

# **ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS EN MODELOS BIOMATEMÁTICOS: PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ITACÓNICO**

**Julio César Sánchez Rendón**

Universidad de Caldas  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología  
Manizales, Colombia  
2021

# **ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS EN MODELOS BIOMATEMÁTICOS: PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ITACÓNICO**

**Julio César Sánchez Rendón**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Biólogo**

Director (a):

Ph.D. Luis Gerónimo Matallana Pérez

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Alimentos y Agroindustria

Línea de Investigación:

Biología Computacional

Universidad de Caldas

Facultad de Ciencias exactas y Naturales, Departamento de Biología

Manizales, Colombia

2021

## Resumen

El ácido itacónico es una molécula orgánica con un mercado de 40,000 toneladas anuales y amplia variedad de usos industriales como aditivo de detergentes, productos farmacéuticos, herbicidas, removedor de resinas, compuestos dentales, entre otros. Esta sustancia se produce generalmente por fermentación del hongo *filamentoso Aspergillus terreus*, sin embargo, no se han propuesto modelos matemáticos detallados del comportamiento dinámico de los metabolitos involucrados en su producción. El presente trabajo muestra el desarrollo de un modelo matemático basado en red metabólica para la producción de ácido itacónico, con diferenciación entre compartimientos celulares y la incorporación del antiporte oxalacetato/*cis*-aconitato presente en la mitocondria. Los parámetros de este modelo matemático fueron calculados a partir del optimizador enjambre de partículas (Global optimization toolbox) y el integrador “ode15s” ambos presentes en Matlab® R2018, función objetivo de mínimos cuadrados y los datos experimentales obtenidos por Pretruccioli y Rychtera & Wase. El modelo presenta un ajuste considerable ( $R^2 = 0.6819$ ) para el mejor conjunto de datos. Así mismo, el modelo propuesto es capaz de describir la dinámica del proceso de fermentación de ácido itacónico a nivel de citosol y mitocondria, el cual no ha sido previamente reportado.

**Palabras clave:** ácido itacónico, modelo matemático, estimación de parámetros.

## Abstract

Itaconic acid is an organic molecule with a market of 40,000 tons per year and a wide variety of industrial uses such as detergent additive, pharmaceuticals, herbicides, resin remover, dental compounds, among others. This substance is generally produced by fermentation of the filamentous fungus *Aspergillus terreus*; however, detailed mathematical models of the dynamic behavior of the metabolites involved in its production have not been proposed. The present work shows the development of a mathematical model based on a metabolic network for itaconic acid production, with differentiation between cellular compartments and the incorporation of the oxaloacetate/*cis*-aconitate antiport present in the mitochondria. The parameters of this mathematical model were calculated with particle swarm optimizer (Global optimization toolbox) and the integrator "ode15s" both present in Matlab® R2018, least squares objective function and the experimental data obtained by Pretruccioli and Rychtera & Wase. The model presents a considerable fit ( $R^2 = 0.6819$ ) for the best data set. Likewise, the proposed model is able to describe the dynamics of the itaconic acid fermentation process at the cytosol and mitochondrial level, which has not been previously reported.

**Keywords:** itaconic acid, mathematical model, parameter estimation.

## Tabla de contenido

1. Introducción.....	7
2. Materiales y métodos.....	9
2.1. Producción bioquímica de ácido itacónico .....	9
2.2. Comportamiento cualitativo de la fermentación de ácido itacónico .....	11
2.3. Estructuración del modelo matemático.....	12
2.3.1. Metabolismo involucrado en la producción de ácido itacónico.....	12
2.3.2. Ecuaciones de transporte .....	13
2.3.3. Reacciones bioquímicas .....	17
2.3.4. Modelo dinámico de producción de ácido itacónico.....	19
2.4. Algoritmo de optimización .....	20
2.5. Problema de estimación de parámetros .....	21
3. Resultados.....	22
4. Discusión .....	27
5. Conclusiones y recomendaciones.....	29
5.1. Conclusiones.....	29
5.2. Recomendaciones.....	29
Referencias bibliográficas.....	30

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Molécula de ácido itacónico. ....	7
<b>Figura 2:</b> Ruta metabólica de producción de ácido itacónico, tomada de (Bentley & Thiessen, 1957).....	10
<b>Figura 3:</b> Ruta metabólica actual de producción de ácido itacónico, tomada de (Wierckx et al., 2020).....	10
<b>Figura 4.</b> Conjunto de datos 1, tomado de (Rychtera & Wase, 1981).....	11
<b>Figura 5:</b> Conjunto de datos 2, tomada de (Petruccioli et al., 1999). ....	12
<b>Figura 6:</b> Estados de unión proteína-sustratos el antiporte de dos, adaptado de (Becker & Kuznetsov, 2013).....	16
<b>Figura 7:</b> Ajuste de parámetros del modelo matemático de producción de ácido itacónico para el conjunto de datos 1. ....	23
<b>Figura 8:</b> Ajuste de parámetros del modelo matemático de producción de ácido itacónico para el conjunto de datos 2. ....	23
<b>Figura 9:</b> Ajuste de parámetros del modelo matemático de producción de ácido itacónico para los conjuntos de datos 1 y 2.....	24

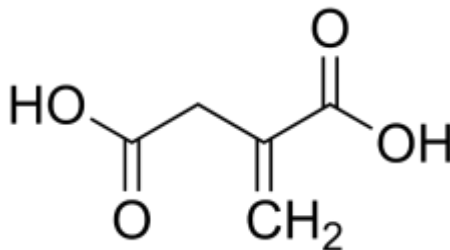
## Lista de tablas

<b>Tabla 1:</b> Parámetros de transporte.....	24
<b>Tabla 2:</b> Parámetros cinéticos.....	25
<b>Tabla 3:</b> Coeficiente de determinación $R^2$ .....	26

# 1. Introducción

El ácido itacónico es una molécula orgánica con fórmula química  $C_5H_6O_4$ , que cuenta con dos grupos carboxilo en sus extremos como se muestra en la Figura 1. Este ácido orgánico fue descubierto en 1837 como producto de la descomposición térmica del ácido cítrico (Baup, 1836). En 1932 su biosíntesis fue reportada por Kinoshita como producto de fermentación del hongo *Aspergillus itaconicus* (Kinoshita, 1932). Posteriormente otras especies de hongos filamentosos capaces de producir este metabolito fueron descubiertas, tomando especial relevancia *Aspergillus terreus*. El ácido itacónico tiene un amplio rango de usos que abarcan la producción de plásticos en forma de ésteres polimerizados, adhesivos elastómeros y recubrimientos. Estos productos se destacan por su alta fuerza y flexibilidad, además de producir recubrimientos resistentes al agua y con gran aislamiento eléctrico. En el área industrial, se encuentran otras aplicaciones en el área de la limpieza como aditivo espesante de detergentes, productos farmacéuticos y herbicidas; removedor industrial de resinas de poliéster insaturado, limpiador de líneas de geles de recubrimiento, espuma de poliuretano y tinta. En el área de la salud, el ácido itacónico es útil para formar compuestos dentales como adhesivos y selladores, y fármacos con efecto antiinflamatorio o analgésico (Willke & Vorlop, 2001; Okabe et al., 2009).

**Figura 1:** Molécula de ácido itacónico.



En la actualidad, el ácido itacónico se reconoce como una biomolécula de alto valor agregado con un amplio potencial en la industria química por su capacidad para formar otros compuestos de uso masivo tales como látex, poliacrilatos, poliésteres y poliamidas. Su producción se ha mantenido estable en los últimos años, alrededor de 40,000

toneladas/año, debido al estado de desarrollo de las tecnologías para la transformación de este ácido orgánico y su precio de venta aproximado de 1.67 USD/kg. Sin embargo, es requerido un precio por debajo de los 0.5 USD/kg para ser competitivo con otros monómeros populares de la industria plástica (De Carvalho et al., 2018).

La biosíntesis del ácido itacónico ha sido ampliamente explorada partiendo de fermentaciones sumergidas con células libres hasta reactores de burbujeo, columnas empacadas de burbujeo, reactores tubulares y reactores tipo air-lift, en donde se han reportado concentraciones finales de ácido itacónico que varían entre los 11.5 a 82 g/L con tiempos de fermentación que abarcan los 4 a 7 días y rendimientos de sustrato entre 0.18 y 0.55 g ácido itacónico/g sustrato (Okabe et al., 2009).

