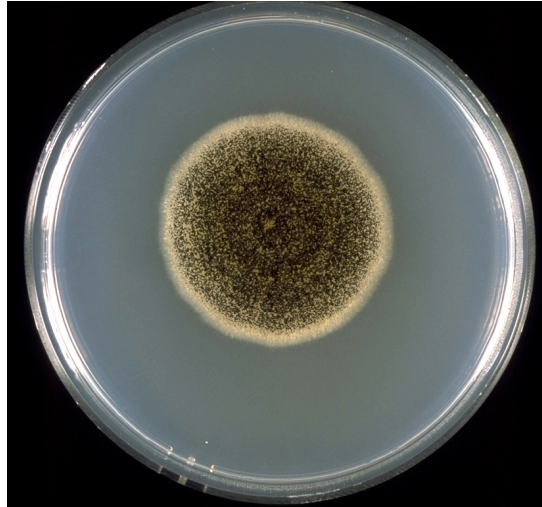


Figura 4. Colonia de *Aspergillus niger* que crece sobre agar.

5.1.1 Las ecuaciones del modelo.

El balance de materia en el agar

Ecuación 1
$$\frac{\partial C_A}{\partial t} = D_{efA} \left(\frac{\partial^2 C_A}{\partial z_A^2} + \frac{1}{r_A} \frac{\partial C_A}{\partial r_A} + \frac{\partial^2 C_A}{\partial r_A^2} \right)$$

La condición inicial

$$t = 0 \quad C_A = C_{A_0}$$

Las condiciones de frontera

$$z_A = 0 \quad \frac{\partial C_A}{\partial z_A} = 0$$

$$z_A = E_A \quad -D_{efA} \frac{\partial C_A}{\partial z_A} = -D_{efM} \frac{\partial C_M}{\partial z_M}$$

$$r_A = 0 \quad \frac{\partial C_A}{\partial r_A} = 0$$

$$r_A = R_A \quad \frac{\partial C_A}{\partial r_A} = 0$$

El balance de materia en el micelio

Ecuación 2
$$\frac{\partial C_M}{\partial t} = D_{efM} \left(\frac{\partial^2 C_M}{\partial z_M^2} + \frac{1}{r_M} \frac{\partial C_M}{\partial r_M} + \frac{\partial^2 C_M}{\partial r_M^2} \right) + \frac{R_X}{Y_{XS}}$$

La condición inicial

$$t = 0 \quad C_M = 0$$

Las condiciones de frontera

$$\begin{aligned}
 z_M = 0 & \quad C_M = C_A \\
 z_M = E_M & \quad \frac{\partial C_M}{\partial z_M} = 0 \\
 r_M = 0 & \quad \frac{\partial C_M}{\partial r_M} = 0 \\
 r_M = l_M(t) & \quad -D_{ef_M} \frac{\partial C_M}{\partial r_M} = l_M \frac{R_X}{Y_{XS}}
 \end{aligned}$$

La reacción de crecimiento de biomasa

Ecuación 3
$$R_X = \frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{X}{X_{MAX}} \right) \left(\frac{C_M}{K_S + C_M} \right)$$

Y el crecimiento de la longitud del micelio tiene la siguiente ecuación $r_M \frac{dl_M}{dt} = \frac{R_A^2}{l_M^2} R_X$

La variable r_A es móvil de modo que se emplea el concepto de frontera móvil para resolver el sistema.

$$\left. \frac{\partial C_M}{\partial t} \right|_{r_M} = \left. \frac{\partial C_M}{\partial t} \right|_l + \frac{\partial C_M}{\partial l} \frac{dl}{dt} \text{ y } \frac{d}{dt} \left(\frac{r_M}{l_M} \right) = \frac{l_M \frac{dr_M}{dt} - r_M \frac{dl_M}{dt}}{l_M^2} = -\frac{r_M}{l_m^2} \frac{dl_m}{dt} = -\frac{l}{l_M} \frac{dl_M}{dt}$$

5.1.2 La solución numérica del modelo.

El modelo fue discretizado espacialmente por el método de diferencias finitas centrales, junto con sus condiciones de frontera. El sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias y sus condiciones de tipo algebraicas no lineales, fue integrado numéricamente con el método de Runge-Kutta F., usando los valores de la Tabla 2 y parámetros reportados en la literatura.

Tabla 2. Los datos experimentales usados en la solución numérica del modelo.

Experimento	X_0 mg/cm ²	X_{MAX} mg/cm ²	C_{A0} mg/cm ²	Y_{xs}	μ_{max} 1/h
1	0.055	5.42	39.76	0.14	0.074
2	0.063	15.91	79.56	0.20	0.092
3	0.071	24.15	159.04	0.15	0.084
4	0.009	29.01	238.56	0.12	0.114
5	0.047	34.25	318.09	0.11	0.094
6	0.017	30.41	397.61	0.18	0.115

$$D_{ef_A} [=] 5.4 \times 10^{-3} \frac{cm^2}{h} \quad R_A [=] 4.5 cm_A \quad D_{ef_M} [=] 5.4 \times 10^{-3} \frac{cm^2}{h} \quad E_M [=] 0.3 cm_M \quad E_A [=] 0.6 cm_A$$

$$l_{M_0} [=] 0.5 cm \quad K_S [=] 3.98 \frac{mg_G}{cm_S^2}$$

5.2 El modelo estructurado del metabolismo de *Aspergillus niger* crecido en agar.

Este modelo considera a una pequeña parte de la red metabólica (Anderson, 2008), que conecta a la glicólisis (EMP), al ciclo de los ácidos tricarbónicos (CAT), a la ruta de las pentosas-fosfato (PF) y, de forma muy reducida, describe la producción de biomasa por diversas rutas. Esta red agrupa al gran número de reacciones enzimáticas en solo 82 reacciones, considerando sin embargo la participación de los cofactores (ATP, NAD⁺, NADPH, etc), como se muestra en la Figura 5. El valor de las constantes de velocidad de reacción y de equilibrio de estas reacciones se encontró por ensayo y error usando diversos órdenes de magnitud para cada una de las rutas de la red metabólica. Se consideran 48 especies, 19 cofactores y 2 especies gaseosas.

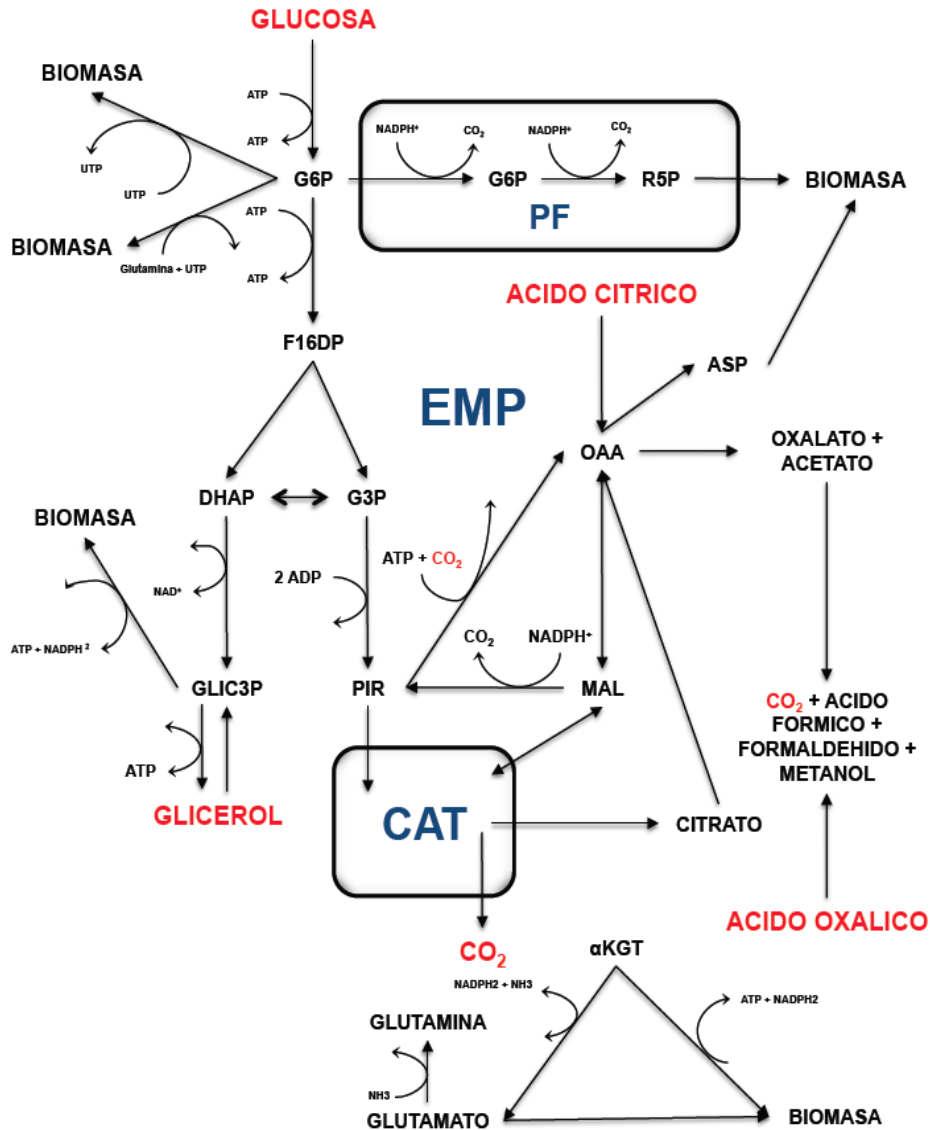


Figura 5. La red metabólica simplificada en la que se basa el modelo estructurado de *Aspergillus niger*. Esta incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs (CAT), a la ruta de las pentosas fosfato (PF), a la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glicolisis y a las reacciones que producen biomasa.

5.2.1 Las ecuaciones del modelo.

El modelo del sistema formado por la caja Petri modificada, considera las fases sólida y gaseosa, que están en contacto con un micelio que crece sobre la superficie sólida, al cual se transportan por difusión los diversos nutrientes y la glucosa del medio sólido, y el O_2 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 glucosa ocurre a través de la pared celular y se da por un proceso difusivo debido a la existencia de un gradiente entre el exterior y la parte interna de la membrana, de acuerdo con la permeabilidad de esta pared. El micelio crece de forma homogénea como una serie de N_h tubos hifales de igual longitud $L_h(t)$ y diámetro promedio d_h que permanece constante (Larralde, 1997), y los procesos difusivos en la caja se dan solo en una dirección.

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

Ecuación 4
$$\frac{\partial C_{n_\Psi}}{\partial t} = D_\Psi \frac{\partial^2 C_{n_\Psi}}{\partial z_\Psi^2}$$

Las condiciones de frontera nos indican que las paredes superior e inferior de la caja Petri son impermeables, y esto corresponde a $z_\Psi = 0$, (Ψ = gas, sólido), por lo que

Ecuación 5
$$\frac{\partial C_{n_\Psi}}{\partial z_\Psi} = 0$$

Se considera que el intercambio de O_2 y CO_2 entre la caja Petri modificada y el aire exterior, debido a la conexión con el pequeño tubo de la parte superior, determina que $C_{n_\Psi} \sim C_{n_0}$, donde C_{n_0} para el O_2 es prácticamente igual a la concentración del oxígeno del aire, y para el CO_2 , $C_{n_0} \sim 0$.

El micelio está en contacto con ambas fases en $z_\Psi = L_\Psi$, 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 la permeabilidad de esta y la diferencia de concentraciones, y está expresada por el flux de masa, como sigue:

Ecuación 6

$$-D_{\psi} \frac{\partial C_{n_{\psi}}}{\partial z_{\psi}} = P_{n_{\psi}} (C_{n_{\psi}} - C_{n_c})$$

Donde D_{ψ} y $P_{n_{\psi}}$ son el coeficiente efectivo de difusión y de permeabilidad del componente n en la fase ψ , respectivamente. Consideramos ahora que el micelio crece radialmente de forma simétrica, y agrupamos 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, $L_h(t)$.

Ecuación 7

$$V_h = \pi L_h^2 d_h \varepsilon_X = N_h \frac{\pi}{4} d_h^2 L_h$$

La cantidad de moles de la especie n producida/consumida en la reacción j , y cuya concentración es C_{n_c} (moles de n/g de biomasa), esta dada por:

Ecuación 8

$$\frac{d}{dt}(\rho_X V_h C_{n_c}) = \rho_X \left[V_h \frac{dC_{n_c}}{dt} + C_{n_c} \frac{dV_h}{dt} \right] = V_h \sum_{j=1}^{NRn} R_{nj}$$

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

Ecuación 9

$$\frac{\partial C_{n_c}}{\partial t} = \frac{1}{\rho_X} \sum_{j=1}^{NRn} R_{nj} - \mu C_{n_c}$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento de la biomasa (Fredrickson, 1976) y esta dada en éste caso por:

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

Ecuación 10

Algunos de los términos de la reacción R_{n_j} para la especie n que participa 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 estas han sido agrupadas en dos reacciones.

$$r_2 = \frac{k_2 [G6P] [ATP] [PFK]}{K_2 + [G6P]}$$

Ecuación 11

La segunda es la reacción de formación de ácido cítrico en la mitochondria

$$r_{11} = k_{11} [Pir] [OAA_m] [ACoA_m] [E_{11}]$$

Ecuación 12

donde $[E_{11}]$ es la expresión que regula a la enzima citrato sintetaza.

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), y se define a como:

Ecuación 13

$$E = \frac{[ATP] + \frac{1}{2}[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Este parámetro se usará más adelante para comparar la carga de energía cuando el micelio crece a diversos niveles de glucosa en el medio sólido, que va de 25 a 250 g/l en el volumen de agar.

En la solución numérica del modelo se utilizó el método de colocación ortogonal (Finlayson, 1972) para discretizar las ecuaciones que describen a la difusión en los medios sólido y gaseoso (4 puntos interiores, con $\alpha = \beta = 0$), y el sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias resultante se resolvió con el método clásico de Runge-Kuta de 4° orden (Collatz, 1966). Los resultados de la solución numérica del modelo tienen por objeto predecir cualitativamente la posible evolución de los diversos cofactores y de algunos metabolitos, durante el crecimiento en el sustrato sólido de acuerdo con el caso experimental considerado.

Las predicciones obtenidas con este modelo son cualitativamente adecuadas, aunque no comparables con los resultados experimentales, la cantidad de biomasa no siempre es del orden de magnitud en cada caso, y las velocidades de crecimiento en la región de crecimiento exponencial son sobrevaloradas por el modelo. Por otro lado, la predicción de la cantidad de CO₂ producido es muy pequeña y está aún lejos de describir lo observado, por lo que es claro que para validar el modelo se requiere de medir los productos excretados al medio sólido, aunque no es tarea fácil. Además es indispensable para estimar algunos de los parámetros cinéticos fundamentales, asociados con las diferentes rutas metabólicas que conforman el modelo.

Capítulo 6. Los Resultados y la Discusión.

En este capítulo se presentan resultados experimentales del crecimiento de *A. niger* A10 sobre un medio sólido de agar enriquecido con diversos nutrientes. Considerando a *A. niger* como un sistema abierto, se estudian de forma cualitativa los cambios en la producción global de biomasa y en el Cociente Respiratorio (CR), cuando se introducen al sistema perturbaciones en el medio de cultivo y variaciones en las condiciones de experimentación, tales como, cambios en la concentración de la fuente de carbono, cambios en la fuente de carbono, uso de metabolitos secundarios en el medio, variación del área específica del medio, entre otros. Las respuestas del microorganismo ante las perturbaciones al sistema se discuten en términos del metabolismo del microorganismo basados en la descripción de las rutas metabólicas y en los resultados del uso de un modelo previamente publicado que permite analizar y apoyar los distintos resultados de crecimiento.

6.1 La evaluación de la evolución de la biomasa global.

En este proyecto de tesis el crecimiento de *A. niger* A10 se llevó a cabo superficialmente sobre una placa de agar con medio nutritivo en caja Petri convencional y modificada, y de forma radial por inoculación por piquete, a una temperatura ambiente o controlada de 28°C.

Para determinar la evolución de la biomasa generada por *A. niger*, se llevaron a cabo experimentos en caja Petri convencional, de 9 y 15 cm de diámetro, inoculando por piquete sobre una membrana de celofán, la cual impide la adhesión del micelio al medio de cultivo. Se realizó un crecimiento control en cajas Petri tradicional y modificada, con un medio de cultivo con concentración de fuente de carbono de 25 g/L de glucosa y una temperatura constante de 28°C, las condiciones fueron elegidas para llevar el crecimiento de *A. niger* A10 sin limitaciones e inhibiciones debidas a la fuente de carbono y otros componentes del

medio de cultivo. La Figura 6 muestra la evolución del peso seco de biomasa producida en este experimento.

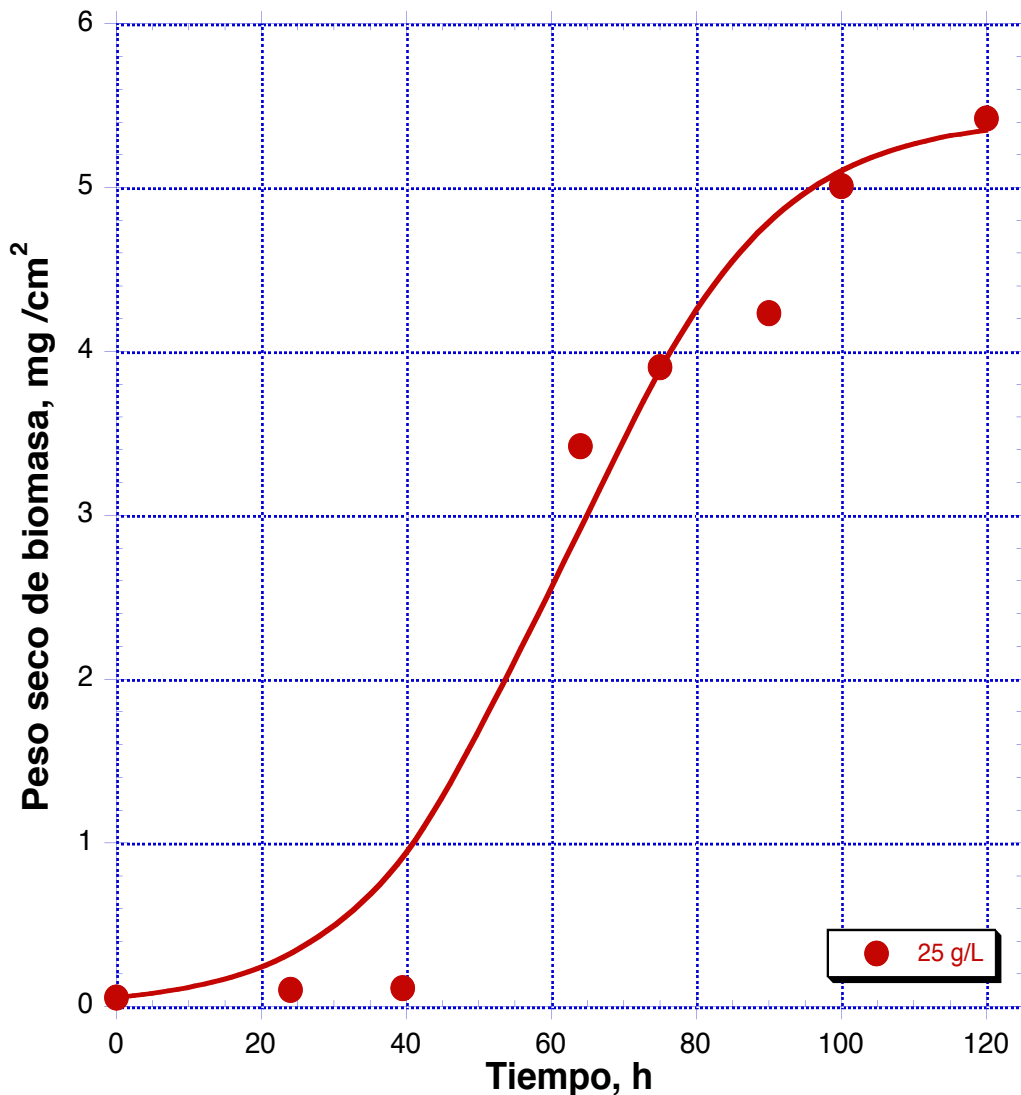


Figura 6. Evolución del peso seco de biomasa de *A. niger* A10 durante el crecimiento superficial en cultivo en caja Petri convencional en experimento control de 25 g/L de glucosa y 28°C.

En términos generales, en estos experimentos observó que la evolución de la biomasa generada presenta cuatro características importantes (Ver Figura 6): (1) crecimiento de tipo sigmoide, (2) una fase “lag” o de adaptación al medio que depende de la concentración inicial y fuente de carbono proporcionada, (3) una fase de crecimiento exponencial y (4) una fase de desaceleración del crecimiento.

