

***“Difusión y Crecimiento
Microbiano de Aspergillus niger
sobre un Medio Sólido”***

PRESENTA:

I.Q. Inés Reyes Ocampo

**Tesis para obtener el
Grado de Maestra en Ciencias
(Ingeniería Química)**

ASESORES:

Dr. Felipe López Isunza¹

Dr. Gustavo Viniegra González²

SINODALES:

Dr. Felipe López Isunza¹

Dr. Ernesto Favela Torres²

Dr. Sergio Huerta Ochoa³

Dr. Enrique Botello Alvarez³



México D. F., 27 de Octubre del 2006

¹ *Departamento de Ing. de Procesos e Hidráulica, División de Ciencias Básicas e Ingeniería.*

² *Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud.*

³ *Instituto Tecnológico de Celaya*

AGRADECIMIENTOS

Gracias

A **Dios**, por la fuerza de todos los días. A mis padres **Aurelia y Mario**, por su cariño, apoyo y por tantos años de estar conmigo en todo momento y lugar, y por todo el orgullo que tengo de que sean mis padres. A **Omar**, por la esperanza y la fe que pones en mí, por todo ese apoyo y comprensión en los tiempos difíciles, por ser mi maestro cuando no entiendo, pero sobre todo por el amor que me demuestras todos los días. A mis hermanos **Jazmín y Mario**, por ser mi familia, por la confianza, por las tristezas y alegrías, y por aguantar conmigo a pesar de los pesares. Al **doc Felipe** por sus historias de vida, por enseñarme tanto y aceptarme como su discípula. A mis amigas del alma: **Fran, Roseta, Ary, Nat, Tony, Pilly y Soco**, por estar conmigo en los momentos de desánimo, desilusión, felicidad y satisfacción, que a veces provoca este andar por la vida. A mis amigos: **Matías, Noé, Oscar, Juan, Artur, José Luís, Erick y Alfredo**, por ser como son y por estar ahí cuando se les necesita. A **Margarita, Celia, Noemí, al doc Hugo, al profe Uriel, Victor Hugo y Rada**, por los sabios y atinados consejos y palabras de aliento. A mis **familiares** (a todos y cada uno de ellos), por ser parte de esta historia, que espero y no termine aquí. A mis **maestros** por todo lo bello que aprendí de ustedes.

A mis asesores:

Dr. Felipe López Isunza

Dr. Gustavo Viniegra González

por su conocimiento y experiencia, me ayudaron comprender un poco más de todo.

Gracias a los revisores:

Dr. Enrique Botello (ITC)

Dr. Ernesto Favela (UAM-I)

Dr. Sergio Huerta (UAM-I)

por que con sus comentarios enriquecieron esta tesis.

A **CONACyT** por el apoyo prestado para la realización de este proyecto (becario No. 188486)

*Muchas
Gracias*

Nei

RESUMEN

Resumen

Los hongos filamentosos son organismos de gran importancia, ya que juegan un papel importante en la nutrición de plantas y otros microorganismos, así mismo tienen un enorme potencial como plaguicidas de insectos en plantas, y son empleados en la fabricación de alimentos y productos farmacéuticos.

Debido a esto desde finales de los años 60 se han desarrollado una serie de estudios sobre el crecimiento y la ramificación de hongos filamentosos en medios sólidos y líquidos para su mayor entendimiento y control en procesos de fermentación; en dichos estudios se han desarrollado modelos para la optimización y diseño de fermentadores, así como modelos que describen el crecimiento fúngico y como éste se ve afectado por las condiciones ambientales. Algunos modelos describen de manera simple la cinética de crecimiento con ecuaciones empíricas y otros más sofisticados describen la interacción del crecimiento con la difusión de enzimas y generación de productos metabólicos.

En el estudio teórico-experimental realizado en esta tesis se investigó el crecimiento de *Aspergillus niger* sobre una placa de agar enriquecida con glucosa, en donde se observó que las propiedades morfométricas del microorganismo presentan una relación inversamente proporcional con la concentración de glucosa inicial del sustrato sólido, y que este crecimiento se ve inhibido a concentraciones mayores a 200 g/L.

Se desarrollaron dos modelos matemáticos que permiten la descripción del comportamiento de crecimiento de *Aspergillus niger*; y la predicción de los efectos en los cambios de las condiciones iniciales del crecimiento. Ambos modelos acoplan el transporte de nutrientes del medio sólido al crecimiento del hongo, utilizando para ello una cinética logística de crecimiento, que a diferencia de otras utilizadas en la literatura contempla la concentración de sustrato.

El primer modelo se emplea en la predicción del crecimiento global de biomasa del hongo y permite la estimación de los parámetros cinéticos de crecimiento; del

mismo modo este modelo se emplea para llevar a cabo un estudio de la sensibilidad paramétrica en el transporte de glucosa sobre el crecimiento microbiano. El segundo modelo describe el crecimiento radial del micelio y permite la predicción de la evolución de la longitud radial de la colonia de hongo así como de los perfiles de concentración de glucosa tanto en el medio sólido como en el micelio en crecimiento. Ambos modelos predicen adecuadamente los resultados experimentales encontrados.

ÍNDICE

Índice

Resumen	i
Índice	v
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Nomenclatura	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. Los hongos	2
1.2. El uso de los hongos	2
1.3. Los hongos filamentosos	3
1.4. Crecimiento hifal (crecimiento microscópico)	4
1.5. Crecimiento micelial (crecimiento macroscópico)	6
1.6. El hongo <i>Aspergillus niger</i>	7
Capítulo 2. Antecedentes	9
2.1. El crecimiento de hongos filamentosos	10
2.1.1. El efecto de la concentración inicial de esporas	12
2.1.2. El efecto de los iones y el pH del medio	12
2.1.3. La influencia de la actividad del agua en el medio	13
2.1.4. Los nutrientes del medio y su efecto sobre el crecimiento	15
2.2. El crecimiento en cultivos líquidos	18
2.2.1. Modelado del desarrollo morfológico de hongos en cultivos líquidos	20
2.3. El crecimiento de hongos filamentosos en medio sólido	23
2.3.1. Modelado del crecimiento y ramificación hifal en medios sólidos	25
Capítulo 3. Objetivos	35
3.1. Objetivo general	36
3.2. Objetivos particulares	35

Capítulo 4. Materiales y Métodos	37
4.1. Conservación de la cepa	38
4.2. Sistema experimental	38
4.3. Composición del medio sólido	39
4.4. Inóculo	40
4.5. Cuantificación de peso seco	42
4.6. Análisis de imágenes	42
Capítulo 5. El Modelo Matemático de Crecimiento Global de Biomasa	43
5.1. La producción de biomasa	45
5.2. El transporte y consumo de glucosa	46
5.3. Las condiciones inicial y de frontera	46
5.4. El modelo adimensional	47
5.5. La solución numérica	48
Capítulo 6. El Modelo Matemático de Crecimiento Radial	51
6.1. La producción de biomasa	53
6.2. El transporte de glucosa	54
6.3. Las condiciones inicial y de frontera	54
6.4. Frontera móvil	56
6.5. El modelo adimensional	58
6.6. La solución numérica	60
Capítulo 7. Resultados y Discusión	65
7.1. Crecimiento global de biomasa de <i>A. niger</i>	66
7.1.1. La predicción del crecimiento global de biomasa	68
7.1.2. La tasa específica de crecimiento	69
7.1.3. La simulación del crecimiento utilizando el modelo de crecimiento global de biomasa variando D_{efA}	70
7.1.4. Alternativas del modelo de producción de biomasa	72

7.2. Crecimiento radial de <i>A. niger</i>	74
7.2.1. La velocidad de extensión radial	75
7.2.2. El diámetro y la longitud promedio de las hifas	77
7.2.3. La predicción del crecimiento radial de la colonia	78
7.2.4. La predicción de la concentración de biomasa y glucosa	79
7.2.5. La tasa específica de crecimiento	83
7.2.6. Efecto de la variación de la concentración de glucosa sobre los parámetros morfométricos y de crecimiento de <i>A. niger</i>	84
Conclusiones	87
Bibliografía	91

Índice de Figuras

1.1. Reproducción asexual de un hongo filamentoso.	4
1.2. Secuencia de germinación de una espora.	4
1.3. Tipos de hifas no septadas (a) y septadas(b); regiones de una hifa (c).	5
1.4. Acumulación vesicular en el extremo de una hifa.	6
1.5. <i>Aspergillus westerdijkiae</i> medio sólido (a), pellet en cultivo líquido (b) y simulación de seis etapas del crecimiento micelial mediante un modelo estocástico (c).	7
1.6. <i>Aspergillus niger</i> , arriba izquierda crecimiento en un medio sólido, arriba derecha esporas y abajo hifas con conidias.	8
4.1. Sistema experimental.	39
5.1. Diagrama del crecimiento global de biomasa sobre una placa de agar y difusión de los nutrientes.	44
6.1. Esquematación del crecimiento radial de un micelio de hongo sobre un placa de agar y la difusión de glucosa.	52

-
- 7.1. Perfiles de la evolución del peso seco de biomasa de *A. niger* por cm² de superficie de agar, a diferentes concentraciones iniciales de sustrato. Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas sólidas a la simulación empleando el modelo de crecimiento global de biomasa. 67
- 7.2. Predicción de los perfiles axiales de concentración de glucosa en el medio sólido a un tiempo de 120 h de crecimiento de *Aspergillus niger* empleando el modelo de crecimiento global de biomasa. 69
- 7.3. Efecto de la variación del coeficiente efectivo de difusión sobre la predicción con el modelo de crecimiento global de biomasa de los perfiles de la concentración adimensional de glucosa en el medio sólido (a), y de la evolución del peso seco de biomasa por cm² (b), para una concentración inicial de glucosa 250 g/L, — 2.5x10⁻⁶ cm²/seg, - — 1.5x10⁻⁶ cm²/seg, --- 4.7x10⁻⁷ cm²/seg, 71
- 7.4. Predicción con el modelo de crecimiento global de biomasa de los perfiles de la evolución de la concentración de peso seco de biomasa por cm² a 250 (a) y 150 g/L (b) empleando las cinéticas de crecimiento tipo — Monod, - —Logística- Monod y ♦ datos experimentales 73
- 7.5. Predicción con el modelo de crecimiento global de biomasa de los perfiles axiales de la concentración adimensional de glucosa en el medio sólido a diferente concentración inicial de glucosa, —250 g/L, - -150 g/L y ---50 g/L, empleando las cinéticas de crecimiento tipo Logístico - Monod (líneas gruesas) y Monod (líneas suaves). 74
- 7.6. Perfiles de evolución de la longitud radial de *A. niger* a diferentes concentraciones de sustrato inicial (izquierda). Fotografía del crecimiento micelial de *Aspergillus niger* en un
-

Índice

medio sólido inoculado por piquete (derecha).	75
7.7. Velocidad de extensión radial de <i>A. niger</i> a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.	76
7.8 Comparación de los perfiles de evolución de la longitud radial del micelio <i>A. niger</i> a las diferentes concentraciones de glucosa inicial, los puntos representan los datos experimentales y las líneas las predicciones del modelo	78
7.9 Perfiles radial (izquierda) y axial (derecha) del peso seco de biomasa por cm ² , a diferentes tiempos del crecimiento fúngico.	80
7.10. Perfiles radial (izquierda) y axial (derecha) de la concentración adimensional de glucosa en el agua que rodea al micelio, a diferentes tiempos del crecimiento fúngico.	81
7.11. Perfiles radial (derecha) y axial (izquierda) de la concentración adimensional de glucosa en el sustrato, a diferentes tiempos del crecimiento fúngico.	83
7.12. Variación de la relación de la tasa específica de crecimiento con respecto al diámetro hifal.	85

Índice de Tablas

2.1. Modelos empíricos de crecimiento que han sido aplicados en sistemas de fermentación en estado sólido.	26
2.2. Modelos de difusión intrapartícula que han sido aplicados en sistemas de fermentación en estado sólido.	31
4.1. Composición del medio basal.	40
4.2. Composición de la solución de oligoelementos.	40
5.1. Valores de las constantes usadas y estimadas en la solución numérica del modelo de crecimiento global de biomasa.	50
6.1. Valores de las constantes usadas y estimadas en la solución numérica del modelo de crecimiento radial.	63
7.1. Tasa específica de crecimiento para el modelo de crecimiento	

global de biomasa.	70
7.2 Valores de los parámetros morfométricos hifales.	77
7.3. Valores obtenidos de la tasa específica de crecimiento para el modelo de crecimiento radial.	84

Nomenclatura

d	diámetro hifal, (μm)
D_{ef_A}	coeficiente de difusividad de la glucosa en el agar, (cm^2/h)
D_{ef_M}	coeficiente de difusividad de la glucosa en agua, (cm^2/h)
G	concentración de glucosa en el micelio, (g / cm^3)
G_S	concentración de glucosa en el sustrato, (g / cm^3)
G_{S_0}	concentración inicial de glucosa en el sustrato, (g / cm^3)
h_m	espesor del micelio, (cm)
K_G	coeficiente de saturación media de glucosa, (g / cm^3)
L_{av}	longitud hifal promedio, (μm)
L_P	longitud del sustrato, (cm)
l_m	longitud radial del micelio función del tiempo, (cm)
l_{m_0}	longitud radial inicial del micelio, (cm)
r	coordenada radial, (cm)
\mathfrak{R}_X	tasa de producción de biomasa, ($\text{g} / \text{cm}^3 * \text{h}$)
t	tiempo, (h)
u_r	velocidad de extensión radial, ($\mu\text{m}/\text{h}$)
x	concentración de biomasa, (g / cm^3)
x_m	concentración máxima de biomasa, (g / cm^3)
x_0	concentración inicial de biomasa, (g / cm^3)
$Y_{X/S}$	coeficiente de rendimiento de glucosa, (g_X/g_G)
y_m	coordenada axial del micelio, (cm)
y_S	coordenada axial del sustrato, (cm)

z coordenada axial del sustrato, (cm)

Letras Griegas

χ variable adimensional de la concentración de biomasa
 χ_M constante adimensional de la concentración de biomasa máxima
 ϕ modulo de Thiele modelo de crecimiento radial
 ϕ_I modulo de Thiele modelo de crecimiento de biomasa global
 γ_M variable adimensional de concentración de glucosa en el micelio
 γ_S variable adimensional de concentración de glucosa en el sustrato
 ϑ concentración de biomasa, (mgPS/cm²)
 κ constante adimensional del coeficiente de saturación media de glucosa
 λ variable adimensional de la coordenada radial del micelio
 μ_{\max} tasa específica de crecimiento, (1 / h)
 ρ_M densidad del micelio hifal, (g/cm³)
 θ tiempo adimensional modelo de crecimiento de biomasa global
 τ tiempo adimensional modelo de crecimiento radial
 ς variable adimensional de la longitud del micelio
 ξ variable adimensional de la coordenada axial del sustrato
 ξ_M variable adimensional de la coordenada axial del micelio
 ξ_S variable adimensional de la coordenada axial del sustrato

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. Introducción

1.1. Los hongos

Los hongos son organismos que constituyen un reino en la naturaleza, se pueden encontrar en una gran variedad de formas y tamaños. Comprenden criaturas formadas por una sola célula, como el caso de las levaduras, y por agregados multicelulares tales como los champiñones y los mohos. Crecen en medio ambientes ligeramente ácidos y en sustancias con baja humedad. Los hongos básicamente son estáticos, pero se diseminan formando esporas que viajan gracias a la acción del viento y de la lluvia, o por crecimiento y extensión de sus hifas. Absorben nutrientes a través de su pared celular de la materia orgánica viva o muerta (plantas, animales) sobre la cual crecen, de los nutrientes disueltos en el medio, o por secreción de enzimas que rompen los nutrientes más complejos a formas sencillas para poderlas absorber [1].

Los hongos son una materia fundamental en la nutrición de plantas y microorganismos. Su importancia radica en que se encargan de la descomposición y el reciclaje nutrimental, además se nutren de los desechos de animales y, de animales y plantas muertos. Se ha estimado que los hongos representan el 90% de la biomasa total del suelo de los bosques, una gran cantidad de micelio de hongos es alimento para un enorme número de vertebrados e invertebrados entre los que se incluyen insectos, ácaros, moluscos y nemátodos entre otros [2].

1.2. El uso de los hongos

Los hongos son, desde tiempos remotos, altamente empleados en la industria alimenticia debido a que, las levaduras, los hongos filamentosos y las setas, presentan un alto contenido de proteínas (20-30% de la materia seca), contienen en sus paredes quitina, que es una fuente de fibra dietética; además contienen vitaminas B, son bajas en grasa, y están libres del colesterol. Así mismo son usados en procesos industriales de los que se derivan productos como el alcohol, la

penicilina y el ácido cítrico, los cuales son los metabolitos más importantes en el mundo en términos de producción [2].

Aunque, la penicilina sigue siendo un antibiótico importante, la mayoría de los antibióticos que se utilizan hoy en día se originan de las bacterias, sin embargo los hongos producen algunos otros productos farmacéuticos útiles. La mayoría de los esteroides de uso clínico son modificados usando hongos, los cuales realizan transformaciones químicas específicas, evitando así hasta veinte o treinta pasos de reacciones químicas que serían imposibles, o demasiado costosos de producir por síntesis química directa. Tienen un gran potencial de uso en áreas de la biotecnología tales como: la biorremediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos; el biocontrol de organismos patógenos en plantas; algunos hongos patógenos pueden ser útiles para el control de plantas indeseables en la agricultura [1,2].

1.3. Los hongos filamentosos

Una gran cantidad de los hongos existentes es denominada hongos filamentosos o mohos, ya que presentan una estructura filamentosa en la fase vegetativa a la que se denomina hifa [3-5]. En su mayoría los hongos filamentosos se reproducen asexualmente; las células hijas se forman en el extremo apical de las hifas, por lo que no se separan. Debido a esto se forman asexualmente esporas unicelulares en hifas especializadas, que son de fácil dispersión para su reproducción (Figura 1.1).

La identificación de los hongos filamentosos radica fundamentalmente en su morfología. Estos hongos pueden crecer en cultivos sumergidos o en sustratos sólidos que presenten bajos niveles de humedad; son empleados de forma importante en procesos en los que se lleva a cabo la fermentación, tanto en cultivo líquido como en sustrato sólido, debido a su capacidad fisiológica y al tipo de crecimiento de las hifas [6].

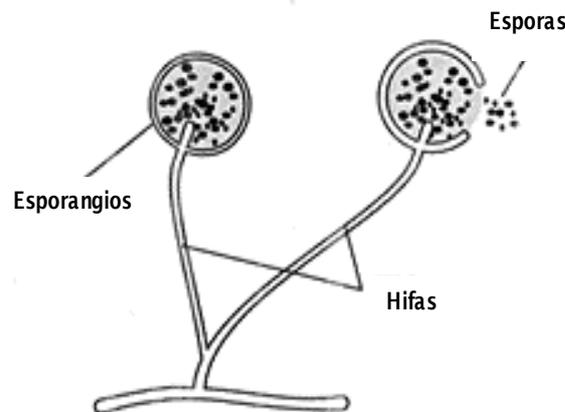


Figura 1.1. Reproducción asexual de un hongo filamentosos.