A pesar de la existencia de una extensa base bibliográfica acerca de la producción y usos de ácido itacónico, no se han reportado modelos matemáticos que describan este proceso biológico de manera rigurosa. Dado lo anterior, este trabajo tiene como objetivo la construcción de un modelo matemático de producción de ácido itacónico basado en red metabólica y la estimación de sus parámetros mediante la solución del problema inverso (problema de optimización.) a partir de los datos experimentales obtenidos por Petruccioli y colaboradores (Petruccioli et al., 1999) y Rychtera & Wase (Rychtera & Wase, 198).



## 2. Materiales y métodos

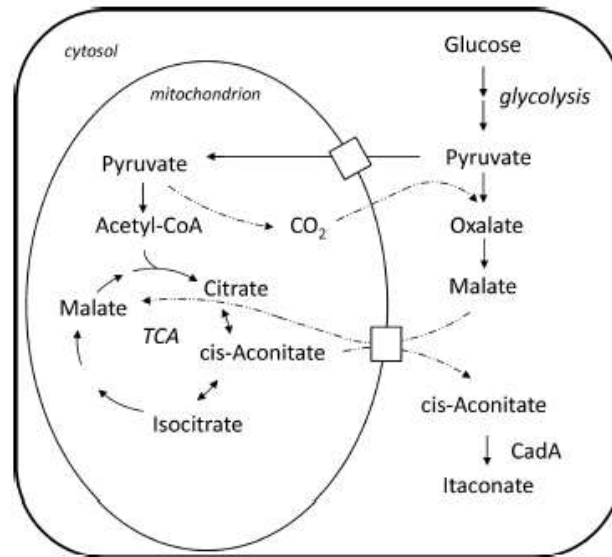
### 2.1. Producción bioquímica de ácido itacónico

La proposición de la ruta metabólica empieza con Kinoshita en el año 1932, en donde se reconoció que la especie *Aspergillus itaconicus* era capaz de producir este metabolito. Sin embargo, se tenía la duda de si este se encontraba acoplado al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Kinoshita, 1932). En 1957 se propuso por primera vez una ruta metabólica completa para el ácido itacónico que involucraba el paso de metabolitos intermedios a través de diferentes compartimientos celulares: exterior de la célula, citosol y mitocondria el cual se muestra en la Figura 2. La ruta metabólica inicia con el transporte de un sustrato como la glucosa al interior de la célula, seguido de su conversión a piruvato. El piruvato puede transportarse al interior de la mitocondria o ser convertido en oxalacetato y este a su vez en malato en el citosol. El piruvato que ingresa a la mitocondria es transformado en acetil-CoA y dióxido de carbono el cual se transporta al citosol y genera el oxalacetato junto con el piruvato. El acetil-CoA entra al ciclo de los ácidos tricarbóxicos transformándose en citrato y este en cis-aconitato. El antiporte de cis-aconitato al citosol se especula, pero no se había confirmado en ese momento. El ácido itacónico es finalmente producido en el citosol y transportado al exterior de la célula (Bentley & Thiessen, 1957).

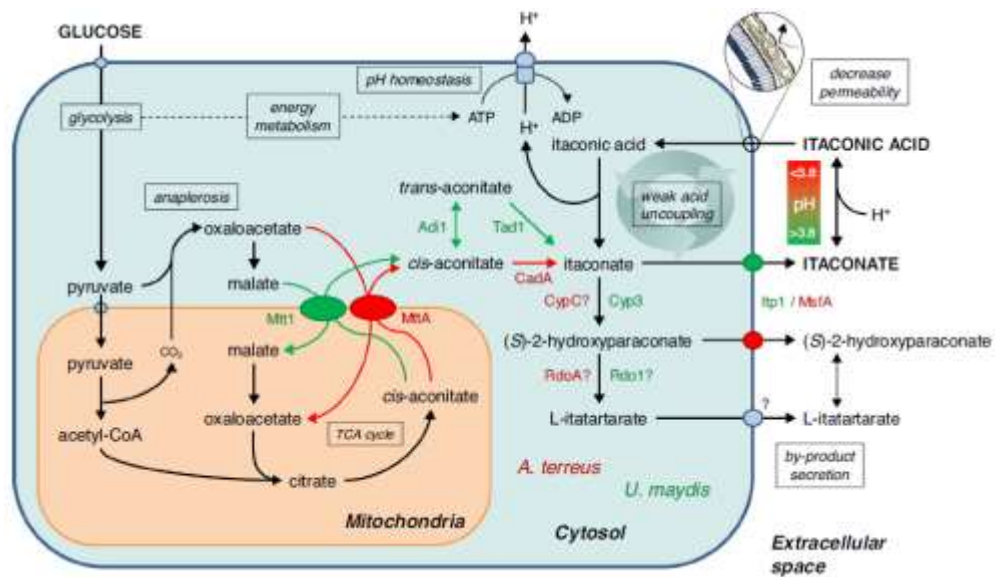
La enzima clave en la transformación del cis-aconitato en itaconato recibe el nombre de CadA, la cual posee un pH óptimo de 6.2, consta de 490 aminoácidos y presenta un peso de 55 kDa. Su secuencia fue descubierta en el año 2008 y clasificada como EC 4.1.1.6 indicando actividad decarboxilasa de ácido cis-aconítico. Un estudio más reciente ha profundizado el entendimiento de las proteínas involucradas en la producción de ácido itacónico para los microorganismos *A. terreus* (ascomiceto) y *Ustilago maydis* (basidiomiceto). En la Figura 3 se muestran las rutas metabólicas para ambas especies, siendo resaltado de color verde las reacciones específicas para *U. maydis* y en rojo las de *A. terreus*. Se confirma el antiporte de cis-aconitato en la mitocondria, cambiando el segundo metabolito según la especie analizada. Esta proteína recibe el nombre Mtt y es

pertenciente a la familia de transportadores mitocondriales y la superfamilia de facilitadores mayores (Wierckx et al., 2020).

**Figura 2:** Ruta metabólica de producción de ácido itacónico, tomada de (Bentley & Thiessen, 1957).



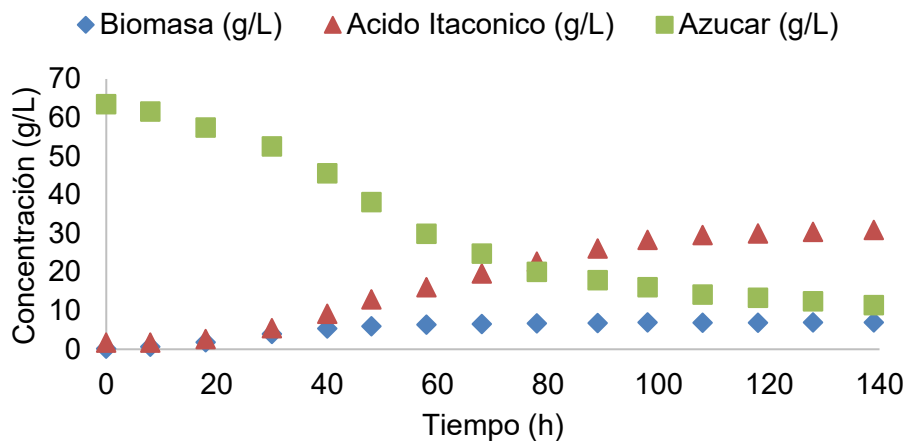
**Figura 3:** Ruta metabólica actual de producción de ácido itacónico, tomada de (Wierckx et al., 2020).