6.1.1 Las variaciones en la concentración de la fuente de carbono y su efecto sobre el crecimiento global de biomasa.

Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de la fuente de carbono sobre el crecimiento de *A. niger* A10, se desarrollaron una serie de experimentos en los que se varió la concentración inicial de la fuente de carbono, en este caso glucosa a: 25, 50, 100, 150, 200 y 250 g/L. La Figura 7 presenta el seguimiento de la cantidad de biomasa seca de *A. niger* A10 generada en estos experimentos.

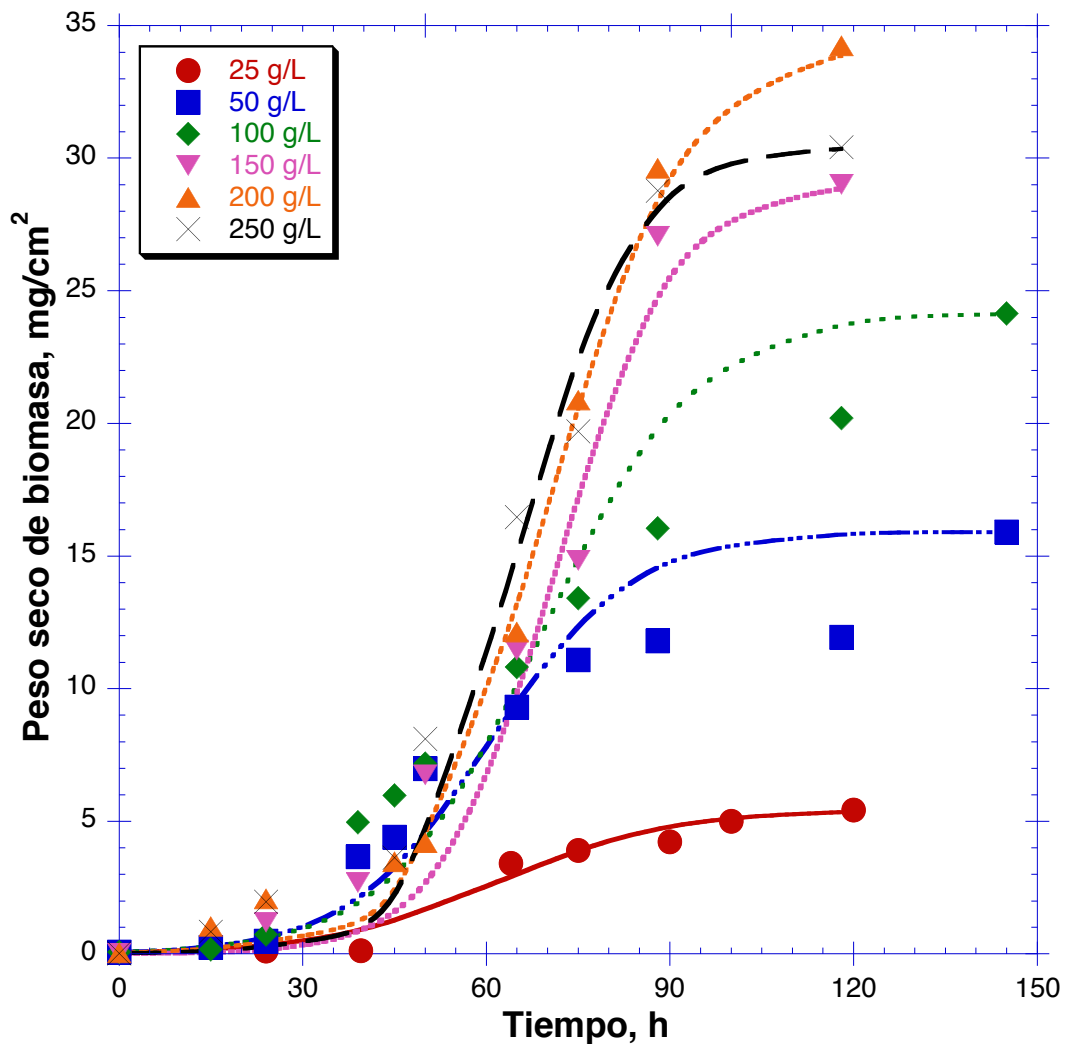


Figura 7. Evolución del peso seco de biomasa durante el crecimiento en caja Petri tradicional de *A. niger* A10 a 25 (●), 50 (■), 100 (◆), 150 (▼), 200 (▽) y 250 (×) g/L de glucosa inicial.

En esta figura se puede observar que la concentración de glucosa inicial en el medio de cultivo tiene un efecto notorio sobre la generación de biomasa, en este rango de concentración se presenta aumento en la densidad máxima de biomasa seca obtenida a medida que se incrementa la cantidad inicial de la fuente de carbono, llegando a un máximo a 200 g/L en la concentración inicial de glucosa. Lo anterior se muestra de forma más clara en la Tabla 3 donde se observa que de la densidad máxima de biomasa obtenida para cada una de los sustratos iniciales es mayor para un sustrato inicial disponible de 318 mg/cm² que corresponde a 200 g/L de glucosa.

Tabla 3. Datos del crecimiento de *Aspergillus niger* en experimentos a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

Sustrato inicial, g/L	Sustrato inicial disponible, mg/cm ²	Densidad máxima de biomasa, mg/cm ²	Rendimiento, Y _{X/S}
25	39.8	5.4	0.14
50	79.5	15.9	0.20
100	159.0	24.1	0.15
150	238.6	29.0	0.12
200	318.1	34.3	0.11
250	397.6	30.4	0.08

Ya que la concentración inicial de glucosa en la experimentación varía de 25 a 250 g/L, se puede esperar que las propiedades del medio de cultivo se modifiquen, así mismo que los coeficientes de difusión efectiva de la glucosa y de otros nutrientes en el agar cambien con la concentración de la glucosa. Además con la concentración no solo cambia el transporte en el medio, si no también en la membrana celular, Torres, *et. al.*, en 1996, observaron que *A. niger*, contiene al menos dos transportadores de glucosa que dependen de la concentración de ésta en el medio; los resultados de su estudio sugieren que la actividad de estos transportadores facilita el catabolismo de la glucosa, modificando la actividad de las enzimas que actúan en él y la acumulación de metabolitos primarios.

Por otro lado se ha demostrado que en hongos filamentosos que la presencia de estos transportadores de la glucosa, difieren en la afinidad y especificidad dependiendo de la concentración de la misma, un vehículo de alta afinidad se

expresa en todo momento y una afinidad baja se expresa sólo en presencia de altas concentraciones de glucosa en el medio (Mark y Romano, 1971; Papagianni, 2004). Así mismo se ha sugerido que el mecanismo de transporte de asimilación de la glucosa a través de la membrana celular es por difusión pasiva cuando existe un gradiente de concentración entre ésta y el medio externo (Nielsen y Krabben, 1995; Legisa y Matthey, 2007); aunque es posible que dicho transporte se lleve a cabo por un proceso de difusión facilitada, como en el caso reportado para *S. cerevisiae* (Rizzi, *et. al.*, 1996).

Sin embargo, cualquiera que sea el proceso de asimilación, podemos esperar que el metabolismo de *A. niger* se vea afectado cuando la concentración de glucosa se incrementa de 25 a 250 g/L debido al gradiente entre el medio externo y la membrana del citosol, además se debe considerar que el metabolismo puede sufrir alguna regulación en sus rutas EMP, PF y TCA ante tales cambios en la concentración de glucosa del cultivo, ya que si la glucosa aumenta, los niveles de ácido cítrico aumentarán y los de ATP disminuirán, como lo determinaron Kubicek y Röhr (1977), lo que afecta el aprovechamiento de la glucosa.

6.1.2 Las mezclas binarias de glucosa con metabolitos primarios y su efecto sobre el crecimiento global de biomasa.

Como se describe en el punto anterior uno de los objetivos de este estudio consistió en emplear a la glucosa como fuente de carbono y verificar el efecto de las variaciones en la concentración de glucosa, pero por otra parte también se utilizó como entrada al sistema la mezcla de la glucosa como fuente de carbono con algún otro metabolito, que se sabe es excretado por este microorganismo, como segunda fuente de carbono.

Para determinar el efecto de una segunda fuente de carbono sobre la generación de biomasa, se añadieron al medio con glucosa metabolitos primarios, glicerol, ácido cítrico y ácido oxálico. Es importante destacar que el uso de las mezclas binarias modifica tanto la textura del medio sólido (y probablemente su viscosidad),

así como su pH, y determinar el impacto que esto tiene durante el crecimiento del micelio es una tarea que no se llevó a cabo en este trabajo.

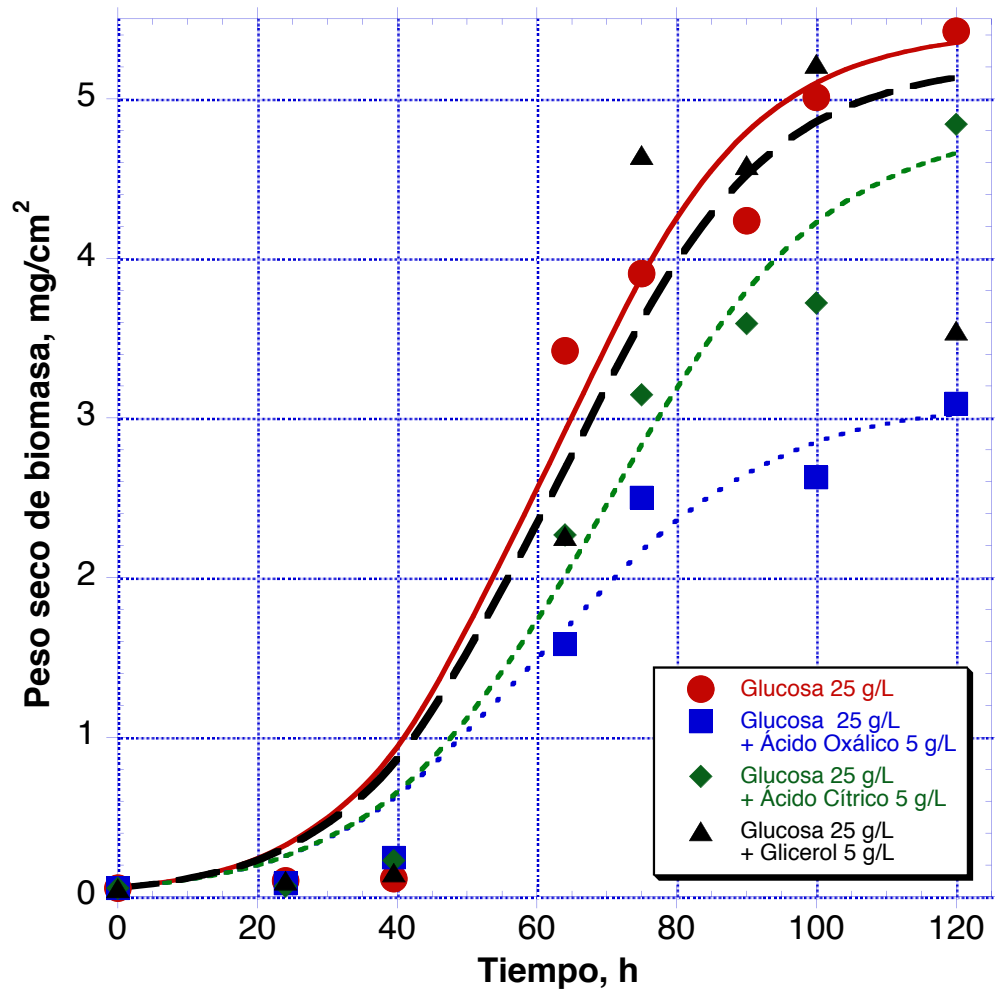


Figura 8. Seguimiento de la evolución en la producción de biomasa durante el crecimiento de *A. niger* A10 en caja Petri convencional a 28°C, con solo 25 g/L glucosa (●), con glucosa 25 g/L más ácido oxálico 5 g/L (■), ácido cítrico 5 g/L (◆) y glicerol 5 g/L (▲) respectivamente.

En la Figura 8 se muestra el crecimiento del micelio como biomasa seca por cm^2 de superficie para los experimentos en los que se añade al medio una segunda fuente de carbono.

Al analizar la evolución de biomasa producida por *A. niger* A10 ante la alimentación de estas mezclas binarias, se puede observar, de forma general, que la producción de la biomasa es más rápida y que se obtiene una mayor densidad

de biomasa para las mezclas de glucosa y glicerol y glucosa por sí sola, y que la generación de biomasa para las mezclas con los ácidos orgánicos es menor. Esto puede deberse a las rutas que el microorganismo sigue en el empleo los carbonos de las diversas fuentes ya que para la glucosa los mecanismos de asimilación y obtención de energía se ven facilitados por el metabolismo del microorganismo, en cambio para la generación de biomasa a partir del glicerol, ácido cítrico y ácido oxálico, el metabolismo de *A. niger* debe convertir estos compuestos a una forma asimilable y así ser transformado en energía.

6.1.3 Los cambios en la concentración de Mn^{2+} y su efecto sobre la producción global de biomasa.

Se ha reportado que la concentración de ciertas sales de Mn y Mg tiene un impacto en la producción de ácido cítrico, modificando también la generación de biomasa y formación de hifas. Si el crecimiento de *A. niger* se lleva a cabo en un medio deficiente de manganeso, éste excreta grandes cantidades de ácido cítrico (Lockwood, 1975). Existen diversas teorías que pretenden explicar la participación del manganeso como pieza clave en la formación de este metabolito Bowes y Matthey (1979). Estudios realizados por Kubicek y Röhr (1977), demostraron que la deficiencia en Mn^{2+} genera un rompimiento de proteínas que da como resultado una concentración intracelular alta de NH_4^+ , que a su vez inhibe a la enzima fosfofructoquinasa permitiendo la formación de ácido cítrico y una aportación activa de la glicólisis. Por otra parte Kisser, *et. al.* (1980) demostraron que la ausencia de iones de manganeso en el medio provoca el crecimiento morfológico anormal del hongo ya que se incrementa la producción de quitina y la formación de hifas. En este trabajo se llevó a cabo el crecimiento de *A. niger* A10 a diferentes concentraciones de manganeso añadido al medio, requerido en el metabolismo para la asimilación de las fuentes de carbono y generación de ATP.

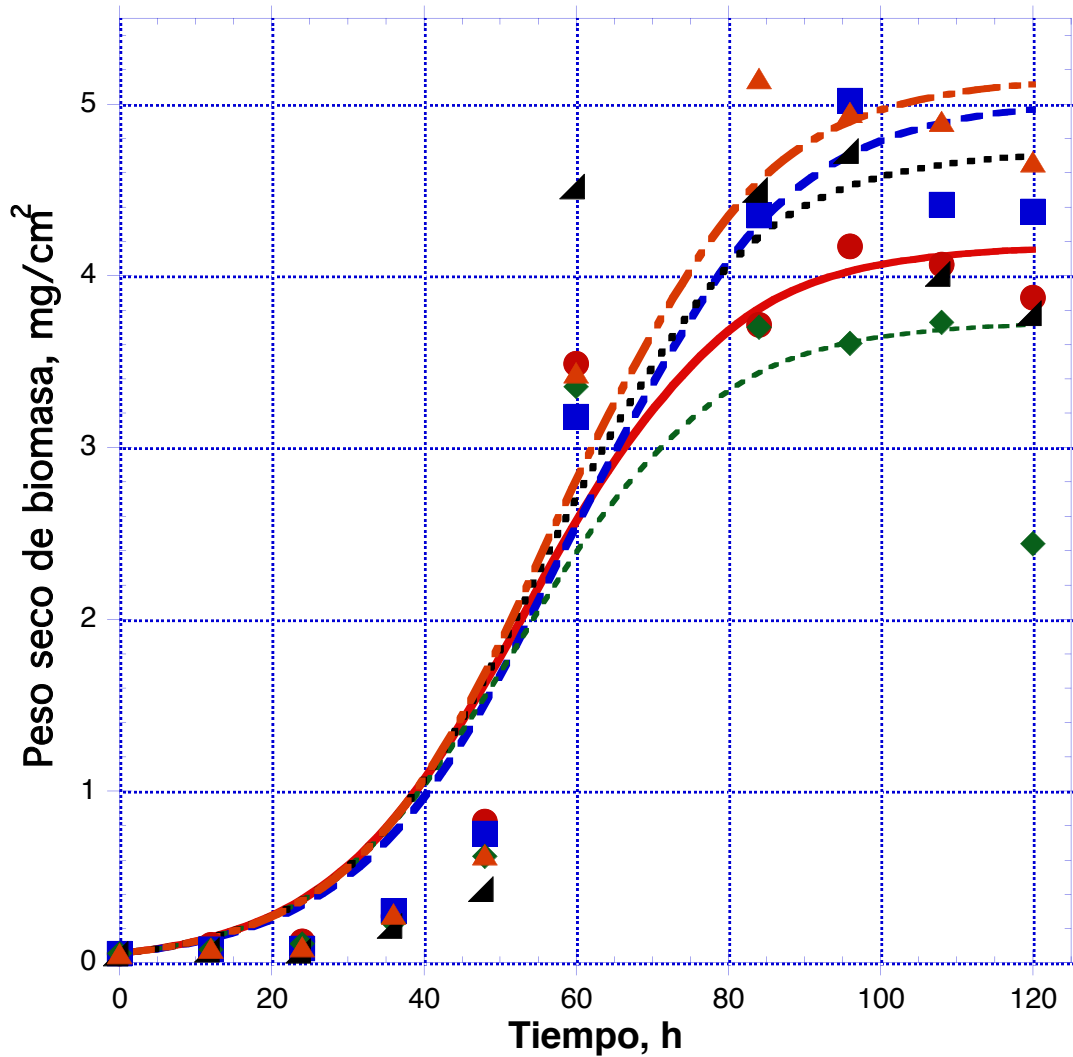


Figura 9. Evolución del peso seco de biomasa durante el crecimiento de *A. niger* A10 variando la concentración de iones de Mn^{+2} adicionados al medio, 0.05 (●), 0.07 (■), 0.10 (◆), 0.14 (▲) y 0.21 mg/L (▲).

La Figura 9 muestra los resultados del seguimiento de la producción de biomasa *A. niger* A10, bajo condiciones de 0.21, 0.14, 0.10, 0.07 y 0.05 mg de Mn^{2+} por litro de medio; para los casos de estudio no se presenta un efecto notorio de la concentración de iones de manganeso en el sistema, pues podría deberse a que los cambios realizados son poco notorios en el metabolismo y el compuesto se encuentra siempre en exceso.

6.1.4 El análisis del crecimiento global de biomasa mediante un modelo matemático.

En este trabajo se determinaron los valores parámetros del crecimiento de *A. niger*, se estimaron los valores de la tasa específica de crecimiento, μ_{\max} , a partir de las mediciones experimentales de la evolución de la concentración global de biomasa bajo las distintas condiciones en el medio, se (Tabla 3), y el modelo presentado por Reyes, *et. al.* (2007), donde se utiliza la ecuación logística modificada con Monod para predecir: la generación de biomasa, el crecimiento radial del micelio y los perfiles de concentración en el medio y en el micelio.

El modelo matemático desarrollado para el estudio del crecimiento del micelio además de predecir el crecimiento global de la biomasa (ver Figura 7), permite predecir el crecimiento radial de una colonia de *A. niger* que crece sobre un sustrato sólido. La Figura 10 muestra la predicción con el modelo de crecimiento radial de la evolución del radio de la colonia de *A. niger* para las diferentes concentraciones iniciales de glucosa empleadas en la experimentación (líneas). Al comparar los datos experimentales desarrollados por Reyes (2006) con estas predicciones se puede apreciar que el modelo de crecimiento radial predice adecuadamente las observaciones experimentales, para todo el rango de concentraciones iniciales de glucosa y nos permite predecir el comportamiento posible para aquellos crecimientos en los que no se realizaron experimentaciones de este tipo.

El modelo propuesto predice los perfiles de concentración de glucosa al interior del medio sólido. Además en este modelo, los fenómenos de transporte de glucosa en el sustrato y en el micelio (para el modelo de crecimiento radial) fueron acoplados al término de generación de biomasa. Otro aspecto de importancia que incluye el modelo matemático de crecimiento radial es el término de frontera móvil que permite establecer el cambio de la longitud del micelio en el tiempo, así como los perfiles de concentración de glucosa, tanto en el sustrato sólido como en el micelio.