1.4. Crecimiento hifal (crecimiento microscópico)

Las hifas son la forma característica del crecimiento de los hongos filamentosos; éstas conectan a la enorme cantidad de células vegetativas que constituye a estos microorganismos. Las hifas surgen a partir de una espora (Figura 1.2); de la germinación de la espora resulta la formación de un tubo germinal que crece linealmente; eventualmente el tubo germinal se convierte en una hifa, y cuando ésta ha excedido una cierta longitud se forma una nueva extremidad o rama a lo largo de la hifa, dando por resultado un nuevo elemento hifal [7-10].



Figura 1.2. Secuencia de germinación de una espora.

Las hifas son estructuras tubulares microscópicas, de diámetro y longitud característicos, dependientes de la especie y las condiciones del medio; dichas

estructuras tubulares se encuentran formadas por quitina como el componente principal, que las hacen lo suficientemente fuertes como para abrir huecos a través de la pared celular de las plantas y del duro exoesqueleto de insectos.

Axialmente la hifa puede estar dividida, según su composición citoplasmática de organelos, en tres regiones principales: apical, subapical y distal (Figura 1.3.c). Generalmente la hifa se encuentra delimitada por septos y la parte de la hifa entre el ápice y el primer septo es comúnmente llamado compartimiento apical (Fig. 1.3.b). En algunas especies la aparición de un septo marca el inicio de una ramificación, aunque en un mismo compartimento pueden existir varias ramas [9,11-13].

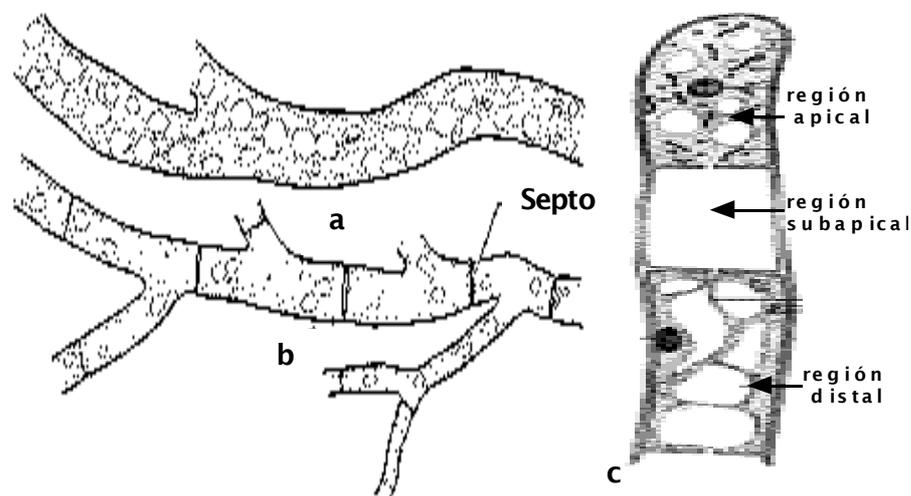


Figura 1.3. Tipos de hifas no septadas (a) y septadas (b); regiones de una hifa (c).

La ramificación es el mecanismo que permite el crecimiento exponencial de los microorganismos filamentosos y junto con la extensión máxima hifal, determina la tasa específica de crecimiento y la morfología de los elementos hifales [9, 14-15]. En la actualidad el mecanismo de ramificación no se ha entendido en su totalidad. Diversos investigadores sugieren que la formación de las nuevas hifas está regulada por un sistema de producción, absorción y distribución de vesículas contenidas en

los septos, que al ser acumuladas en regiones de la pared celular de los extremos o septos de la hifa producen una ramificación [11, 16-17].

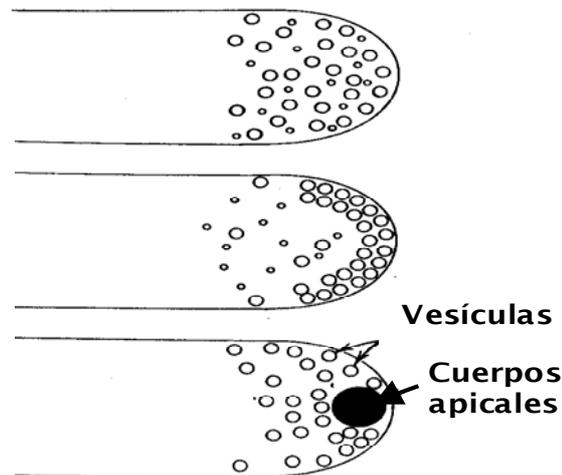


Figura 1.4. Acumulación vesicular en el extremo de una hifa.

1.5. Crecimiento micelial (crecimiento macroscópico)

Un micelio surge a consecuencia del incremento en las ramificaciones de las hifas, lo que genera un aumento en el número de ápices y produce el incremento de la biomasa del hongo [13-14, 18]. El crecimiento a nivel micelial ocurre esencialmente en la zona periférica del micelio; la forma y longitud máxima de extensión del diámetro de éste, es función de las características del medio en el que se desarrolla (Figuras 1.5.a y b); por ejemplo, en cultivos líquidos las hifas originan la formación de aglomerados de varios elementos miceliales o hifales comúnmente llamados pellets, cuya máxima extensión depende de la disponibilidad de nutrientes del medio, ya que si se excede la máxima concentración tolerada se presenta la inhibición del crecimiento [12, 19]. Muchos investigadores se han dado a la tarea de explicar la formación, crecimiento y efectos del medio ambiente sobre el micelio, mediante el estudio de su morfología y el desarrollo de modelos que permiten describir el comportamiento de su crecimiento tanto en cultivos líquidos como en medios sólidos (Figura 1.5.c) [8, 18, 20-21].

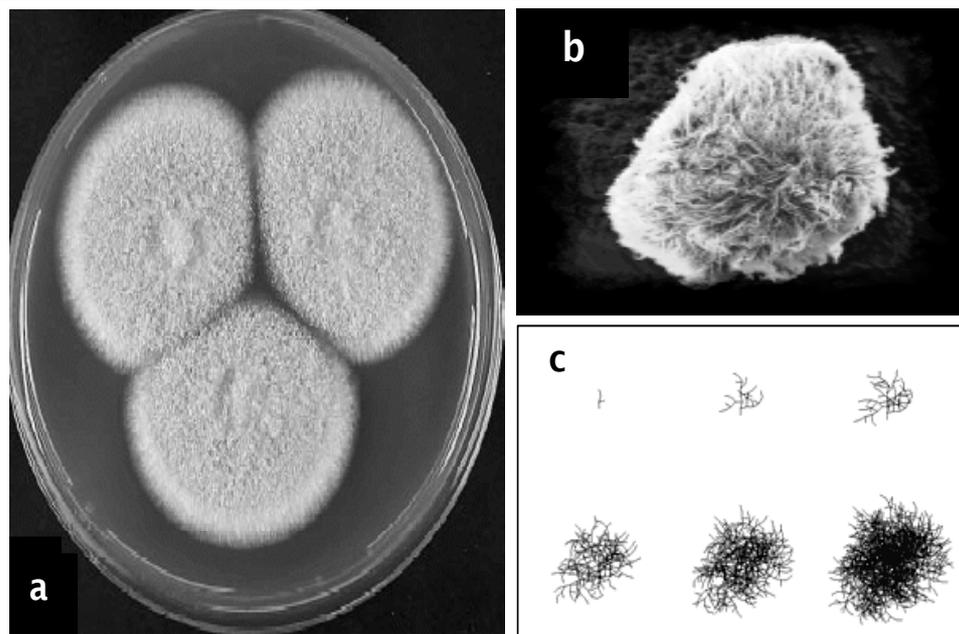


Figura 1.5. *Aspergillus westerdijkiae* medio sólido (a), pellet en cultivo líquido (b) y simulación de seis etapas del crecimiento micelial mediante un modelo estocástico(c).

1.6. El hongo *Aspergillus niger*

Una de las especies de hongos filamentosos más comunes es el género *Aspergillus*. Éste fue descrito por primera vez por Micheli en 1729, que lo denominó con este nombre por su parecido con un "aspergillum" (instrumento religioso utilizado para dispersar el agua bendita). *Aspergillus* es un hongo filamentosos del grupo Deuteromycetes u hongos Imperfectos, se caracteriza por unas estructuras esporíferas o reproductoras llamadas conidias. El *Aspergillus* es un hongo ampliamente difundido en la naturaleza ya que se llega a desarrollar en vegetales en descomposición, granos de cereal, tejidos de algodón y, lana y plumas; su medio es un ambiente oscuro, húmedo y cerrado [22].

Es posible encontrar esporas de *Aspergillus* en los depósitos de cereal, en los edificios en obras, en los aparatos de aire acondicionado y en los alimentos enmohecidos. Las esporas de este hongo pueden sobrevivir en condiciones adecuadas, durante miles de años; se han encontrado esporas de *A. niger* y *flavus* en

Introducción

la comida, ropas, flores y otros objetos de las tumbas de los faraones del antiguo Egipto. También había una notable presencia de ambas especies en los restos del rey Casimiro de Polonia y en la momia y el sarcófago de Ramses II [22].

Se conocen unas 900 especies del género *Aspergillus*. Rapper y Fennell los clasifican en 18 grupos; basándose en su aspecto macroscópico y en las características morfológicas de los conidióforos, siendo de éste las especies más importantes: *Aspergillus fumigatus* (85%), *A. flavus* (5-10%) y *A. niger* (2-3%) [22].

Al comienzo de su crecimiento *Aspergillus niger* forma colonias miceliales lanosas blancas o amarillentas; a medida que éste se desarrolla la superficie micelar se va cubriendo de puntos negros: son las cabezas aspergiales que pueden llegar a medir hasta 1 mm de diámetro, éstas se encuentran cargadas de esporas negras (Figura 1.6). Este hongo es un importante agente productor de ácidos orgánicos, principalmente glucónico, cítrico y oxálico; también es utilizado para la obtención de enzimas como la glucoamilasa y del 1- α -galactosidasa, por lo que es ampliamente cultivado para la producción industrial de estos compuestos químicos [22-23].

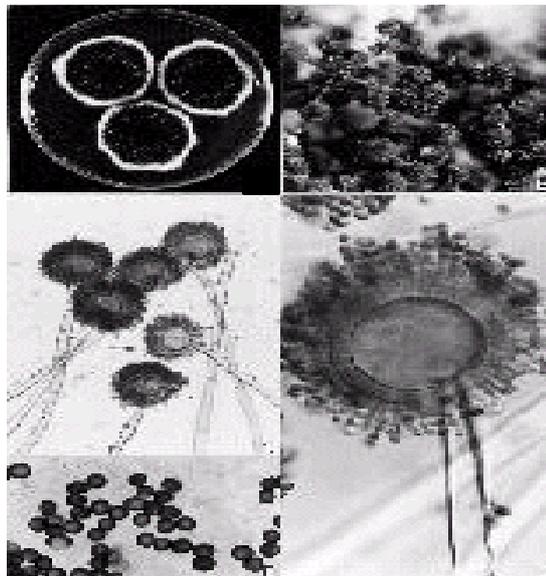


Figura 1.6. *Aspergillus niger*, arriba izquierda crecimiento en un medio sólido, arriba derecha esporas y abajo hifas con conidias.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Capítulo 2. Antecedentes

Los hongos filamentosos son microorganismos de gran importancia industrial, ya que son usados para la producción de una enorme variedad de productos derivados de su metabolismo. La explotación de las actividades bioquímicas de los hongos y su uso en producciones a gran escala ha sido acompañado de estudios sobre relación de la producción metabólica y los cambios morfológicos producidos en el microorganismo [3-5, 24].

Industrialmente se considera que la clave en la producción de ciertos metabolitos es la morfología fúngica, la cual se ve afectada por diversos parámetros durante el proceso de fermentación, tales como: el tipo de medio de cultivo; la tasa específica de crecimiento del mismo; la disponibilidad del oxígeno y los nutrientes del medio; y la actividad de agua en el medio, entre otros [9].

Debido a esto, es de suma importancia entender el proceso de crecimiento y la morfología de los hongos filamentosos. A continuación se presenta una revisión de la literatura más relevante con relación a este trabajo, en la que se presenta un análisis de los experimentos de diversos microorganismos filamentosos, los efectos sobre el crecimiento de varios parámetros y características ambientales sobre el crecimiento, y los modelos propuestos que describen la ramificación, fragmentación y crecimiento de las hifas tanto en medio sólido como en cultivos líquidos.

2.1. El crecimiento de hongos filamentosos

En el crecimiento de los hongos filamentosos y en general en los cultivos bacterianos, se presentan una sucesión de fases claramente distinguibles, caracterizadas por variaciones en la tasa de crecimiento [25], las cuales se enumeran a continuación:

1. Fase lag o tasa de crecimiento nulo.
2. Fase exponencial o tasa de crecimiento constante.

3. Fase estacionaria o de retardo.

La fase inicial o fase lag en los hongos filamentosos termina entre las primeras 15 y 20 horas del cultivo, ésta se encuentra seguida de un rápido crecimiento exponencial que se extiende hasta las 50 o 75 horas desde inicio del crecimiento, durante las cuales se producen ramificaciones hifales. Por último se da la fase final estacionaria o de retardo, en la que se produce el máximo crecimiento de biomasa [20-21].

La estimación de la tasa de crecimiento en hongos filamentosos presenta algunos problemas debido a la morfología que adoptan estos microorganismos al crecer, ya que en medios líquidos forman agregados que dificultan el muestreo y en medios sólidos el micelio se adhiere fuertemente al sustrato impidiendo su separación. Por ello se han desarrollado una serie de técnicas para la estimación del crecimiento de hongos; éstas comprenden métodos químicos indirectos, determinaciones gravimétricas, técnicas de cuantificación enzimática, y uso del análisis de imágenes [9].

El análisis de imágenes es un método rápido, práctico y adecuado que permite la fácil caracterización de la morfología de los hongos filamentosos; no sólo facilita la estimación de los parámetros morfológicos usuales si no que permite determinar la proporción de biomasa de los agregados miceliales en cultivos líquidos. Este método además de facilitar el estudio del desarrollo morfológico de los hongos filamentosos, también permite el estudio de la reología, el mezclado y la transferencia de masa en las fermentaciones de microorganismos filamentosos [9].

Generalmente, el método de análisis de imágenes es usado para la caracterización de la morfología de los hongos filamentosos, por lo que se han desarrollado una serie de metodologías que permiten la fácil cuantificación de los parámetros que caracterizan la morfología hifal, tales como son: la longitud efectiva o promedio de la hifa, L_{av} ; la longitud total de la hifa, L_t ; la longitud de la ramificaciones, L_b ; la

longitud de los segmentos o septos, L_s ; el número de ramificaciones, n ; y el diámetro promedio de la hifa, d [9, 12, 26-28].

2.1.1. El efecto de la concentración inicial de esporas

El proceso de la germinación de las esporas de hongos filamentosos constituye la fase lag del crecimiento de los mismos, la siguiente morfología y productividad del cultivo puede ser fuertemente influenciada por la concentración y condición inicial de las esporas. Durante la germinación de las esporas se observa una respiración lenta, una baja producción de enzimas y una actividad reducida; ésto toma demasiado tiempo comparado con una reproducción vegetativa normal [24].

La producción de algunas sustancias inhibitorias es una adición a este fenómeno básico del crecimiento de los hongos filamentosos, ya que algunas esporas se encargan de elaborar compuestos inhibidores que previenen un crecimiento prematuro de las hifas si hay condiciones desfavorables en el medio en el que se desarrollan; la producción de estas sustancias depende de el número de esporas inoculadas, el pH, la temperatura y la humedad, entre otras condiciones [24].

2.1.2. El efecto de los iones y el pH del medio

Durante el crecimiento de los microorganismos se pueden modificar o producir gradientes en el pH del medio en el que éstos se desarrollan; éstas alteraciones suelen ser originadas por una serie de procesos en los que se producen algunos metabolitos secundarios tales como son los ácidos orgánicos o el amoníaco.

La alteración del pH por el crecimiento microbiano ha sido fuertemente estudiada; estas investigaciones sugieren que los procesos por los cuales se producen gradientes en el pH del medio son originados por la adición de algunos nutrientes o la falta de aeración del sistema. Estudios realizados por Robinson y colaboradores [29] revelan que las colonias bacterianas crecidas sobre agar con glucosa presentan

acidificación del medio debajo de ellas, y una zona periférica alcalina. En fermentaciones realizadas bajo condiciones anaeróbicas encuentran que el microorganismo produce ácidos orgánicos que provocan la acidificación del medio, en cambio para sistemas aeróbicos se presenta la oxidación de aminoácidos que genera amoníaco y el medio se alcaliniza.

La presencia de ciertos iones en el medio puede llegar a ser de suma importancia para la germinación de las esporas y el crecimiento hifal; algunos estudios han determinado que al interior de las hifas existe un flujo de iones durante el crecimiento. Específicamente alteraciones en la concentración de algunos cationes como el calcio producen un efecto directo en la tasa de elongación de las hifas, Schmid y Harold [30] determinaron que para *Neurospora crassa* la disminución en la concentración de este catión da lugar al crecimiento de hifas de estructura bulbosa; es decir, más cortas y anchas, sin embargo la alta concentración de Ca^{++} no afecta directamente a la tasa específica de crecimiento.

2.1.3. La influencia de la actividad del agua en el medio

El agua juega diversos papeles en los sistemas biológicos, ya que participa directamente en los procesos de solvatación y difusión de nutrientes, y en algunos mecanismos de interacción molecular, además de ser un importante componente biológico estructural. El agua presenta dos funciones fundamentales [31-32]:

1. A nivel celular es un solvente que provee de nutrientes, facilita la excreción de desechos y metabolitos secundarios, además de constituir un alto porcentaje de la estructura celular.
2. A nivel molecular el agua se encuentra unida a otras moléculas, como los polioles, azúcares o enzimas, contribuye a mantener el volumen celular, y estabiliza las estructuras de los biopolímeros, como las proteínas, los nucleótidos, y los carbohidratos.

Antecedentes

Los hongos muestran un comportamiento muy variado respecto a la disponibilidad de agua, pero en general son más tolerantes a la ausencia de este compuesto que otros organismos. Este comportamiento fue estudiado por Inch y Trinci [33], quienes determinan los efectos de la actividad del agua (o humedad relativa del medio o sustrato) sobre el crecimiento de *Paecilomyces farinosus*. De este estudio se observa que la actividad del agua afecta directamente: la tasa de crecimiento radial en el medio sólido, K_r ; la tasa específica de crecimiento en cultivo líquido, μ_i ; y el rendimiento del crecimiento, estableciendo que la tasa específica de crecimiento y la extensión radial presentan una relación similar como función de la actividad del agua, y que el rendimiento de la biomasa disminuye al bajar dicha actividad.