## 2.2. Comportamiento cualitativo de la fermentación de ácido itacónico

Dado que el modelo matemático debe describir el comportamiento real del sistema modelado, se requiere de experimentación siempre que sea posible, con el objetivo de determinar características únicas inherentes al sistema estudiado. Para el caso de producción de ácido itacónico, se han reportado varios estudios que muestran los perfiles de concentración de ácido itacónico durante el tiempo de fermentación. A continuación, se muestran algunos de ellos:

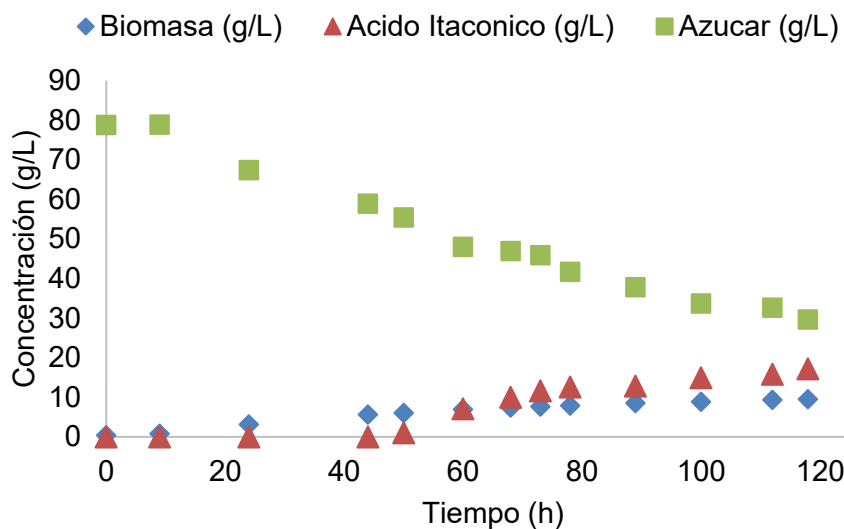
**Figura 4.** Conjunto de datos 1, tomado de (Rychtera & Wase, 1981)



Los datos experimentales reportados en la Figura 4 y Figura 5, que son tomados de diferentes autores, muestran el comportamiento de la producción de ácido itacónico en el transcurso de una fermentación. El tiempo de fermentación puede oscilar entre los 3 a 10 días en los experimentos, siendo común que finalicen en un plazo de 6 días (140 horas aproximadamente). El comportamiento de los perfiles de concentración es similar entre las gráficas, los cuales muestran decrecimiento del sustrato (entre 62% a  $\approx 100\%$  de consumo), baja producción de biomasa (6% a 12% respecto al sustrato inicial) y producción variable de ácido itacónico (23% a  $\approx 50\%$  respecto al sustrato inicial). Los perfiles de concentración exhiben un comportamiento logístico con una latencia inicial que oscila entre las 24 a 50 horas. Posteriormente, se presenta un consumo rápido de sustrato con crecimiento

exponencial de biomasa durante aproximadamente el mismo tiempo de latencia y finalmente, una estabilización en los perfiles. Para el caso de este tipo de fermentación, en particular, se encuentra que hay concordancia en los aspectos generales de los perfiles de concentración y los valores de consumo de sustrato y producción de biomasa e itaconato (Okabe et al., 2009).

**Figura 5:** Conjunto de datos 2, tomada de (Petruccioli et al., 1999).



## 2.3. Estructuración del modelo matemático

### 2.3.1. Metabolismo involucrado en la producción de ácido itacónico

Para generar un modelo matemático a partir de red metabólica (ver Figura 3) se hace necesario conocer las reacciones bioquímicas involucradas en la producción del metabolito de interés. Siguiendo el metabolismo elucidado por Wierckx y colaboradores (Figura 3) se tiene el siguiente conjunto de reacciones bioquímicas, desde el ingreso de sustrato hasta la expulsión de ácido itacónico:

- a) Transporte de glucosa al citosol
- b) Glicólisis: Glucosa  $\rightarrow$  Piruvato
- c) Producción de oxalacetato: Piruvato + CO<sub>2</sub>  $\rightarrow$  Oxalacetato
- d) Transporte de piruvato al interior de la mitocondria
- e) Producción de Acetil-CoA y CO<sub>2</sub>: Piruvato  $\rightarrow$  Acetil-CoA + CO<sub>2</sub>
- f) Difusión de CO<sub>2</sub> al citosol
- g) Producción de citrato: Oxalacetato + Acetil-CoA  $\rightarrow$  Citrato
- h) Producción de cis-aconitato: Citrato  $\rightarrow$  cis-Aconitato
- i) Antiporte oxalacetato - cis-aconitato: Oxalacetato (citosol) + cis-Aconitato (mitocondria)  $\rightarrow$  Oxalacetato (mitocondria) + cis-Aconitato (citosol)
- j) Producción de itaconato: cis-Aconitato  $\rightarrow$  itaconato
- k) Transporte de itaconato al exterior de la célula

Las reacciones descritas por los ítems anteriores se pueden agrupar en dos tipos: reacciones de transporte y reacciones químicas. Las reacciones de transporte pueden darse por difusión como el caso del CO<sub>2</sub> o por transporte facilitado, en donde enzimas especializadas trasladan el metabolito de un compartimiento a otro, en estas se incluyen glucosa, piruvato y ácido itacónico. Para el caso del oxalacetato y el cis-aconitato, el transporte es realizado por antiporte a través de la proteína MttA en donde inicialmente se toma oxalacetato en citosol y cis-aconitato al interior de la mitocondria y se intercambian de compartimiento. Las reacciones bioquímicas corresponden a procesos enzimáticos que pueden o no tener algún tipo de inhibición.

### 2.3.2. Ecuaciones de transporte

#### Transporte de glucosa

El transporte de glucosa al interior de la célula ha sido descrito de manera experimental como un comportamiento que sigue una cinética de Michaelis-Menten con  $K_m$  igual a 1.93 g glucosa/L y  $V_{max}$  igual a 0.17 g glucosa/g biomasa-h (Dos Reis et al., 2013). Sin embargo, el transporte de glucosa puede ser inhibido por la presencia de ácidos orgánicos, por tanto, este fenómeno se considera en la ecuación (1) como inhibición por sustrato (Castro et al., 2008).

$$T_{glucosa} = \frac{V_{max,Tg}[glucosa]}{K_{m,Tg} + [glucosa] \left(1 + \frac{[Itaconato]}{K_{i,itaconato}}\right)} \quad (1)$$

### **Transporte de piruvato**

El transporte de piruvato desde el citosol al interior de la mitocondria (descrito en la ecuación (2)) fue estudiado previamente por varios investigadores (Bender et al., 2015; McCommis & Finck, 2015), en donde se probó la velocidad de ingreso de piruvato a la mitocondria para diferentes proteínas transportadoras encontrándose valores de  $K_m$  entre  $4.38 \times 10^{-4}$  y  $1.22 \times 10^{-3}$  g piruvato/L y valores de  $V_{max}$  entre  $9.81 \times 10^{-5}$  a  $2.3 \times 10^{-3}$  g piruvato/g biomasa-h.

$$T_{piruvato} = \frac{V_{max,Tp}[piruvato]}{K_{m,Tp} + [piruvato]} \quad (2)$$

### **Transporte de itaconato**

Se ha demostrado la presencia de proteínas transportadoras de ácido itacónico en miembros del género *Aspergillus* lo que permite hacer la suposición inicial de una cinética de tipo Michaelis-Menten para el transporte de ácido itacónico al exterior de la célula (van der Straat & de Graaff, 2014). Mediante análisis de regresión con la ecuación de Michaelis-Menten en su forma lineal y los datos presente en la Figura 5 de (Li et al., 2011) se pueden extraer los siguientes datos cinéticos para dos transportadores:  $K_m$  entre 0.27 a 0.36 g ácido itacónico/L y  $V_{max}$  entre  $1.41 \times 10^{-4}$  y  $2.32 \times 10^{-4}$  g ácido itacónico/ g biomasa-h. Este mecanismo de transporte es descrito por la ecuación (3).

$$T_{itaconato} = \frac{V_{max,Ti}[itaconato]}{K_{m,Ti} + [itaconato]} \quad (3)$$

## Difusión de CO<sub>2</sub>

El dióxido de carbono es una molécula muy pequeña por lo que se puede difundir a través de la membrana de la mitocondria sin la necesidad de un transportador (Endeward et al., 2017). Al tratarse de un fenómeno difusivo, el transporte de dióxido de carbono es proporcional al área de difusiva (área de la membrana mitocondrial), a su permeabilidad y la diferencia de concentraciones entre los extremos opuestos de la membrana. El área mitocondrial específica ( $A_{mit}$ ) para un hongo filamentoso, como aquellos pertenecientes al género *Aspergillus*, es de 18.08 m<sup>2</sup>/g biomasa (Bakken & Olsen, 1983; Manteifel & Karu, 2005; Besserer et al., 2006). El valor de permeabilidad del CO<sub>2</sub> ( $P_{CO_2}$ ) calculado para células humanas oscila entre 1 a 0.001 cm/s dependiendo del porcentaje de colesterol presente en la membrana (Endeward et al., 2017). El transporte difusivo de CO<sub>2</sub> se modela como la ecuación (4).

$$T_{CO_2} = 3.6 \times 10^6 P_{CO_2} A_{mit} ([CO_{2,mit}] - [CO_{2,cit}]) \quad (4)$$