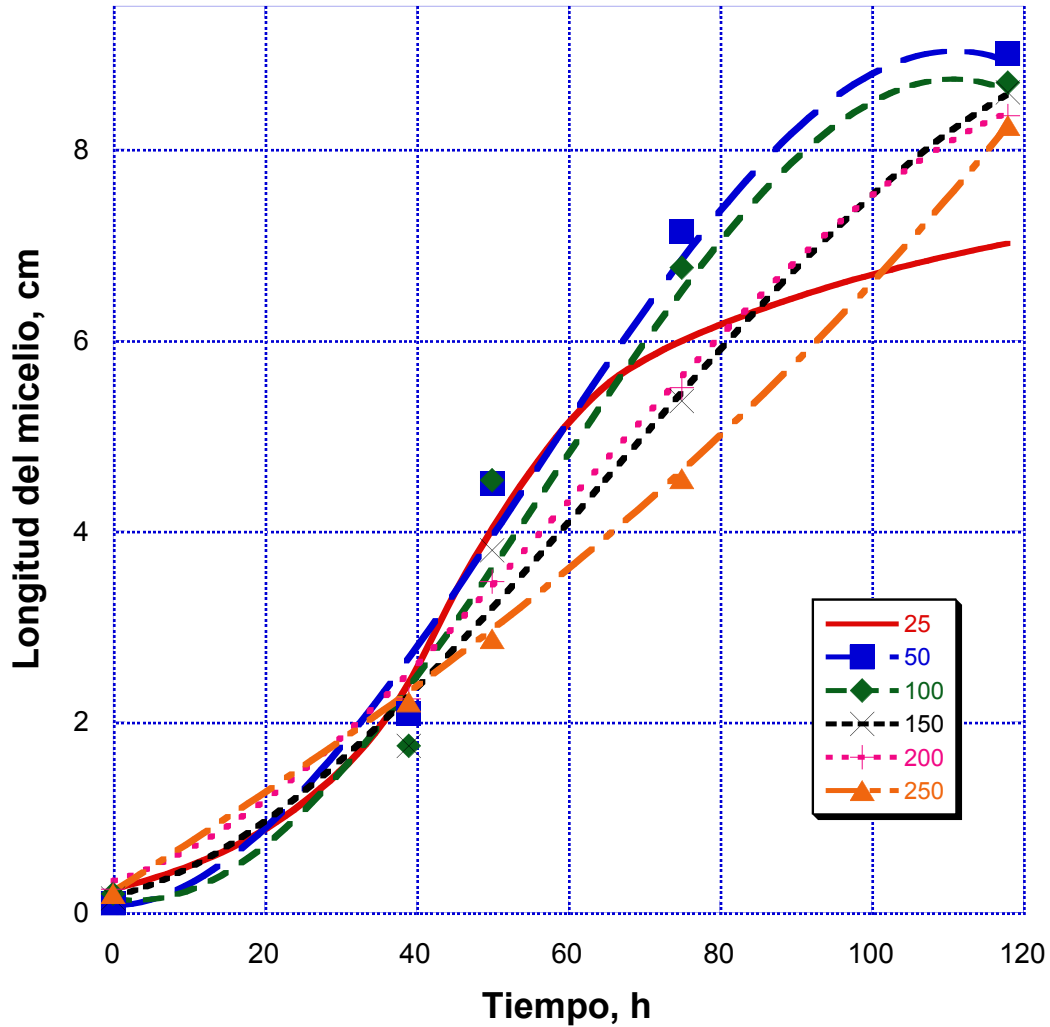


Figura 10. Evolución de la longitud del micelio a las diferentes condiciones de crecimiento.

En la Figura 11 se presentan los resultados de la simulación para una concentración inicial de glucosa de 150 g/L; en ellas se puede observar que el modelo de crecimiento radial desarrollado permite predecir los perfiles de concentración de la biomasa, de la glucosa en el sustrato, y en el micelio, tanto axial como radialmente. En la Figura se muestran los perfiles de la concentración de glucosa en el micelio y en el agar a diversos tiempos del crecimiento (15, 45, 90 y 120 hrs respectivamente); los perfiles nos muestran que la máxima concentración de nutrientes siempre se encuentra en la periferia del micelio en crecimiento y en la zona cercana al agar. Este comportamiento es consecuencia del transporte por difusión que se lleva a cabo en el medio sólido. Axialmente la

concentración de glucosa en el micelio presentaron gradientes menores que radialmente; radialmente la glucosa disminuye en mayor proporción en la zona céntrica por debajo de la colonia hasta llegar a consumirse en la totalidad de la concentración inicial de glucosa en el medio. En la periferia de la colonia la concentración es mayor presentando una disminución mayor al 90% de la concentración inicial a tiempos largos del crecimiento (120 hrs).

Los resultados mostrados hasta el momento concuerdan con los estudios experimentales realizados por varios investigadores. En el estudio desarrollado por Robson y colaboradores (1987), demostraron que el crecimiento en el radio de la colonia de *R. cerealis* produce disminuciones en la concentración de la glucosa del medio, y que los perfiles de concentración de glucosa radiales desarrollados presentan formas similares para cada concentración de glucosa utilizada (10, 25 y 50 mM). En la experimentación llevada a cabo por Robson, a los 6 días del crecimiento del microorganismo las colonias habían crecido aproximadamente hasta la mitad de la longitud del medio que, inicialmente contenía una concentración de glucosa 50 mM, a este tiempo del crecimiento en el centro del medio por debajo de las colonias esta concentración se había agotado. Axialmente observaron diferencias notables entre la concentración superficial y la concentración en los fondos del medio que tenía una profundidad de 1.6 mm.

Así mismo Olsson (1994), en un estudio del crecimiento de *Fusarium oxysporum* sobre agar enriquecido con glucosa y fosfato, ratifica la generación de los gradientes de concentración de los nutrientes en el medio sólido ocasionados por el crecimiento radial de la colonia fúngica, pero a diferencia de Robson, Olsson establece que axialmente se forman gradientes más o menos apreciables dependiendo de la profundidad del medio sólido; llegando a ser mas pronunciados en sustratos más profundos debido a un efecto de la difusión de los nutrientes.

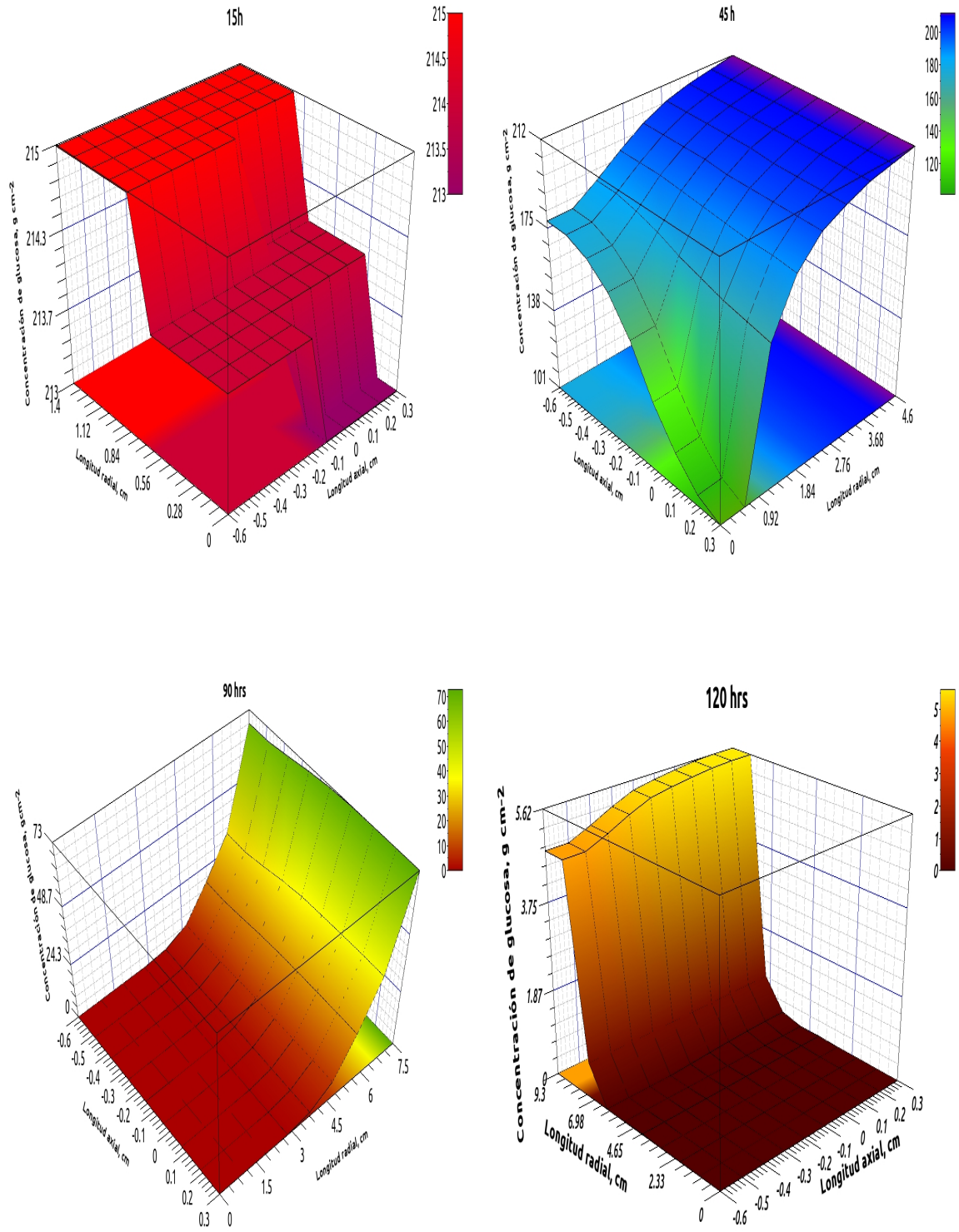


Figura 11. Perfiles de concentración de glucosa en el agar y el micelio para una concentración de glucosa inicial de 150 g/L.

Con el modelo de crecimiento radial fue posible estimar el valor de la tasa específica de crecimiento para cada una de las concentraciones iniciales de

glucosa empleadas en la experimentación. En la Tabla 4 se presentan los valores estimados para la tasa específica de crecimiento a las diferentes concentraciones de glucosa inicial.

Tabla 4. La tasa específica de crecimiento a diferentes concentraciones de glucosa inicial.

Sustrato inicial, g/L	Tasa específica de crecimiento, 1/h	R ² Ecuación Logística
25	0.074	0.92
50	0.091	0.85
100	0.084	0.93
150	0.114	0.89
200	0.094	0.98
250	0.114	0.87

Si se grafican algunos de los parámetros de las Tabla 3 y Tabla 4, se pueden observar los efectos que tiene el cambio de la concentración de glucosa en el crecimiento y producción de biomasa. En la siguiente figura se presenta el efecto de la glucosa inicial disponible sobre la cantidad máxima de biomasa, en esta figura se puede observar que se presenta un máximo en la densidad de biomasa a una concentración de glucosa disponible de 318 mg/cm² lo que corresponde a una concentración de glucosa de 200 g/L.

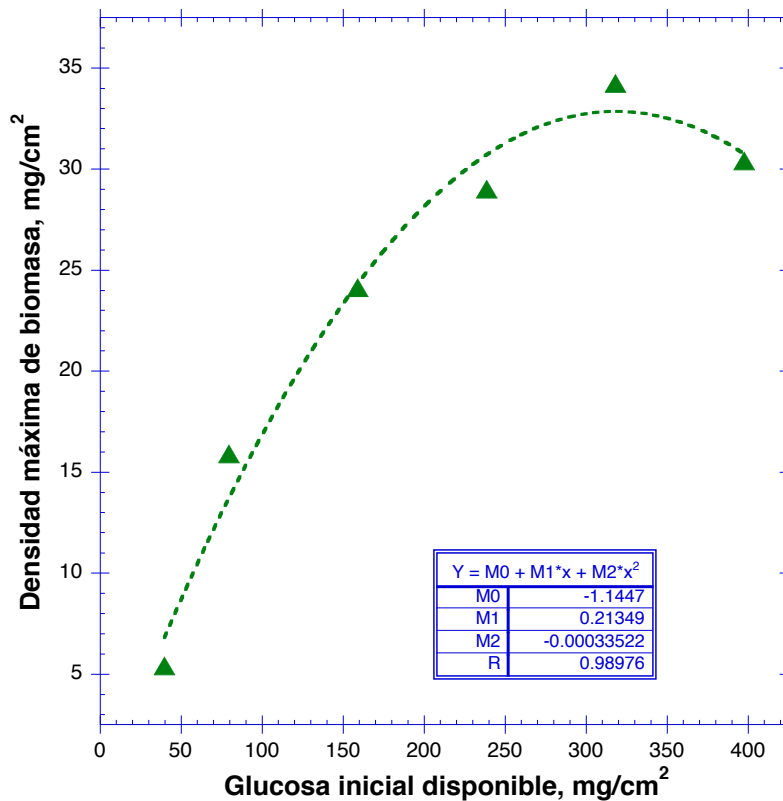


Figura 12. Densidad máxima de biomasa de *A. niger* a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

En la Figura 12 también se puede observar que para concentraciones mayores a 200 g/L el microorganismo es afectado por alta concentración de glucosa, ya que se disminuye la cantidad de biomasa obtenida. Un comportamiento similar para el crecimiento de *A. niger* fue observado en el trabajo desarrollado por Larralde, *et. al.* (1997). En ese estudio se llevaron a cabo experimentos a 10, 40, 70, 120 y 300 g/L de glucosa, y se concluye que el crecimiento de este microorganismo presenta una inhibición a una concentración inicial mayor a 300 g/L de glucosa.

Para los experimentos realizados en este estudio la tasa de producción de biomasa es mayor a altas concentraciones de fuente de carbono, a partir de los 150 g/L. A pesar de que se obtuvo una cantidad máxima de biomasa a las 120 horas de crecimiento para una concentración inicial de 200 g/L de glucosa alimentada, en la Figura 13, se puede observar que el rendimiento es mayor a concentraciones menores de 50 g/L. A concentraciones mayores a los 100 g/L se

observa que el rendimiento disminuye a medida que aumenta la cantidad de glucosa inicial, lo que podría depender de la disponibilidad de energía que se encuentra limitada por la cantidad de ATP y de otros cofactores; sin embargo, con esta información no es posible concluir sobre la existencia de un proceso inhibitorio debido a restricciones de disponibilidad de energía como ATP y otros cofactores durante el crecimiento.

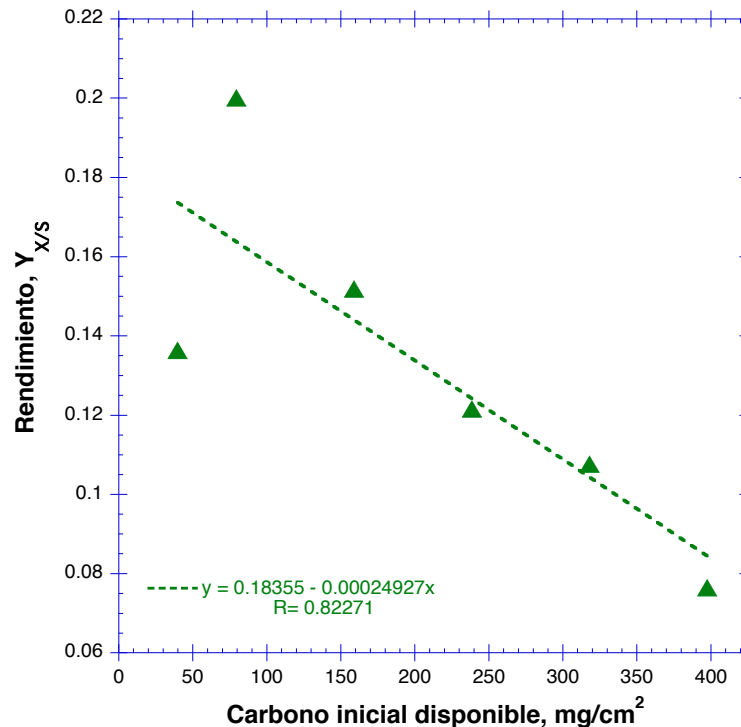


Figura 13. Rendimiento en función de la concentración de carbono inicial disponible.

La siguiente Figura compara los resultados de la disponibilidad energética del micelio durante su crecimiento cuando la concentración de glucosa en la placa de agar varia de 25 a 250 g/L obtenidos con el modelo estructurado propuesto por Reyes y colaboradores (2013). En esta figura se muestra que existen diferencias importantes entre los nivel energéticos de las respuestas entre 25 y 250 g/L, ya que en el segundo caso se dispone solamente del 40 % de la carga energética que se tiene en el primero. Al comparar la carga energética durante el crecimiento del micelio a las diferentes concentraciones se muestra que para consumir diez veces más glucosa se requiere de más energía.

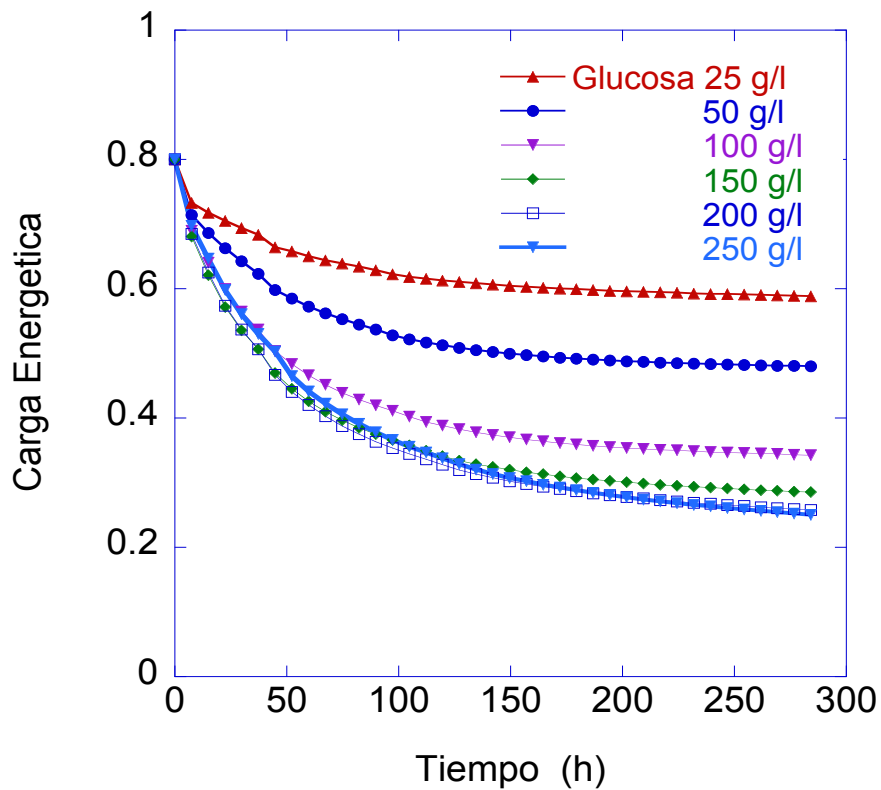


Figura 14. Predicción de la variación de la carga energética durante el crecimiento de *A. niger* para diferentes valores de la concentración inicial de glucosa en la placa de agar.

6.2 Caracterización abiótica de la caja Petri modificada.

Se llevaron a cabo dos experimentos de tipo abiótico, donde, por un lado se monitoreó el efecto de los ciclos diurno y nocturno sobre las concentraciones de CO_2 y O_2 en ambiente experimental sin control de temperatura. Y por otro lado se determinó el flujo de aire al interior de la caja Petri modificada.

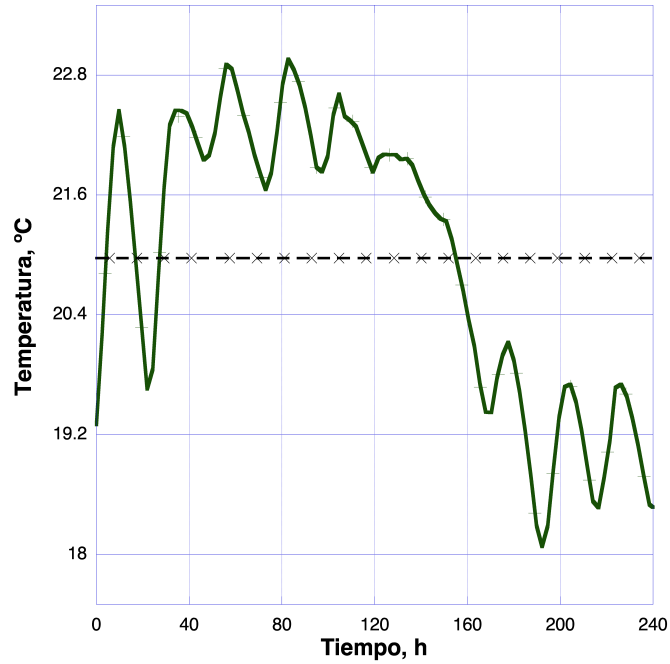


Figura 15. Efecto de los ciclos diurno y nocturno sobre la temperatura en el sistema experimental.