La actividad del agua ha sido fuertemente relacionada con el crecimiento micelial, lo cual ha generado el desarrollo de modelos que describen dicha relación. De estudios de Gervais y colaboradores [32] se observa que el crecimiento y la esporulación de *Trichoderma viride* y *Penicillium roqueforti* se ven fuertemente influenciados por la actividad aparente del agua, ya que ante variaciones pequeñas alrededor del nivel óptimo de este parámetro (0.98~0.99 para *T. viride* y 0.96~0.97 para *P. roqueforti*) se observa un drástico decaimiento de la esporulación y del crecimiento en ambos microorganismos. Estos autores desarrollaron un modelo basado en el consumo energético de nutrientes debido a la actividad metabólica de los hongos, del gasto energético por el crecimiento y mantenimiento, y la energía usada para la prevención de un choque osmótico en la que interviene la actividad del agua. El modelo permite predecir la tasa de extensión hifal para diversos valores de la actividad del agua.

En las fermentaciones en estado sólido (F.E.S.) el agua tiene un efecto directo en la morfología de los hongos filamentosos; recientemente Gervais y Molin [31] se han dado a la tarea de llevar a cabo una revisión bibliográfica de este efecto a niveles macro y microscópico sobre el crecimiento de hongos filamentosos. A nivel macroscópico el efecto de la actividad del agua se observa en que un crecimiento radial y una producción de biomasa adecuados se obtienen únicamente con un valor óptimo en la actividad de agua para cada especie fúngica; este valor es un poco

menor a 1 para todos los hongos estudiados. Microscópicamente los cambios en la actividad del agua del medio implican modificaciones en la tasa de crecimiento hifal y en la orientación en el crecimiento de las ramificaciones.

2.1.4. Los nutrientes del medio y su efecto sobre el crecimiento

A pesar de que los hongos tienen la capacidad de degradar una amplia gama de compuestos orgánicos naturales, así como algunos compuestos sintetizados por el hombre, no pueden usar toda clase de compuestos como fuente de energía y carbono. La fuente de energía más abundante para los hongos en la naturaleza se encuentra constituida por los carbohidratos de origen vegetal; casi todos los hongos utilizan glucosa, y la gran mayoría utilizan maltosa, sacarosa y almidón. Además de los carbohidratos mencionados los hongos utilizan hexosas, pentosas, y algunos derivados de azúcares como el ácido urónico y los alcoholes; sólo una pequeña minoría no utiliza los carbohidratos, debido a que crecen en hábitats que no contienen dichos compuestos [34].

Los microorganismos al crecer experimentan afinidad por el sustrato en el que se desarrollan, promoviendo un mayor o menor crecimiento celular ante la concentración del sustrato presente. Monod expresa lo anterior mediante la Ecuación 2.1, que determina la relación entre la tasa específica de crecimiento (μ_{\max}) y la concentración del sustrato limitante en el medio (S) [25],

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S + K_S} \quad (2.1.)$$

Donde K_S es la constante de saturación media, que es una medida de la afinidad del microorganismo por el sustrato. En un estudio realizado por Fiddy y Trinci [35] se determinaron los valores de las constantes de afinidad de glucosa para el crecimiento de *Geotrichum candidum*, en cultivos líquidos y sobre medios sólidos como agar o silica gel. La determinación de las constantes de saturación se lleva a cabo a partir de la tasa de crecimiento radial para crecimiento en medios sólidos, y

Antecedentes

de la tasa específica de crecimiento para crecimiento en cultivos líquidos; encontrando que las constantes presentan valores mayores para el cultivo en medios sólidos (1.4 g/L) que para los cultivos líquidos (0.002 g/L). En los medios sólidos la reducción de la concentración inicial de glucosa tiene efecto en la tasa de crecimiento radial disminuyéndola y presentando una relación lineal con el logaritmo de la concentración para concentraciones de 20 a 100 g/L.

Robson y colaboradores [36] llevaron a cabo un estudio sobre el crecimiento de colonias de *Rhizoctonia cerealis* y *Penicillium chrysogenum* en medios sólidos con concentraciones de glucosa inicial entre 10 y 50 mM; el crecimiento de estos microorganismos no causó una reducción importante en la concentración de glucosa del medio, pero generó gradientes de concentración en el sustrato debido al crecimiento de la colonia. Al centro de la colonia microbiana se forman algunos metabolitos secundarios y productos de la autólisis, preferentemente inhibitorios del crecimiento; estos metabolitos reducen la tasa de crecimiento radial y se acumulan bajo la colonia en una zona periférica.

Estudios de análisis de imágenes realizados por Olsson [37] respecto al crecimiento de *Fusarium oxysporum* sobre agar con glucosa y fósforo, muestran la disminución en la concentración debajo de la colonia microbiana. Estos estudios también revelan que la densidad de la biomasa se ve afectada por el nivel de concentración de la glucosa, siendo esta concentración más alta en la periferia de la colonia cuando se disminuye la concentración del nutriente en el medio. Este efecto también es reportado por Nagel y colaboradores [38]; ellos determinan que el crecimiento de *Aspergillus oryzae* en una fermentación en estado sólido genera gradientes en la concentración de glucosa en el medio por debajo de la colonia del microorganismo.

El seguimiento del crecimiento microbiano en biorreactores puede llevarse a cabo a través de mediciones del peso seco de biomasa, de la producción de proteínas y CO₂, y de los cambios en la presión del sistema de estudio. Auria y colaboradores [39] llevaron a cabo el estudio del crecimiento de *Aspergillus niger* en un biorreactor con

altas concentraciones de sacarosa (de 100 a 400 g/L), monitoreando las diferentes fases del crecimiento del microorganismo con base en mediciones de la caída de presión del sistema; obtuvieron que la tasa específica de crecimiento disminuye a medida que aumenta la concentración de sacarosa inicial en el biorreactor.

Larralde y colaboradores [12, 19] también estudiaron el crecimiento de *A. niger* en un medio sólido (agar) y de *G. fujikuroi* en un cultivo líquido. Su investigación se enfocó en el estudio de la morfometría y del crecimiento de los microorganismos por consumo de glucosa; de éste trabajo se deriva que incrementos en la concentración inicial del medio causan reducciones en la tasa específica de crecimiento, en la tasa de elongación de los tubos germinales y en el diámetro de las hifas. En términos macroscópicos, morfológicamente el incremento en la concentración de glucosa inicial produce el crecimiento de colonias densas con una baja tasa de crecimiento radial. Una importante aportación de este estudio es el establecimiento de que el crecimiento en medios líquidos esta limitado a un máximo en la concentración alimentada de glucosa de 50 g/L; ya que observan que concentraciones mayores el hongo experimenta una inhibición en su crecimiento, por lo que usan como alternativa un medio sólido; experimentalmente Larralde [12] demostró que para estos medios la inhibición al crecimiento aparece a concentraciones de 300 g/L de concentración inicial de glucosa como máximo.

Gutiérrez y colaboradores [40] estudiaron el efecto de la concentración de glucosa sobre el crecimiento en *A. niger* para la producción de diversos metabolitos secundarios, analizando la producción de ácido cítrico y polioles a altas concentraciones de glucosa (mayores de 300 g/L) en una fermentación en estado sólido.

Otro metabolito secretado por *A. niger* es la enzima tanasa, Cerda y colaboradores [41] proponen la hipótesis de que para modificar la producción de dicha enzima es necesario alterar la disponibilidad de los nutrientes; por lo que llevaron a cabo un estudio del efecto de la reducción y aumento de glucosa en el medio, teniendo como

resultado que bajas concentraciones de glucosa incrementan la producción de la enzima intra y extracelular; a altas concentraciones de glucosa no se ve afectada la producción de tanasa intracelular, en cambio la producción extracelular decrece notoriamente y bajo estas condiciones concluyen que la difusión del sustrato en el medio sólido puede ser uno de los factores responsables de la disminución de la producción enzimática.

La difusión, el consumo de la glucosa y su conversión a biomasa fueron estudiados por Mitchell y colaboradores [21]; en esta investigación se realizó un estudio cinético y se desarrolló un modelo matemático para describir el crecimiento de *Rhizopus oligosporus* en un sistema modelo de fermentación en estado sólido. El modelo incluye la difusión de glucoamilasa en el medio, la hidrólisis del almidón por glucoamilasa y el consumo y la difusión de la glucosa para su conversión a biomasa.

Müller y colaboradores [42] llevaron a cabo investigaciones con el fin de determinar el efecto de la concentración de sustrato sobre el crecimiento de dos especies de *Aspergillus*; encontraron que los septos con alto contenido nucleico son resultado de altas concentraciones de glucosa, y que un compartimiento apical pequeño con bajo contenido nucleico se debe a bajas concentraciones de glucosa en el medio.

2.2. El crecimiento en cultivos líquidos

Los procesos de fermentación de hongos filamentosos pueden llevarse a cabo en cultivos líquidos o en medios sólidos y las observaciones experimentales muestran que la distribución y crecimiento hifal de los hongos son distintos en cada uno de estos casos. En los cultivos líquidos los hongos filamentosos puede llegar a crecer en forma de elementos hifales o como aglomerados esféricos de varios elementos hifales; esta morfología de aglomerados modifica el comportamiento reológico del medio de cultivo líquido a uno de tipo no Newtoniano, y dificulta la transferencia del oxígeno y nutrientes al microorganismo, así como la productividad y la eficiencia de estos sistemas de fermentación [9].

En el crecimiento de los hongos filamentosos en cultivos líquidos la morfología y el crecimiento micelial dependen principalmente de la distribución y extensión de las ramificaciones hifales; y muchos investigadores se han encargado de caracterizar fisiológica, reológica y morfológicamente su crecimiento. La implementación del análisis de imágenes ha facilitado la caracterización de la morfología de los hongos filamentosos, la cual se realiza con mediciones a nivel macroscópico (la formación de pellets) y a nivel microscópico (la extensión y ramificación hifal), así como la clasificación y el estudio de la formación de metabolitos secundarios [20, 42-45].

De diversas investigaciones se ha derivado la estimación de la tasa específica de crecimiento de los diversos microorganismos filamentosos con base en mediciones del peso seco de la biomasa total, del incremento total en la longitud hifal o del promedio del número de hifas [19, 46-47]. Del mismo modo la relación entre la morfología micelial y las propiedades reológicas de los medios de cultivo ha sido sujeto de diversos estudios [42, 48-51], debido a que estas propiedades tienen una fuerte influencia sobre el diseño de los biorreactores y fermentadores.

La reología, la morfología y la concentración de biomasa en los cultivos líquidos de microorganismos miceliales, están íntimamente relacionados entre sí. En los cultivos líquidos los micelios se encuentran suspendidos por lo que el medio puede llegar a poseer propiedades de un fluido no - Newtoniano, por ejemplo para *P. chrysogenum* la viscosidad del medio va en aumento a medida que el microorganismo crece hasta la formación de pellets [24, 49].

Yang y colaboradores [52] estudiaron el crecimiento de *Streptomyces tendae* en cultivo sumergido, realizaron mediciones microscópicas del crecimiento mediante el análisis tridimensional de imágenes, del que destacan que la ramificación y el crecimiento hifal no se dan en una sola dirección, por lo que calcularon los ángulos de ramificación y crecimiento de los extremos de la hifa.

2.2.1. Modelado del desarrollo morfológico de hongos en cultivos líquidos

El modelado matemático se ha convertido en una herramienta esencial en las ciencias biológicas. En la micología ofrece una alternativa a través de la cual es posible dar explicación a diversos aspectos del crecimiento de hongos; de modo que se han desarrollado diversos modelos a distintos niveles de descripción, lo que permite una mayor comprensión del crecimiento fúngico.

Los modelos se basan en la cinética global de la fermentación, las expresiones que se emplean para expresar el crecimiento del microorganismo y que con mayor frecuencia son encontradas en la literatura, son cinéticas exponenciales o del tipo de Monod; las cuales a pesar de los años siguen demostrado validez a través de experimentos. Pero estos modelos de naturaleza esencialmente empírica no consideran los mecanismos fundamentales del proceso de crecimiento, es decir no incluyen a los distintos procesos bioquímicos que se involucran en el crecimiento biológico.

Aynsley y colaboradores [53], desarrollaron un modelo en el que se hace uso de la expresión de Monod para describir el incremento en la biomasa microbiana. El modelo asume que el crecimiento depende de una sola fuente de carbono, y que el transporte interno de éste a través de la célula produce la formación de un precursor de la membrana de la hifa, por lo que la formación de nuevas ramificaciones depende del suministro del precursor del crecimiento de las hifas. Este modelo proporciona una buena predicción del crecimiento en una fermentación de tipo lotebatch; lo que se demostró al comparar las simulaciones con datos experimentales de *P. chrysogenum*. El modelo, además, permite hacer un análisis de los efectos de las variaciones en las condiciones iniciales de la concentración de sustrato sobre la producción de metabolitos secundarios tales como la penicilina.

El crecimiento micelial puede ser explicado a través de la descripción de la extensión de los extremos y de la ramificación, que se encuentra asociada con la septación de

la hifa. Yang y colaboradores [54] desarrollaron un modelo de dos partes que se basa en mecanismos físicos y celulares, en éste, fueron acoplados el crecimiento y la ramificación direccionados (parte estocástica), con la cinética de crecimiento y la ramificación total (parte determinista). Este modelo es capaz de describir la complejidad del desarrollo micelial por un periodo largo de tiempo para la formación de pellets, y considera que los microorganismos crecen bajo condiciones en las que los nutrientes se encuentran presentes en exceso y que los productos inhibidores del crecimiento no son acumulados. La parte determinista de este modelo asume que la extensión hifal esta limitada por un precursor de la síntesis de la pared celular que se produce a lo largo de la hifa y que se consume en el extremo de ésta. También considera que la septación depende de la cantidad de material nuclear y que los compartimentos pueden estar divididos en segmentos con una longitud y volumen equivalente. Este modelo se comparó con resultados experimentales de *Geotrichum candidum*, realizados por Fiddy y Trinci en 1976 y de *Streptomyces coelicolor* realizados por Allan y Prosser en 1983.

Viniegra y colaboradores [55], desarrollaron un modelo de dos partes que a nivel microscópico emplea la teoría de ramificación simétrica para la descripción de crecimiento y ramificación hifal, y a nivel macroscópico usa los parámetros microscópicos para la estimación de los parámetros relacionados con la evolución de biomasa fúngica. A nivel microscópico el modelo de ramificación simétrica asume que el nivel de las ramificaciones esta relacionado logarítmicamente con el número de extremos y segmentos hifales. El modelo permite la estimación de parámetros cinéticos del crecimiento micelial a partir de mediciones experimentales microscópicas, como por ejemplo: la tasa específica de crecimiento del microorganismo, a partir del diámetro de las hifas y de las esporas inoculadas o de la longitud hifal promedio.

Nielsen [56] desarrolló un modelo que permite la descripción del crecimiento de microorganismos filamentosos en un medio sólido o en un cultivo sumergido. El modelo acopla un mecanismo estructurado de crecimiento que establece que la

Antecedentes

formación de biomasa ocurre únicamente en las zonas apical y subapical de la hifa, y un modelo poblacional para la fragmentación hifal. Este modelo permite una buena representación del crecimiento y de la fragmentación de tres especies de microorganismos filamentosos: *G. candidum*, *S. hygroscopicus* y *P. chrysogenum*.

Un modelo morfológico detallado del crecimiento de un pellet de un microorganismo filamentosos es el que desarrollaron Meyerhoff y colaboradores [57]. Este modelo se basa en el modelo de crecimiento, septación y ramificación individual de una hifa descrito por Yang y colaboradores en 1992. Este modelo incluye aspectos de limitación de crecimiento por consumo de sustrato y oxígeno debida a la difusividad de éstos compuestos al interior del pellet; el modelo permite la predicción de los perfiles radiales de concentración de oxígeno en el pellet, la formación de las hifas y la determinación de los ángulos de distribución de las ramificaciones.

Nielsen y Krabben [47], desarrollaron un modelo que describe la fragmentación y el crecimiento hifal; este modelo se deriva de un balance general de la distribución de elementos hifales. Las expresiones cinéticas para la germinación, la extensión hifal, la ramificación y la fragmentación, son el resultado de datos experimentales del crecimiento de *P. chrysogenum*. En este estudio la germinación de la espora pudo ser cuantificada a través de tres parámetros: Los tiempos inicial y final de germinación de la espora, y la concentración de esporas inoculadas. Además los autores describen la tasa promedio de extensión hifal a través de la longitud hifal y establecen que la frecuencia de ramificación se encuentra relacionada con la longitud de las hifas.

Un modelo basado en la hipótesis de que el crecimiento y la ramificación hifal se produce por la acumulación de vesículas en los septos, es el desarrollado por Paul y Thomas [58]; este modelo describe, mediante una cinética estructurada: el crecimiento, y la producción de un metabolito secundario (penicilina). El modelo fue usado satisfactoriamente para la predicción de la producción de penicilina por *P. chrysogenum* en una fermentación batch.

Otro modelo que describe la dinámica del crecimiento y la fragmentación de microorganismos filamentosos es el desarrollado por Krabben y colaboradores [59], éste se basa en un modelo poblacional y permite predecir la concentración de los elementos hifales, la concentración del sustrato, la longitud promedio de las hifas totales y el número promedio de ápices o extremos. El modelo fue resuelto por el método de discretización y el método Monte Carlo, dando como resultado que el método Monte Carlo tiene mayor versatilidad y eficiencia en el tiempo de cómputo empleado.

Lejeune y Baron [60] desarrollaron un modelo basado en la evolución de la morfología microscópica de *Trichoderma reesei*, el modelo predice el comportamiento del crecimiento desde una spora hasta la formación del pellet. Éste incluye la difusión del oxígeno y determina la estructura tridimensional del pellet con base en la hipótesis de que éste presenta una naturaleza fractal.

Un estudio desarrollado por Amrane y colaboradores [61] presenta un modelo estructurado que describe la cinética de consumo de glucosa por *P. camembertii* hasta el agotamiento (consumo total del nutriente), seguido de la adición de un segundo nutriente (arginina), y la producción de dióxido de carbono y amoníaco. El modelo describe eficientemente el proceso de diauxia del microorganismo, en el que son generados productos de la biosíntesis y manutención celular.

2.3. El crecimiento en medios sólidos

En los medios ambientes naturales los hongos en general suelen crecer en sustratos sólidos, húmedos y airados, bajo estas condiciones las hifas y el micelio del hongo llegan a expandirse kilométricamente. Por ello gracias a su capacidad fisiológica y morfología los hongos filamentosos pueden ser empleados en los procesos de fermentación en estado sólido, ya que en estos casos de fermentación se pretende que el micelio invada lo mayormente posible el medio o soporte sólido.

Antecedentes

El estudio del crecimiento microbiano sobre sustratos sólidos comenzó con Pirt [62]; quien estableció algunos postulados para el crecimiento de bacterias sobre una placa de agar y que se enumeran a continuación:

1. El crecimiento celular se lleva a cabo con una tasa máxima exponencial, solo si la concentración de nutrientes permanece por arriba de las constantes de saturación del medio y no existe ninguna condición inhibitoria.
2. El crecimiento de una colonia microbiana genera gradientes de concentración de nutrientes en dirección vertical por debajo de donde se sitúa la colonia.
3. La concentración del nutriente limitante del crecimiento disminuye de tal forma que ocasiona una disminución en el crecimiento de las células centrales de la colonia.
4. El crecimiento radial de la colonia puede estar restringido a un anillo exterior, con perímetro constante, debido al consumo y difusión de nutrientes en la zona de crecimiento.
5. Una vez alcanzado este perímetro constante la colonia puede establecer una tasa lineal de expansión radial.