## Antiporte oxalacetato/cis-aconitato

Como fue elucidado por Wierckx y colaboradores, existe un proceso de antiporte que se encarga de expulsar *cis*-aconitato fuera de la mitocondria y durante el proceso ingresar oxalacetato. Se puede suponer el esquema de reacción mostrado en la Figura 6, en donde en este caso  $A_1$  corresponderá a la concentración de oxalacetato en citosol,  $B_2$  a la concentración de *cis*-aconitato en mitocondria,  $A_2$  concentración de oxalacetato en mitocondria,  $B_1$  concentración de *cis*-aconitato en citosol.  $C_1$  y  $C_2$  corresponden a estados conformacionales de la enzima. Con base en la teoría expuesta por (Becker & Kuznetsov, 2013), el equilibrio entre estados conformacionales del complejo enzima-A-B puede suponerse que se da a una velocidad mucho mayor que el cambio en las concentraciones de sustrato, lo que implica la ecuación (5).

$$k_A [C_1][A_1] = k_{-A} [C_1 A_1] \quad (5)$$

En donde  $k_A$  y  $k_{-A}$  son constantes cinéticas de las reacciones directa e inversa del equilibrio. Adicionalmente, el flux neto a través de la proteína antiportadora se puede

expresar como la diferencia de velocidades en la que ocurre el cambio del estado conformacional de la proteína, como se describe por la ecuación (6).

$$Flux = k_3[A_1C_1B_2] - k_{-3}[A_2C_2B_1] \quad (6)$$

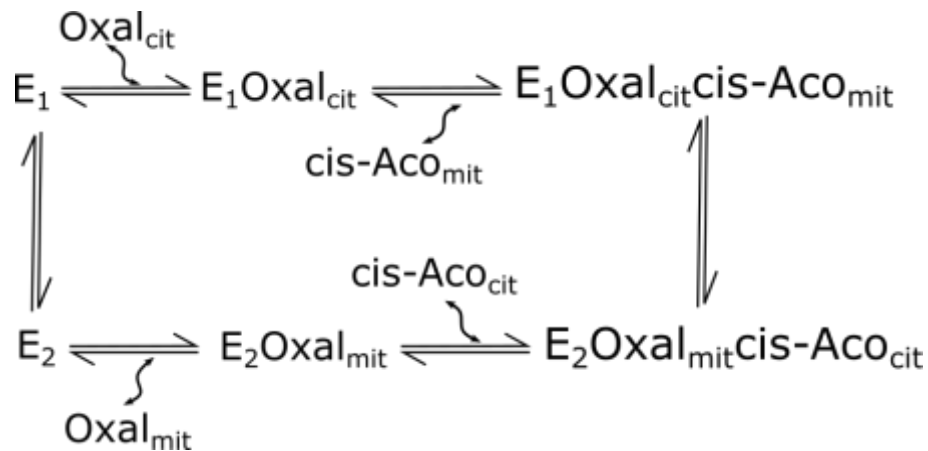
Adicionalmente, la cantidad total de enzima total estará repartida entre los diferentes complejos enzima-sustrato y enzima libre, como se presenta en la ecuación (7).

$$C_{total} = C_1 + A_1C_1 + A_1C_1B_2 + C_2 + A_2C_2 + A_2C_2B_1 \quad (7)$$

Resolviendo el sistema de ecuaciones algebraicas compuesto por 6 equilibrios químicos en forma de la ecuación (5) y la ecuación (7) en términos de las concentraciones de los sustratos se llega a la ecuación (8).

$$T_{antiporte} = \frac{K_{T1}[A_1][B_2] - K_{T2}[A_2][B_1]}{K_{T3}[A_1][B_2] + K_{T4}[A_2][B_1] + K_{T5}[A_1] + K_{T6}[A_2] + K_{T7}} \quad (8)$$

**Figura 6:** Estados de unión proteína-sustratos el antiporte de dos, adaptado de (Becker & Kuznetsov, 2013)





### 2.3.3. Reacciones bioquímicas

#### Crecimiento de biomasa

El crecimiento de biomasa, como se observó en la Figura 4 y Figura 5, posee la característica de tener un comportamiento logístico. La forma clásica de modelar este comportamiento ha sido descrita para el cambio en el número de individuos (Tsoularis & Wallace, 2002). Sin embargo, se requiere una expresión que permita relacionar el crecimiento no solo a la capacidad de carga de la biomasa, también al consumo de sustrato como se expone en (Kargi, 2009; Xu, 2019):

$$r_1 = \mu_{max} \left( \frac{[glucosa_{cit}]}{K_{S1} + [glucosa_{cit}]} \right) \left( 1 - \frac{[X]}{[X_{max}]} \right) \quad (9)$$

La ecuación (9) acopla el crecimiento del microorganismo debido al consumo de sustrato como una cinética de tipo Michaelis-Menten y el crecimiento logístico cuya capacidad de carga es la cantidad máxima de biomasa obtenida al final de la fermentación.

#### Energía destinada a crecimiento

El consumo de sustrato destinado exclusivamente a biomasa puede expresarse en forma de una fracción de la velocidad de crecimiento de biomasa, como se muestra en la ecuación (10) (Kargi, 2009).

$$r_2 = -\frac{1}{Y_{XS}} \frac{dX}{dt} = -\frac{1}{Y_{XS}} r_1 \quad (10)$$

En donde  $Y_{XS}$  corresponde al rendimiento biomasa-sustrato, para el caso de la fermentación de ácido itacónico se han reportado valores alrededor de 0.054 de g biomasa/ g sustrato (Okabe et al., 2009).

### **Glicolisis**

En este modelo la ruptura de la glucosa para su posterior conversión a piruvato se modelará como una cinética simple de Michaelis-Menten, sin inhibición como se muestra en la ecuación (11).

$$r_3 = \frac{v_{max3}[glucosa_{cit}][X]}{K_{S3} + [glucosa_{cit}]} \quad (11)$$

### **Producción de acetil-CoA y CO2**

La ruptura del piruvato en acetil-CoA y dióxido de carbono se modeló en la ecuación (12) como un proceso enzimático con inhibición por producto (acetil-CoA) y por sustrato (piruvato) según la descripción de la enzima piruvato descarboxilasa (Baburina et al., 1998).

$$r_4 = \frac{V_{max4}[piruvato_{mit}][X]}{[piruvato_{mit}] + K_{S4} \left( 1 + \frac{piruvato_{mit}}{K_{I3P}} + \frac{[Acetil - CoA]}{K_{I3A}} \right)} \quad (12)$$

### **Producción de oxalacetato**

La producción de oxalacetato se modeló en la ecuación (13) como un proceso enzimático con dos sustratos y la generación de un producto (Splittgerber, 1983):

$$r_5 = \frac{V_{max5}[CO2_{cit}][piruvato_{cit}][X]}{[CO2_{cit}][piruvato_{cit}] + K_{S5C}[CO2_{cit}] + K_{S5P}[piruvato_{cit}] + K_{S5}} \quad (13)$$

### **Producción de citrato**

La conversión de oxalacetato y acetil-CoA en citrato se modeló en la ecuación (14) como un proceso de dos sustratos y un producto (Splittgerber, 1983):

$$r_6 = \quad (14)$$

$$\frac{V_{max6}[Oxal_{mit}][Acetil - CoA][X]}{[Oxal_{mit}][Acetil - CoA_{mit}] + K_{S6O}[Oxal_{mit}] + K_{S6A}[Acetil - CoA_{mit}] + K_{S6}}$$

### **Producción de cis-aconitato**

La conversión de citrato en cis-aconitato corresponde a un proceso enzimático simple de tipo Michaelis-Menten, escrito en la ecuación (15).

$$r_7 = \frac{v_{max7}[citrato_{mit}][X]}{K_{S7} + [citrato_{mit}]} \quad (15)$$

### **Producción de itaconato**

La conversión de citrato en cis-aconitato corresponde a un proceso enzimático simple de tipo Michaelis-Menten, como se muestra en la ecuación (16).

$$r_8 = \frac{v_{max8}[cis - Aconitato_{cit}][X]}{K_{S8} + [cis - Aconitato_{cit}]} \quad (16)$$