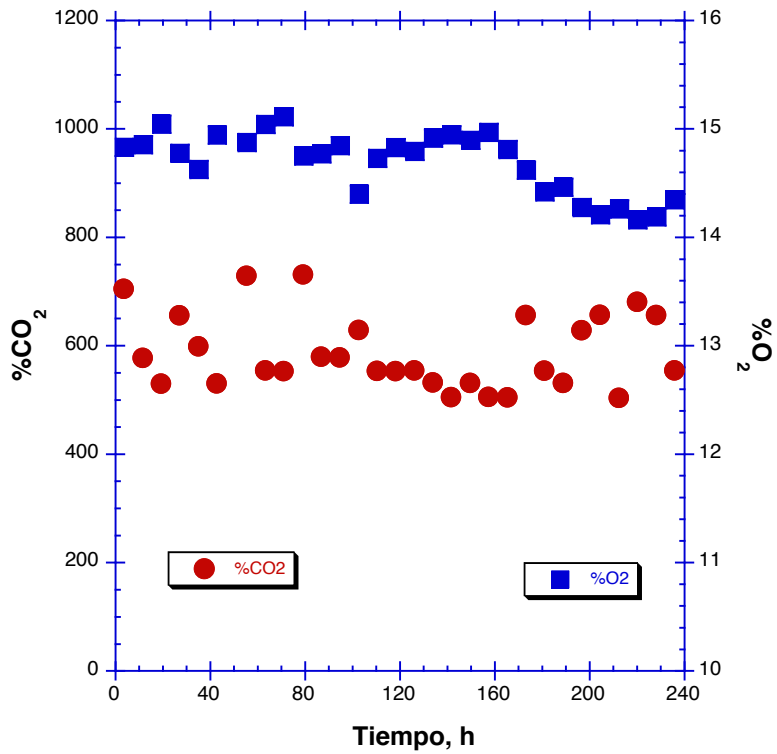


Figura 16. Efecto de los ciclos diurno y nocturno sobre las concentraciones de CO₂ (●) y O₂ (■) en la caja Petri modificada sin reacción.

La Figura 15 muestra los resultados del seguimiento de la temperatura ambiente en el sistema experimental sin reacción, en ella se observa que la temperatura no presenta cambios mayores a 5°C en los ciclos diurno y nocturno. Al llevar a cabo la medición de la concentración de los gases en el sistema experimental sin llevar a cabo el crecimiento de *A. niger* (Figura 16), se puede observar que las variaciones en la temperatura ambiental no presentan un efecto notable en la concentración del CO₂ y O₂ del ambiente, por lo que se establece una temperatura promedio de 20.97°C.

Por otro lado el flujo de aire al interior de la caja Petri modificada se determino de forma indirecta llevando a cabo un experimento que consistió en hacer pasar a la caja Petri modificada libre de oxígeno, un flujo natural de aire, la Figura 17 muestra el cambio del porcentaje de O₂ en el sistema a lo largo del experimento.

De los resultados de este experimento se obtuvo que a un tiempo de 23.6 h de experimentación el valor promedio de oxígeno es de 19.8 % y que la tasa de oxígeno promedio de 0.83 %O₂/h, que da flujo un promedio de aire de 0.02 ml_{Aire} /h.

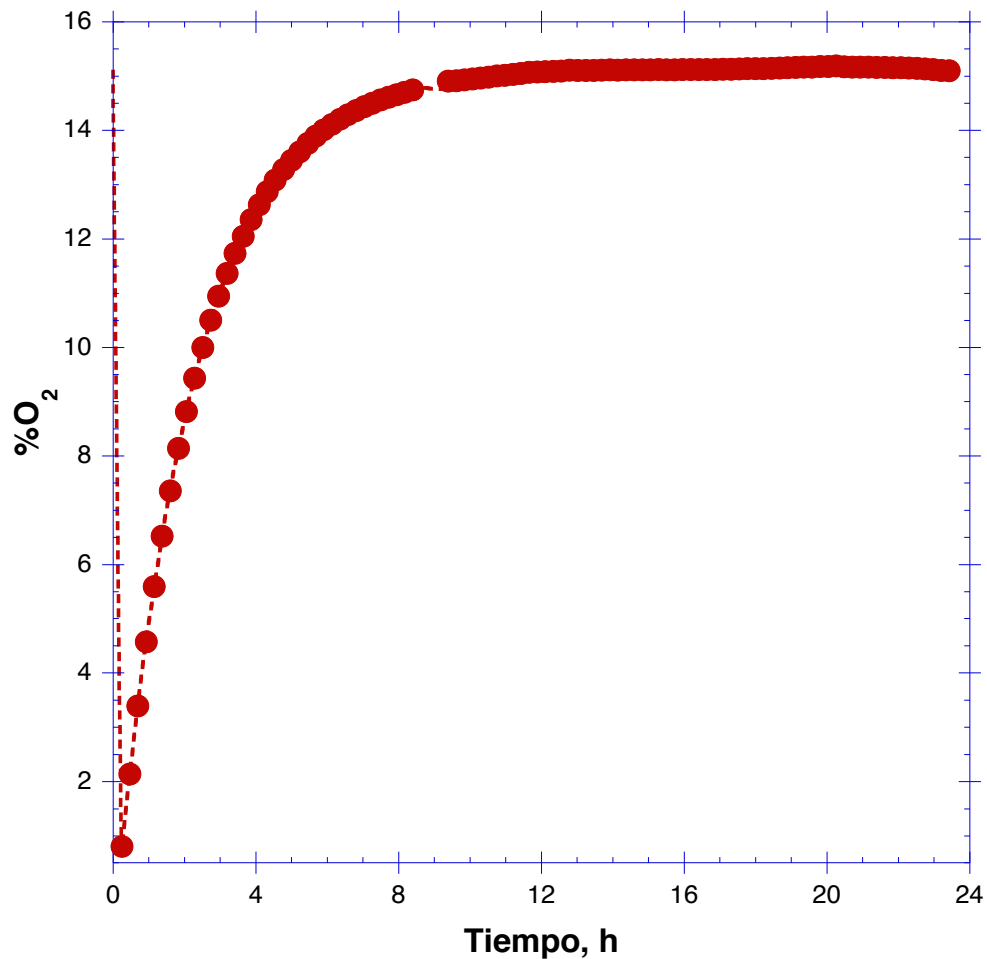


Figura 17. Evolución del flujo de oxígeno en la caracterización abiótica del sistema experimental.

6.3 La evaluación del cociente respiratorio en el crecimiento superficial de *Aspergillus niger*.

Según algunos investigadores, el registro de CO₂ hace posible evaluar el crecimiento microbiano, para validar los modelos de difusión de gases y para monitorear la fermentación (Bellon-Maurel y col., 2003). En este trabajo se midieron la emisión de CO₂ y el consumo de O₂ en la fase gaseosa dentro de las cajas Petri modificadas (Figura 18), esto con la finalidad de evaluar el efecto de las variaciones en la naturaleza del sustrato sobre el CR. Para poder llevar a cabo este propósito se usaron sensores que utilizan la espectrometría infrarroja que es la técnica más utilizada para registrar el CO₂.

Se sabe bien que el catabolismo de la glucosa o vía de la glucólisis, permite la producción de biomasa a través del anabolismo y conlleva la generación de compuestos como el CO₂, que son indicadores del crecimiento celular, y en el crecimiento de *A. niger* la medición de CO₂ ha sido usado como parámetro para medir la biomasa y establecer la asimilación del sustrato por medio del CR. Si se comparan las Figura 7 y Figura 18 se puede observar que para el crecimiento a 25 g/L de glucosa, aunque el volumen de cultivo es mayor en la caja Petri modificada se tiene que la producción de biomasa esta acoplada con la generación de CO₂.

Cabe destacar que en este trabajo la producción de CO₂ y los cambios en el CR no se utilizan como una medida de la cantidad de biomasa generada por el microorganismo, ya que, en la mayoría de los casos de estudio la fase exponencial de producción de CO₂ se presenta posteriormente a la fase exponencial de producción de biomasa; esto podría deberse a la utilización del CO₂ por el microorganismo en otros procesos metabólicos distintos a la generación de biomasa, tales como las rutas anapleróticas que utilizan el CO₂ para la generación de los ácidos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Vease Figura 19). Por otro lado la generación de este gas, en los distintos experimentos realizados, permite dar explicación a los efectos de las entradas en el sistema sobre el metabolismo de *A. niger*; es decir, a los cambios en el medio de cultivo y condiciones del sistema.

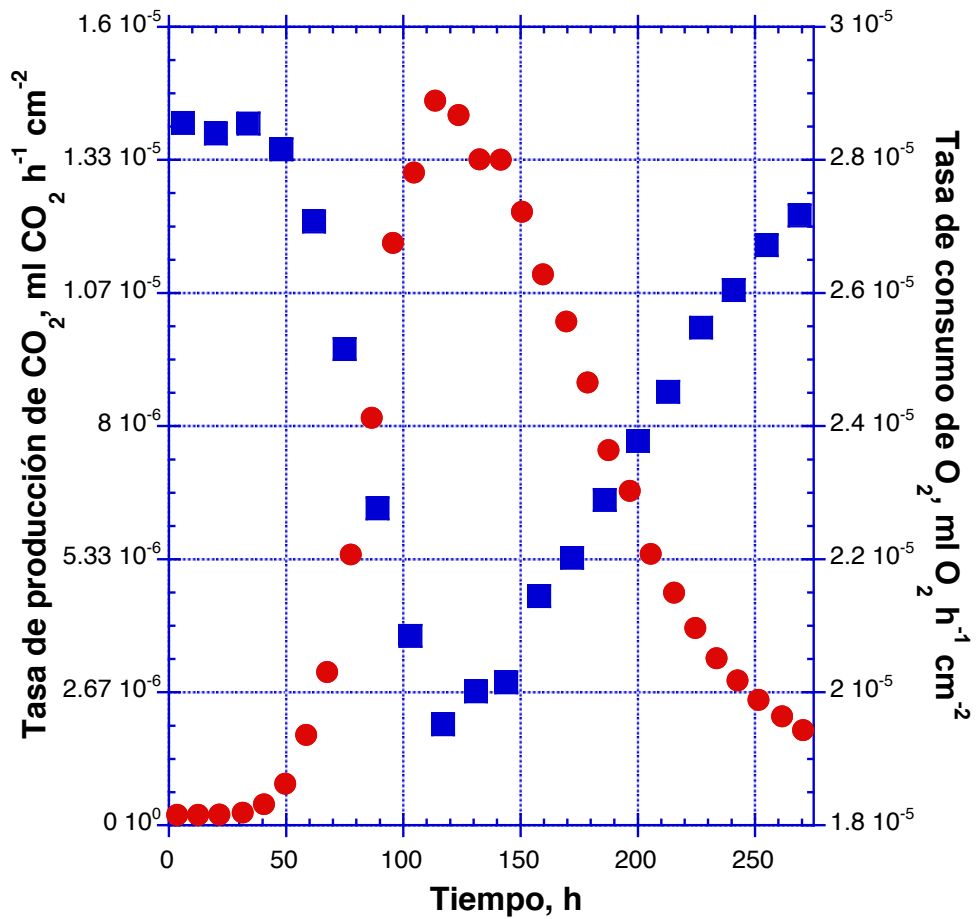


Figura 18. Seguimiento de la evolución de las tasas de producción de CO₂ (●) y consumo de O₂ (■) durante el crecimiento de *A. niger* A10 en caja Petri modificada a glucosa 25 g/L y 28°C.

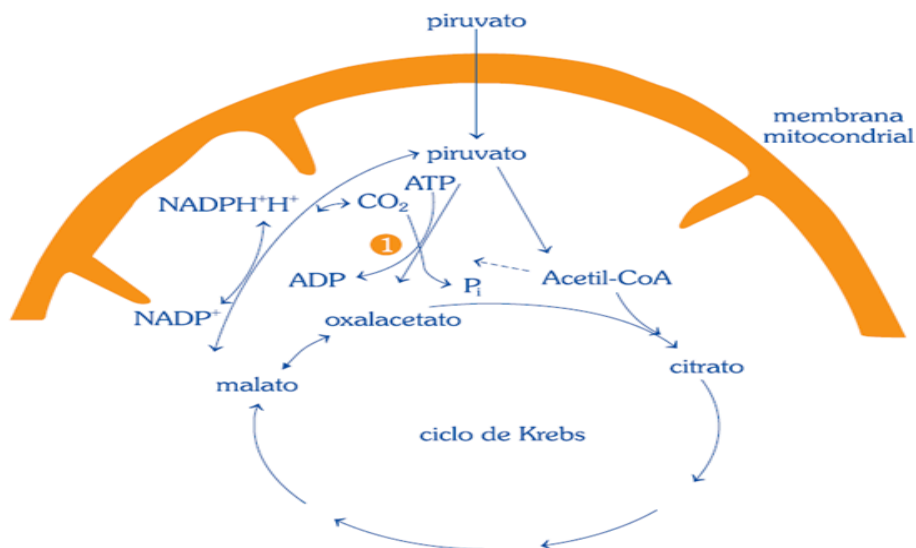


Figura 19. Diagrama de la reacción anaplerótica, (1) catalizada por la piruvato carboxilasa permite la reposición de intermediarios del ciclo de Krebs.

6.3.1 Las mezclas binarias de glucosa con metabolitos primarios y las variaciones de la fuente de carbono del medio y su efecto sobre el cociente respiratorio.

Para comparar y analizar las respuestas en la producción de CO₂ y en el CR ante el uso de metabolitos primarios en el medio de cultivo, se realizaron dos series de experimentos en caja Petri modificada a temperatura controlada de 28° C. La primer serie consistió en cuatro experimentos, de los cuales uno de ellos utiliza una concentración inicial de glucosa de 25 g/L de glucosa, y en cada uno de los tres experimentos restantes se adicionaron a los 25 g/L de glucosa: 5 g/L de ácido oxálico, 5 g/L de ácido cítrico y 5 g/L de glicerol, respectivamente. En la segunda serie se realizaron tres experimentos en los que en cada uno se utilizaron como fuente de carbono al ácido oxálico, al ácido cítrico y al glicerol, respectivamente, en una concentración de 5 g/L, y se llevó a cabo con el propósito de determinar el efecto de la adición de algunos metabolitos primarios sobre la generación de biomasa.

Los experimentos de ambas series tienen como objeto determinar el efecto de los cambios en la naturaleza de los sustratos sobre la variable de respuesta, el CR. 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 determinar el impacto que esto tiene durante el crecimiento del micelio es una tarea que no se llevó a cabo en este trabajo.

Las Figura 20 y Figura 21 presentan la evolución de las tasas de producción de CO₂ y el CR, calculado a partir de las mediciones de la producción de CO₂ gaseoso, y el consumo de O₂, en crecimiento en caja Petri modificada, para la primer serie de experimentos. Las Figura 22 y Figura 23 presentan la evolución de la tasa de producción de CO₂ y el CR, respectivamente, para la segunda serie de experimentos.

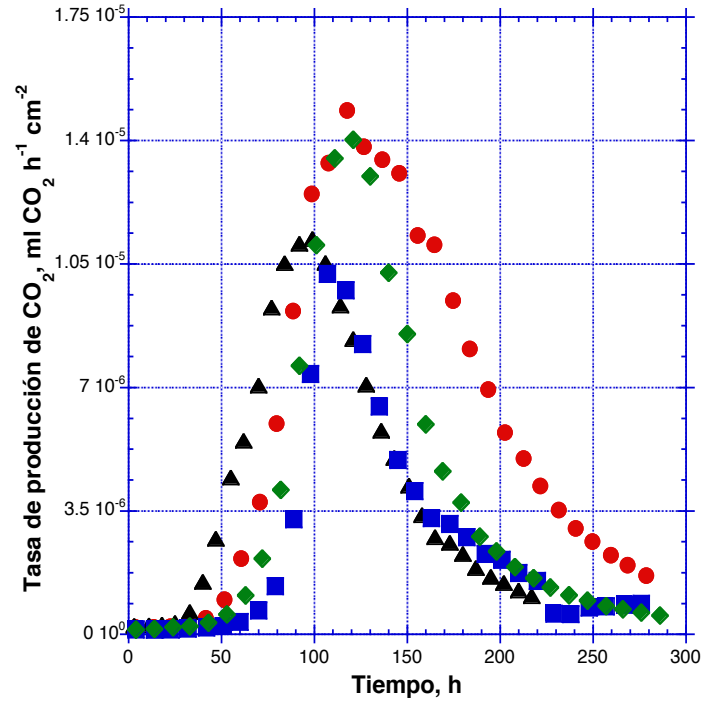


Figura 20. Seguimiento de la evolución en la tasa de producción de CO_2 durante el crecimiento de *A. niger* A10 a 28°C , solo glucosa 25 g/L (●), glucosa 25 g/L más ácido oxálico 5 g/L (■), ácido cítrico 5 g/L (◆) y glicerol 5 g/L (▲) respectivamente.

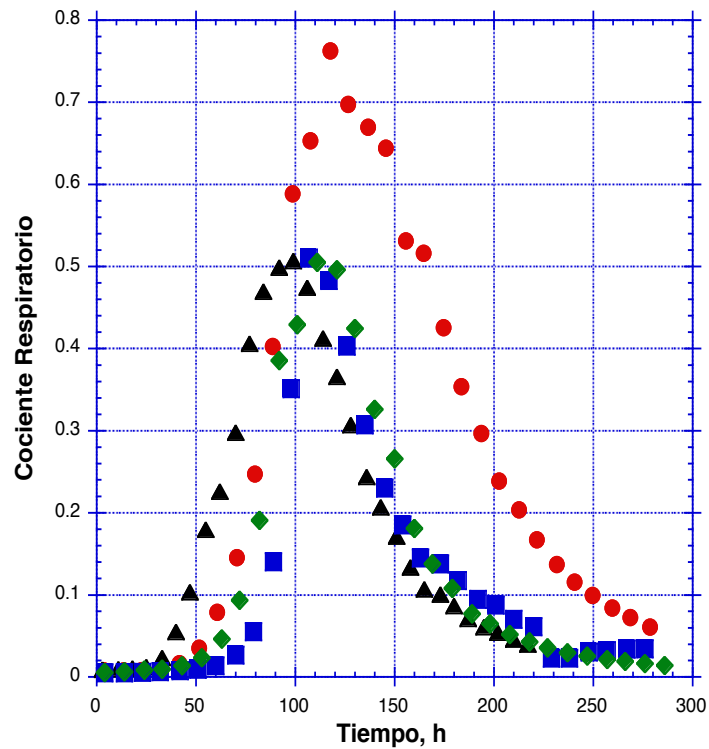


Figura 21. Seguimiento de la evolución de cociente respiratorio (CO_2/O_2) durante el crecimiento de *A. niger* A10 a 28°C , con glucosa 25 g/L (●); glucosa 25 g/L más ácido oxálico 5 g/L (■), ácido cítrico 5 g/L (◆) y glicerol 5 g/L (▲) respectivamente.

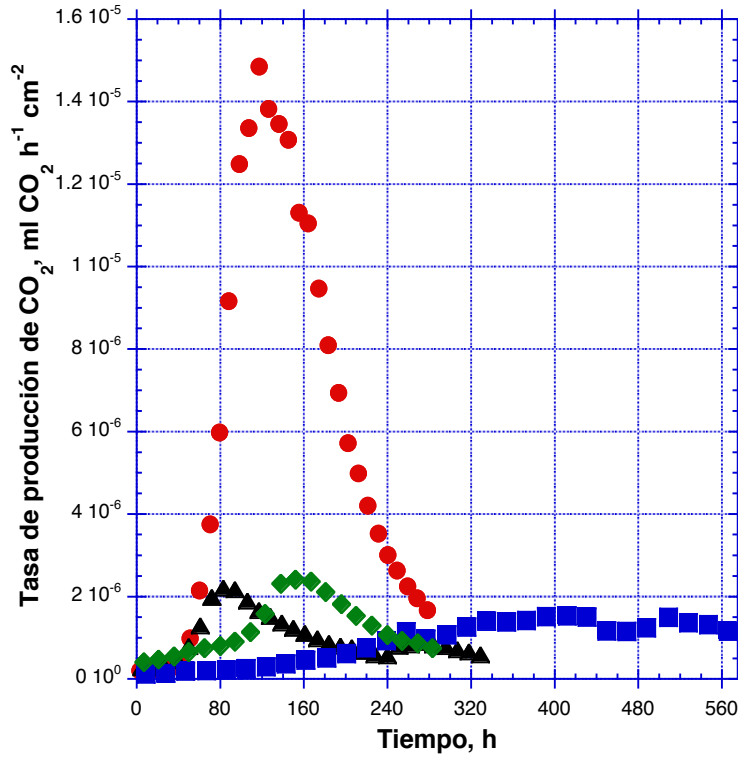


Figura 22. Evolución de la tasa de producción de CO₂ producido durante el crecimiento de *A. niger* A10 a 28 °C y 25 g/L de glucosa (●), 5 g/L de ácido oxálico (■), 5 g/L de ácido cítrico (◆) ó 5 g/L de glicerol (▲).