Trinci [13] verificó los postulados anteriores en un estudio sobre el crecimiento de algunos hongos filamentosos (*R. stolonifer*, *M. racemosus*, *Actinomucor repens*, *Absidia glauca*, *G. lactis*, *P. chrysogenum*, *A. wentii*, *A. niger* y *A. nidulans*) sobre un medio sólido. En este estudio estableció que la tasa de crecimiento radial de la colonia (K_r) es función de la longitud promedio de las hifas (w) encontradas en la zona periférica del crecimiento de la colonia y de la tasa específica de crecimiento (α), además los valores obtenidos de la tasa específica de crecimiento radial en los sustratos sólidos son idénticos a los de la tasa máxima específica de crecimiento en cultivos líquidos (μ_{max}).

En el crecimiento de hongos filamentosos sobre sustratos sólidos existen dos fenómenos de importancia y que han sido objeto de estudio: la extensión y la ramificación hifal. Trinci [15], realizó un estudio cinético de la extensión hifal de

diversos hongos (*M. hiemalis*, *G. candidum*, *P. chrysogenum*, *N. crassa* y *A. nidulans*), en el que determinó que la longitud hifal total del micelio de cada una de las especies de estudio incrementa con una tasa exponencial. En este estudio se estableció que después del proceso de germinación existe una producción discontinua de ramificaciones seguida de una fase continua de ramificación hifal, lo que ocasiona que la longitud hifal y el número de ramificaciones del micelio se incrementen exponencialmente de forma aproximada a la tasa específica de crecimiento.

La longitud máxima de extensión de las hifas de los hongos filamentosos en el crecimiento micelial sobre sustratos sólidos se restringe a una zona que se conoce como la zona de extensión. La forma y longitud de la zona de extensión y diámetro hifal son, según Trinci y Collinge, función del suministro de los precursores de la formación de la pared celular y de la tasa con que estos precursores son incorporados a la pared.

Lo anterior fue corroborado por Steele y Trinci [14] quienes, en un estudio sobre el crecimiento de *N. crassa* determinaron, que el tiempo de expansión de la zona en la cual se extienden las hifas, es una medida inversa de la tasa de formación de la pared celular, ya que la longitud de la zona de extensión de las hifas refleja las diferencias en el suministro de los precursores de la pared celular.

2.3.1. Modelado del crecimiento y ramificación hifal en medios sólidos

El modelado del crecimiento de los hongos filamentosos ha tenido diversos enfoques, algunos modelos se encargan de describir el crecimiento global de biomasa (Tabla 2.1), otros en cambio sólo predicen el comportamiento de una hifa o están constituidos por mecanismos estructurados de los procesos bioquímicos para dar explicación a la generación de hifas y sus ramificaciones.

Antecedentes

Tabla 2.1. Modelos empíricos de crecimiento que han sido aplicados en sistemas de fermentación en estado sólido [63].

	Forma diferencial	Forma integral
Linear	$\frac{dX}{dt} = K$	$X = Kt + X_0$
Exponencial	$\frac{dX}{dt} = \mu X$	$X = X_0 e^{\mu t}$
Logístico	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m} \right)$	$X = \frac{X_m}{1 + \left(\frac{X_m}{X_0} - 1 \right) e^{-\mu t}}$
Dos fases	$\frac{dX}{dt} = \mu X, \quad t < t_0$	$X = X_0 e^{\mu t}, \quad t < t_0$
	$\frac{dX}{dt} = \mu L e^{-k(t-t_a)} X, \quad t \geq t_a$	$X = X_A \exp \left[\frac{\mu L}{k} \left(1 - e^{-k(t-t_a)} \right) \right], \quad t \geq t_a$

Los primeros modelos sobre el crecimiento de microorganismos filamentosos se encargan de hacer una descripción macroscópica de dicho crecimiento. Koch [64] desarrolló un modelo que se basa en la hipótesis de que el crecimiento fúngico se comporta como una ley de crecimiento logístico; el modelo asume que el decaimiento de la tasa de crecimiento está asociado con el incremento en la densidad hifal y se expresa por una ecuación en la que se incluye la geometría de crecimiento, de modo que pueda ser usado satisfactoriamente en estudios de fermentación sólida y líquida.

El crecimiento y la ramificación hifal son procesos que no han sido descritos en su totalidad, debido a esto se han propuesto diversas teorías. Una de ellas; la más aceptada, es la teoría de la formación de vesículas contenidas en las hifas, las cuales almacenan precursores para la formación de la pared hifal y/o las enzimas requeridas para la síntesis de la misma. Prosser y Trinci [65] desarrollaron un modelo matemático para la descripción del crecimiento y ramificación hifal en el que hacen uso de esta teoría; el modelo relaciona los diversos eventos citológicos del crecimiento hifal con la cinética de crecimiento micelial, el uso de este modelo

permitió la predicción de los cambios en la longitud hifal y el número y la posición de las ramificaciones y septos de las hifas con base en los cambios de la concentración de las vesículas.

Edelstein y colaboradores [66] llevaron a cabo un estudio del crecimiento de *Sclerotium rolfii* para el desarrollo de un modelo en el que se relacionan la cinética de ramificación con la forma de la colonia. En este estudio se describe el crecimiento micelial a través de la distribución promedio de la densidad hifal, y se incluyen los fenómenos de ramificación lateral y autólisis hifal, los cuales se definen en términos algebraicos.

El fenómeno de difusión de los nutrientes a través del medio sólido es un punto clave en la creación de modelos de crecimiento de hongos filamentosos; en un medio sólido el crecimiento de los microorganismos se encuentra limitado por la geometría del sustrato (Tabla 2.2). Georgiou y Shuler [67] desarrollan un modelo que relaciona el proceso de crecimiento micelial y la difusión del sustrato en el medio sólido, en coordenadas cilíndricas. Este modelo permite la explicación de los cambios morfológicos del microorganismo; ya que toma en consideración los fenómenos de muerte, mantenimiento y diferenciación celular, además permite la predicción de los gradientes de concentración de sustrato en el medio.

Otro modelo que incluye la difusión de nutrientes es el que desarrollan Mitchell y colaboradores [21]; este modelo tiene como objeto la descripción del crecimiento de *R. oligosporus*, que ellos simplifican en cinco etapas: (1) la excreción de la enzima glucoamilasa al sustrato, (2) la difusión de la glucoamilasa en el medio sólido, (3) la glucólisis debida a la acción de la glucoamilasa del medio sólido, (4) la difusión de la glucosa al micelio en la superficie del sustrato y (5) la absorción de la glucosa por el micelio para la generación de nuevo micelio. El modelo incorpora la cinética de cada uno de estos pasos, pero esta restringido a la fase de crecimiento exponencial en donde se hace presente la producción de esta enzima.

Antecedentes

Un modelo que incluye las fases de difusión y reacción; es decir, la difusión de nutrientes y el crecimiento micelial, fue desarrollado por Molin y colaboradores [68]. De este estudio matemático se derivan las ecuaciones diferenciales que permiten la descripción de la difusión de la glucosa en el sustrato sólido y en el interior del micelio, y la generación de biomasa por consumo de glucosa. Este modelo les permite realizar la estimación de diversas constantes con base en datos experimentales del crecimiento de *R. oligosporus* y *T. viride* T.S.

Otro modelo que describe la transferencia de masa y la cinética de crecimiento en hongos filamentosos en un medio sólido antes de la ramificación de la hifa es el que desarrollan López Isunza y colaboradores [69]. Éste incluye la difusión del sustrato en el medio, la adsorción de nutrientes en la pared del hongo, el transporte de dichos nutrientes al interior de la hifa a través de una enzima acarreadora, la formación de los precursores de la pared hifal, el transporte por difusión y convección de dichos productos al interior de la hifa y por último el crecimiento hifal debido a la acumulación de dichos precursores en la hifa. El modelo permitió predecir los microgradientes dentro del medio sólido y determinar los efectos de los parámetros cinéticos y de transporte sobre el crecimiento individual hifal.

Boswell y colaboradores [70] realizaron un estudio teórico experimental para estudiar el crecimiento fúngico y las consecuencias funcionales del transporte de nutrientes en el micelio. El modelo considera el transporte por difusión de nutrientes y las reacciones de los componentes metabólicos; la parte experimental consiste en un estudio del crecimiento de *Rhizoctonia solani*. Con base en los datos experimentales se estimaron los parámetros de transporte difusivo y cinéticos de crecimiento, los resultados de la simulación demostraron que la difusión es el mecanismo dominante en las reacciones de crecimiento de dicho microorganismo y quizás los gradientes internos o externos de los nutrientes actúan como un interruptor de los mecanismos de transporte.

El oxígeno es un factor importante en el crecimiento de los microorganismos, en las fermentaciones sólidas de hongos filamentosos; el transporte de dicho compuesto tiene un efecto sobre la formación de las hifas aéreas, por tal motivo diversos investigadores se han dado a la tarea de determinar las limitaciones de la difusión del oxígeno en el crecimiento de los hongos filamentosos. Oostra y colaboradores [71] realizaron un estudio teórico-experimental sobre la difusión de oxígeno a través de un micelio de *R. oligosporus*, que se desarrolla sobre una superficie sólida con glucosa. Durante el crecimiento se llevó a cabo el monitoreo de oxígeno al interior del micelio y se cuantificaron algunos productos secundarios del metabolismo como el etanol. La parte teórica del estudio consistió en el desarrollo de un modelo matemático que describe el fenómeno de difusión de oxígeno en el micelio. En este estudio se considera que la porosidad del medio no afecta el coeficiente de difusión efectivo por lo que su valor corresponde a la difusividad de oxígeno en agua.

Rahardjo y colaboradores [72] llevaron a cabo un estudio sobre el crecimiento de hifas aéreas de *A. oryzae* y su contribución en la respiración del micelio; en esta investigación se desarrollará un modelo matemático para la descripción de los perfiles de oxígeno en la zona hifal del micelio en estado estacionario.

Las reacciones químicas necesarias para el crecimiento de los hongos filamentosos generan o requieren de energía, por lo que en los sistemas de fermentación o en el medio de crecimiento de los microorganismos se producen gradientes temperatura. Debido a lo anterior algunos investigadores [73-75] se han dado a la tarea de estudiar este parámetro en el crecimiento de los hongos filamentosos en sustratos sólidos, desarrollando modelos matemáticos que describen los efectos de la temperatura sobre la producción de metabolitos y de biomasa, y determinado los gradientes de temperatura originados en el medio.

Algunos de los modelos desarrollados se constituyen de dos partes con las que representan con detalle la distribución y crecimiento hifal y el crecimiento macroscópico micelial. Lejeune y Baron [76] desarrollaron un modelo en tres

Antecedentes

dimensiones del crecimiento de los hongos filamentosos, que considera la difusión y el consumo de oxígeno en el micelio, este modelo considera a la difusividad como una función de la porosidad del medio, que a su vez es función del tiempo. El modelo, basado en la evolución microscópica de *Trichoderma reesei* incluye los términos de ramificación y extensión hifal. Las estructuras tridimensionales del crecimiento micelial del hongo fueron simuladas mediante un modelo fractal, que sólo determina el crecimiento de biomasa y no afecta los parámetros como la extensión y ramificación hifal. El modelo permite predecir los efectos de parámetros como la tasa de extensión hifal, la frecuencia de ramificación y la porosidad mínima, sobre los perfiles de concentración de oxígeno, y concentración de biomasa y la tasa con la que el micelio incrementa su diámetro.

Nopharatana y colaboradores [77] desarrollaron un modelo de crecimiento de hongos filamentosos sobre sustratos sólidos, el modelo incluye los términos de crecimiento hifal, producción de biomasa y, consumo y transporte de glucosa. La producción de biomasa se representa mediante una ecuación logística de la biomasa acoplada a una ecuación de Monod de consumo de glucosa. Las simulaciones del modelo demostraron que incrementos en parámetros como la difusividad o la constante de saturación de Monod producen incrementos en la tasa de consumo de glucosa.

Otro modelo que incluye los mecanismos de crecimiento microscópico y permite la predicción del crecimiento de biomasa en un medio sólido con base en mediciones de parámetros de la morfología microscópica del borde de la colonia de *Gibberella fujikuroi* fue desarrollado por Ferret y colaboradores [18]. Este modelo predice la evolución de la biomasa total y la evolución del borde de la colonia.

Ikasari y Mitchell [78] llevaron a cabo el desarrollo de un modelo empírico de crecimiento de *R. oligosporus* sobre un medio sólido, este modelo divide en dos fases el crecimiento micelial: la fase de crecimiento exponencial, en la que se lleva a cabo la producción de ramificaciones hifales de acuerdo con la teoría de ramificación

simétrica (Viniestra y colaboradores, 1993), y la fase de desaceleración del crecimiento. El modelo permite la estimación de los parámetros de crecimiento del hongo como son: la tasa de crecimiento específica, la masa hifal muerta generada en el proceso de desaceleración del crecimiento y la constante de decaimiento que representa la muerte hifal.

Tabla 2.2. Modelos de difusión intrapartícula que han sido aplicados en sistemas de fermentación en estado sólido.

Consideraciones	Forma diferencial	Referencia
Difusión del sustrato en 1 y 2 dimensiones.	$\frac{\partial C}{\partial t} = D \nabla^2 C$	[67]
Difusión de glucoamilasa (E) y glucosa (G) en el medio, reacción en el micelio para la producción de biomasa (X).	$\frac{\partial G}{\partial t} = D \frac{\partial^2 G}{\partial x^2} + \frac{k_{Cat} + EG}{K_M + S}$ $\frac{\partial E}{\partial t} = -D \frac{\partial^2 E}{\partial x^2}$ $\frac{\partial X}{\partial t} = Y_{X/G} \frac{q_m G _{\delta} P(X)}{K_s + G _{\delta}}$	[21]
Difusión y consumo de glucosa (G) y producción de biomasa (B).	$\frac{\partial B}{\partial t} = \alpha C_G - \beta B_{NM} + D_B \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial B}{\partial r} \right)$ $\frac{\partial G}{\partial t} = -P_G + D_G \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial G}{\partial r} \right)$	[68]
Difusión de sustrato en el medio (s_m), transporte de acarreadores del sustrato en la membrana de la hifa (a , θ) y difusión, convección y reacción de sustrato y precursores del crecimiento al interior de la hifa (s, p).	$\frac{\partial s_m}{\partial t} = \gamma_{sm} \frac{\partial^2 s_m}{\partial l^2}$ $\frac{\partial a}{\partial t} = \gamma_{ap} \frac{\partial^2 a}{\partial \xi^2}$ $\frac{\partial s}{\partial t} = \gamma_s \left\{ \frac{1}{\lambda^2} \frac{\partial^2 s}{\partial \xi^2} + a_1^2 \left(\frac{\partial^2 s}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial s}{\partial r} \right) \right\} +$ $\left\{ \xi D_{aw} \left(\frac{qp}{K_p + p} \right)_{\xi=1} - \frac{a}{\lambda} \right\} \frac{\partial s}{\partial \xi} - D_{ap} \left(\frac{s}{K_s + s} \right) \lambda$	[69]

$$\frac{\partial p}{\partial t} = \left\{ \frac{1}{\lambda^2} \frac{\partial^2 p}{\partial \xi^2} + a_1^2 \left(\frac{\partial^2 p}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial p}{\partial r} \right) \right\} +$$

$$\left\{ \xi D_{av} \left(\frac{qp}{K_p + p} \right)_{\xi=1} - \frac{a}{\lambda} \right\} \frac{\partial p}{\partial \xi} - D_{ap} \left(\frac{s}{K_s + s} \right) \lambda$$

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} = \gamma_{asp} \frac{\partial^2 \theta}{\partial \zeta^2}$$

Producción de biomasa hifal (m), producción de ramificaciones (p) y difusión y reacción de sustrato al interior del micelio (s_i) y en el medio sólido (s_e).

$$\frac{\partial m}{\partial t} = vs_i p - dm \quad [70]$$

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -\frac{\partial^2}{\partial x^2} (vs_i p) + bs_i m - fmp$$

$$\frac{\partial s_e}{\partial t} = D_e \frac{\partial^2 s_e}{\partial x^2} - c_3 s_i m s_e$$

$$\frac{\partial s_i}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D_i m \frac{\partial s_i}{\partial x} - D_a m \frac{\partial p}{\partial x} \right)$$

$$+ c_1 s_i m s_e + c_2 vs_i p - c_3 D_a m s_i \left| \frac{\partial p}{\partial x} \right|$$

Difusión de oxígeno en términos de la porosidad y tortuosidad del medio, tasas extensión y ramificación de las hifas.

$$q_{tip}^i = k_{tip,1} + k_{tip,2} \frac{l_{br}^i}{l_{br}^i + K_t} \quad [60]$$

$$q_{bran} = k_{bran} \cdot l_{tot}$$

$$D(t)_{eff}^j = \frac{D_{O_2} \mathcal{E}(t)_j}{\tau}$$

Tasa de producción de las hifas (n), la producción de biomasa (B) y el transporte y consumo de glucosa (G).

$$\frac{\partial n}{\partial t} = a_t \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) \quad [77]$$

$$+ D_b \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) \frac{\partial n}{\partial x}$$

$$\frac{\partial B}{\partial t} \Big|_x = nv_{max} \left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) ap$$

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D_{typ} \frac{\partial}{\partial x} \left(B \frac{\partial G}{\partial x} \right) - \frac{1}{Y_{X/G}} nv_{max}$$

$$\left(1 - \frac{B}{B_m} \right) \left(\frac{G|_{x-\delta}}{k_t + G|_{x-\delta}} \right) a\rho - mB$$

En suma el amplio estudio de los factores que influyen en el crecimiento de los hongos filamentosos tanto en cultivos líquidos como en medios sólidos ha tenido como objeto la optimización de los procesos de fermentación, pero el crecimiento de estos microorganismos y en general de todos los organismos vivos se debe una serie de reacciones enzimáticas bioquímicas, las cuales representan un fenómeno complejo que no ha sido estudiado en su totalidad. Un modelo altamente estructurado del desarrollo de hongos filamentosos debe incluir las ecuaciones que describan los procesos bioquímicos por medio de los cuales se lleva a cabo el crecimiento microbiano, además de las ecuaciones que describan el sistema con mayor detalle en el que se desarrolle tal crecimiento.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

Capítulo 3. Objetivos

3.1. Objetivo general

- Desarrollar un modelo dinámico que describa el transporte de nutrientes acoplado al proceso de crecimiento de *Aspergillus niger* en un sustrato sólido de agar enriquecido con glucosa.