## **2.3.4. Modelo dinámico de producción de ácido itacónico**

El comportamiento dinámico del sistema modelado es descrito por las ecuaciones (17) a (31), las cuales describen el cambio de las concentraciones en el tiempo de glucosa (extracelular), glucosa (citosol), biomasa, piruvato (citosol), piruvato (mitocondria), CO<sub>2</sub> (citosol), CO<sub>2</sub> (mitocondria), acetil-CoA, oxalacetato (citosol), oxalacetato (mitocondria), citrato, cis-aconitato (citosol), cis-aconitato (mitocondria), itaconato (citosol) e itaconato (extracelular), respectivamente.

$$\frac{d[glucosa_{extra}]}{dt} = -T_{glucosa} \quad (17)$$

$$\frac{d[glucosa_{cit}]}{dt} = T_{glucosa} - r_1 + r_2 - r_3 \quad (18)$$

$$\frac{d[X]}{dt} = r_1 \quad (19)$$

$$\frac{d[\text{Piruvato}_{cit}]}{dt} = r_3 - T_{piruvato} - r_5 \quad (20)$$

$$\frac{d[\text{Piruvato}_{mit}]}{dt} = T_{piruvato} - r_4 \quad (21)$$

$$\frac{d[\text{CO}_2_{cit}]}{dt} = T_{CO_2} - r_5 \quad (22)$$

$$\frac{d[\text{CO}_2_{mit}]}{dt} = r_4 - T_{CO_2} \quad (23)$$

$$\frac{d[\text{Acetil} - \text{CoA}]}{dt} = r_4 - r_6 \quad (24)$$

$$\frac{d[\text{Oxal}_{cit}]}{dt} = r_5 - T_{antiporte} \quad (25)$$

$$\frac{d[\text{Oxal}_{mit}]}{dt} = T_{antiporte} - r_6 \quad (26)$$

$$\frac{d[\text{Citrato}]}{dt} = r_6 - r_7 \quad (27)$$

$$\frac{d[\text{cis} - \text{Aconitato}_{cit}]}{dt} = T_{antiporte} - r_8 \quad (28)$$

$$\frac{d[\text{cis} - \text{Aconitato}_{mit}]}{dt} = r_7 - T_{antiporte} \quad (29)$$

$$\frac{d[\text{Itaconato}_{cit}]}{dt} = r_8 - T_{itaconato} \quad (30)$$

$$\frac{d[\text{Itaconato}_{extra}]}{dt} = T_{itaconato} \quad (31)$$

## 2.4. Algoritmo de optimización

El algoritmo de optimización global utilizado para estimar los parámetros del modelo propuesto en este trabajo corresponde al optimizador de enjambre de partículas o PSO por sus siglas en inglés. Este algoritmo de optimización corresponde a un algoritmo biomimético de naturaleza estocástica que busca representar el comportamiento típico de un enjambre

en busca de alimento (Xia, 2012). Cada individuo dentro del enjambre presenta dos comportamientos: atracción hacia el individuo con la mejor fuente de alimento y forrajeo independiente. Matemáticamente, una mejor fuente de alimento corresponde a un menor valor en la función objetivo. Así mismo, el forrajeo independiente correspondería a la fase de “exploración”, en donde el algoritmo busca regiones promisorias y evita estancarse en mínimos locales. Finalmente, la atracción hacia el individuo con mejor fuente de alimento corresponde a la fase de “explotación”, en donde se refina la solución obtenida. A pesar de que el algoritmo enjambre de partículas es de naturaleza estocástica, su garantía teórica de convergencia fue demostrada través del análisis de su ecuación de recurrencia (Lin et al., 2014). El algoritmo enjambre de partículas utilizado en este trabajo se encuentra en el global optimization toolbox de Matlab® R2018.

## 2.5. Problema de estimación de parámetros

El problema de optimización planteado para estimar los parámetros del modelo matemático propuesto en este trabajo se compone entonces de: el modelo matemático planteado en las fórmulas (1) a (31), los conjuntos de datos experimentales obtenidos por Pretruccioli y colaboradores (Petruccioli et al., 1999) y Rychtera & Wase (Rychtera & Wase, 1981), algoritmo de optimización enjambre de partículas y la función objetivo de mínimos cuadrados (ecuación (32)). En (32)  $N$  corresponde al número de datos experimentales,  $M$  número de variables experimentales,  $x(t, \theta)$  respuesta del modelo,  $\theta$  parámetros estimados y  $y_{i,j}$  datos experimentales. La función objetivo de mínimos cuadrados presenta las ventajas de ser un estimador no sesgado, eficiente y de máxima verosimilitud (Fiebig et al., 1992).

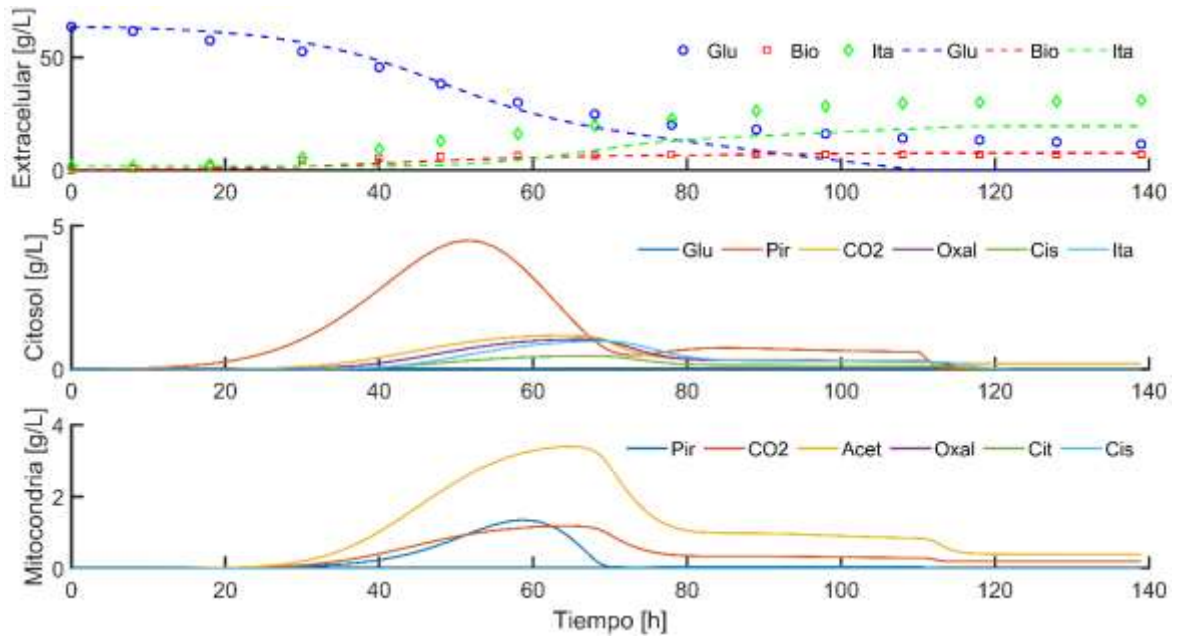
$$F_{obj} = \sum_{j=1}^M \sum_{i=1}^N (x(t, \theta)_{i,j} - y_{i,j})^2 \quad (32)$$

El modelo matemático fue integrado mediante el comando “ode15s” de Matlab® R2018. Este integrador presenta las características de ser de tipo implícito, tamaño de paso variables y A-estable (Shampine & Reichelt, 1997). Adicionalmente, el desempeño de este algoritmo ya ha sido comprobado para la solución de modelos biomatemáticos (Postawa et al., 2020).