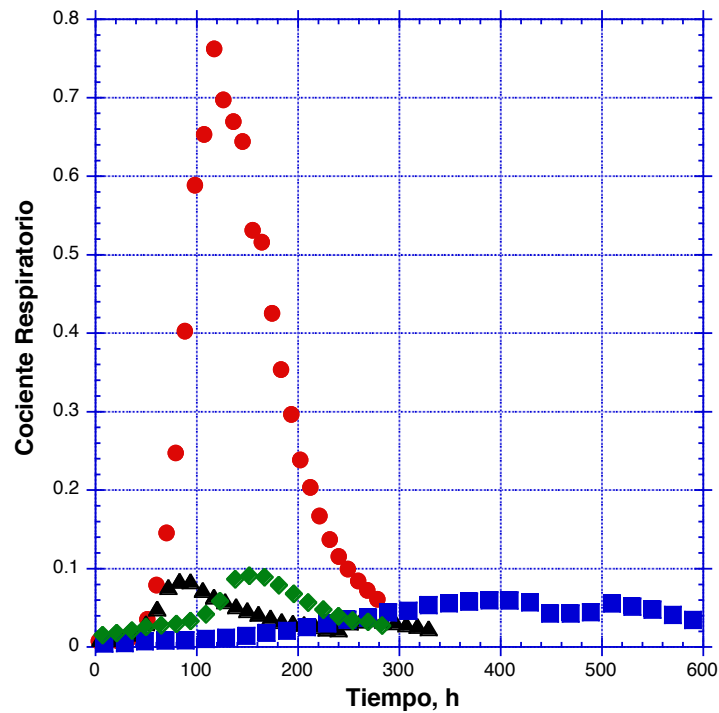


Figura 23. Evolución del cociente respiratorio durante el crecimiento de *A. niger* A10 a 28 °C y 25 g/L de glucosa (●), 5 g/L de ácido oxálico (■), 5 g/L de ácido cítrico (◆) y 5 g/L de glicerol (▲).

Al analizar las Figuras 20 a 23 se puede observar, de forma general, que tienen como factor común la disminución en las tasas de producción de CO₂ y de los valores de CR por la adición de: glicerol, ácido oxálico y ácido cítrico, solos o acompañando a la glucosa. Esto puede deberse a modo de cómo el microorganismo empleó los carbonos de las diversas fuentes ya que para la glucosa los mecanismos de asimilación y obtención de energía se ven facilitados por el metabolismo del microorganismo, en cambio para la generación de biomasa a partir del glicerol, ácido cítrico y ácido oxálico, el metabolismo de *A. niger* debe convertir estos compuestos a una forma asimilable y así ser transformado en energía.

En la Figura 19 se muestra que estos sustratos pueden ser utilizados como alimentadores de la reacción anaplerótica o fijadora de CO₂, catalizada en forma inversa por la enzima descarboxilasa del piruvato. Esta reacción ya fue descrita por Cleland y Johnson (1954) y ha estado ligada a la síntesis del ácido cítrico. Esto indica que un valor del CR menor de la unidad es una posible indicación de la fijación de CO₂ por este organismo. Cabe señalarse que Pappagiani (2007) encontró en cultivos sumergidos de *A. niger* que los valores iniciales de CR eran cercanos a la unidad y decrecían hasta un valor CR=0.86, cuando al final del cultivo se acumulaba el ácido cítrico. Los resultados aquí mostrados concuerdan con los indicados por Raimbault (1998) con cultivos de *Rhizopus sp.* crecido sobre sustratos sólidos. Además, Volke, *et. al.* (2003) demostraron que los cultivos sumergidos de *A. niger*, usando hexadecano como sustrato, tenían valores mucho más altos de CR que cuando los crecían sobre soportes sólidos. Todo esto indica que la fisiología y el metabolismo de *A. niger* crecido sobre superficie sólida parece producir con mayor facilidad compuestos carboxilados, como el ácido cítrico, a diferencia de los cultivos sumergidos. Esto ha sido comprobado por Lakshminarayana *et. al.* (1975) quienes encontraron que los cultivos de *A. niger* crecidos sobre caña de azúcar molida que contenía 12.5% de sacarosa y 3% de metanol, tenían un rendimiento del 72% de ácido cítrico, a comparación con los cultivos crecidos en medio sumergido, con los mismos sustratos y presentaban el 4% de rendimiento de este producto metabólico. En consecuencia, los presentes

resultados indican que es posible manipular el CR y por ende, el metabolismo, de *A. niger* crecido sobre una superficie sólida, mediante la adición de sustratos que posiblemente estimulen la reacción en reversa catalizada por la descarboxilasa pirúvica.

Cabe señalarse que Machida *et. al.* (2008) han informado que los cultivos de *A. oryzae* tienen una marcada expresión genética diferencial cuando los sustratos son sólidos o líquidos. O dicho de otra forma, aproximadamente el 25% de los genes de este hongo se expresan sólo cuando el cultivo crece sobre superficies sólidas y no cuando el cultivo es sumergido.

Todo ello indica que la manipulación genética y fisiológica de *A. niger* hará posible el desarrollo de nuevos procesos industriales para producir compuestos orgánicos de interés comercial, como es el propio ácido cítrico, del cual se consumen anualmente cerca de un millón de toneladas. El desarrollo de procesos con sustratos más baratos y con menos costo energético seguramente será de gran valor estratégico. Por esa razón, los presentes resultados indican que el estudio de la manipulación del CR de *A. niger*, crecido sobre superficies sólidas, puede ser de interés para la futura industria biotecnológica.

6.3.1.1 Un análisis del efecto de la mezcla de glucosa y glicerol sobre metabolismo de *Aspergillus niger*.

Durante su crecimiento *A. niger* produce algunos polioles los cuales permiten el flujo metabólico a las rutas de pentosa fosfato para la síntesis de biomasa (ver Figura 24) (David *et. al.*, 2003; Diano *et. al.*, 2006). Además de contribuir a la producción de biomasa, los polioles, como el glicerol, actúan como reservas de carbono, de aquí que este metabolito pueda ser empleado por el hongo de forma favorable en su crecimiento. En la Figura 25 se puede observar que al usar como fuente de carbono a la glucosa más el glicerol, *A. niger* presenta un crecimiento similar al crecimiento que tiene en el medio con solo glucosa, aunque, para la mezcla de glucosa y glicerol hay un incremento en la velocidad de formación de biomasa, obteniéndose mayor producción de la misma. Este mismo efecto se

puede apreciar si se observa la generación de CO₂ al comparar el CO₂ generado por las otras mezclas binarias y fuentes de carbono, ya que éste se produce de manera anticipada entre las 40 y 60 horas (Figura 20, Figura 22 y Figura 25). La Figura 24 nos muestra que la asimilación del glicerol es similar a la de la glucosa, ya que el aprovechamiento del glicerol de reserva en el citoplasma requiere de la misma cantidad de ATP para formar el gliceraldehido-3-fosfato (GAD3P) que da paso a la formación del piruvato (PYR) y a su vez al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), en donde se lleva a cabo la utilización del O₂ y la generación de CO₂ en la respiración. En la Figura 25, se observa que al comparar las tasas de producción de CO₂ y la acumulación del mismo para los casos en los que se utiliza a la glucosa, la glucosa más glicerol y al glicerol como fuentes de carbono, se presenta un crecimiento facilitado por la mezcla binaria en comparación al uso del glicerol como única fuente de carbono, ya que la velocidad de formación de CO₂ es mayor, así como también la producción de biomasa.

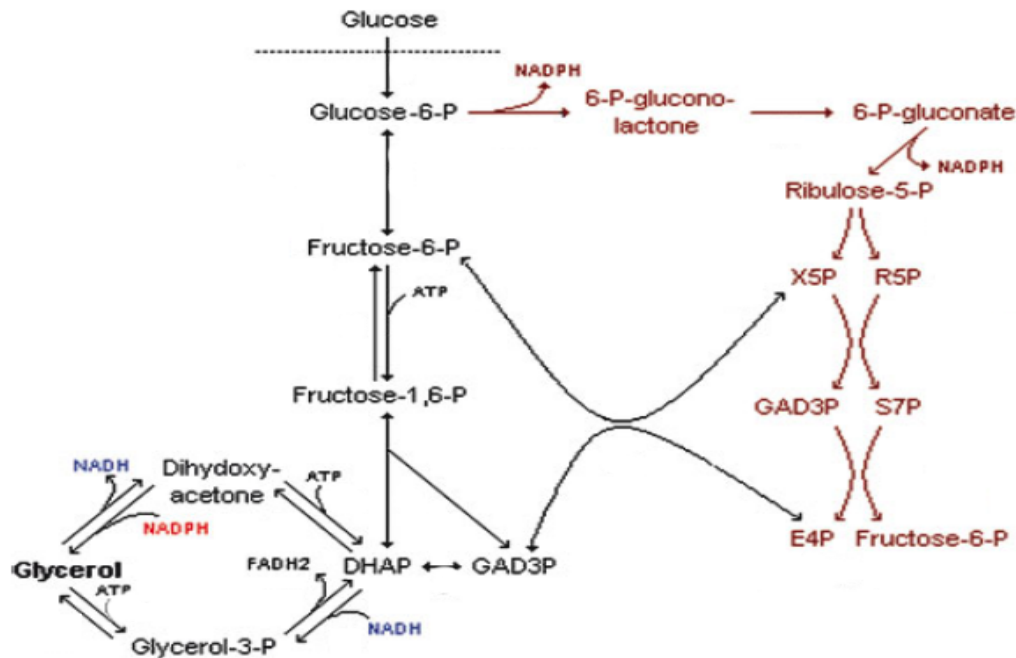


Figura 24. Anabolismo de glicerol y metabolismo catabólico en *Aspergillus niger*. (Imagen tomada y modificada de Diano *et. al.*, 2006).

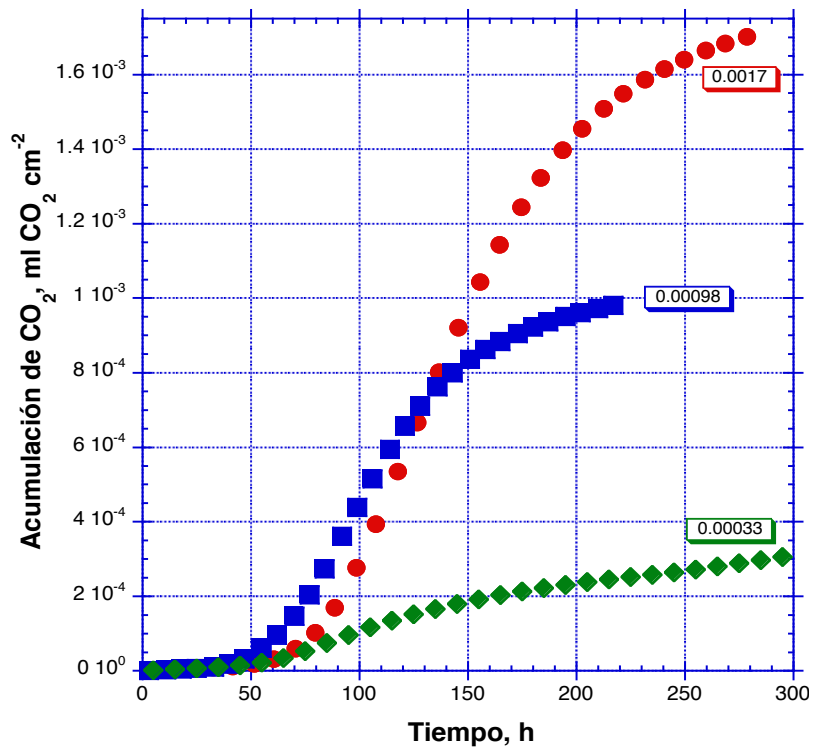
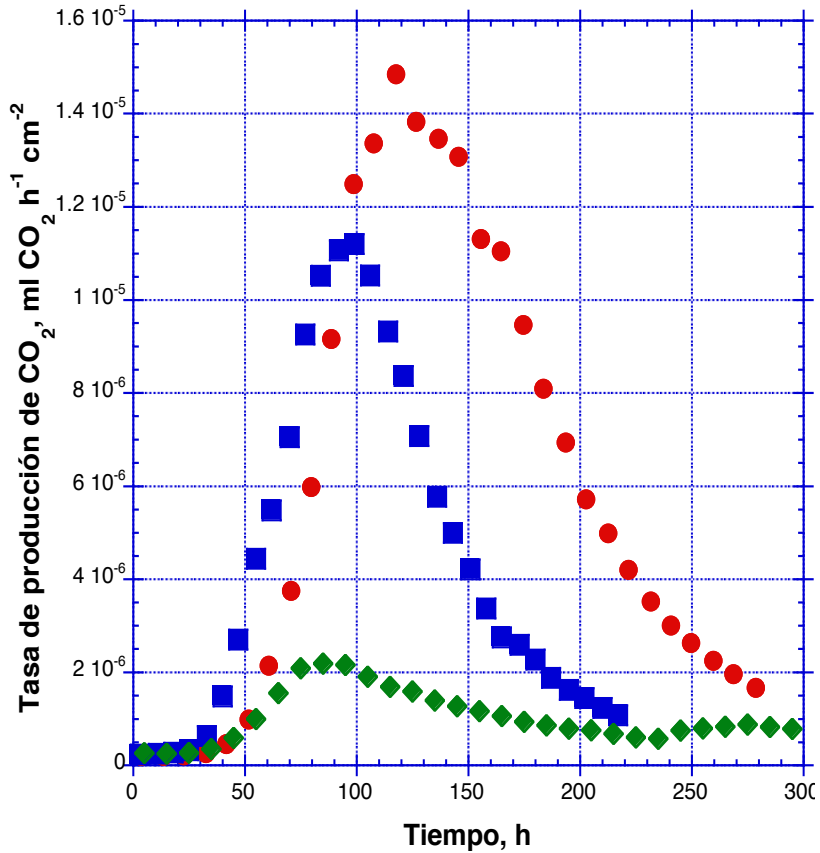


Figura 25. Evolución de la tasa de producción (arriba) y acumulación de CO₂ (abajo) durante el crecimiento de *A. niger* A10 en caja Petri modificada a 25 g/L de glucosa (●), 25 g/L de glucosa más 5 g/L de glicerol (■) y 5 g/L de glicerol (◆).

6.3.1.2 Un análisis del efecto de la mezcla de glucosa y ácido oxálico sobre metabolismo de *Aspergillus niger*.

El ácido oxálico es producido por una gran variedad de hongos. La biosíntesis de este ácido parece ser una estrategia del *A. niger* y otros hongos para acidificar su ambiente a través de la excreción del mismo mediante la glucosa oxidasa, que facilita el transporte de los ácidos orgánicos al exterior una vez que éstos se han acumulado intracelularmente (Ruijter, *et. al.*, 1999). Pero esta excreción puede no deberse a su uso como una herramienta de adecuación del medio por el microorganismo, si no, a una forma de liberación de un exceso que puede llevar a la intoxicación (Villadsen, 2007). Hay muchos trabajos que describen como se lleva a cabo la formación del ácido (Clark, *et. al.*, 1966; Álvarez-Vázquez, *et. al.*, 2000; Goldberg, *et. al.*, 2006), pero no toman en consideración la utilización de éste mismo como fuente de carbono.

En la Figura 8 se observa que la formación de biomasa utilizando la mezcla glucosa-ácido oxálico es de la mitad de la biomasa producida cuando el crecimiento se lleva a cabo utilizando solo glucosa como fuente de carbono. La glucosa como sustrato en suma a la adición al medio de metabolitos primarios como el ácido oxálico, tiene efectos en la oxidación a CO₂ (Figura 21 y Figura 23). Una de las vías del metabolismo por la cual el ácido oxálico es asimilado; además de la ruta anaplerótica (Figura 19) para la fijación de CO₂, con lleva a la formaldehído, ácido fórmico y metanol (Andersen, 2008; Raistrick, 1919), en este caso el ácido oxálico no es aprovechado en la biosíntesis dando como resultado bajas cantidades de biomasa, producción de CO₂ y utilización de O₂ (Figura 26), lo que se traduce en un bajo CR.

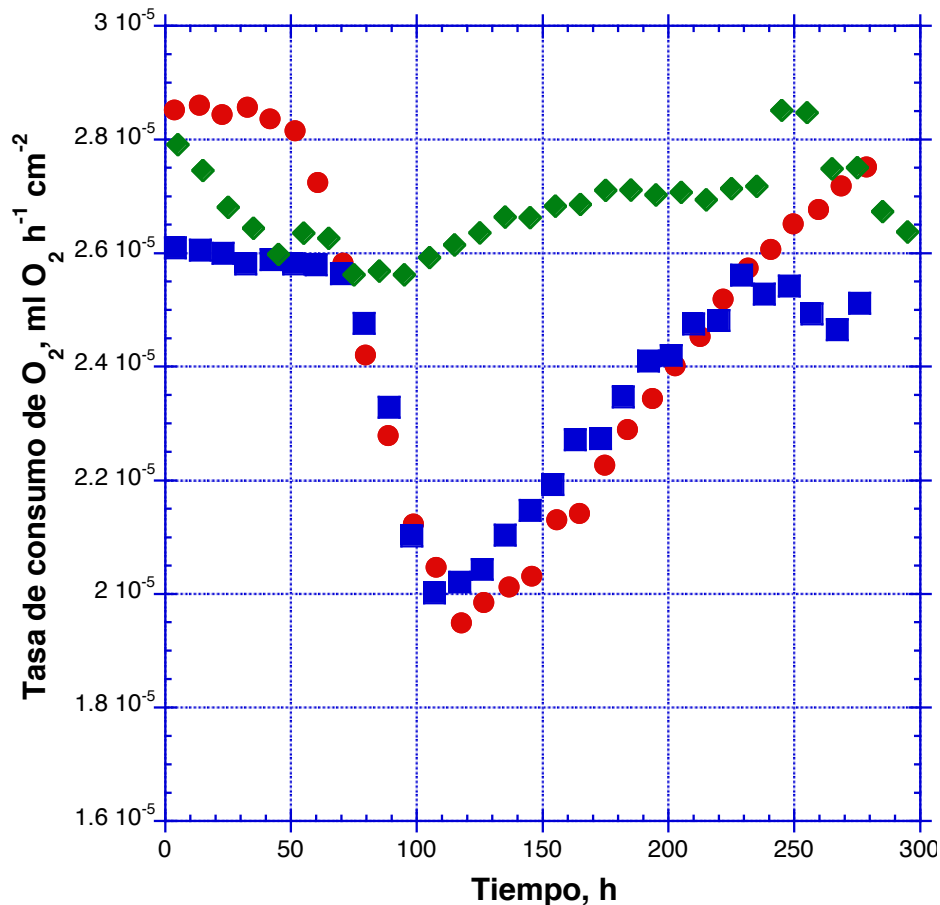


Figura 26. Evolución de la tasa de consumo de O_2 durante el crecimiento en caja Petri modificada de *A. niger* A10 a 25 g/L de glucosa (●), 25 g/L de glucosa más 5 g/L de ácido oxálico (▲) y 5 g/L de ácido oxálico (◆).

6.3.1.3 Un análisis del efecto de la mezcla de glucosa y ácido cítrico sobre metabolismo de *Aspergillus niger*.

El proceso de producción de ácido cítrico por *A. niger* es uno de los procesos industriales en biotecnología más viejos y más estudiados. La mayoría de los parámetros que permiten la obtención eficiente de este ácido orgánico han sido determinados de forma empírica. La acumulación del ácido cítrico puede deberse a la actividad de algunos metales traza y otros factores como la concentración y disponibilidad del carbono y nitrógeno, que activan o inhiben ciertas enzimas que alteran la acumulación del mismo (Sauer, *et. al.*, 2008). Esta acumulación en el *A. niger* tiene consecuencias, ya que el ácido cítrico es un potente inhibidor de la glicólisis, ya que inhibe a la fosfofructoquinasa (Legisa y Matthey, 2007).