3.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto de la concentración inicial del sustrato en la producción total de biomasa.
- Determinar experimentalmente las propiedades morfométricas del sistema en estudio.
- Realizar la estimación de los parámetros cinéticos del crecimiento *Aspergillus niger*.
- Desarrollar un modelo dinámico de difusión de nutrientes en un micelio de hongo acoplado con el crecimiento de *Aspergillus niger*.
- Determinar el efecto la variación de los parámetros del sistema sobre los perfiles de evolución de concentración de biomasa y sustrato.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo 4. Materiales y Métodos

Para la experimentación se empleó la cepa No.C28B25 de *Aspergillus niger*, de la colección fúngica de la Universidad Autónoma Metropolitana - Institut pour le Recherche et D´eveloppement.

4.1. Conservación de la cepa

La conservación de la cepa se llevó a cabo según el protocolo desarrollado por Smith [79], haciendo crecer *Aspergillus niger* C28B25 hasta la esporulación (aproximadamente por 5 días) en un medio sólido de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) con Desoxicolato, con el propósito de obtener colonias individuales, de modo que se obtuvo un cultivo monoespórico que fue transferido para su crecimiento a un medio en un matraz Erlenmeyer.

Al cabo de cinco días se cosecharon las esporas de la superficie de la colonia, utilizando para ello una solución estéril de Tween 80 al 0.01%, y un agitador magnético, el cual raspó la superficie de la colonia por aproximadamente 10 minutos con el fin de separar las esporas adheridas a la colonia, de aquí se obtuvo una suspensión de esporas que fue transferida a un matraz Erlenmeyer estéril. Con una pipeta estéril se tomaron 5 mL de la suspensión obtenida y se colocaron en recipientes con tapa de roscada en los que había el medio adecuado para el crecimiento del microorganismo (5 mL del medio PDA).

Una vez que el hongo esporuló, se añadió glicerol (99%) estéril a los frascos y se conservaron en refrigeración (entre 5 y 10 °C), con una viabilidad de la cepa de un año de preservación.

4.2. Sistema experimental

El sistema experimental (Figura 4.1) consistió de una caja Petri de plástico de 9 cm de diámetro que contiene aproximadamente 45 mL de medio sólido, equivalentes a aproximadamente 0.7 cm de profundidad, en cuya superficie, para un inculó tipo

césped, se coloca una lámina de celofán previamente tratada y sobre la cual se lleva a cabo el crecimiento del microorganismo.

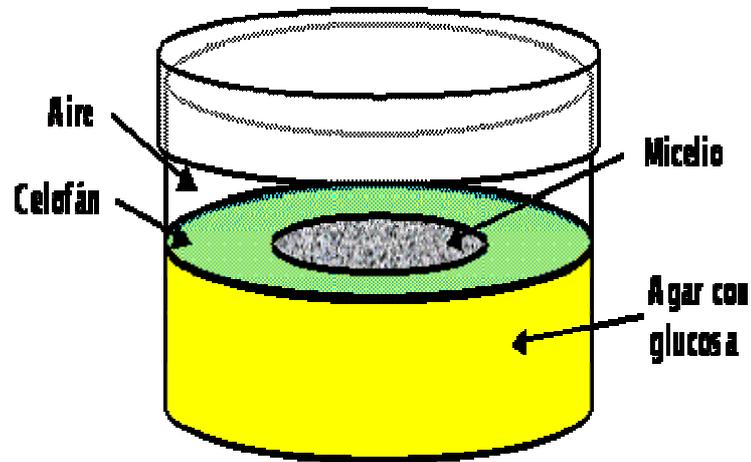


Figura 4.1. Sistema experimental.

El celofán se cortó en forma circular, con un radio entre 4.5 y 5 cm, se lavó durante 10 min con agua caliente, secó a 60 °C en una estufa, se dejó reposar durante la noche y posteriormente fue tarado, por último se esterilizó en una autoclave para poder ser utilizado.

4.3. Composición del medio sólido

El crecimiento de *Aspergillus niger* C28B25 se llevó a cabo sobre un medio sólido (agar) enriquecido con glucosa; en la preparación del medio de cultivo se añadieron sulfato de amonio y urea, para obtener una relación C/N de 12, también fue agregada una concentración de oligoelementos tal que no se presentaran limitaciones debido a estos componentes a lo largo del crecimiento del hongo. Para los experimentos a diferentes concentraciones de glucosa, se variaron proporcionalmente las concentraciones de los demás componentes del medio de cultivo. Las composiciones del medio basal y de la solución de los oligoelementos se presentan en las tablas siguientes [12]:

Tabla 4.1. Composición del medio basal.

Compuesto	g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.98
Urea	0.24
KH_2PO_4	0.50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.60
Extracto de levadura	0.10
Oligoelementos (solución)	2 (mL/L)
Glucosa	10.0

Tabla 4.2. Composición de la solución de oligoelementos.

Compuesto	g/L
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.50
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	11.0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.15
H_3BO_3	5.50
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.55
Na_2EDTA	25.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.80
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.80

Nota: El extracto de levadura también representa una fuente nitrógeno al medio, sin embargo dado que el contenido de este elemento es de aproximadamente 7.4% en peso, su uso no modifica la relación C/N.

4.4. Inóculo

A continuación se presenta la metodología utilizada para inocular las cajas Petri con esporas de *A. niger* recién cosechadas:

1. Se inocularon 15 μL del medio en conservación de *A. niger* en una matraz Erlenmeyer que contiene el medio PDA.
2. Una vez que la colonia de *A. niger* esporuló, las esporas se cosecharon de la superficie de la colonia raspándola por aproximadamente 10 minutos, de aquí se obtuvo una suspensión de esporas.
3. La suspensión de esporas se vació en un matraz estéril y del cual se tomó una muestra para realizar el conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer.

Con el fin de caracterizar el crecimiento de *A. niger* a dos niveles, se utilizaron dos tipos de inoculación:

- La inoculación tipo *césped*, que consistió en depositar una cantidad conocida de la suspensión de esporas en el centro de la caja Petri con agar y celofán estéril, dispersarla con una barra de vidrio estéril, de manera que en toda la superficie haya una distribución uniforme de esporas. El volumen utilizado de suspensión fue generalmente de 0.5 mL, para tener una concentración final de esporas de aproximadamente 1×10^5 esporas /caja. En estas cajas se realizó un seguimiento del peso seco de la biomasa sintetizada, que se expresa con la variable ϑ (mgPS/cm²).
- La inoculación por *piquete*, que se realizó depositando con una punta de una pipeta un volumen bajo de la suspensión de esporas (aproximadamente 10 μL) en el centro de la caja, cuidando no dispersar el líquido y procurando enterrar la punta de la pipeta en el agar. Con este tipo de inoculación se logró obtener una colonia circular por caja, lo cual permitió medir el cambio del diámetro de la colonia. Así mismo, esto permitió la medición de la longitud y el diámetro de las hifas distales en el borde de la colonia.

4.5. Cuantificación del peso seco

Una vez que el hongo creció en forma de césped sobre el sustrato sólido separado por una lámina de papel celofán previamente tratada y pesada, se separó el celofán del agar con pinzas de disección. La lámina con biomasa fue secada en una estufa a 60 °C, durante 24 horas; después se almacenó en un desecador toda la noche, y se pesó posteriormente en una balanza analítica. El peso seco de la muestra se obtuvo de la diferencia del peso de la lámina de celofán, antes y después del crecimiento del micelio. El resultado se reportó en mgPS / cm². La superficie de una caja Petri de 9 cm de diámetro fue de 63.6 cm².

4.6. Análisis de imágenes

Este estudio se realizó para el inóculo tipo piquete y para llevar a cabo las mediciones morfométricas se empleó el programa IMAGEM 2000. El equipo de análisis de imágenes constó de un microscopio, conectado a una cámara de circuito cerrado, en blanco y negro, la cual envía la imagen a una computadora, donde es procesada por el mismo programa. Este software contiene las opciones necesarias para segmentar la imagen, aplicar filtros y mejorar la imagen, así como para realizar las mediciones de longitud, área y factor de forma, entre las más importantes. Las mediciones se realizaron manualmente, moviéndose dentro del campo del microscopio sobre el micelio en turno, para evitar sesgar el muestreo.

Todos los experimentos se realizaron por lo menos dos veces, para corroborar la reproducibilidad de los resultados. Las mediciones de radios de la colonia se hicieron por triplicado; la medición de longitudes y diámetros de las hifas se realizaron tomando muestras de 30 o 40 por caja.

CAPÍTULO 5. EL MODELO MATEMÁTICO DE CRECIMIENTO GLOBAL DE BIOMASA

Capítulo 5. El Modelo Matemático de Crecimiento Global de Biomasa

Los estudios del crecimiento de hongos filamentosos sobre medios sólidos se han llevado a cabo desde principios de los años 70 por Prosser y Trinci [10, 65], quienes fueron los primeros en presentar un modelo donde se relaciona al crecimiento de la hifa con los mecanismos celulares. Durante este tipo de crecimiento los nutrientes se difunden a través del medio sólido hasta estar en contacto con el microorganismo, ser consumidos y con ello llevar a cabo la generación de biomasa.

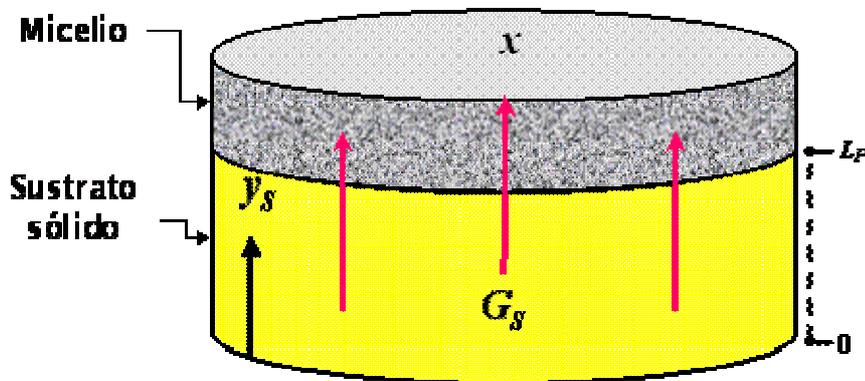


Figura 5.1. Diagrama del crecimiento global de biomasa sobre una placa de agar y difusión de los nutrientes.

En la Figura 5.1 se muestra el diagrama del sistema que describe el crecimiento global de biomasa sobre un medio sólido (agar); en este sistema la biomasa crece homogéneamente sobre la superficie del medio la glucosa (G_s) se transfiere del medio de cultivo al micelio, y al estar en contacto con éste pasa a través del hongo por difusión facilitada para la producción de biomasa (x); de este modo la biomasa generada depende de la magnitud de la concentración de nutrientes en el medio.

El desarrollo del presente modelo se basa en los trabajos desarrollados por Larralde [12, 19]; López Isunza y colaboradores [69] y Viniegra y colaboradores [55], y se basa en las siguientes consideraciones:

- Las esporas de *A. niger* son cultivadas sobre un medio sólido (agar, enriquecido con glucosa).
- El modelo describe globalmente el crecimiento de una colonia.
- El crecimiento del micelio depende de la disponibilidad de una sola fuente de carbono, y la transferencia por difusión del sustrato en el agar obedece a la ley de Fick.
- El crecimiento radial de la colonia está restringido a un anillo exterior, cuyo diámetro permanece constante.
- El micelio presenta un espesor constante.
- La colonia crece con una tasa exponencial máxima de modo que el modelo se basa en la cinética de tipo logístico acoplada a Monod.
- El consumo de glucosa sólo se debe al crecimiento celular.

Este modelo se utilizó para predecir: el crecimiento global de la biomasa del micelio; los perfiles de concentración de glucosa en el medio y para realizar la estimación de los parámetros de transporte y reacción a partir de las mediciones experimentales de la biomasa total del hongo sobre la superficie de agar.

Este modelo no describe el caso real del crecimiento micelial del hongo, ya que no considera el crecimiento del micelio en dirección paralela a la transferencia de masa, debido a que supone un espesor y radio de micelio constantes. Además no se toma en cuenta los procesos bioquímicos del microorganismo en los que se llevan a cabo los procesos de difusión enzimática y biorreacción de los nutrientes para la generación de pared hifal, y por consiguiente de biomasa. Con base en las consideraciones anteriores se escriben las ecuaciones para la generación de biomasa, y el transporte glucosa.

5.1. La producción de biomasa

La generación de biomasa durante el proceso de crecimiento de *Aspergillus niger* depende de la difusión y del consumo de la glucosa por el micelio. En este trabajo se hace la suposición de que el crecimiento sigue un comportamiento logístico

limitado por un máximo en la concentración de biomasa (x_m), y está dado por la siguiente expresión para la tasa de producción de biomasa (\mathfrak{R}_x).

$$\frac{dx}{dt} = \mu_{\max} x \left(1 - \frac{x}{x_m} \right) \left(\frac{G_s}{K_G + G_s} \right) \quad (5.1.)$$

Donde la concentración de biomasa (x), esta dada por $x = \mathcal{G} \cdot h_m$; h_m corresponde a el espesor del micelio, μ_{\max} corresponde a la tasa específica de crecimiento, y K_G es la constante de saturación media de la glucosa.

5.2. El transporte y consumo de glucosa

El balance de glucosa en el medio sólido depende de la tasa de difusión en el medio sólido y de su consumo por el micelio para el crecimiento y manutención en la parte superior de la placa de agar. Por lo cual la tasa de acumulación de glucosa en el medio sólido se expresa de la siguiente forma;

$$\frac{\partial G_s}{\partial t} = D_{efA} \left(\frac{\partial^2 G_s}{\partial y_s^2} \right) \quad (5.2.)$$

Donde el transporte de glucosa en el medio ocurre por difusión de modo que D_{efA} corresponde al coeficiente efectivo de difusión de la glucosa en el medio sólido.

5.3. Las condiciones inicial y de frontera

La condición inicial representa el inicio de la germinación de las esporas sobre la membrana, y corresponde a la concentración inicial de biomasa inoculada en cada uno de los experimentos realizados, así que al tiempo inicial:

$$t = 0 \quad x(0) = x_0 \quad (5.3.)$$

$$G_S(0, y_S) = G_{S_0} \quad (5.4.)$$

Las condiciones de frontera representan la situación física del sistema de estudio, y para el caso del crecimiento global de biomasa de un hongo filamentoso sobre un medio sólido son las siguientes: (1) en el medio sólido (agar) en contacto con la base de la caja Petri ($y_S = 0$), esto es, el flux de glucosa es igual a cero debido a la impermeabilidad del recipiente, (2) en la superficie del medio en contacto con el micelio ($y_S = L_P$) el flux de glucosa es igual al flux de consumo de glucosa por la colonia de hongo. Lo anterior se expresa como sigue:

$$y_S = 0 \quad \frac{\partial G_S}{\partial y_S} = 0 \quad (5.5.)$$

$$y_S = L_P \quad -D_{ef_A} \frac{\partial G_S}{\partial y_S} = \frac{\mathfrak{R}_x h_m}{Y_{X/S}} \quad (5.6.)$$

Donde $Y_{X/S}$ es el rendimiento del consumo de glucosa del microorganismo. De esta forma las Ecuaciones 5.1 a 5.6 describen el transporte y consumo de glucosa en el agar.

5.4. El modelo adimensional

Tomando las siguientes variables y coeficientes de adimensionalización y sustituyendo en las Ecs. 5.1 a 5.6, se presentan las ecuaciones del modelo de forma adimensional obtenidas;

$$\chi = \frac{x}{x_0}, \quad \chi_M = \frac{x_m}{x_0}, \quad \theta = \frac{D_{ef_A}}{L_P^2} t, \quad \gamma_S = \frac{G_S}{G_{S_0}}, \quad \kappa = \frac{K_G}{G_{S_0}},$$

$$\phi_I^2 = L_P^2 \frac{\mu_{\max}}{D_{ef_A}}, \quad \zeta_S = \frac{y_S}{L_P}$$

La producción de biomasa

$$\frac{d\chi}{d\theta} = \phi_1^2 \chi \left(1 - \frac{\chi}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_S}{\kappa + \gamma_S} \right) \Big|_{\zeta_s=1} \quad (5.7.)$$

El transporte y consumo de glucosa en el medio sólido

$$\frac{\partial \gamma_S}{\partial \theta} = \left(\frac{\partial^2 \gamma_S}{\partial \zeta_s^2} \right) \quad (5.8.)$$

Condición inicial

$$\theta = 0 \quad \chi(0) = 1 \quad (5.9.)$$

$$\gamma_S(0, \zeta_s) = 1 \quad (5.10.)$$

Condiciones de frontera

$$\zeta_s = 0 \quad \frac{\partial \gamma_S}{\partial \zeta_s} = 0 \quad (5.11.)$$

$$\zeta_s = 1 \quad \frac{\partial \gamma_S}{\partial \zeta_s} = - \frac{\phi_1^2 x_0 \chi}{G_{S_0} Y_{X/S}} \left(\frac{h_m}{L_p} \right) \left(1 - \frac{\chi}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_S}{\kappa + \gamma_S} \right) \Big|_{\zeta=1} \quad (5.12.)$$

5.5. La solución numérica

La solución numérica del modelo adimensional se llevó a cabo empleando el método de colocación ortogonal, usando polinomios de Legendre con 7 puntos internos de colocación ($N=7$) [80].

La producción de biomasa

$$\frac{d\chi}{d\theta} = \phi_1^2 \chi \left(1 - \frac{\chi}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_{S_{N+2}}}{\kappa + \gamma_{S_{N+2}}} \right) \quad (5.13.)$$

para toda $i = 1, \dots, N+2$

El transporte y consumo de glucosa en el medio sólido

$$\frac{\partial \gamma_{S_i}}{\partial \theta} = \sum_{j=1}^{N+2} B_{i,j} \gamma_{S_j} \quad (5.14.)$$

para toda $i = 2, \dots, N+1$

Condición inicial

$$\theta = 0 \quad \chi(0) = 1 \quad (5.15.)$$

$$\gamma_{S_i} = 1 \quad (5.16.)$$

para toda $i = 1, \dots, N+2$

Condiciones de frontera

$$i = 1 \quad \sum_{j=1}^{N+2} A_{1,j} \gamma_{S_j} = 0 \quad (5.17.)$$

$$i = N+2 \quad \sum_{j=1}^{N+2} A_{N+2,j} \gamma_{S_j} + \frac{\phi_I^2 x_0 \chi}{G_{S_0} Y_{X/S}} \left(\frac{h_m}{L_P} \right) \left(1 - \frac{\chi}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_{S_{N+2}}}{\kappa + \gamma_{S_{N+2}}} \right) = 0 \quad (5.18.)$$

para toda $j = 1, \dots, N+2$

Como resultado de la discretización espacial de la Ecuación 5.8 y sus condiciones de frontera, se obtuvo un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias con condiciones de frontera no lineales que fueron integradas numéricamente con un método de Runge Kutta de cuarto orden acoplado al método de Broyden y usando las constantes de la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Valores de las constantes usadas y estimadas en la solución numérica del modelo de crecimiento global de biomasa.