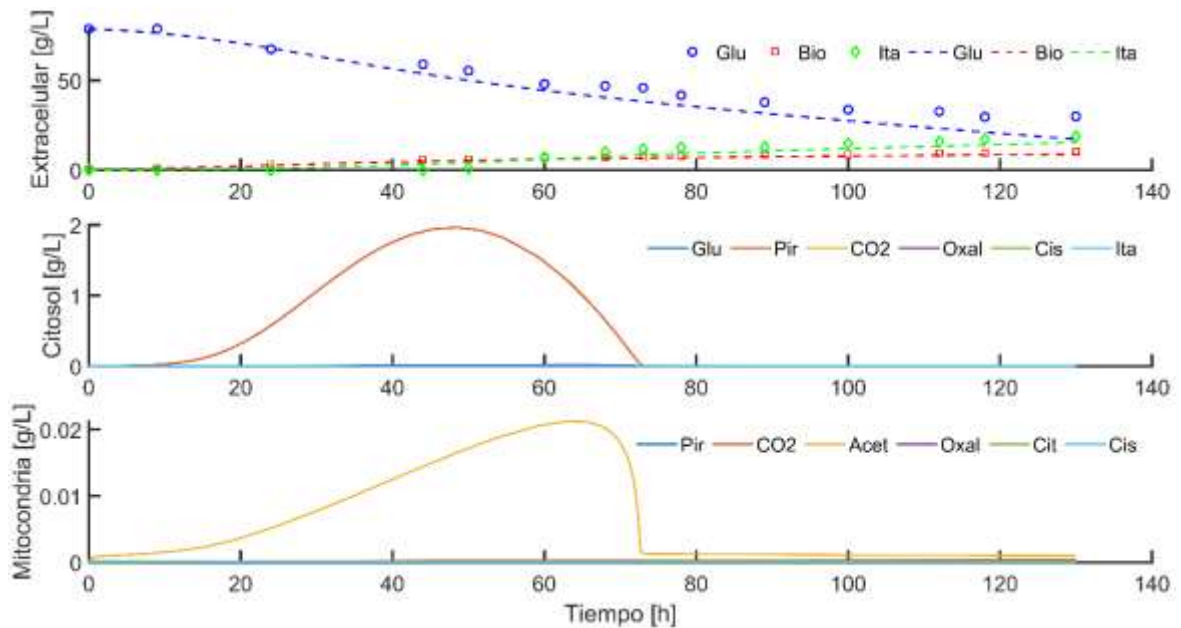
### 3.Resultados

El ajuste de datos resultado de la estimación de parámetros del modelo matemático de producción de ácido itacónico basado en red metabólica descrito en las ecuaciones (1) - (31) para los conjuntos de datos experimentales 1, 2 y 1 a 2 combinado se presenta en las Figura 7 a Figura 9. La simulación con los parámetros estimados para el conjunto de datos 1 (Figura 7) muestra acumulaciones de metabolitos, con puntos máximos alrededor de la hora 50 de fermentación. La elevada actividad metabólica de los microorganismos en este punto sugiere un estado de crecimiento exponencial con transformación rápida del sustrato en biomasa y otros metabolitos. En la mitocondria solo se observa acumulación de dióxido de carbono, piruvato y acetil-CoA, lo que indica alta velocidad en el antiporte de oxalacetato y *cis*-aconitato con rápida cinética de transformación de oxalacetato en citrato y de este último en *cis*-aconitato. En cuanto al citosol se presenta acumulación de los diferentes metabolitos. A nivel extracelular, el consumo de glucosa presenta un cambio de pendiente alrededor de la hora 60, el cual es debido al efecto de la inhibición de su transporte debido a la presencia de ácido itacónico. El comportamiento del modelo para el conjunto de datos 2 es diferente respecto al mencionado para el conjunto de datos 1, con una dinámica más simple. Se observa acumulación de piruvato en el citosol junto con acumulación de acetil-CoA en la mitocondria y con el resto de los metabolitos en concentraciones muy bajas. El ajuste obtenido con los conjuntos de datos 1 y 2 presenta un comportamiento dinámico al inicio de la fermentación, con acumulación de metabolitos en las primeras 20 horas tanto en el citosol como en la mitocondria. Los perfiles de glucosa y *cis*-aconitato en el citosol son similares, lo que indica una alta velocidad de reacción química y transporte en la mitocondria.

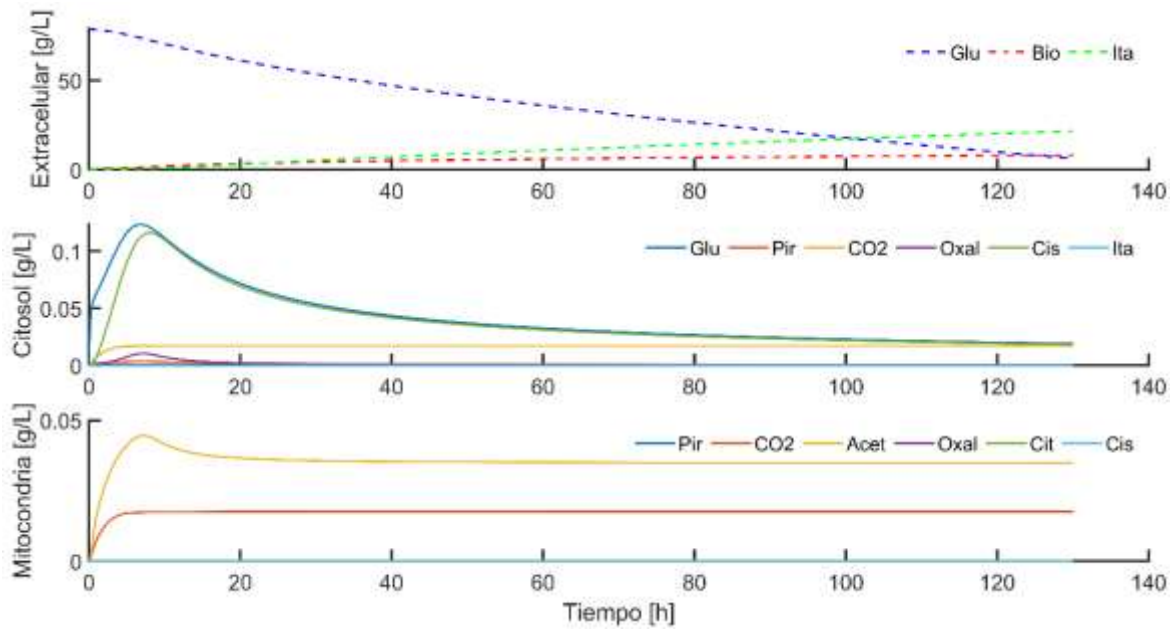
**Figura 7:** Ajuste de parámetros del modelo matemático de producción de ácido itacónico para el conjunto de datos 1.



**Figura 8:** Ajuste de parámetros del modelo matemático de producción de ácido itacónico para el conjunto de datos 2.



**Figura 9:** Ajuste de parámetros del modelo matemático de producción de ácido itacónico para los conjuntos de datos 1 y 2.



**Tabla 1:** Parámetros de transporte.

Parámetro	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1 y 2
$V_{max,Tg}$	1.000	0.698	1.000
$V_{max,Tp}$	0.2670	0.031	7.073
$V_{max,Ti}$	8.0839	6.669	6.446
$K_{m,Tg}$	$1.158 \times 10^{-4}$	49.964	$1 \times 10^{-4}$
$K_{m,Tp}$	7.7797	0.005	0.220
$K_{m,Ti}$	99.8159	0.020	$5.963 \times 10^{-4}$
$K_{t1}$	9.6590	2.477	9.741
$K_{t2}$	9.2116	6.389	2.634
$K_{t3}$	1.2477	5.040	1.031
$K_{t4}$	892.172	59.351	48.419
$K_{t5}$	$2.953 \times 10^{-5}$	$4.382 \times 10^{-6}$	0.010
$K_{t6}$	667.575	1.899	987.405
$K_{t7}$	0.0267	$2.618 \times 10^{-5}$	$1.742 \times 10^{-5}$
$P_{CO_2}$	0.01	0.009	0.007
$K_{I1_{ita}}$	1.000	0.999	1.000

La Tabla 1 presenta el valor estimado de los parámetros de transporte presentes en las ecuaciones (1) a (8). Se presentan diferencias en los valores estimados para el experimento



1, experimento 2 y su combinación. Sin embargo, el valor de la constante de inhibición del transporte de glucosa debido a ácido itacónico es constante, esto puede deberse a que en el conjunto de datos 2 no se presenta este fenómeno. Los parámetros  $K_{t1}$  a  $K_{t7}$  son muy diferentes entre los experimentos, por lo que el antiporte de oxalacetato y *cis*-aconitato tendría diferente influencia en el sistema.