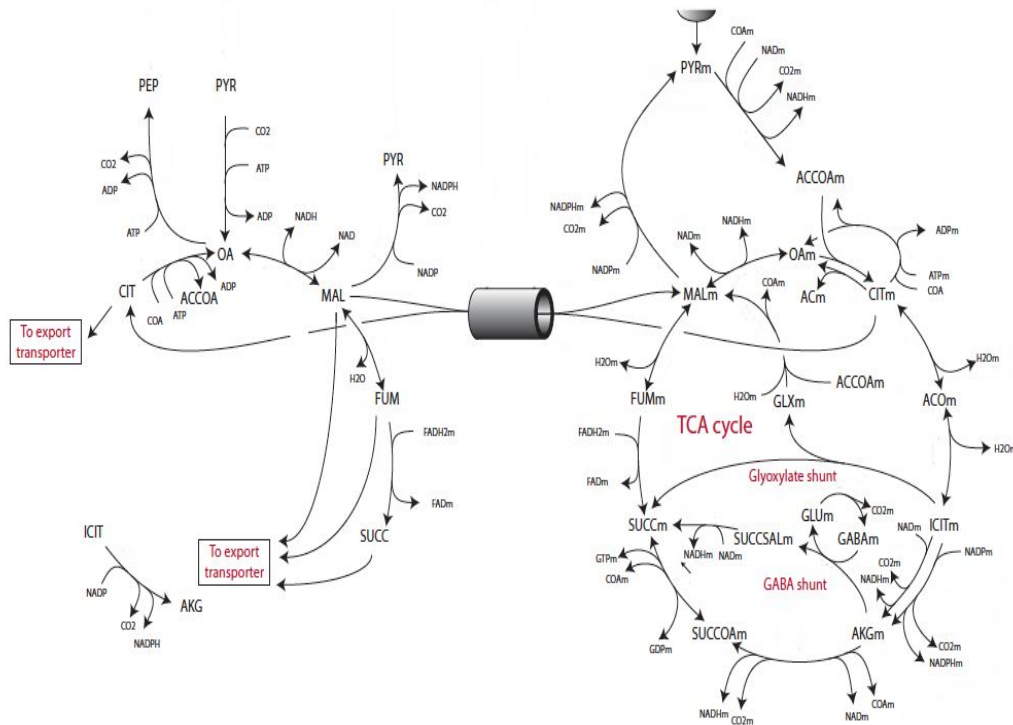


Figura 27. Reacciones del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del transporte y consumo de citrato en el citoplasma. (Imagen tomada y modificada de Andersen *et. al.*, 2008).

En la Figura 8 se puede observar que la velocidad de crecimiento de la biomasa en la fase exponencial, en comparación a la de la glucosa como única fuente de carbono, es menor para la mezcla con ácido cítrico, además de que la cantidad máxima de biomasa obtenida fue un poco mayor a la mitad. Por otro lado si se analizan los valores de CR obtenidos para la mezcla de glucosa – ácido cítrico y ácido cítrico solo (Figura 21 y Figura 23), se puede observar que estos son menores a los de la glucosa, además de que la emplearse al ácido cítrico como fuente de carbono hay una mayor utilización de CO_2 . Ahora bien al revisar las rutas del metabolismo del ácido cítrico se tiene que el consumo de ácido cítrico en el citosol formará oxaloacetato (Figura 27), el cual tiene tres posibles rutas a seguir: formar malato (que puede reingresar al TCA), formar fosfoenolpiruvato (para regresar a la glicólisis), 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 fijación de CO_2 ,

que participan en diversas reacciones, cuya suma determina el consumo de O₂ en la fosforilación oxidativa. 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 que ha sido asimilado la presencia del ácido cítrico reduce la cantidad de biomasa producida.

6.3.2 Un análisis del crecimiento bajo diversas fuentes de carbono.

La Tabla 5 se obtiene de analizar los parámetros de crecimiento de *A. niger* usando dos fuentes de carbono, en ella se presenta una comparación de la disponibilidad de los sustratos, la densidad máxima de biomasa obtenida en cada uno de estos experimentos, los rendimientos y el grado de reducción de la segunda fuente. La adición de una segunda fuente de carbono aumenta la cantidad de carbono inicial disponible, lo que se reflejaría en una mayor densidad de biomasa producida, sin embargo al graficar estos datos (Figura 28), se observa que para estos casos de estudio la cantidad máxima de biomasa no presenta una relación directa con la cantidad de carbono adicionado al medio, así mismo el rendimiento (Figura 29). Esto nos permite ver que no hay una clara relación como se observa al usar a la glucosa como única fuente de carbono.

Tabla 5. Datos del crecimiento de *A. niger* para experimentos con glucosa como sustrato principal más un segundo sustrato.

Sustratos	Carbono inicial disponible, mg/cm ²	Densidad máxima de biomasa, mg/cm ²	Rendimiento, Y _{x/s}	Grado de oxidación del 2º sustrato
Glucosa	15.90	5.42	0.34	2.3
Glucosa más Ácido Oxálico	18.03	3.09	0.17	1
Glucosa más Ácido Cítrico	18.89	4.84	0.26	3
Glucosa más Glicerol	19.02	5.22	0.27	4.7

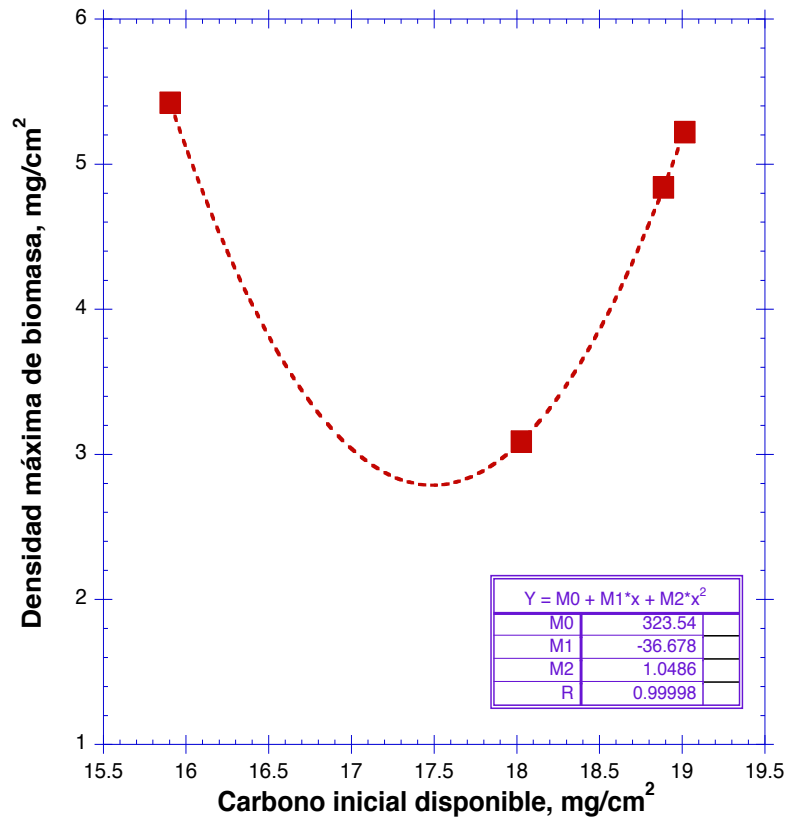


Figura 28. Densidad máxima de biomasa de *A. niger* en función de la cantidad de carbono inicial disponible.

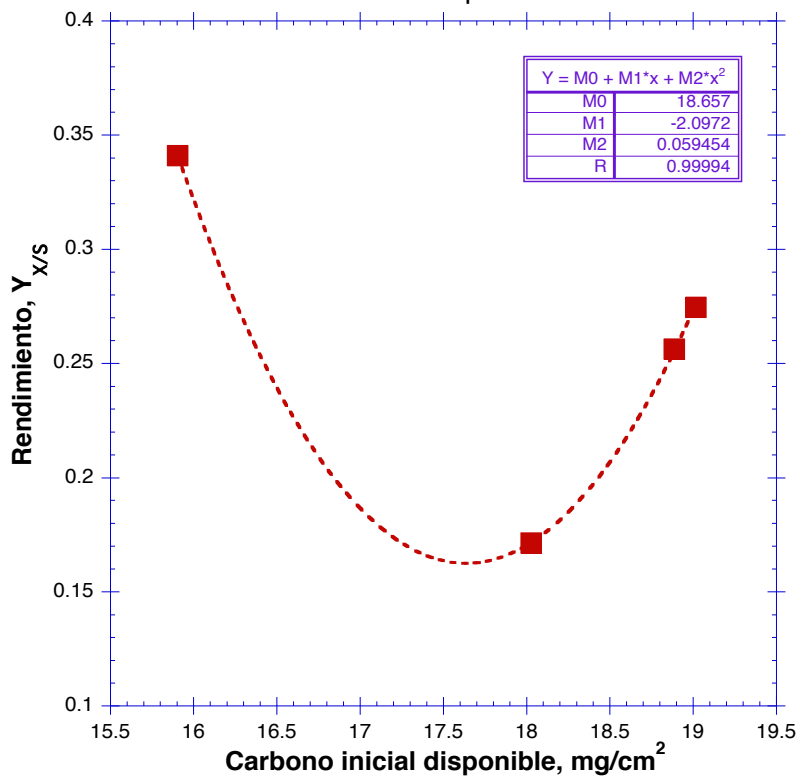


Figura 29. Rendimiento en función de la concentración de carbono inicial disponible.

Al realizar el mismo análisis en función del grado de oxidación de la fuente de carbono añadida, se puede apreciar en forma más clara los efectos de estos cambios sobre los parámetros medidos. En las Figura 30 y Figura 31 se presentan la densidad máxima de biomasa y rendimientos en función del grado de oxidación de la segunda fuente de carbono para estos experimentos. De los datos de la Tabla 5, se sabe que la densidad máxima de biomasa y el rendimiento máximos se presentan para cuando se tiene a la glucosa como única fuente de carbono, pero las figuras muestran la existencia de un máximo en un grado de oxidación de 4.

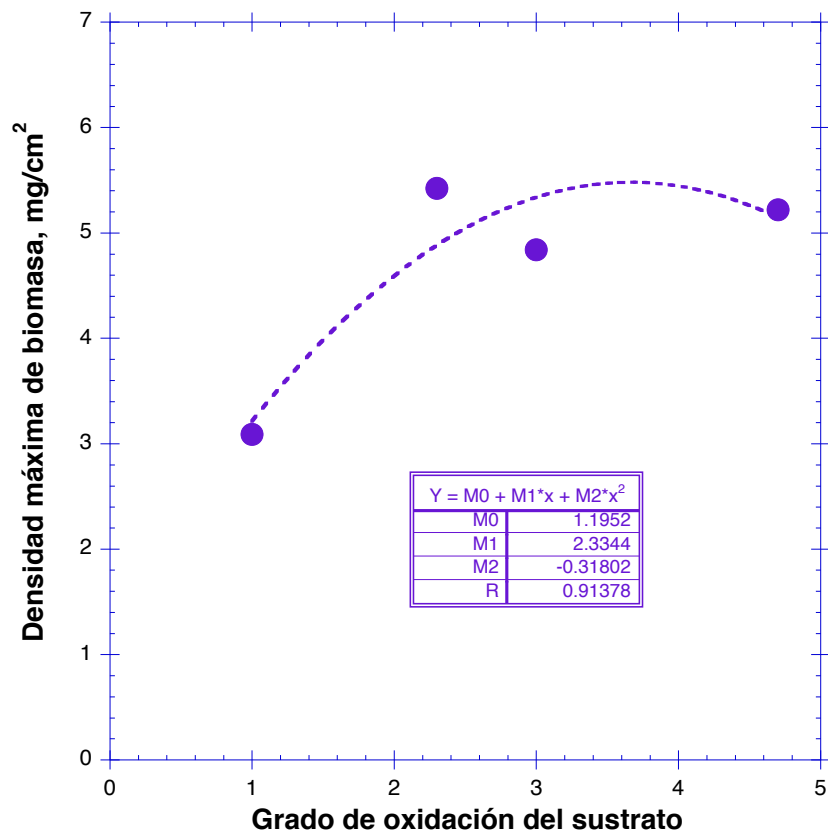


Figura 30. Densidad máxima de biomasa de *A. niger* en función del grado de oxidación del sustrato.

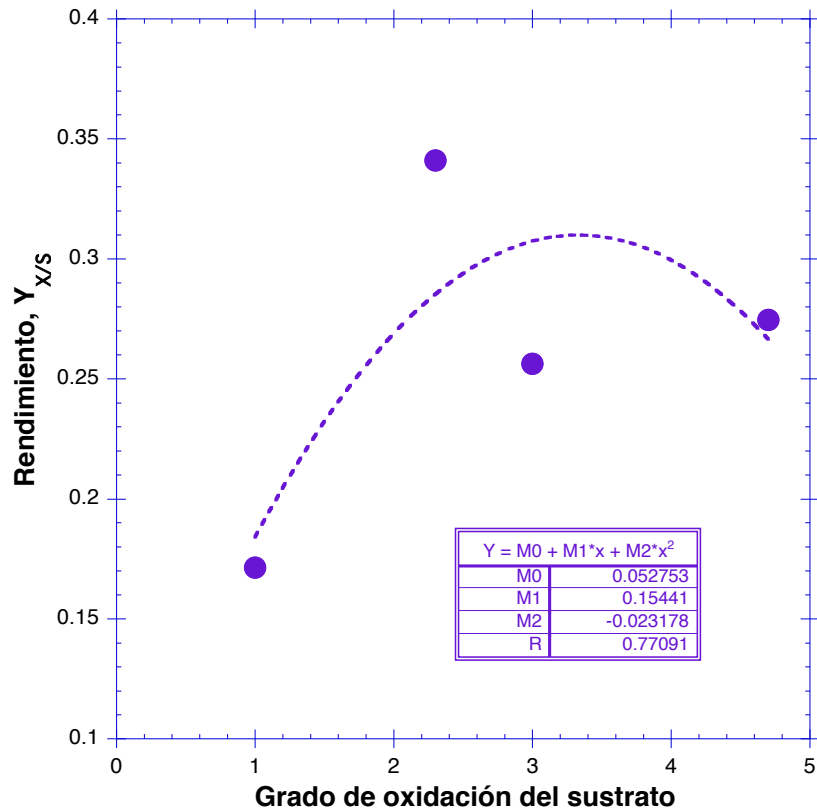


Figura 31. Rendimiento en función del grado de oxidación del sustrato.

6.3.3 Las variaciones en la concentración de iones de manganeso y su efecto sobre la producción de CO₂.

Como se menciona anteriormente en este trabajo se llevó a cabo el crecimiento de *A. niger* A10 a diferentes concentraciones de manganeso añadido al medio, la Figura 32 presenta la tasa de producción de CO₂ durante el crecimiento de *A. niger* en crecimiento con glucosa (25 g/L) como fuente de carbono variando la concentración de iones de manganeso en el medio (0.21 y 0.05 mg/L Mn⁺²).

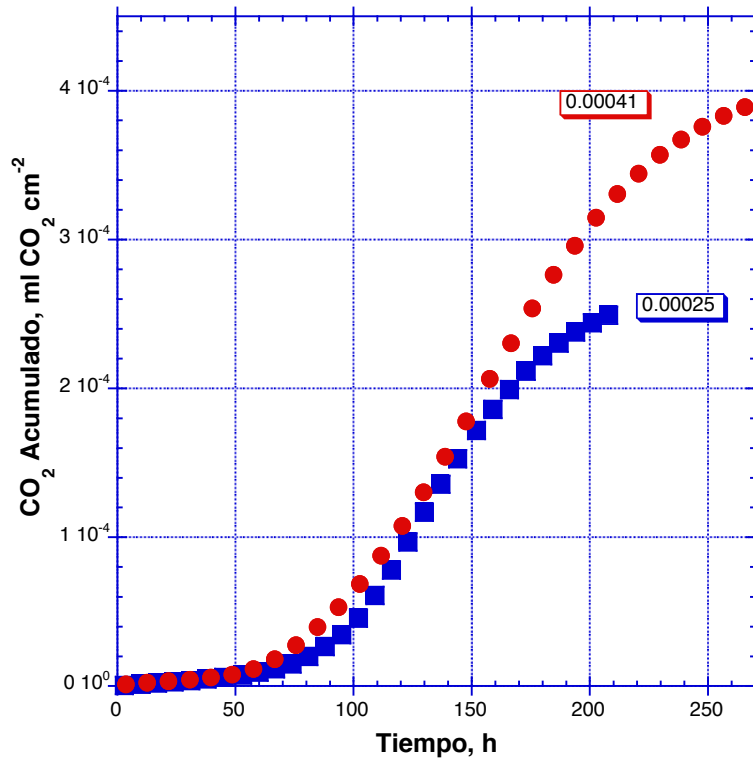
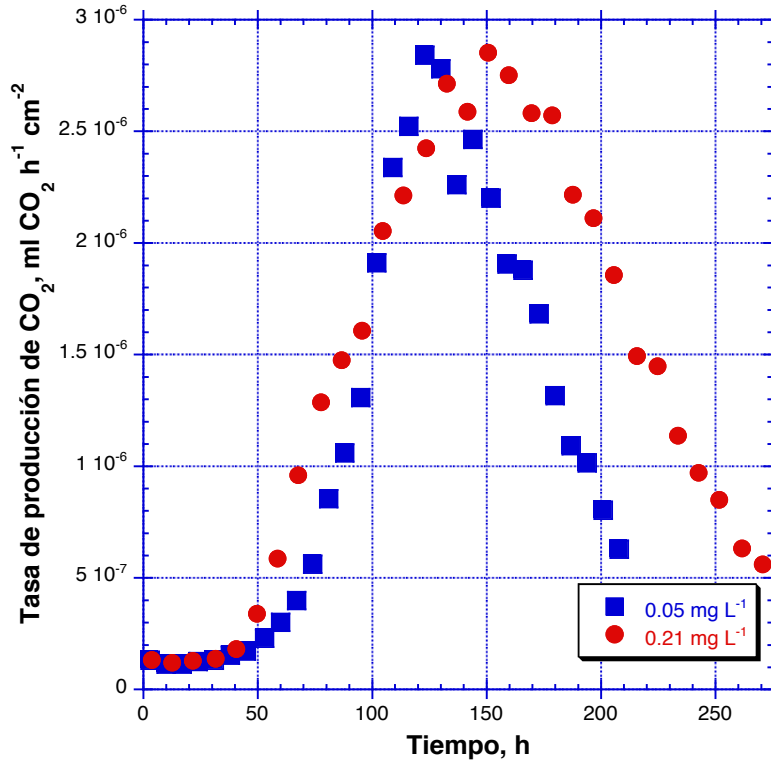


Figura 32. Evolución de la tasa de producción de CO₂ (arriba), y de la acumulación del CO₂ (abajo) durante el crecimiento de *A. niger* A10 variando la concentración de iones de Mn⁺² adicionados al medio, 0.05 (■) y 0.21 mg/L (●), en caja Petri modificada a temperatura ambiente.

En la Figura 9 se presentaron los resultados del seguimiento de la producción de biomasa *A. niger* A10, bajo las condiciones empleadas; en esta figura se puede ver que no hay un efecto de la concentración de iones de manganeso en el sistema hecho que se corrobora en la Figura 32, donde se presentan la tasa de producción de CO₂ cuando se usan dos distintas cantidades de sales de Mn, en esta se puede ver que la producción de CO₂ no varía de forma importante entre una cantidad de Mn y otra, el único efecto que se puede observar es que el CO₂ es producido 1.6 veces más a una concentración de Mn 0.21 mg/L. Por lo que se puede decir, que para los casos de estudio no se presenta un efecto notorio de la concentración de iones de manganeso en el sistema, pues podría deberse a que los cambios realizados son poco notorios en el metabolismo y el compuesto se encuentra siempre en exceso.

6.4 El efecto de los cambios en los parámetros físicos del sistema experimental de reacción.

6.4.1 El efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*.

Durante el crecimiento microbiano se genera calor que es conducido a través del medio sólido. Este produce gradientes de temperatura en el medio que como resultado se tiene un sistema en condiciones no isotérmicas que alteran el intercambio de calor en el medio y afectan el crecimiento.

6.4.1.1 El crecimiento a temperatura controlada.

Se llevaron a cabo experimentos de crecimiento de *A. niger* A10 en fermentación en estado sólido y bajo condiciones controladas de temperatura de 23 y 28°C. La Figura 33 (arriba) presenta el efecto de la temperatura en la tasa de generación y en la acumulación del CO₂ durante el crecimiento de *A. niger* en fermentación en estado sólido a una concentración inicial de glucosa de 25 g/L. En esta se puede observar que la temperatura tiene un efecto sobre el crecimiento modificando el tiempo de generación del CO₂ en su fase exponencial y modificando la amplitud de la curva de concentración, además de que al usar una mayor temperatura la cantidad máxima acumulada de CO₂ es 2 veces la de 5°C menos.