Constante	Valor	
$Y_{X/S}$	0.5 g _X /g _G	[21, 57]
K_G	0.0025 g/cm ³	[69]
D_{ef_A}	5.4 x 10 ⁻³ cm ² /h	[81]
x_m	0.009 - 0.07 g/cm ³	Datos experimentales
x_0	0.14 - 0.35 g/cm ³	Datos experimentales
L_p	0.6 cm	Dato experimental
G_{S_0}	0.05 - 0.25 g/cm ³	Datos experimentales
μ_{max}	0.0527- 0.2125 1/h	Parámetro estimado con el modelo de crecimiento global de biomasa
h_m	0.1 cm	Dato experimental

CAPÍTULO 6. EL MODELO MATEMÁTICO DE CRECIMIENTO RADIAL

Capítulo 6. El Modelo Matemático de Crecimiento Radial

Una colonia micelial resulta de la germinación de una espora que se desarrolla bajo condiciones de crecimiento favorables, una característica importante del crecimiento micelial en sustratos sólidos es el incremento gradual de la longitud de la colonia; según Trinci [13], este incremento es función del crecimiento de las hifas presentes en la zona periférica de la colonia y de la tasa de crecimiento específica del microorganismo.

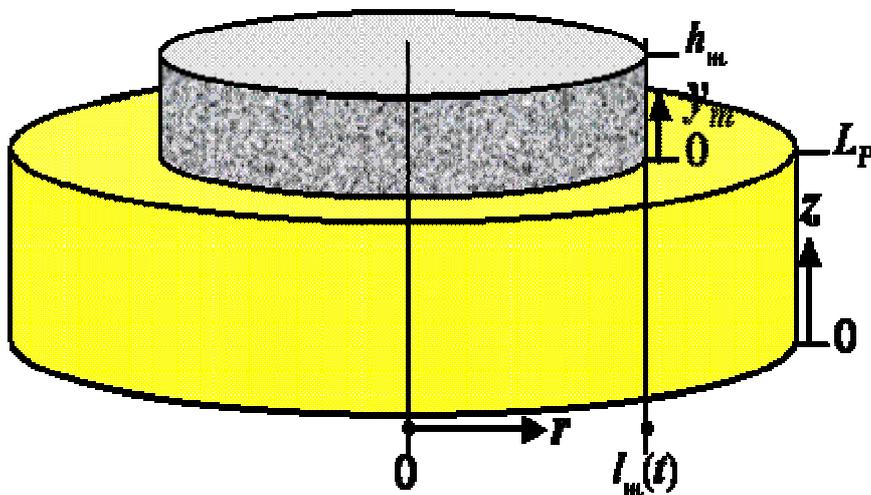


Figura 6.1. Esquematización del crecimiento radial de un micelio de hongo sobre una placa de agar y la difusión de glucosa.

El crecimiento micelial en medios sólidos es complejo, y se limita al tipo de superficie sobre la que crece el microorganismo; en la Figura 6.1 se presenta el sistema modelo que describe el crecimiento radial del micelio en una placa de agar, en este sistema la biomasa crece de forma homogénea y horizontalmente sobre la superficie del medio sólido, de modo que la glucosa difunde a través del medio (G_S) hacia la superficie donde se encuentra el micelio y al contacto con éste ingresa al interior del hongo por difusión facilitada a través de las hifas. Es importante resaltar que el microorganismo crece sobre una capa de agua superpuesta sobre la superficie del agar que se libera del medio sólido por hidrólisis.

Las consideraciones que se tomaron en cuenta para desarrollar este modelo son las siguientes:

- Las esporas de *A. niger* son cultivadas en un punto central del medio sólido (agar, enriquecido con glucosa).
- El crecimiento de la colonia sólo se lleva a cabo en su zona periférica.
- La colonia crece radial y simétricamente.
- El crecimiento del micelio depende de la disponibilidad de una sola fuente de carbono, y la transferencia por difusión de la glucosa en el agar obedece a la ley de Fick.
- El micelio tiene una densidad constante.
- El crecimiento del micelio presenta un espesor constante.
- El micelio se encuentra rodeado de una capa delgada de agua.
- La colonia crece en la zona periférica del micelio con una tasa exponencial máxima de modo que el modelo se basa en la cinética de Monod acoplada a una ecuación logística.
- El consumo de glucosa se debe sólo al crecimiento celular.

Este modelo se usará para predecir: el crecimiento radial del micelio; los perfiles de concentración en el medio y en el micelio, y para realizar la estimación de los parámetros de transporte y reacción a partir de mediciones experimentales del cambio en el tiempo de la longitud del radio en la colonia de hongos.

6.1. La producción de biomasa

Al igual que el modelo de crecimiento global de biomasa, la generación del biomasa que ocurre durante el proceso de crecimiento de *Aspergillus niger* depende de la difusión y del consumo de glucosa por el microorganismo, por lo que este crecimiento sigue un comportamiento logístico limitado por un máximo en la densidad de biomasa (x_m) y está dado por la Ec. 5.1.

6.2. El transporte de glucosa

En este caso la acumulación de glucosa depende su difusión en el medio sólido; esta difusión se lleva a cabo de manera, tanto axial como radial. Debido a esto las tasas de acumulación de glucosa en el medio sólido y en el agua que rodea al micelio se expresan como sigue;

En el medio sólido

$$\frac{\partial G_s}{\partial t} = D_{ef_A} \left(\frac{\partial^2 G_s}{\partial z^2} + \frac{\partial^2 G_s}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial G_s}{\partial r} \right) \quad (6.1.)$$

En el agua que rodea al micelio

$$\frac{\partial G}{\partial t} = D_{ef_M} \left(\frac{\partial^2 G}{\partial y_m^2} + \frac{\partial^2 G}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial G}{\partial r} \right) \quad (6.2.)$$

Donde el transporte de glucosa en el medio ocurre por difusión, de modo que D_{ef_A} corresponde al coeficiente efectivo de difusividad de la glucosa en el medio sólido, y debido a que el micelio se encuentra recubierto de una capa de agua, D_{ef_M} es el coeficiente de difusividad de la glucosa en agua.

6.3. Las condiciones inicial y de frontera

La condición inicial para la biomasa corresponde a la cantidad inoculada; para la glucosa es su concentración inicial en el medio sólido; y ya que no existe aún, es cero para el agua que rodea al micelio, de tal forma que:

$$t = 0 \quad x(0) = x_0 \quad (6.3.)$$

$$G_s(0, z, r) = G_{s_0} \quad (6.4.)$$

$$G(0, y_m, r) = 0 \quad (6.5.)$$

Las condiciones de frontera, que representan la situación física de este caso de estudio, son las siguientes: para la longitud axial en el medio sólido (1) la caja Petri es impermeable a la glucosa ($z = 0$), por lo tanto el flux de glucosa es igual a cero; (2) en la superficie del medio en contacto con el micelio ($z = L_p$) la concentración de glucosa es igual a la concentración de glucosa en el agua que rodea al micelio, debido a que la solubilidad de glucosa en agua es mayor a la concentración de glucosa en el medio para los diferentes casos de concentración inicial de glucosa (1.9 kg/L) [82].

$$z = 0 \quad \frac{\partial G_s}{\partial z} = 0 \quad (6.6.)$$

$$z = L_p \quad G_s = G \quad (6.7.)$$

Para la longitud radial en el medio sólido: (3) el flux de glucosa radial es igual a cero en el centro del medio ($r = 0$), debido a que tenemos un sistema simétrico; (4) el flux de glucosa en el medio es cero en el punto $r = l_m$ por presentarse un máximo en la concentración.

$$r = 0 \quad \frac{\partial G_s}{\partial r} = 0 \quad (6.8.)$$

$$r = l_m(t) \quad \frac{\partial G_s}{\partial r} = 0 \quad (6.9.)$$

Para la longitud axial del micelio: (5) el flux difusivo de glucosa en el medio es idéntico al flux difusivo de glucosa en el micelio, ya que existe continuidad de fluxes en el punto ($y_m = 0$) que equivale al punto del micelio en contacto con el medio, (6) el flux de glucosa es igual a cero en el punto que el micelio esta en contacto con el aire ($y_m = h_m$), ya que la glucosa no difunde en él.

$$y_m = 0 \quad -D_{ef_M} \frac{\partial G}{\partial y_m} = -D_{ef_A} \frac{\partial G_S}{\partial z} \quad (6.10.)$$

$$y_m = h_m \quad \frac{\partial G}{\partial y_m} = 0 \quad (6.11.)$$

Para la longitud radial en el micelio: (7) el flux de glucosa en el micelio es igual a cero debido a que tenemos un sistema simétrico radial, y (8) en $r = l_m(t)$ se lleva a cabo el crecimiento radial de la colonia por lo tanto el flux de glucosa es igual a el flux de consumo glucosa de la colonia.

$$r = 0 \quad \frac{\partial G}{\partial r} = 0 \quad (6.12.)$$

$$r = l_m(t) \quad -D_{ef_M} \frac{\partial G}{\partial r} = \frac{\mathfrak{R}_x}{Y_{X/S}} h_m \quad (6.13.)$$

6.4. Frontera móvil

El crecimiento de la colonia se da de forma radial, de modo que esta longitud no es fija y se incrementa a medida que transcurre el tiempo de crecimiento del microorganismo. Si se considera este crecimiento radial en el modelo, se presenta un problema de frontera móvil.

Para dar solución a este problema, se considera la transformación de la coordenada móvil a una coordenada fija, por lo que se define la siguiente transformación;

$$\lambda = \frac{r}{l_m(t)} \quad (6.14.)$$

Una vez fija la coordenada que se modifica con el crecimiento radial de la colonia, λ será 1 para todo tiempo de crecimiento. La tasa de acumulación de glucosa tanto en el medio sólido como en el agua que rodea al micelio depende de la posición radial,

usando relaciones estándar de frontera móvil [83], tenemos que para el consumo de glucosa en el medio sólido;

$$\left. \frac{\partial G_s}{\partial t} \right|_r = \left. \frac{\partial G_s}{\partial t} \right|_\lambda + \frac{\partial G_s}{\partial \lambda} \frac{d\lambda}{dt} \quad (6.15.)$$

En donde $\frac{d\lambda}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{r}{l_m} \right)$, y que es igual a

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{r}{l_m} \right) = \frac{l_m \frac{dr}{dt} - r \frac{dl_m}{dt}}{l_m^2} = - \frac{r}{l_m^2} \frac{dl_m}{dt} = - \frac{\lambda}{l_m} \frac{dl_m}{dt} \quad (6.16.)$$

Sustituyendo la Ec. 6.16 en la Ec. 6.15 tenemos:

$$\left. \frac{\partial G_s}{\partial t} \right|_r = \left. \frac{\partial G_s}{\partial t} \right|_\lambda - \frac{\lambda}{l_m} \frac{\partial G_s}{\partial \lambda} \frac{dl_m}{dt} \quad (6.17.)$$

Reacomodando la Ec. 6.1 y sustituyéndola en la ecuación anterior, se obtiene que la acumulación de glucosa en el medio sólido está dada por;

$$\left. \frac{\partial G_s}{\partial t} \right|_\lambda = D_{efA} \left(\frac{\partial^2 G_s}{\partial z^2} + \frac{\partial^2 G_s}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial G_s}{\partial r} \right) + \frac{\lambda}{l_m} \frac{\partial G_s}{\partial \lambda} \frac{dl_m}{dt} \quad (6.18.)$$

Aplicando la definición de frontera móvil a la Ec. 6.2 y tenemos que para la glucosa en el agua que rodea al micelio la acumulación queda;

$$\left. \frac{\partial G}{\partial t} \right|_\lambda = D_{efM} \left(\frac{\partial^2 G}{\partial y_m^2} + \frac{\partial^2 G}{\partial r^2} + \frac{1}{r} \frac{\partial G}{\partial r} \right) + \frac{\lambda}{l_m} \frac{\partial G}{\partial \lambda} \frac{dl_m}{dt} \quad (6.19.)$$

Al incrementarse radialmente la colonia la biomasa aumenta su volumen, por lo tanto si se define el flux de crecimiento radial de la colonia como: $\rho_M \frac{dl_m}{dt}$, y se considera que el crecimiento de biomasa es función de la tasa consumo de glucosa, el flux de cambio de longitud de la colonia se representa con la siguiente ecuación [83]:

$$\rho_M \frac{dl_m}{dt} = \mathfrak{R}_x l_m \quad (6.20.)$$

6.5. El modelo adimensional

De forma adimensional las ecuaciones que describen el modelo quedan como sigue:

La producción de biomasa

$$\frac{d\chi}{d\tau} = \phi^2 \chi \left(1 - \frac{\chi}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_M}{\kappa + \gamma_M} \right) \Big|_{\lambda=1} \quad (6.21.)$$

El flux de crecimiento

$$\frac{d\zeta}{d\tau} = \frac{x_0}{\rho_M} \zeta \phi^2 \chi \left(1 - \frac{\chi}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_M}{\kappa + \gamma_M} \right) \Big|_{\lambda=1} \quad (6.22.)$$

El transporte de glucosa

En el medio sólido

$$\frac{\partial \gamma_S}{\partial \tau} = \frac{D_{efA}}{D_{efM}} \left[\left(\frac{l_{m_0}}{L_P} \right)^2 \left(\frac{\partial^2 \gamma_S}{\partial \xi^2} \right) + \frac{1}{\zeta^2} \left(\frac{\partial^2 \gamma_S}{\partial \lambda^2} + \frac{1}{\lambda} \frac{\partial \gamma_S}{\partial \lambda} \right) \right] + \frac{\lambda}{\zeta} \frac{\partial \gamma_S}{\partial \lambda} \frac{d\zeta}{d\tau} \quad (6.23.)$$

En el agua que rodea al micelio

$$\frac{\partial \gamma_M}{\partial \tau} = \left[\left(\frac{l_{m_0}}{h_m} \right)^2 \left(\frac{\partial^2 \gamma_M}{\partial \zeta_m^2} \right) + \frac{1}{\zeta^2} \left(\frac{\partial^2 \gamma_M}{\partial \lambda^2} + \frac{1}{\lambda} \frac{\partial \gamma_M}{\partial \lambda} \right) \right] + \frac{\lambda}{\zeta} \frac{\partial \gamma_M}{\partial \lambda} \frac{d\zeta}{d\tau} \quad (6.24.)$$

Condición inicial

$$\tau = 0 \quad \chi(0) = 1 \quad (6.25.)$$

$$\gamma_s(0, \xi, \lambda) = 1 \quad (6.26.)$$

$$\gamma_M(0, \zeta_M, \lambda) = 0 \quad (6.27.)$$

Condiciones de frontera

En el medio sólido

$$\xi = 0 \quad \frac{\partial \gamma_s}{\partial \xi} = 0 \quad (6.28.)$$

$$\xi = 1 \quad \gamma_s = \gamma_M \quad (6.29.)$$

$$\lambda = 0 \quad \frac{\partial \gamma_s}{\partial \lambda} = 0 \quad (6.30.)$$

$$\lambda = 1 \quad \frac{\partial \gamma_s}{\partial \lambda} = 0 \quad (6.31.)$$

En el agua que rodea el micelio

$$\zeta_M = 0 \quad \frac{\partial \gamma_M}{\partial \zeta_M} = \frac{D_{efA}}{D_{efM}} \frac{h_m}{L_P} \frac{\partial \gamma_s}{\partial \xi} \quad (6.32.)$$

$$\zeta_M = 1 \quad \frac{\partial \gamma_M}{\partial \zeta_M} = 0 \quad (6.33.)$$

$$\lambda = 0 \quad \frac{\partial \gamma_M}{\partial \lambda} = 0 \quad (6.34.)$$

$$\lambda = 1 \quad \frac{\partial \gamma_M}{\partial \lambda} = -\frac{x_0}{Y_{X/S} G_{S_0}} \frac{h_m}{l_{m_0}} \zeta \phi^2 \chi \left(1 - \frac{\chi}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_M}{\kappa + \gamma_M} \right) \Big|_{\lambda=1} \quad (6.35.)$$

En donde:

$$\chi = \frac{x}{x_0}, \quad \chi_M = \frac{x_m}{x_0}, \quad \gamma_M = \frac{G_M}{G_{S_0}}, \quad \gamma_S = \frac{G_S}{G_{S_0}}, \quad \kappa = \frac{K_S}{G_{S_0}}, \quad \tau = \frac{D_{ef_M}}{l_{m_0}} t, \quad \xi = \frac{z}{L_P}, \quad \lambda = \frac{r}{l_m}, \quad \zeta_M = \frac{y_m}{h_m}, \quad \zeta = \frac{l_m}{l_{m_0}},$$

$$\phi = l_{m_0} \sqrt{\frac{\mu_{max}}{D_{ef_M}}}$$

6.6. La solución numérica

Se empleo el método de doble colocación ortogonal para llevar a cabo la solución numérica del modelo adimensional en dos dimensiones, usando polinomios de Legendre con 4 puntos internos de colocación axiales ($N=4$) y 5 puntos internos radiales ($M=5$) [80].