**Tabla 2:** Parámetros cinéticos.

Parámetro	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 1 y 2
$V_{max1}$	9.8396	6.707	9.963
$K_{S1}$	1.2516	$8.373 \times 10^{-5}$	5.763
$Y_{x/s}$	0.37	0.370	0.369
$V_{max3}$	99.937	95.636	95.4312
$V_{max4}$	73.671	11.860	99.153
$V_{max5}$	6.7115	78.195	55.971
$V_{max6}$	80.378	87.841	98.024
$V_{max7}$	26.478	0.031	86.681
$V_{max8}$	14.699	67.482	92.070
$K_{S3}$	13.174	0.002	54.243
$K_{S4}$	99.795	$1.617 \times 10^{-6}$	$1.617 \times 10^{-4}$
$K_{S5CO_2}$	$4.479 \times 10^{-5}$	2.299	0.933
$K_{S5Pir}$	97.630	$6.221 \times 10^{-6}$	0.043
$K_{S5}$	0.0038	0.004	0.014
$K_{S6acet}$	$1 \times 10^{-6}$	$5.013 \times 10^{-6}$	$2.569 \times 10^{-6}$
$K_{S6oxal}$	0.711	0.762	0.588
$K_{S6}$	$5.015 \times 10^{-4}$	$1.068 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-6}$
$K_{S7}$	$5.944 \times 10^{-4}$	$5.353 \times 10^{-6}$	0.035
$K_{S8}$	85.847	$2.931 \times 10^{-4}$	100
$K_{I4pir}$	0.123	$1.602 \times 10^{-6}$	98.842
$K_{I4acet}$	90.687	$1.2289 \times 10^{-6}$	8.686

La Tabla 2 presenta el valor estimado de los parámetros cinéticos del modelo descrito en las ecuaciones (9) a (16). Los valores de estos parámetros tienen a ser más cercanos que en los parámetros de transporte. Sin embargo, hay diferencias notables en algunos de ellos como es el caso de la constante de saturación de glucosa  $K_{S1}$  la cual presenta cambios en 6 órdenes en su rango. Las velocidades de reacción para los metabolitos en general son elevadas al igual que las constantes de saturación, siendo las excepciones  $K_{S6}$  y  $K_{S7}$  correspondientes a citrato y *cis*-aconitato. Respecto a las constantes de inhibición en el experimento o conjunto de datos 1 el piruvato ejerce una fuerte inhibición de la enzima

piruvato descarboxilasa, pero esto no sucede con el acetyl-CoA. Esta situación es diferente para el experimento o conjunto de datos 2, en la cual ambos metabolitos causan un efecto fuerte de inhibición en dicha enzima. Para el caso de la combinación de experimentos se observa una mayor inhibición de la enzima piruvato descarboxilasa debido al piruvato respecto al acetyl-CoA.

La Tabla 3 presenta el coeficiente de determinación calculado con los parámetros estimados para cada experimento o conjunto de datos. Se presenta un ajuste del 68.19% para el conjunto de datos 1, respecto al 84.13% obtenido para el conjunto de datos 2. La combinación de conjuntos de datos presenta un ajuste del 43.05% siendo el menor.

**Tabla 3:** Coeficiente de determinación  $R^2$ .

Experimento 1	Experimento 2	Experimentos 1 y 2
0.6819	0.8413	0.4305

## 4. Discusión

Las diferencias en el comportamiento dinámico mostradas en las Figura 7 a Figura 9 pueden atribuirse a dos factores: por un aparte, la capacidad del modelo matemático para representar efectivamente la fenomenología experimentada en el sistema modelado. Por otra parte, la calidad del experimento en cuanto a las variables cuantificadas y la incertidumbre en las mediciones. Dado que los dos experimentos utilizados para la estimación de parámetros proveen de fuentes diferentes, es evidente que no se trata de la misma cepa del microorganismo, aunque sean de la misma especie. Adicionalmente, se observa un comportamiento diferente en ambos casos, lo cual es debido principalmente a adaptaciones particulares de las cepas utilizadas en los experimentos (Delvigne et al., 2014, Tang et al., 2019). En este sentido, otra característica que es necesario resaltar es la diferencia en la activación de la inhibición del transporte de glucosa en ambos conjuntos de datos. En el conjunto de datos 1 se presenta este fenómeno el cual a nivel de estimación de parámetros genera una retroalimentación: el transporte de glucosa siendo el primer paso para el desarrollo de las reacciones bioquímicas y el transporte de sustancias dentro y fuera de la célula es afectado directamente por la concentración extracelular de ácido itacónico. De esta forma, la cantidad de ácido itacónico producido afecta directamente el resto de los procesos metabólicos descritos por el modelo matemático. Este fenómeno mejora entonces la calidad de la información que pueden brindar los parámetros, de forma similar a como un sistema en general es regulado por retroalimentación (Liu et al., 2015). En comparación, el conjunto de datos (o experimento) 2 no presenta esta característica, por lo cual, la producción de ácido itacónico es independiente al transporte de glucosa. Lo anterior lleva a insensibilidad del modelo respecto a los parámetros correspondientes a procesos metabólicos intermedios, lo que se muestra como líneas constantes con valores cercanos a cero, en lugar de las curvas observadas para el conjunto de datos 1 (Pinto & Immanuel, 2006). La calidad de los parámetros está directamente relacionada a la información experimental utilizada para obtenerlos, por tanto, mejor calidad experimental (tanto en diseño como en cuantificación) se traduce en parámetros más confiables (Abt et al., 2018, Sadino-Riquelme et al., 2020). Debido a lo anterior, los valores estimados para los parámetros del modelo matemático de producción de ácido itacónico con el conjunto de datos 1 presentan una mejor aproximación a la realidad. Sin embargo, a nivel general la

información experimental relacionada a fermentaciones para producción de ácido itacónico con *A. terreus* es escasa.

La comparación de los valores estimados para los parámetros del modelo descrito por las ecuaciones (1) a (31) puede brindar información acerca del estado metabólico de la cepa utilizada en un experimento. A nivel experimental, se determinó que la velocidad máxima de transporte de glucosa  $V_{max,TG}$  para un hongo es de 0.17 g glucosa/g biomasa y su constante de saturación  $K_{m,Tg}$  es de 1.93 g glucosa/L, sin embargo, para el presente estudio se encontró que sus valores son 1.00 y  $1.16 \times 10^{-4}$ , respectivamente (Dos Reis et al., 2013). Mayores valores en velocidad máxima y menores en constantes de saturación se traducen en un transporte más veloz. No obstante, la diferencia entre los valores calculados y obtenidos de forma experimental puede ser atribuida a que la determinación experimental se realizó con el uso de una especie diferente (*Aspergillus nidulans*) o se presenta interacción entre parámetros. Dado que los parámetros fueron estimados con una limitada información experimental y ambos parámetros se encuentran un término racional es altamente probable la interacción (Fernández et al., 2012). La interacción o correlación de parámetros ocasiona que el valor de los parámetros involucrados en la interacción cambie de tal forma que se produce el mismo resultado para diferentes combinaciones ej. en términos reaccionales un valor mayor del numerador es compensado por un mayor valor en el denominador (Vanrolleghem & Dochain, 1998). La situación anterior se repite para los parámetros de transporte de piruvato y ácido itacónico. Una alternativa para mejorar de manera significativa la interpretabilidad de los parámetros es a través la medición directa de los metabolitos considerados en el modelo matemático. Varias alternativas han sido propuestas como el uso de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (Weuster-Botz & De Graaf, 1996), extracción y análisis por cromatografía HPLC (Schaefer et al., 1999) o transferencias de energía resonante de Förster (FRET) basada en marcadores lumínicos (Constantinou & Polizzi, 2013).

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1. Conclusiones

En el presente trabajo se desarrolló un modelo matemático estructurado y no segregado basado en red metabólica para la producción de ácido itacónico. El comportamiento dinámico del sistema obtenido por simulación del modelo expone las diferencias en la calidad de los datos experimentales de obtenidos por Pretruccioli y colaboradores (Petruccioli et al., 1999) y Rychtera & Wase (Rychtera & Wase, 198). En este sentido, el conjunto de datos de Rychtera & Wase permitió estimar mejores parámetros debido un efecto de retroalimentación producto de la inhibición del transporte de glucosa debido a la presencia de ácido itacónico en el medio fermentativo. Así mismo, los parámetros estimados indican una alta velocidad de transporte de glucosa, piruvato e itaconato en comparación con la velocidad de antiporte en la mitocondria. En cuanto a las reacciones bioquímicas se tiene una rápida conversión de glucosa en piruvato en el citosol junto con la transformación de oxalacetato en citrato y citrato en cis-aconitato en la mitocondria. En vista de lo anterior, este modelo matemático puede convertirse en una herramienta que permita un mayor entendimiento del proceso de producción de ácido itacónico a nivel intracelular, sin embargo, se requiere de mayor información experimental tanto en cantidad como calidad.