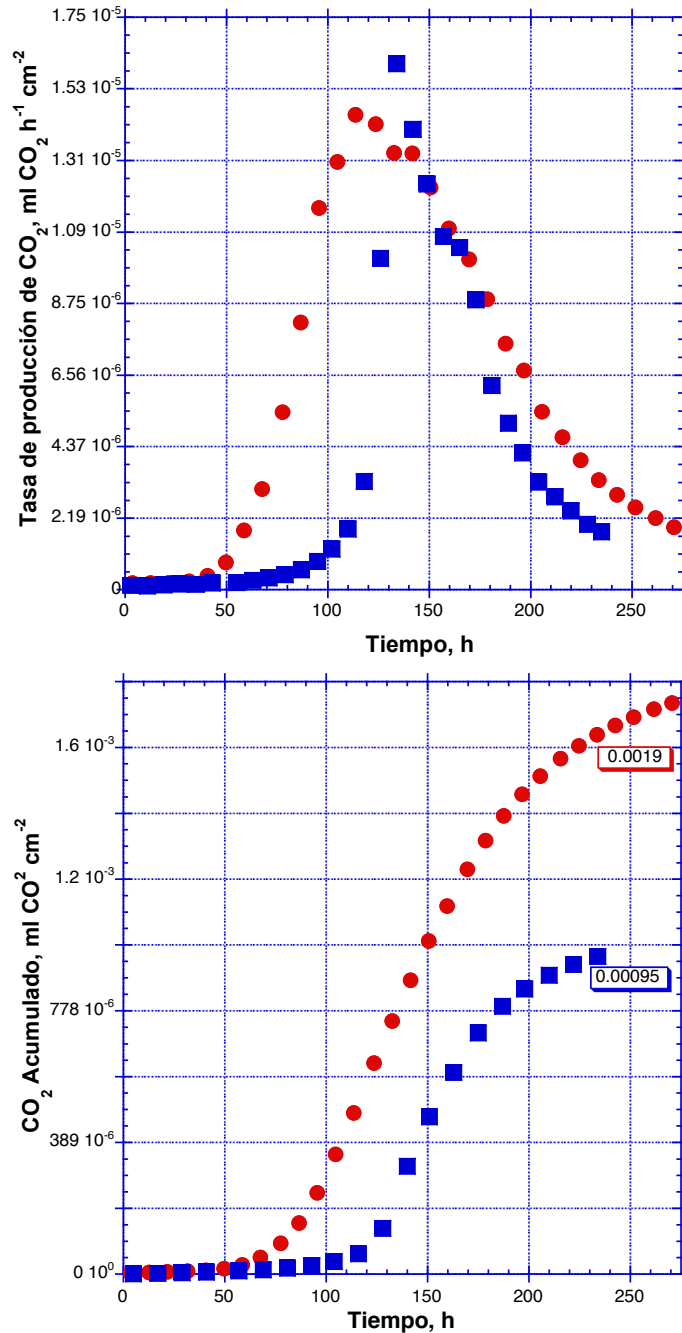


Figura 33. Evolución de la tasa de producción (arriba) y acumulación de CO₂ (abajo) durante el crecimiento de *A. niger* A10 a temperaturas de 23 (■) y 28°C (●), en caja Petri modificada.

6.4.1.2 El crecimiento a temperatura ambiente.

Se llevó a cabo un experimento en caja Petri modificada a temperatura ambiente en el que se creció superficialmente sobre agar a *A. niger* A10. En este

experimento se midió la emisión de CO₂ y se observó el efecto sobre este de los ciclos diurno y nocturno. En la Figura 34 se puede observar que los ciclos del día y la noche no tienen un efecto sobre la cantidad de CO₂ producido, solo se generan pequeñas oscilaciones. Pero al comparar con los cocientes respiratorios de obtenidos en temperaturas controladas podemos apreciar que este gas se produce en menor cantidad en condiciones de temperatura ambiente lo que nos da una idea clara si el efecto es debido al cambio de la condición en el medio de cultivo o a las variaciones en la temperatura que dependen de la hora del día y estación del año (Figura 35). Por otro lado se puede ver el tiempo en el que la producción de CO₂ llega a la fase exponencial es menor a medida en que aumenta la temperatura, además el cociente respiratorio incrementa y por lo que hay un alto consumo de O₂ en la transformación del sustrato.

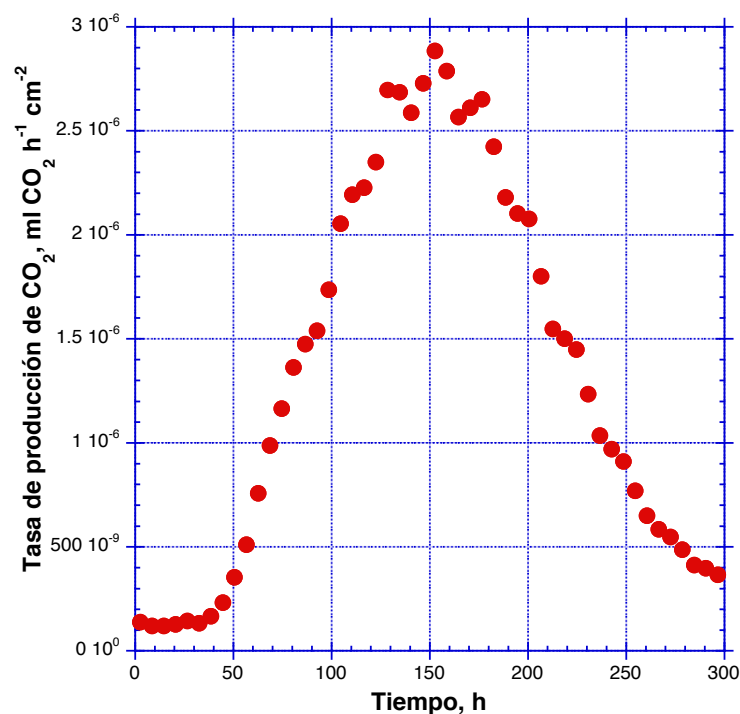


Figura 34. Evolución de la tasa de producción de CO₂ durante el crecimiento de *A. niger* A10 a temperatura ambiente.

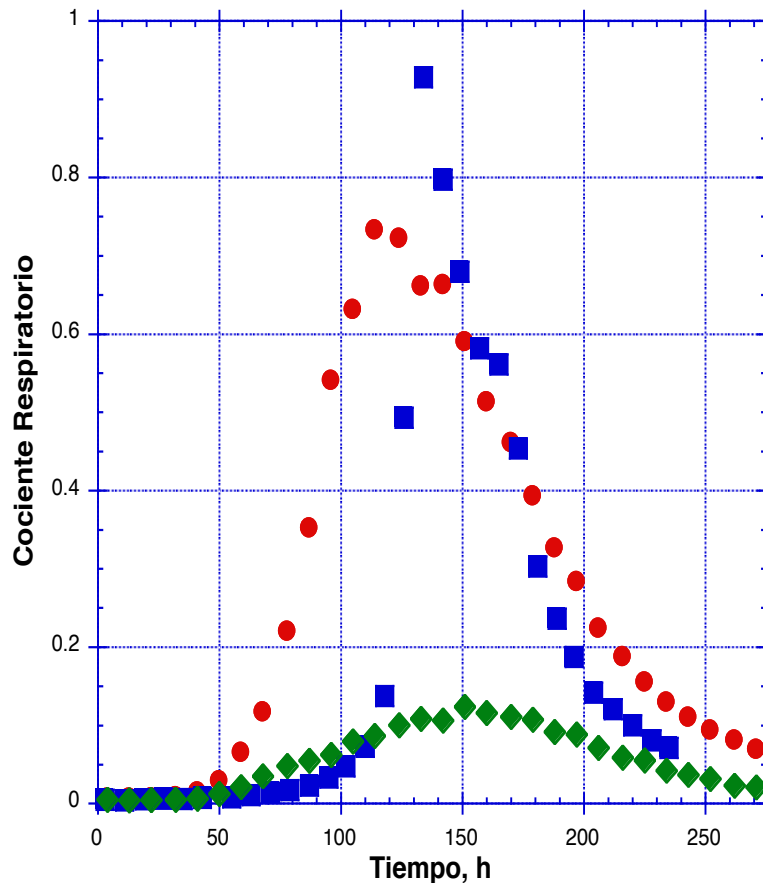


Figura 35. Evolución del cociente respiratorio durante el crecimiento de *A. niger* A10 a temperatura de 23 (■), 28°C (●) y ambiente (◆).

6.4.2 El uso de membranas permeables y su efecto sobre la producción de CO₂.

A pesar del número de publicaciones que tratan de la fermentación en estado sólido (FES) y cultivo superficial, es difícil sacar conclusiones generales a partir de los datos presentados. Esto se debe a que la falta de estandarización en los procesos experimentales reportados, no permite realizar una comparación objetiva de los resultados. Los trabajos de investigación realizados hasta ahora se han centrado en reportar la producción de enzimas, metabolitos y esporas, y el crecimiento de diversos hongos sobre diversos sustratos sólidos al utilizar este tipo de cultivos (Vicini, *et. al.*, 2001). Uno de los problemas en el estudio de

hongos filamentosos en crecimiento superficial, es la cuantificación de la biomasa, ya que el micelio se adhiere a la matriz sólida, dificultando su separación.

En este trabajo la medición de la biomasa se llevó a cabo con el crecimiento del microorganismo en una caja Petri convencional, donde se colocó sobre el agar una membrana semipermeable de celofán. El uso de la membrana de celofán permite el crecimiento del microorganismo y evita la adhesión del hongo debida a la penetración de las hifas al medio de cultivo, pero al mismo modo supone una barrera al libre paso de los nutrientes del medio hacia el microorganismo y aprovechamiento de los mismos, para verificar esta hipótesis se llevaron a cabo experimentos en la caja Petri modificada para llevar a cabo el seguimiento del CO₂ en condiciones similares a las de las cajas Petri convencionales.

En la Figura 36, se muestra la tasa de producción CO₂ al llevar a cabo el crecimiento de *A. niger* en un medio de cultivo enriquecido con 250 g/L glucosa con y sin membrana de celofán. En ella se puede observar que el CO₂ en el experimento en el que se usó el papel celofán mantiene una tasa de producción constante después de la fase exponencial del crecimiento (50 hrs), esto no ocurre cuando se elimina la membrana, ya que una vez transcurridas 150 horas la tasa de CO₂ generado durante este experimento decae, para presentar fluctuaciones posteriormente. En la Figura 37 se puede observar que la tasa de consumo del O₂ al utilizar y no usar la membrana de celofán, en esta se presenta un comportamiento inverso al de la producción de CO₂. Además al integrar la tasa de consumo de O₂, se obtiene que el oxígeno total consumido es mayor cuando no se usa la membrana.

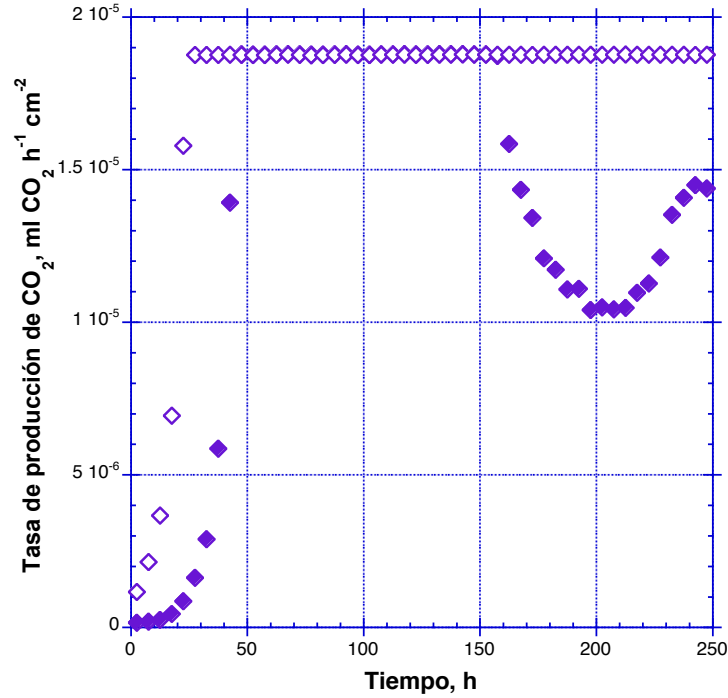


Figura 36. Evolución de la tasa de producción de CO₂ durante el crecimiento de *A. niger* A10 en caja Petri modificada con 150 mL de medio de cultivo y 250 g/Lde glucosa, sin usar (◆) y usando (◇) una membrana permeable de celofán.

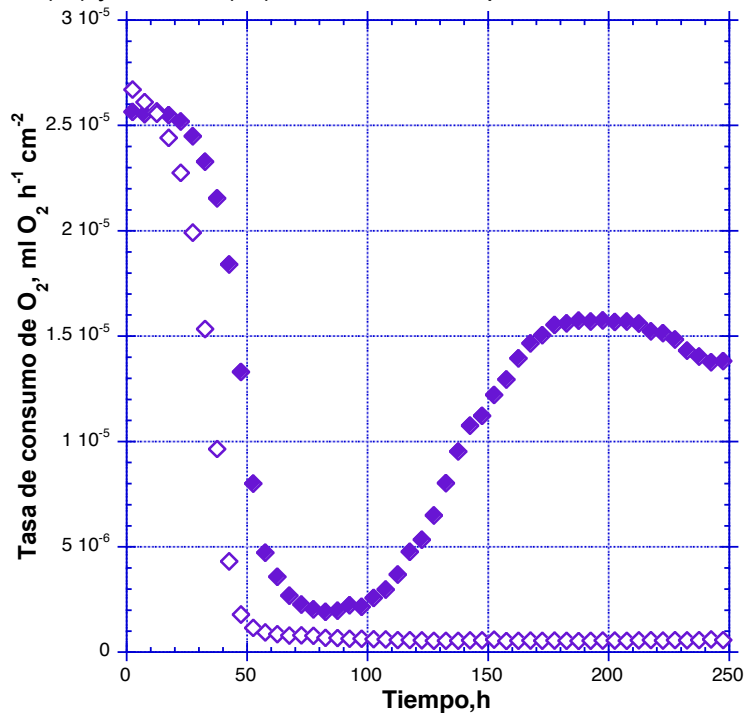


Figura 37. Evolución de la tasa de consumo de O₂ durante el crecimiento de *A. niger* A10 en 150 mL de medio de cultivo con 250 g/Lde glucosa, sin usar (◆) y usando (◇) una membrana permeable de celofán.

Estos experimentos nos permiten ver que la membrana semipermeable de celofán tiene un efecto en el metabolismo y en el crecimiento del micelio, lo que se demuestra al limitar la generación de biomasa a una capa de baja densidad (16.5 mg/cm^2) y al presentar un bajo consumo de oxígeno ($0.101\% \text{ O}_2 \text{ cm}^{-2}$), una producción de CO_2 baja ($0.36\% \text{ CO}_2 \text{ cm}^{-2}$) y a una lámina muy delgada de agar con sustrato, que según los Nopharatana *et. al.* (2003) se limita a 0.1 cm cuando el crecimiento del hongo es el tipo penetrativo al llevarse a cabo sin obstáculos y penetrando hasta una distancia de 0.4 cm. El cultivo sin membranas presenta un consumo mayor de oxígeno ($0.329\% \text{ O}_2 \text{ cm}^{-2}$).

Se puede decir que, además de limitar el paso del microorganismo a la matriz del agar, la membrana de celofán restringe los procesos de translocación del sustrato que normalmente ocurren desde las hifas penetrantes en el agar hacia las hifas vegetativas o aéreas situadas por encima del agar.

6.4.3 La variación del área específica de la placa de agar y su efecto sobre la producción de CO_2 .

En este trabajo se llevaron a cabo experimentos usando dos distintos volúmenes de medio, es decir, modificando el área específica del cultivo. En la Figura 38 se presenta la evolución en la tasa de producción de CO_2 al hacer crecer *A. niger* en un medio de cultivo sólido con 25 g/L de glucosa como sustrato con un volumen de 75 y 150 mL. En esta figura se observa que el CO_2 generado en el experimento con un volumen de 75 mL (área específica, $A/V=1.5$) de medio alcanza un máximo con mayor rapidez que cuando se utiliza un volumen de medio de cultivo de 150 mL ($A/V=0.75$), también se observa que el decaimiento en la velocidad de CO_2 tiene mayor rapidez que para el volumen mayor. A medida que el volumen de medio se disminuye la relación A/V el CR también disminuye a pesar de aumentar la cantidad de sustrato disponible en el medio.

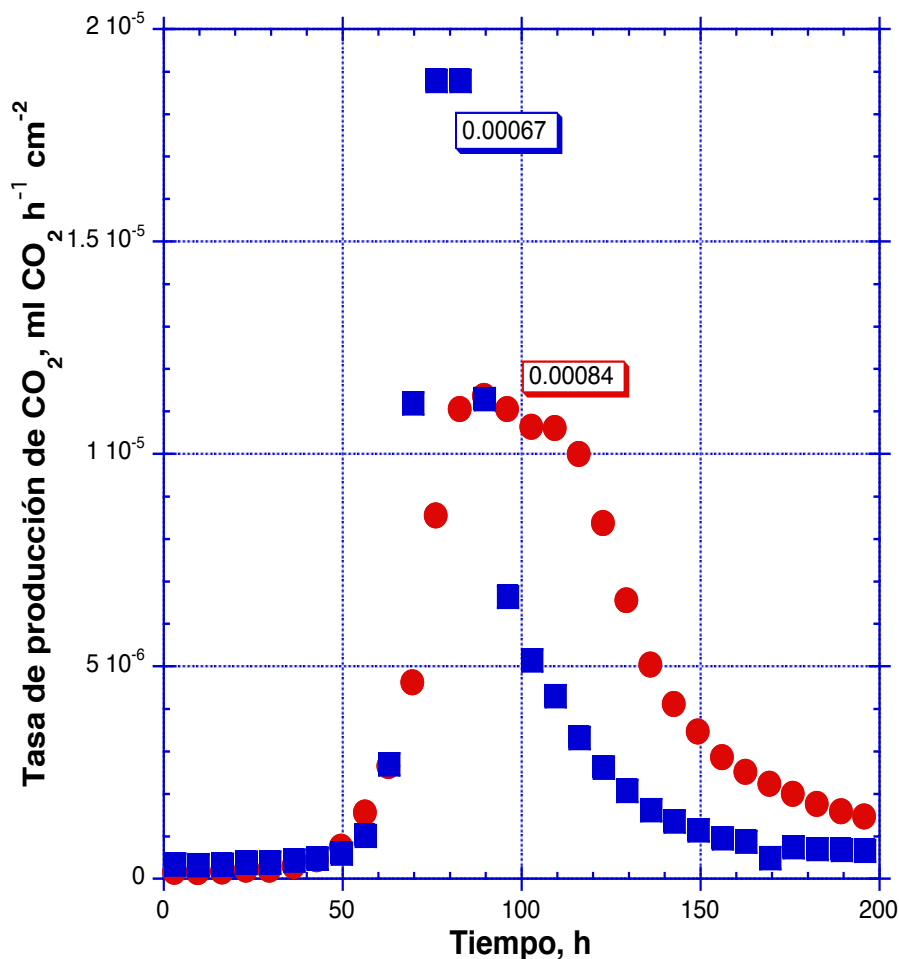


Figura 38. Comparación de la evolución tasa de producción de CO₂ durante el crecimiento de *A. niger* A10 con 75 (A/V=1.5 cm⁻¹) (■) y 150 (A/V=0.75 cm⁻¹) (●) mL de medio de cultivo con 25 g/L de glucosa en caja Petri modificada.

Al llevar a cabo el mismo experimento variando la cantidad de glucosa (250 g/L) (ver Figura 39) podemos observar que de igual manera que a 25 g/L, la rapidez en la generación de CO₂ es mayor cuando se tiene un menor volumen de medio, es decir, hay una mayor disponibilidad del sustrato para la manutención del microorganismo, además la cantidad máxima de CO₂ acumulado, para ambos casos, se obtiene cuando se emplea una relación A/V menor. Se puede decir, que la relación A/V modifica el grado de la oxidación del sustrato, ya que sí se analiza en término del CR este disminuiría con el área específica de la placa de agar.

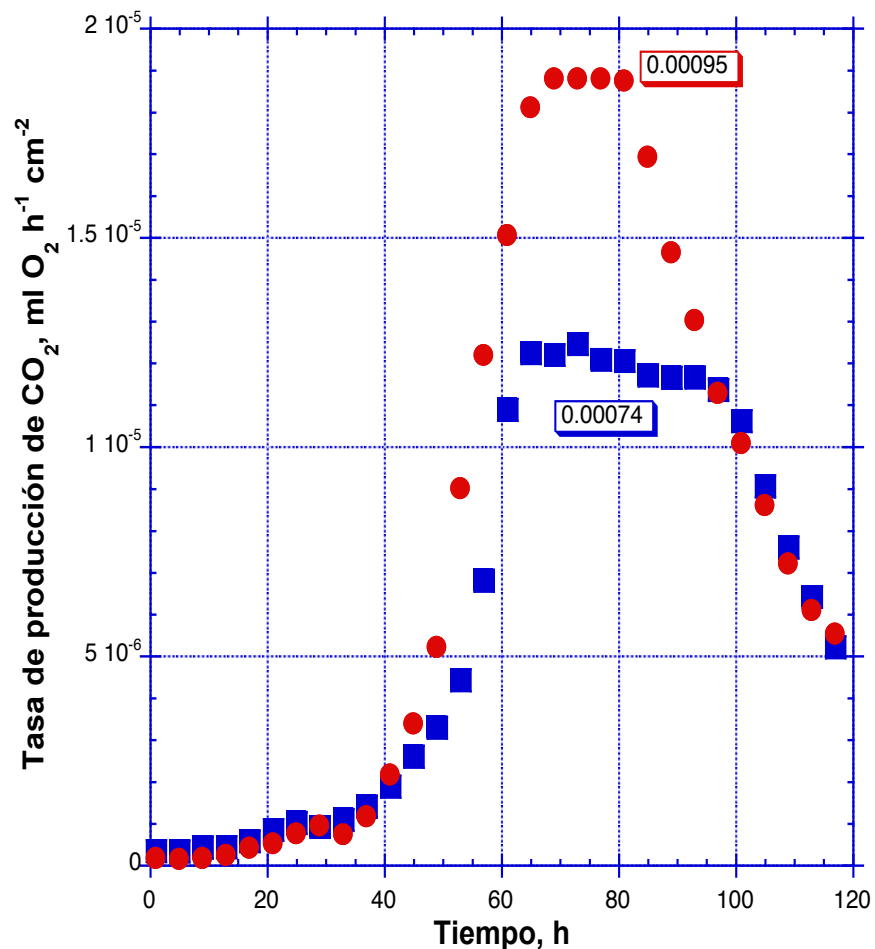


Figura 39. Comparación de la evolución tasa de producción de CO₂ durante el crecimiento de *A. niger* A10 con 75 (A/V=1.5 cm⁻¹) (■) y 150 (A/V=0.75 cm⁻¹) (●) mL de medio de cultivo con 250 g/L de glucosa en caja Petri modificada.