La producción de biomasa

$$\frac{d\chi_{i,j}}{d\tau} = \phi^2 \chi_{i,j} \left(1 - \frac{\chi_{i,j}}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_{M_{M+1,j}}}{\kappa + \gamma_{M_{M+1,j}}} \right) \quad (6.36.)$$

para toda $i = 1, \dots, M+1$

$j = 1, \dots, N+2$

El flux de crecimiento

$$\frac{d\zeta_{M+1}}{d\tau} = \frac{x_0}{\rho_M} \zeta_{M+1} \phi^2 \chi_{M+1} \left(1 - \frac{\chi_{M+1}}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_{M_{M+1}}}{\kappa + \gamma_{M_{M+1}}} \right) \quad (6.37.)$$

para toda $i = 1, \dots, M+1$

El transporte de glucosa

En el medio sólido (6.38.)

$$\frac{\partial \gamma_{S_{i,j}}}{\partial \tau} = \frac{D_{efA}}{D_{efM}} \left[\left(\frac{l_{m_0}}{L_p} \right)^2 \sum_{l=2}^{N+1} B_{i,l} \gamma_{S_{i,l}} + \frac{1}{\zeta_{M+1}} \sum_{k=2}^M B_{k,j} \gamma_{S_{k,j}} \right] + \frac{\lambda_i}{\zeta_{M+1}} \sum_{k=2}^M A_{k,j} \gamma_{S_{k,j}} \frac{d\zeta_{M+1}}{d\tau}$$

para toda $i = 2, \dots, M$ y $j = 2, \dots, N+1$

En el agua que rodea al micelio

$$\frac{\partial \gamma_{M_{i,j}}}{\partial \tau} = \left[\left(\frac{l_{m_0}}{h_m} \right)^2 \sum_{l=2}^{N+1} B_{i,l} \gamma_{M_{i,l}} + \frac{1}{\zeta_{M+1}} \sum_{k=2}^M B_{k,j} \gamma_{M_{k,j}} \right] + \frac{\lambda_i}{\zeta_{M+1}} \sum_{k=2}^M A_{k,j} \gamma_{M_{k,j}} \frac{d\zeta_{M+1}}{d\tau} \quad (6.39.)$$

para toda $i = 2, \dots, M$ y $j = 2, \dots, N+1$

Condición inicial

$$\tau = 0 \quad \chi(0) = 1 \quad (6.40.)$$

$$\gamma_{S_{i,j}} = 1 \quad (6.41.)$$

$$\gamma_{M_{i,j}} = 0 \quad (6.42.)$$

para toda $i = 2, \dots, M$ y $j = 2, \dots, N+1$

Condiciones de frontera

En el medio sólido

$$j = 1 \quad \sum_{i=1}^{M+1} A_{i,1} \gamma_{S_{i,1}} = 0 \quad (6.43.)$$

$$j = N + 2 \quad \gamma_{S_{i,N+2}} = \gamma_{M_{i,1}} \quad (6.44.)$$

para toda $i = 1, \dots, M+1$

$$i = 1 \quad \sum_{j=1}^{N+2} A_{1,j} \gamma_{S_{1,j}} = 0 \quad (6.45.)$$

$$i = M + 1 \quad \sum_{j=1}^{N+2} A_{M+1,j} \gamma_{S_{M+1,j}} = 0 \quad (6.46.)$$

para toda $j = 1, \dots, N + 2$

En el agua que rodea el micelio

$$j = 1 \quad \sum_{i=1}^{M+1} A_{i,1} \gamma_{M_{i,1}} + \frac{D_{ef_A}}{D_{ef_M}} \frac{h_m}{L_P} \sum_{i=1}^{M+1} A_{i,N+2} \gamma_{S_{i,N+2}} = 0 \quad (6.47.)$$

$$j = N + 2 \quad \sum_{i=1}^{M+1} A_{i,N+2} \gamma_{M_{i,N+2}} = 0 \quad (6.48.)$$

para toda $i = 1, \dots, M + 1$

$$i = 1 \quad \sum_{j=1}^{N+2} A_{1,j} \gamma_{M_{1,j}} = 0 \quad (6.49.)$$

$i = M + 1$

$$\sum_{j=1}^{N+2} A_{M+1,j} \gamma_{M_{M+1,j}} + \frac{x_0}{Y_{X/S}} \frac{h_m}{G_{S_0}} \frac{1}{l_{m_0}} \zeta_{M+1} \phi^2 \chi_{M+1,j} \left(1 - \frac{\chi_{M+1,j}}{\chi_M} \right) \left(\frac{\gamma_{M_{M+1,j}}}{\kappa + \gamma_{M_{M+1,j}}} \right) = 0 \quad (6.50.)$$

para toda $j = 1, \dots, N + 2$

La solución numérica del modelo adimensional se llevó a cabo empleando el método de colocación ortogonal, usando polinomios de Legendre. Como resultado de la discretización espacial de las ecuaciones del modelo y sus respectivas condiciones de frontera, se obtuvo un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias con condiciones de frontera no lineales que fueron integradas numéricamente con un método de Runge Kutta de cuarto orden acoplado al método de Broyden y usando los valores de las constantes de la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Valores de las constantes usadas y estimadas en la solución numérica del modelo de crecimiento radial.

Constante	Valor	
D_{ef_A}	$5.4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{h}$	[81]
D_{ef_M}	$5.4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{h}$	[81]
ρ_M	$0.09 \text{ g}/\text{cm}^3$	[60]
K_G	$0.0025 \text{ g}/\text{cm}^3$	[69]
$Y_{X/S}$	$0.5 \text{ g}_X/\text{g}_G$	[21, 57]
x_m	$0.009 - 0.07 \text{ g}/\text{cm}^3$	Datos experimentales
x_0	$0.14 - 0.35 \text{ g}/\text{cm}^3$	Datos experimentales
L_P	0.6 cm	Dato experimental
G_{S_0}	$0.05 - 0.25 \text{ g}/\text{cm}^3$	Datos experimentales
μ_{\max}	$0.0527 - 0.2125 \text{ 1}/\text{h}$	Parámetro estimado con el modelo de crecimiento global de biomasa
l_{m_0}	0.4 cm	Dato experimental
h_m	0.1 cm	Dato experimental

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 7. Resultados y Discusión

En este capítulo se discuten los resultados experimentales del crecimiento de *Aspergillus niger*, y las predicciones de los modelos de crecimiento global de biomasa y crecimiento radial del micelio.

El crecimiento de *Aspergillus niger* sobre el medio sólido (agar enriquecido con glucosa) se llevo a cabo de 2 formas: el crecimiento de biomasa (inoculación tipo césped) y el crecimiento en colonias (inoculación por piquete). El primero se realizó con el objeto de cuantificar el peso seco de biomasa total por cm² de superficie de agar y el segundo para el seguimiento del crecimiento radial de la colonia, así como la cuantificación de las propiedades morfométricas de las hifas, tales como la longitud y el diámetro promedio.

Para estos experimentos se emplearon concentraciones de glucosa 50, 100, 150, 200 y 250 g/L en los medios de agar. A continuación se presentan los resultados obtenidos de los experimentos realizados para el crecimiento global del micelio y el crecimiento en colonias, y los resultados de las simulaciones hechas con cada uno de los modelos.

7.1. Crecimiento global de biomasa de *A. niger*

En la Figura 7.1 se muestran los datos experimentales y de simulación con el modelo de crecimiento global de la evolución del peso seco de biomasa de *Aspergillus niger* por cm² de superficie de agar para cada una de las concentraciones iniciales de glucosa, al hacer inoculación tipo césped. De estos experimentos se observa que la evolución de la biomasa total del micelio presentó cuatro características importantes: (1) un crecimiento sigmoideal para todas las concentraciones iniciales de glucosa utilizadas; (2) una fase “lag” o de adaptación al medio hasta las 20 horas de crecimiento; (3) una fase de crecimiento exponencial y, (4) una desaceleración lenta posterior a la fase de crecimiento exponencial (a partir de las 90 horas).

Aunque la biomasa continuó incrementándose durante la desaceleración del crecimiento, la experimentación se suspendió a las 145 horas con el objeto de caracterizar, en todo este tiempo el crecimiento del hongo.

Para concentraciones mayores a 200 g/L el microorganismo es afectado por un proceso de inhibición debido a la alta concentración de glucosa, lo cual podría estar relacionado con el requerimiento energético del hongo; ya que a menores concentraciones de glucosa en el medio, éste cuenta con los recursos energéticos suficientes para llevar a cabo la generación de biomasa, pero a medida que se incrementa la concentración se 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.

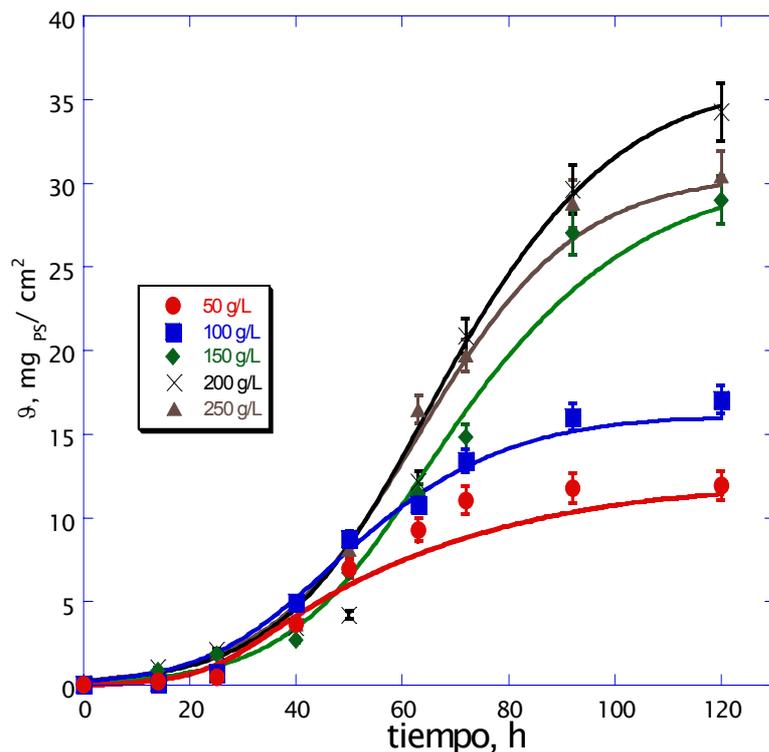


Figura 7.1. Perfiles de la evolución del peso seco de biomasa de *A. niger* por cm² de superficie de agar, a diferentes concentraciones iniciales de sustrato. Los puntos corresponden a los datos experimentales y las líneas sólidas a la simulación empleando el modelo de crecimiento global de biomasa.

Un comportamiento similar para el crecimiento de *Aspergillus niger* sobre un medio sólido fue observado por Larralde [12], en donde se diferencian claramente las fases lag, crecimiento exponencial y desaceleración. 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.

7.1.1. La predicción del crecimiento global de biomasa

El modelo matemático para el crecimiento global de biomasa; representado por las Ecs. 5.1-5.6, predice el crecimiento global de *Aspergillus niger* acoplado al transporte de glucosa en el medio sólido; sin embargo, es importante enfatizar que este modelo solo describe, a nivel macroscópico, a un sistema biológico donde la serie de reacciones metabólicas que se llevan a cabo han sido agrupadas en una sola expresión cinética; la de consumo de glucosa. En la Figura 7.1 se puede observar que el modelo de crecimiento global de biomasa predice satisfactoriamente las observaciones experimentales de la evolución del crecimiento de *A. niger*, para los diferentes valores en la concentración inicial de glucosa en el medio.

Según algunos investigadores, el crecimiento de biomasa fúngica en medios sólidos genera gradientes en la concentración de los nutrientes del medio [36-39]; en este estudio no se contó con las herramientas necesarias para realizar la medición de los perfiles de la concentración de glucosa en el medio, sin embargo, el modelo propuesto contempla este comportamiento físico.

En la Figura 7.2, se presenta la predicción de los perfiles axiales de la concentración adimensional glucosa en el medio sólido a un tiempo 120 h de crecimiento de *A. niger*, en donde se puede apreciar la generación de gradientes de la concentración adimensional e glucosa en el agar para todas las concentraciones iniciales de glucosa utilizadas.

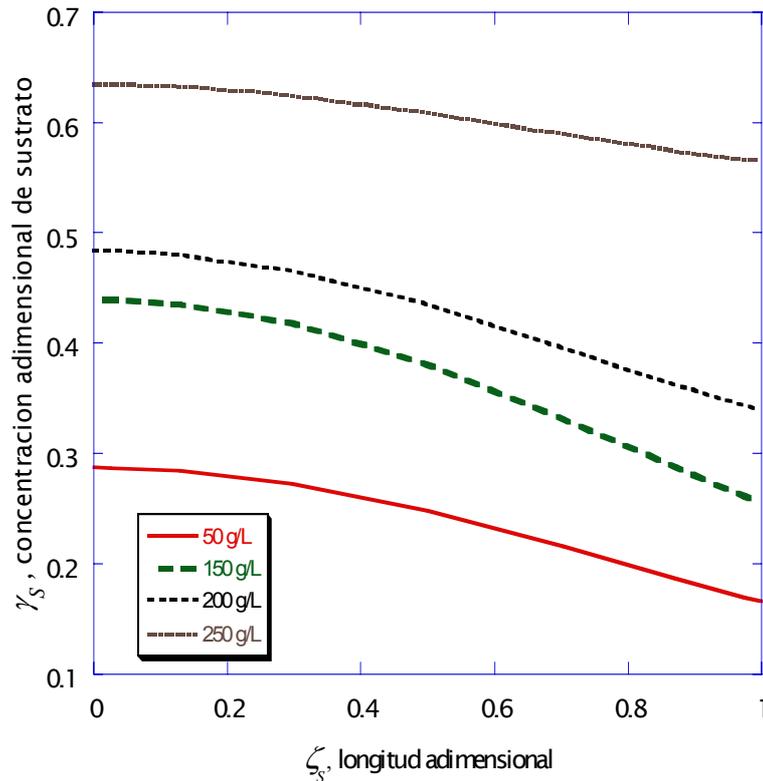


Figura 7.2. Predicción de los perfiles axiales de concentración de glucosa en el medio sólido a un tiempo de 120 h de crecimiento de *Aspergillus niger* empleando el modelo de crecimiento global de biomasa.

En las simulaciones realizadas se mantuvo constante el coeficiente efectivo de difusión de glucosa en el agar, ya que se ha reportado que el valor de este parámetro corresponde al coeficiente de difusión de la glucosa en agua para las concentraciones iniciales de glucosa utilizadas [81], los valores de los coeficientes de rendimiento y de saturación media de glucosa también se mantuvieron constantes.

7.1.2. La tasa específica de crecimiento

A partir de las mediciones experimentales de la evolución de la concentración global de biomasa se estimaron los valores de la tasa específica de crecimiento, μ_{\max} . En la Tabla 7.1 se presentan los valores encontrados para este parámetro; éstos presentan un comportamiento inversamente proporcional a la concentración inicial de glucosa, por lo que se puede concluir que el crecimiento está relacionado con la

Resultados y Discusión

concentración inicial de sustrato, ya que μ_{\max} engloba las diferentes reacciones metabólicas del crecimiento de los microorganismos y este parámetro se modifica a medida que se aumenta o disminuye la concentración inicial de glucosa en el medio.

Tabla 7.1 Tasa específica de crecimiento para el modelo de crecimiento global de biomasa.

Concentración, g/L	μ_{\max} , 1/h
50	0.2125
100	0.1125
150	0.0935
200	0.0847
250	0.0813

7.1.3. La simulación del crecimiento utilizando el modelo de crecimiento global de biomasa variando D_{efA}

Una vez revisadas las predicciones del modelo de crecimiento global de biomasa se llevó a cabo un estudio de la sensibilidad paramétrica del coeficiente efectivo de difusión de glucosa en el agar; ya que este parámetro es de suma importancia en el proceso de crecimiento de los hongos filamentosos sobre un medio sólido, pues representa el factor limitante en el transporte de los nutrientes; el cambio en este parámetro obedece a variaciones en el medio o soporte en el que se lleve a cabo el crecimiento fúngico.

Hasta este punto el coeficiente efectivo de difusión de glucosa en el agar se mantuvo constante (5.4×10^{-3} cm²/h) en todas las simulaciones realizadas; para determinar el efecto de este parámetro en la evolución de la concentración de biomasa del *Aspergillus niger*, y en consecuencia de los perfiles de la concentración de glucosa del medio sólido, se realizaron simulaciones con tres valores de D_{efA} , los cuales se encuentran dentro del rango de órdenes de magnitud reportados en la literatura [81], manteniendo sin variaciones las demás constantes del modelo (μ_{\max} , K_G , $Y_{X/S}$, L_P , etc).

En la Figura 7.3.a se presentan los perfiles axiales de la concentración de glucosa en el medio sólido a un tiempo de 120 horas del comienzo del crecimiento de *A. niger* a una concentración inicial de glucosa de 250 g/L, en esta se observa que al disminuir el valor de la D_{efA} en un orden de magnitud ($1.7 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{seg}$), las resistencias difusionales son mayores, generando gradientes en la concentración de glucosa a lo largo de la placa de agar, de aproximadamente el 80%; lo anterior se refleja en una disminución en el crecimiento de biomasa (Figura 7.3.b).

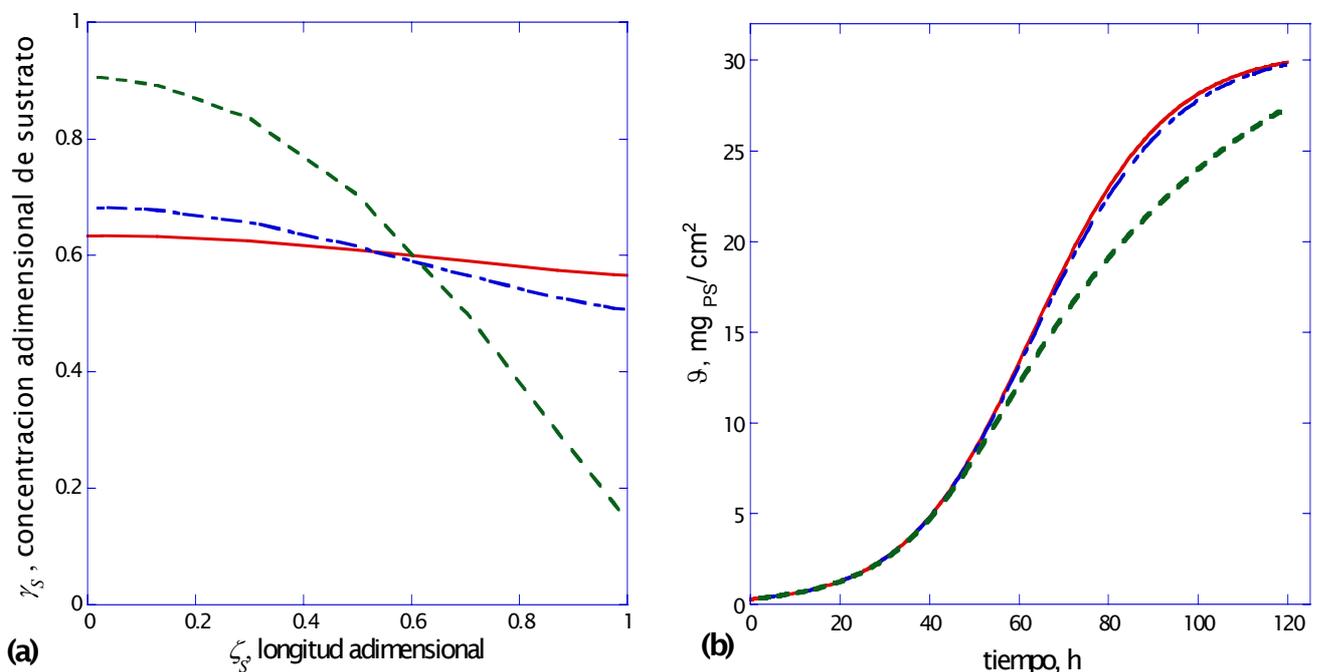


Figura 7.3. Efecto de la variación del coeficiente efectivo de difusión sobre la predicción con el modelo de crecimiento global de biomasa de los perfiles de la concentración adimensional de glucosa en el medio sólido (a), y de la evolución del peso seco de biomasa por cm^2 (b), para una concentración inicial de glucosa de 250 g/L, — $9.0 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{seg}$, - - $5.4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{seg}$, --- $1.7 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{seg}$,

Por otra parte al incrementar este parámetro ($9.0 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{seg}$), el transporte de la glucosa dentro del medio sólido se facilita ocasionando menores gradientes de concentración y una mayor producción de biomasa. Estos resultados confirman que sí,

se encuentra un medio o soporte que facilite el transporte de los nutrientes al microorganismo favorecerá la producción de biomasa.