### 5.2. Recomendaciones

El presente trabajo abre la posibilidad de investigar nuevas aproximación para el entendimiento de la producción de ácido itacónico por medios biológicos. Una observación relevante corresponde a la necesidad de nuevos experimentos para este tipo de fermentación, que consideren la cuantificación de concentraciones intracelulares de los metabolitos investigados y nuevas condiciones experimentales: diferentes concentraciones iniciales de sustrato o perfiles de alimentación de sustrato continuos o semicontinuos.

## Referencias bibliográficas

Abt, V., Barz, T., Cruz-Bournazou, M. N., Herwig, C., Kroll, P., Möller, J., ... & Schenkendorf, R. (2018). Model-based tools for optimal experiments in bioprocess engineering. *Current opinion in chemical engineering*, 22, 244-252.

Baburina, I., Dikdan, G., Guo, F., Tous, G. I., Root, B., & Jordan, F. (1998). Reactivity at the substrate activation site of yeast pyruvate decarboxylase: inhibition by distortion of domain interactions. *Biochemistry*, 37(5), 1245-1255.

Bakken, L. R., & Olsen, R. A. (1983). Buoyant densities and dry-matter contents of microorganisms: conversion of a measured biovolume into biomass. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(4), 1188-1195.

Baup, S. (1836). Ueber eine neue Pyrogen-Citronensäure, und über Benennung der Pyrogen-Säuren überhaupt. *Annalen der Pharmacie*, 19(1), 29-38.

Becker, S., & Kuznetsov, A. (Eds.). (2013). *Transport in biological media*. Newnes.

Bender, T., Pena, G., & Martinou, J. C. (2015). Regulation of mitochondrial pyruvate uptake by alternative pyruvate carrier complexes. *The EMBO journal*, 34(7), 911-924.

Bentley, R., & Thiessen, C. P. (1957). Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus* I. Tracer studies with C<sup>14</sup>-labeled substrates. *Journal of Biological Chemistry*, 226(2), 673-687.

Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., ... & Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS biology*, 4(7).

Castro, M. A., Angulo, C., Brauchi, S., Nualart, F., & Concha, I. I. (2008). Ascorbic acid participates in a general mechanism for concerted glucose transport inhibition and lactate transport stimulation. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 457(2), 519-528.

Constantinou, A., & Polizzi, K. M. (2013). Opportunities for bioprocess monitoring using FRET biosensors. *Biochemical Society Transactions*, 41(5), 1146-1151.

De Carvalho, J. C., Magalhães, A. I., & Soccol, C. R. (2018). Biobased itaconic acid market and research trends—Is it really a promising chemical. *Chim Oggi/Chem Today*, 36, 56-8.

Delvigne, F., Zune, Q., Lara, A. R., Al-Soud, W., & Sørensen, S. J. (2014). Metabolic variability in bioprocessing: implications of microbial phenotypic heterogeneity. *Trends in Biotechnology*, 32(12), 608-616.

Dos Reis, T. F., Menino, J. F., Bom, V. L. P., Brown, N. A., Colabardini, A. C., Savoldi, M. & Goldman, G. H. (2013). Identification of glucose transporters in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 8(11).

Endeward, V., Arias-Hidalgo, M., Al-Samir, S., & Gros, G. (2017). CO<sub>2</sub> permeability of biological membranes and role of CO<sub>2</sub> channels. *Membranes*, 7(4), 61.

Fernandes, R. L., Bodla, V. K., Carlquist, M., Heins, A. L., Lantz, A. E., Sin, G., & Gernaey, K. V. (2012). Applying mechanistic models in bioprocess development. *Measurement, Monitoring, Modelling and Control of Bioprocesses*, 137-166.

Fiebig, D. G., McAleer, M., & Bartels, R. (1992). Properties of ordinary least squares estimators in regression models with nonspherical disturbances. *Journal of Econometrics*, 54(1-3), 321-334.

Kargi, F. (2009). Re-interpretation of the logistic equation for batch microbial growth in relation to Monod kinetics. *Letters in applied microbiology*, 48(4), 398-401.

Kinoshita, K. (1932). Über die Produktion von Itaconsäure und Mannit durch einen neuen Schimmelpilz *Aspergillus itaconicus*. *Acta Phytochim*, 5, 271-287.

Li, A., van Luijk, N., ter Beek, M., Caspers, M., Punt, P., & van der Werf, M. (2011). A clone-based transcriptomics approach for the identification of genes relevant for itaconic acid production in *Aspergillus*. *Fungal genetics and Biology*, 48(6), 602-611.

Lin, W., Lian, Z., Gu, X., & Jiao, B. (2014). A local and global search combined particle swarm optimization algorithm and its convergence analysis. *Mathematical Problems in Engineering*, 2014.

Liu, D., Xiao, Y., Evans, B. S., & Zhang, F. (2015). Negative feedback regulation of fatty acid production based on a malonyl-CoA sensor–actuator. *ACS synthetic biology*, 4(2), 132-140.

Manteifel, V. M., & Karu, T. I. (2005). Structure of mitochondria and activity of their respiratory chain in successive generations of yeast cells exposed to He-Ne laser light. *Biology Bulletin*, 32(6), 556-566.

McCommis, K. S., & Finck, B. N. (2015). Mitochondrial pyruvate transport: a historical perspective and future research directions. *Biochemical journal*, 466(3), 443-454.

Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S., & Park, E. Y. (2009). Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(4), 597-606.

Petruccioli, M., Pulci, V., & Federici, F. (1999). Itaconic acid production by *Aspergillus terreus* on raw starchy materials. *Letters in applied microbiology*, 28(4), 309-312.

Pinto, M. A., & Immanuel, C. D. (2006). Parameter Identification for Cybernetic Models of Bioprocesses. *Proceedings:AIChE 2006 Annual Meeting*.

Postawa, K., Szczygieł, J., & Kułczyński, M. (2020). A comprehensive comparison of ODE solvers for biochemical problems. *Renewable Energy*.

Rychtera, M., & Wase, D. J. (1981). The growth of *Aspergillus terreus* and the production of itaconic acid in batch and continuous cultures. The influence of pH. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 31(1), 509-521.

Sadino-Riquelme, M. C., Rivas, J., Jeison, D., Hayes, R. E., & Donoso-Bravo, A. (2020). Making sense of parameter estimation and model simulation in bioprocesses. *Biotechnology and bioengineering*, 117(5), 1357-1366.



Schaefer, U., Boos, W., Takors, R., & Weuster-Botz, D. (1999). Automated sampling device for monitoring intracellular metabolite dynamics. *Analytical biochemistry*, 270(1), 88-96.

Shampine, L. F., & Reichelt, M. W. (1997). The matlab ode suite. *SIAM journal on scientific computing*, 18(1), 1-22.

Splittgerber, A. G. (1983). Simplified treatment of two-substrate enzyme kinetics. *Journal of Chemical Education*, 60(8), 651.

Tang, C., Sun, P., Yang, J., Huang, Y., & Wu, Y. (2019). Kinetics simulation of Cu and Cd removal and the microbial community adaptation in a periphytic biofilm reactor. *Bioresource technology*, 276, 199-203.

Tsoularis, A., & Wallace, J. (2002). Analysis of logistic growth models. *Mathematical biosciences*, 179(1), 21-55.

van der Straat, L., & de Graaff, L. H. (2014). Pathway transfer in fungi: transporters are the key to success. *Bioengineered*, 5(5), 335-339.

Vanrolleghem, P. A., & Dochain, D. (1998). Bioprocess model identification. In *Advanced instrumentation, data interpretation, and control of biotechnological processes* (pp. 251-318). Springer, Dordrecht.

Weuster-Botz, D., & De Graaf, A. A. (1996). Reaction engineering methods to study intracellular metabolite concentrations. *Metabolic Engineering*, 75-108.

Wierckx, N., Agrimi, G., Lübeck, P. S., Steiger, M. G., Mira, N. P., & Punt, P. J. (2020). Metabolic specialization in itaconic acid production: a tale of two fungi. *Current opinion in biotechnology*, 62, 153-159.

Willke, T., & Vorlop, K. D. (2001). Biotechnological production of itaconic acid. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(3-4), 289-295.

Xia, X. (2012). Particle swarm optimization method based on chaotic local search and roulette wheel mechanism. *Physics Procedia*, 24, 269-275.

Xu, P. (2019). Analytical solution for a hybrid Logistic-Monod cell growth model in batch and continuous stirred tank reactor culture. *Biotechnology and bioengineering*.