6.5 El Resumen de Resultados

En este trabajo se diseñó y construyó un sistema de biorreacción basado en una caja Petri convencional, pero cuyas modificaciones permiten la medición en línea de compuestos gaseosos que participan en el metabolismo de *A. niger* A10, gases que permiten conocer acerca del crecimiento del microorganismo. En los experimentos de crecimiento superficial sobre agar se midió conjuntamente la cantidad de biomasa y CO₂ producidos y el consumo de O₂ en la caja Petri modificada para la determinación del CR.

Los resultados obtenidos en la experimentación en las cajas Petri modificada y convencional bajo las diferentes perturbaciones, considerando a *A. niger* como un

sistema abierto, se analizan y discuten de forma cualitativa y con base en el metabolismo del microorganismo y con el uso de dos modelos previamente publicados, uno permite predecir de forma adecuada el crecimiento global de biomasa y el otro determinar la disponibilidad energética en algunos de los casos de estudio. Estos modelos se emplean como herramientas para dar una mejor interpretación de los resultados experimentales, el primer modelo aunque es un modelo que describe globalmente al crecimiento, predice además el crecimiento radial de la colonia de hongo, el segundo es un modelo estructurado simplificado que considera las principales rutas metabólicas del microorganismo así como las producciones de ATP, NAD^+ y NADP^+ , brinda información sobre estos procesos celulares. Los experimentos realizados permitieron una comparación cualitativa con las predicciones de estos modelos.

De los resultados experimentales se observa que al utilizar a la glucosa como fuente de carbono y modificar la cantidad de la misma, se presenta un efecto notorio sobre la generación de biomasa, además de que se modifican las propiedades y los parámetros de transporte de los nutrientes en el medio, tal como el coeficiente de difusión efectiva. En los experimentos realizados en este estudio la tasa de producción de biomasa es mayor a altas concentraciones de fuente de carbono, de forma que el crecimiento de *A. niger* esta limitado debido al suministro del sustrato inicial que afecta las reacciones del metabolismo del microorganismo así como también a la asimilación de la glucosa.

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 se observa un menor crecimiento y cambios en el CR para cada mezcla de sustratos esto puede traducirse en una lenta etapa de adaptación al medio y utilización de las fuentes de carbono como generadores de energía, además de que la ausencia de glucosa se observa un crecimiento menor, ya que las rutas del metabolismo que permiten la asimilación de los mismos son distintas para cada uno de los casos de forma tal que la oxidación de los sustratos es diferente para cada uno de ellos y el CO_2 esta siendo acoplado en las rutas

metabólicas en lugar de ser generado, el grado de oxidación de estos compuestos no está relacionado a la generación de energía como ATP.

En este trabajo se llevó a cabo el crecimiento de *A. niger* a diferentes concentraciones de manganeso añadido al medio, a pesar de que el manganeso es un metal requerido en el metabolismo para la asimilación de las fuentes de carbono y generación de ATP, para los casos de estudio no se presenta un efecto notorio de la concentración de iones de manganeso en el sistema.

Los cambios controlados en la temperatura presentan una variación en el aprovechamiento del O₂ y la producción de CO₂ para el crecimiento de *A. niger*, al realizar el crecimiento del microorganismo a temperatura ambiente el crecimiento se ve desfavorecido.

Los aspectos físicos del medio como son el uso de membranas semipermeables y la variación en el área específica de la placa de agar son condicionales del crecimiento del microorganismo, para el caso del uso del papel celofán se tiene que al implementar en el sistema este componente se añade una barrera al paso de los nutrientes que puede dosificar la cantidad de sustrato modificando el crecimiento además de que se impide el libre crecimiento del microorganismo en el agar. El incremento en el volumen de medio aumenta la cantidad de sustrato presente, y a pesar de que el microorganismo cuenta para su crecimiento con la misma área de contacto para el caso de mayor y menor volumen, el transporte del sustrato al interior de las células se ve modificado.

Ya que en este trabajo los resultados obtenidos se discuten de forma cualitativa con base en el metabolismo de *A. niger*, se propone una experimentación más detallada en la que se monitoreen los metabolitos excretados al medio y como esta producción se afecta debido a las perturbaciones en el sistema de reacción, de esta forma se podrán establecer de forma más precisa los efectos de tales perturbaciones.

Conclusiones

Se demostró que es posible el monitoreo en línea de CO_2 y O_2 para el análisis del CR de cultivos de *A. niger* crecidos en placas de agar. Este resulta ser un sistema modelo sencillo y barato para el análisis del metabolismo de los hongos crecidos sobre superficies sólidas.

Se demostró que los cambios en la concentración de la fuente de carbono (glucosa), modifican la generación de biomasa por *A. niger*, siendo afectado por altas concentraciones al disminuir la cantidad de biomasa máxima producida.

Se demostró que es posible reducir drásticamente el cociente respiratorio (CR) de *A. niger* crecido en una superficie sólida, mediante la adición de sustratos distintos de la glucosa (ácidos oxálico, cítrico y glicerol) y por lo tanto, que se puede manipular su metabolismo de una forma compatible con la fijación de dióxido de carbono por la inversa de la descarboxilación del piruvato, ya que estos sustratos alternativos pueden ser alimentadores de dicha reacción.

Se demostró que la presencia de una membrana semipermeable de celofán limita el crecimiento del micelio a una capa de biomasa poco densa, esto se asocia aún bajo consumo total de oxígeno. En cambio, el cultivo sin membrana produjo un consumo máximo de oxígeno 3 veces mayor. Estos resultados muestran la importancia de las barreras físicas para la expansión del micelio y concuerdan con los estudios de crecimiento de micelio penetrante desarrollados por otros autores.

Con la disminución del CR con la disminución en el área específica de la placa de agar se demostró que la relación A/V (área específica) modifica el grado de la oxidación del sustrato. Del mismo modo el cambio en la temperatura del sistema altera la producción de CO_2 por ende el CR se modifica.

Como conclusión general se tiene: que el metabolismo de *A. niger*, caracterizado por el CR y crecido sobre superficies sólidas, puede manipularse

mediante cambios en: la naturaleza de los sustratos, las barreras físicas para la expansión del micelio en el sustrato, el área específica del soporte sólido y la temperatura del sistema.

Referencias

- Álvarez-Vázquez F., González-Alarcón C. y Torres N.V. (2000) **Metabolisms of citric acid production by *Aspergillus niger*: Model definition, steady-state analysis and constrained optimization of citric acid production rate.** *Biotechnology and Bioengineering* 70, 82-108.
- Andersen M.R. (2008) **Sistem 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 the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*.** *Molecular Systems Biology* 4(178),1-13.
- Atkinson D.E. (1965) **Biological feedback control at the molecular level.** *Science* 150, 851-857.
- Atkinson D.E. (1969) **Regulation of enzyme function.** *Annual Review of Microbiology* 24, 47-68.
- Bellon –Maurel V., Orliac O. y Christen P. (2003) **Sensors and measurements in solid-state fermentation. A review.** *Process Biochemistry*, 38, 881-896.
- Bowes I. y Matthey M. (1979) **The effect of manganese and magnesium ions on mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from *Aspergillus niger*.** *FEMS Microbiology Letters*, 6, 219-222.
- Canela A.B., van Gulik W.M., 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.
- Carter B.L.A. y Bull A.T. (1971) **The effect of oxygen tension in the medium on the morphology and growth kinetics of *Aspergillus nidulans*.** *Journal of General Microbiology* 65, 265-273.
- Chassagnole Ch., Noisommit-Rizzi N., Schmid J. W., Mauch K., Reuss M. (2002). **Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*.** *Biotechnology and Bioengineering* 79, 53-73.
- Clark D.S., Ito K. y Horitsu H. (1966) **Effect of manganese and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses.** *Biotechnology and Bioengineering* 8, 465-471.
- Cleland W. y Johnson M. (1954) **Tracer experiments on the mechanism of citric acid formation by *Aspergillus niger*.** *The Journal of Biological Chemistry*, 208:679-690.

Collatz, L. (1966). **The numerical treatment of differential equations**. 3^a Ed. Springer-Verlag, Berlín.

Cui Y.Q., van der Lans R. G.J.M. y Luyben K.C.A.M. (1997) **Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation**. *Biotechnology and Bioengineering* 55(5), 715-726.

Currie J.N. (1917) **The citric acid fermentation of *Aspergillus niger***. *The Journal of Biological Chemistry* 31(1), 39.

David H., Akesson M. y Nielsen J. (2003) **Reconstruction of the central carbon metabolism of *Aspergillus niger***. *European Journal of Biochemistry* 270(21), 4243-4253.

Deacon J.W. (1993) **Introducción a la micología moderna**. Ed. Limusa, México.

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(5), 899-908.

Escamilla-Silva E.M., Gutierrez G.F., Dendooven L., Jiménez I. H. y Ochoa-Tapia J.A. (2001) **A method to evaluate the isothermal effectiveness factor for dynamic oxygen into mycelial pellets in submerged cultures**. *Biotechnology Progress* 17:95-103.

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, New York.

Gheshlaghi R., Scharer J. M. Moo-Young M. y Douglas P.L. (2007) **Metabolic flux analysis for optimizing the specific growth rate of recombinant *Aspergillus niger***. *Bioprocess Biosystem Engineering* 30, 397-418.

Goldberg I., Rokem J.S. y Pines O. (2006) **Organic acids: old metabolites, new themes**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81, 1601-1611.

Gooday G.W. (1995) **The dynamics of hyphal growth**. *Mycology Research*, 99 (4), 385-394.

Gottschalk G. (1979) **Bacterial metabolism**. Springer-Verlang, Nueva York.

Grimm L.H., Kelly S., Krull R. Y Hempel D.C. (2005) **Morphology and productivity of filamentous fungi**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 375-384.

Gupta S. y Sharma G.B. (2002) **Biochemical studies of citric acid production and accumulation by *Aspergillus niger* mutants.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18, 379-383.

Haq I.U., Ali S. Qadder M.A. y Iqbal J. (2002) **Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses bases media.** *Process Biochemistry* 37, 1085-1090.

Heijnen J.J. y Roels J.A. (1981) **A macroscopic model describing yield and maintenance relationships in aerobic fermentation processes.** *Biotechnology and Bioengineering*. 23, 739-163.

Hellendoorn L., Mulder H., van den Heuvel J. C., Ottengraf S.P.P. (1997). **Intrinsic kinetic parameters of the pellet forming fungus *Aspergillus awamori*.** *Biotechnology and Bioengineering* 58, 478-485.

Henrikensen, C.M., Christensen L.H., Nielsen J. y Villadsen J. (1996) **Growth energetics and metabolic fluxes in continuous cultures of *Penicillium crysogenum*.** *Journal of Biotechnology* 45,149-164.

Hölker U., Höfer M. y Lenz J. (2004) **Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 175-186.

Jakoby W.B., Bhat J.V., (1958). **Microbial metabolism of oxalic acid.** *Bacteriology Review* 22, 75-80.

Karaffa L. y Kubicek C.P. (2003) ***Aspergillus niger* citric acid accumulation: do we understand this well working black box?** *Applied Technology and Biotechnology* 61, 189-196.

Khazaei T., McGuigan A. y Mahadevan R. (2012) **Ensemble modeling of cancer metabolism.** *Frontiers in Physiology-Computational Physiology and Medicine* 3, 1-14.

Kisser M., Kubicek C.P. y Röhr M. (1980) **Influence of manganese on morphology and cell wall composition of *Aspergillus niger* during citric acid fermentation.** *Archives of Microbiology* 128, 26-33.

Krishna C. (2005) **Solid-state fermentation systems-an overview.** *Critical Reviews in Biotechnology* 25, 1-30.

Kubicek C.P. y Röhr M. (1977) **Influence of manganese on enzyme synthesis and citric acid accumulation by *Aspergillus niger*.** *European Journal of Applied Microbiology* 4, 167-173.

Lakshminarayan K., Chaudhary K., Etiraj S. y Tauro P. (1975) **A solid state fermentation method for citric acid production using sugar cane bagasse.** *Biotechnology and Bioengineering*, XVII, 291-293.

Larralde-Corona 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(3), 287-294.

Legisa M. y Matthey M. (2007) **Changes in primary metabolism leading to citric acid overflow in *Aspergillus niger*.** *Biotechnology Letters*, 29, 181-190.

Lehninger A. (1982) **Principles of biochemistry.** Worth Publishers, Nueva York.

Lockwood, L.B (1975) En: **The Filamentous Fungi.** Smith J.E. and Berry D.R. eds., Edward Arnold, London, Vol. 1, pp. 140-157.

López Isunza F., Larralde Corona P. y Viniegra Gonzalez G., (1997) **Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi.** *Chemical Engineering Science* 52, 2629-2639.

Luedeking R., 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.

Machida,M., Yamada,O. y Gomi,K. (2008) **Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future.** *DNA Research*. 15,173-183.

Makagiansar H.Y., AyaziShamlou P, Thomas C.R. y Lilly M.D. (1993) **The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*.** *Bioprocess Engineering* 9(2-3), 83-90.

Mark C.G. y Romano A.H. (1971) **Properties of the hexose transport systems of *Aspergillus nidulans*.** *Biochim. Biophys. Acta*, 249, 216-226.

Martinelli S.D. y Kinghorn J.R. (1994) ***Aspergillus*: 50 years on. Progress in industrial microbiology.** Volumen 29, ElsevierScience B. V.

Matthey M. (1992) **The production of organic acids.** *Critical Review in Biotechnology* 12, 87-132.

Melzer G. Esfandabadi M.E., Franco-Lara E., Wittmann Ch. (2009) **Flux design: *In silico* design of cell factories based on correlation of pathway fluxes to desired properties.** *BMC Systems Biology* 3, 120, 1-16.

Nielsen J. (1995). **Physiological engineering aspects of *Penicillium chrysogenum*.** Polyteknisk Forlag, Denmark.

Nielsen J. y Krabben P. (1995) **Hyphal growth and fragmentation of *Penicillium chrysogenum* in submerged culture.** *Biotechnology and Bioengineering* 46(6), 588-598.

Nielsen J., Villadsen J. y Lidén G. (2003) **Bioreaction engineering principles.** Plenum Press, New York, 2ª edición.

Nopharatana M., Mitchell D. y Howes T. (2003) **Use of confocal scanning laser microscopy to measure the concentration of aerial and penetrative hyphae during growth of *Rhizopus oligosporus* on a solid surface.** *Biotechnology and Bioengineering*, 84(1)71-77.

Olsson S. (1994) **Uptake of glucose and phosphorus by growing colonies of *Fusarium xysporum* quantified by image analysis.** *Experimental Mycology* 18, 33-47.

Olsvik E.S. y Kristiansen B. (1992) **Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth.** *Biotechnology and Bioengineering* 40:1293-1299.

Ooijkaas L.P., Weber F.J., Buitelaar R.M., Tramper J. y Rinzema A. (2000) **Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation production systems.** *TIBTECH* 18, 356-360.

Papagianni M. (2007) **Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling.** *Biotechnology Advances* 25, 244-263.

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.

Papagianni M., Matthey M. y Kristiansen B. (1994) **Morphology and citric acid production of *Aspergillus niger* PM1.** *Biotechnology Letters* 16, 929-34.

Papagianni M., Matthey M. y Kristiansen B. (1999) **The influence of glucose concentration on citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* in a batch and culture.** *Enzyme and Microbial Technology* 25, 710-717.

Pazouki M. y Panda T. (2000) **Understanding the morphology of fungi.** *Bioprocess Engineering* 22, 127-143.

Rahardjo Y.S.P., (2005). **Fungal mats in solid-state fermentation.** Tesis Doctoral, Universidad de Wageningen, Holanda.

Raimbault M. (1998) **General and microbiological aspects of solid substrate fermentation.** *Electronic Journal of Biotechnology* 1(3):174-188.

Raistrick H. y Clark A. B. (1919) **On the mechanism of oxalic acid formation by *Aspergillus niger***. *Biochem. Journal.* 33, 329-334.

Reyes-Ocampo I. (2006) **Difusión y crecimiento microbiano de *Aspergillus niger* sobre un medio sólido**. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana.

Reyes-Ocampo I., Castillo-Araiza C. y López-Isunza F. (2007) **A mathematical model of the growth of *Aspergillus niger* in a solid-state fermentation**. European Congress of Chemical Engineering, Book of abstracts.

Reyes-Ocampo, I., González-Brambila M. y López-Isunza F. (2013) **Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido**. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 12 (1) 41-56.

Rizzi M. Baltes M., Theobald U., Reuss M. (1997). **In vivo analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II Mathematical model**. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 592-608.

Rizzi M., Theobald U., Querfurth E., Rohrsch T. Baltes M., y Reuss M. (1996). **In vivo investigations of glucose transport in *S. cerevisiae***. *Biotechnology and Bioengineering* 49, 316-327.

Robson G.D., Bell S.D., Kuhn P.J. y Trinci P.J. (1987) **Glucose and penicillin concentrations in agar medium bellow fungal colonies**. *Journal of General Microbiology* 133, 361-367.

Ruijter G., van de Vondervoort P. y Visser J. (1999) **Oxalic acid production by *Aspergillus niger* an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese**. *Microbiology*, 145, 2569-2576.

Salazar M., Vongsangnak W., Panagiotou G., Anders M.R., Nielsen J. 2009. **Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data analysis**. *Molecular Genetic Genomics* 282, 571-586.

Sauer M., Porro D., Mattanovich D. y Bramduardi P. (2008) **Microbial production of organic acids expanding the markets**. *Trends in Biotechnology*, 26(2),100-108.

Schmid J. y Harold F.M. (1988) **Dual roles for calcium ions in apical growth of *Neurospora crassa***. *Journal of General Microbiology* 134, 2623-2631.

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 ^{13}C - ^{13}C coupling constrains on the isotopomer distribution in labeled biomass components**. *Metabolic Engineering* 1, 166-179.

Smith E. y Berry D.F. (1978) **Filamentous fungi**. Volumen 1, Editor Edward Arnold, Londres.

Thiele E. W. (1939). **Relation between catalytic activity and size of particle**. *Industrial and Engineering Chemistry* 31, 916-926.

Torres N.V., Riol-Cimas 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.

Torres N.V. y Voit E.O. (2002) **Pathway analysis and optimization in metabolic engineering**. Cambridge University Press.

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 VOCs biofiltration**. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, Vol. 10, No. 2, 225-233.

Verhoff F.H. y Spradlin J.E. (1976) **Mass and Energy Balance Analysis of Metabolic Pathways Applied to Citric Acid Production by *Aspergillus niger***. *Biotechnology and Bioengineering*, 18, 425-432.

Viccini G., Mitchel D.A., Boit S.D., Gern J.C., da Rosa A.S., Costa R.M., Dalsenter F.D.H., von Meien O.F. y Krieger N. (2001) **Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation**. *Food Technology and Biotechnology*. 39 (4), 271-294.

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

Volke Sepúlveda, T.L; Gutiérrez Rojas, M y Favela Torres, E. (2003) **Biodegradation of hexadecane in liquid and solid-state fermentations by *Aspergillus niger***. *Follow Bioresource Technology*, 87(1)

Wolschek M. F., Kubicek Ch. P. (1999) **Biochemistry of citric acid accumulation by *Aspergillus niger***. En *Citric Acid Biotechnology* (B. Kristiansen, M. Matthey y Linden J, eds), Pp. 11-32. Taylor & Francis, London.

Xu D.B., Madrid C.P. Röhr M. y Kubicek C.P. (1989) **The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger***. *Applied Microbiology and Biotechnology* 30, 553-558.

Young J.D., Henne K.L., Morgan J.A., Konopa A.E., Ramkrishna D. (2008). **Integrating cybernetic modeling with pathway analysis provides a dynamic, systems-level description of metabolic control**. *Biotechnology and Bioengineering* 100, 542-559.