7.1.4. Alternativas del modelo de producción de biomasa

Existen dos puntos de vista en cuanto a la predicción macroscópica del crecimiento micelial: (1) que la velocidad de crecimiento se encuentra limitada por la concentración de sustrato, de acuerdo con la ecuación de Monod (Ecuación 2.1) [25]; (2) que la velocidad de crecimiento esta limitada por la concentración de biomasa, de acuerdo con la ecuación logística (Pearl-Verlhust) [55]. Sin embargo, ninguna de éstas contempla la interacción entre estos dos factores limitantes, lo cual es importante debido a que como se puede observar en los resultados experimentales; la concentración de biomasa se encuentra relacionada con la concentración de sustrato en el medio. Por ello, en este trabajo se propone el uso de una cinética que contempla las limitaciones debidas a la concentración de sustrato y de biomasa, dada por la Ecuación 5.1, que combina la ecuación logística con la de Monod.

En la Figura 7.4 se presenta una comparación de los perfiles de producción de biomasa utilizando las ecuaciones de Monod, Logística-Monod y los datos experimentales. En esta figura se muestra que ambos modelos predicen la tendencia experimental, sin embargo el modelo utilizado en este estudio (Logística-Monod) ajusta mejor a los datos experimentales, sobre todo a altas concentraciones de glucosa inicial; en estas simulaciones se utilizaron los valores experimentales de la máxima producción de biomasa x_m , a las diferentes concentraciones iniciales de glucosa. Los valores de μ_{\max} usados fueron los estimados con los datos experimentales y el modelo de crecimiento global de biomasa y se mantuvieron constantes los demás parámetros del modelo.

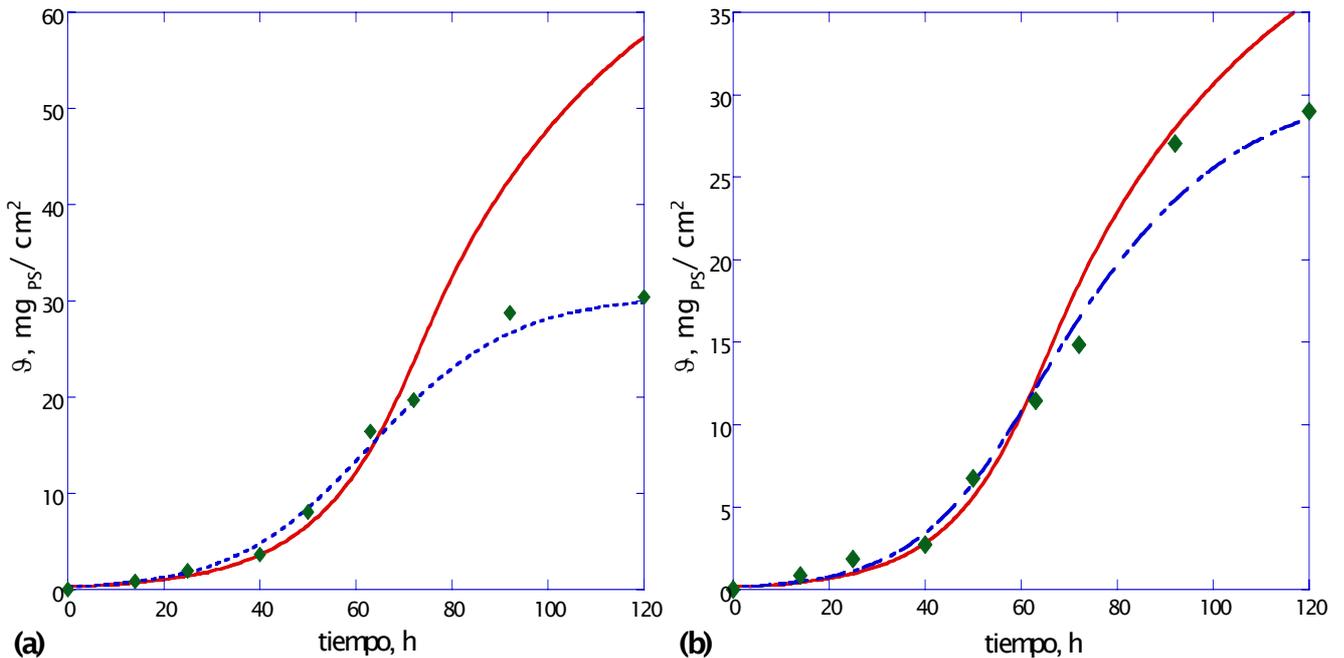


Figura 7.4. Predicción con el modelo de crecimiento global de biomasa de los perfiles de la evolución de la concentración de peso seco de biomasa por cm^2 a 250 (a) y 150 g/L (b) empleando las cinéticas de crecimiento tipo — Monod, - —Logística-Monod y \blacklozenge datos experimentales.

El fenómeno de difusión de la glucosa del medio sólido obedece a la ley de Fick, de modo que en el modelo sólo se modifica la ecuación de producción de biomasa, y por lo tanto los perfiles de concentración de la glucosa en el medio solo se ven afectados por la generación de biomasa fúngica.

En la Figura 7.5 se muestran los perfiles axiales de la concentración de la glucosa en el agar a las 120 horas del crecimiento, en ésta se observa que la ecuación de Monod predice los perfiles de glucosa en el sustrato con un comportamiento de decaimiento similar para cada concentración inicial de glucosa, sin embargo se produce un agotamiento de los nutrientes que esta relacionado con una mayor producción de biomasa (Figura 7.4); por otro lado la ecuación de crecimiento logística-Monod también predice comportamientos similares en los perfiles de glucosa para cada concentración inicial de glucosa, llegando a un crecimiento total del microorganismo

sin el requerimiento total de los nutrientes; lo que nos muestra que estos perfiles se ven afectados por la producción de biomasa sobre el transporte de la glucosa en el medio.

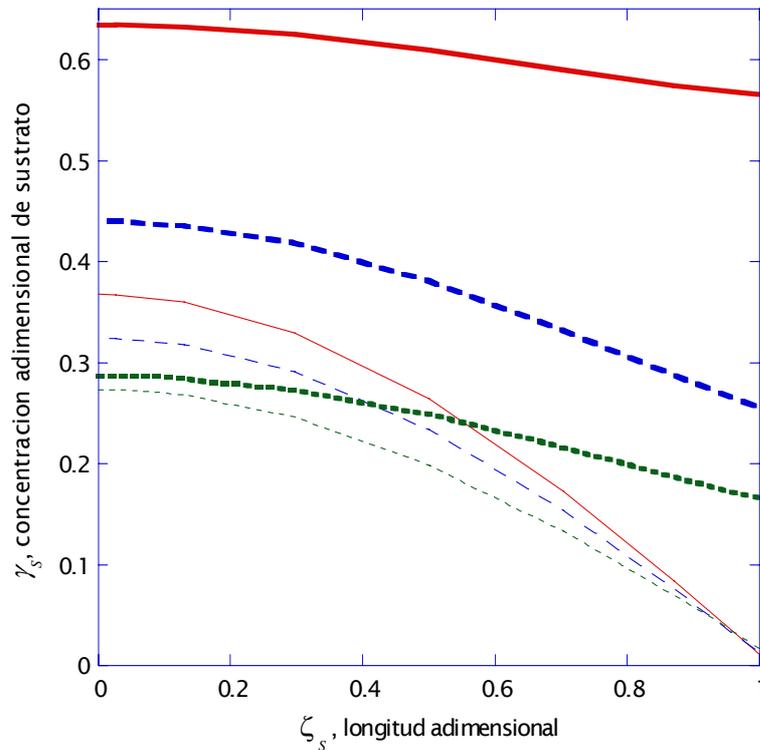


Figura 7.5. Predicción con el modelo de crecimiento global de biomasa de los perfiles axiales de la concentración adimensional de glucosa en el medio sólido a diferente concentración inicial de glucosa, —250 g/L, --150 g/L y ---50 g/L, empleando las cinéticas de crecimiento tipo Logístico - Monod (líneas gruesas) y Monod (líneas suaves).

7.2. Crecimiento radial de *A. niger*

Para el crecimiento en colonias de *A. niger* se llevó a cabo el seguimiento del cambio del diámetro de las colonias en función del tiempo, en la Figura 7.6 se presentan los perfiles de la evolución de este parámetro para las diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

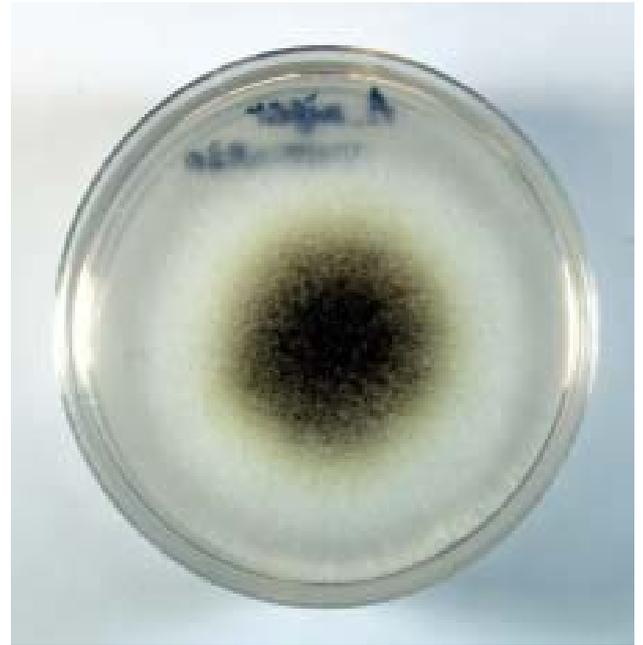
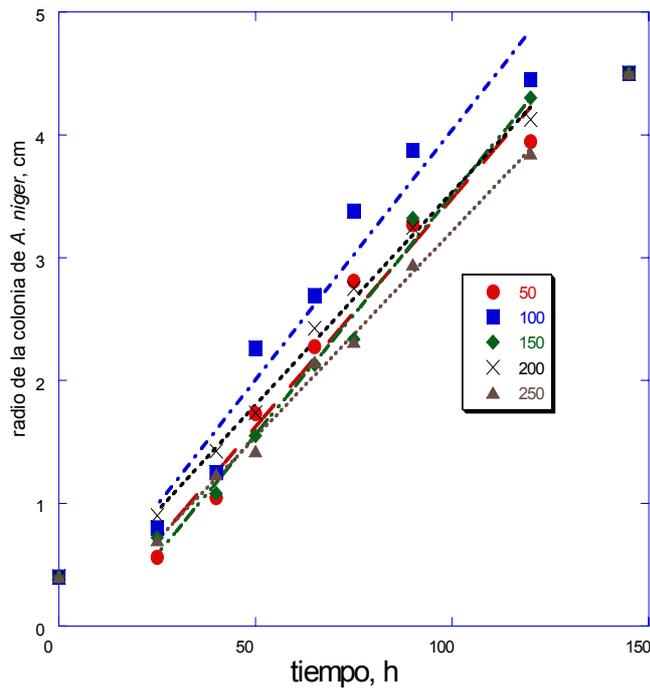


Figura 7.6. Perfiles de evolución de la longitud radial de *A. niger* a diferentes concentraciones de sustrato inicial (izquierda). Fotografía del crecimiento micelial de *Aspergillus niger* en un medio sólido inoculado por piquete (derecha).

Como fue establecido por Trinci para *Aspergillus nidulans* y para otros microorganismos fúngicos [10], en este estudio la evolución de la longitud radial del micelio de *Aspergillus niger* presenta una alta circularidad en las colonias del hongo y un aparente incremento lineal para todas las concentraciones iniciales de glucosa, este comportamiento lineal corresponde a la fase exponencial de producción de biomasa.

7.2.1. La velocidad de extensión radial

Sí el radio de la colonia de *A. niger* se incrementa de forma lineal con el tiempo en la fase de crecimiento exponencial es posible determinar la velocidad de extensión radial, u_r [10]. En este estudio este parámetro fue determinado como la pendiente de la curva de los perfiles de evolución de la longitud radial para cada una de las concentraciones iniciales de glucosa. Considerando que en el intervalo de tiempo

Resultados y Discusión

estudiado el crecimiento es constante, el cambio en la longitud radial del micelio varía linealmente con el tiempo.

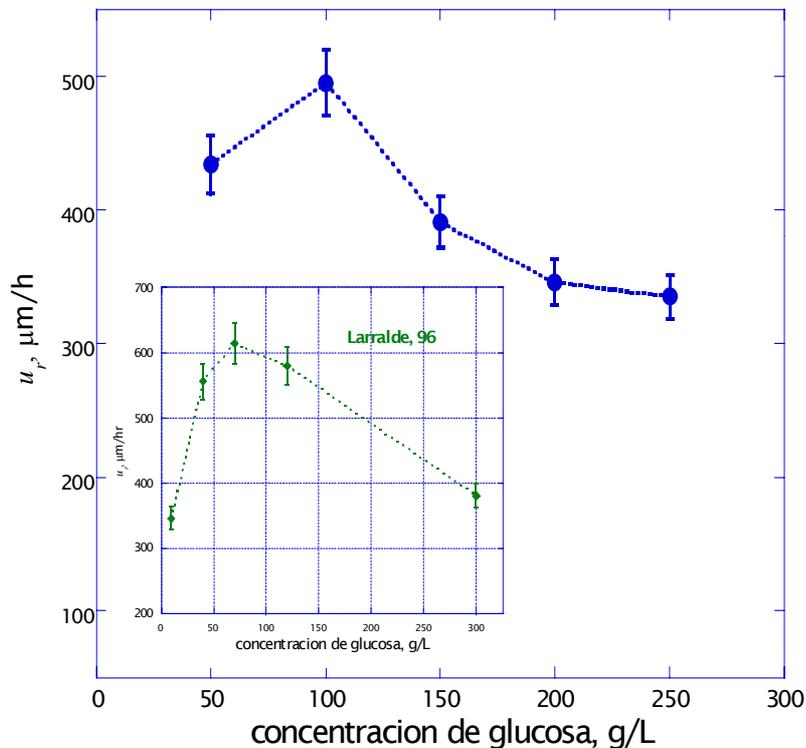


Figura 7.7. Velocidad de extensión radial de *A. niger* a diferentes concentraciones iniciales de glucosa.

En la Figura 7.7 se presentan los valores de la velocidad de crecimiento (u_r), calculados como una función de la concentración inicial de glucosa, y se puede apreciar que este parámetro presenta su máximo valor a 100 g/L de concentración inicial glucosa: para concentraciones altas mayores a 150 g/L de glucosa, u_r disminuye conforme la concentración inicial de glucosa se incrementa, un comportamiento similar fue el observado por Larralde [12], quien establece un máximo en la u_r a 70 g/L y una disminución de este parámetro a concentraciones mayores a 120 g/L.

Físicamente este comportamiento podría reflejarse en la disminución de la tasa de producción de las hifas distales de la zona periférica; ocasionando una disminución

en la longitud radial de la colonia. Sin embargo, la concentración máxima de biomasa es mayor a medida que aumenta la concentración inicial de glucosa (Figura 7.1), por lo tanto la disminución en la velocidad de la producción de las hifas distales podría estar acompañada de un incremento en las ramificaciones dando como consecuencia un aumento en la densidad del micelio [13].

7.2.2. El diámetro y la longitud promedio de las hifas

Para las colonias de *A. niger* se llevo a cabo la medición de los parámetros morfométricos de las hifas distales, que se encuentran al borde de las mismas, desde los extremos hasta la intersección con la primera ramificación. En la Tabla 7.2 se presentan los valores del diámetro d , y de la longitud promedio L_{av} , correspondientes a cada una de las concentraciones iniciales de sustrato.

Tabla 7.2. Valores de los parámetros morfométricos hifales

Concentración, g/L	d , μm	L_{av} , μm
50	4.64 ± 0.96	274.5 ± 152.6
100	4.51 ± 0.84	236.0 ± 149.3
150	4.25 ± 0.79	225.3 ± 133.2
200	3.76 ± 0.57	200.7 ± 96.5
250	3.28 ± 0.43	176.7 ± 78.8

En esta tabla se puede observar que los parámetros morfométricos presentan un comportamiento inversamente proporcional a la concentración inicial de glucosa, esta variación debida a la fuente de carbono fue también observada por Larralde [12, 69], encontrando que el diámetro promedio de las hifas decrece a medida que se aumenta la concentración de glucosa inicial. Actualmente no se tiene claro cuáles son los factores que provocan dicho comportamiento, sin embargo algunos autores han establecido hipótesis en las que argumentan que las condiciones del medio alteran la morfología hifal, ya que el aumento en la concentración de sustrato inhibe los procesos de formación y velocidad de rigidez de la pared hifal de las puntas recién formadas [84], y la velocidad de desplazamiento de la estructura citológica (cuerpo

apical) encargado de acumular a las vesículas que crean la pared hifal [11], lo que genera una disminución en los parámetros morfológicos de la hifa.

7.2.3. La predicción del crecimiento radial de la colonia

Los hongos filamentosos crecen de diversas formas dependiendo de la manera en que son inoculados. Como se dijo anteriormente, en este trabajo se llevaron a cabo dos tipos de inoculación: en césped para el seguimiento de la biomasa total producida (Figura 7.1), y en piquete para el seguimiento del radio de la colonia (Figura 7.6). El modelo matemático desarrollado para el estudio del crecimiento del micelio permite predecir el crecimiento radial de una colonia de *Aspergillus niger* que crece sobre un sustrato sólido.

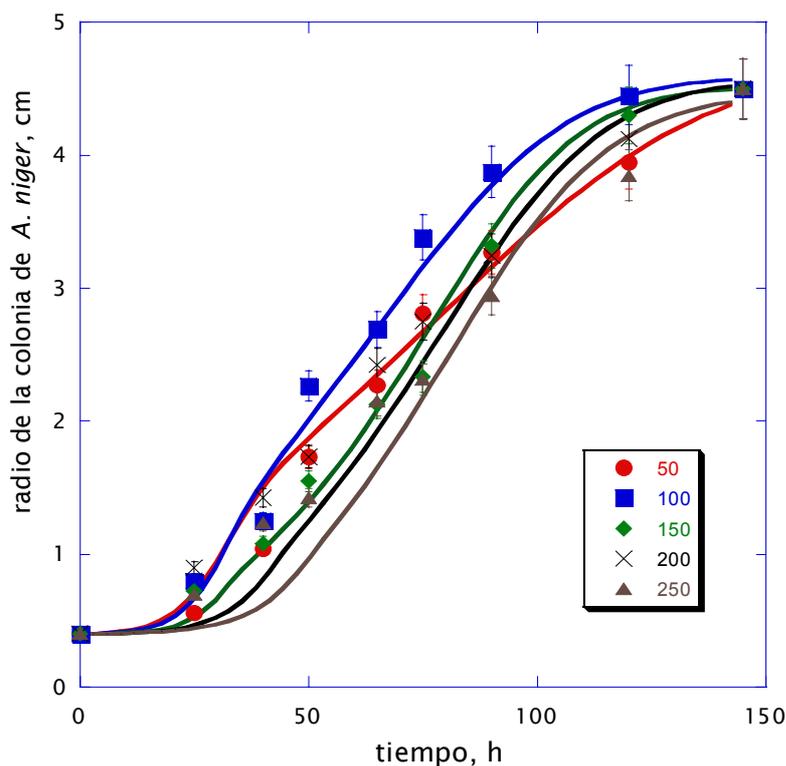


Figura 7.8. Comparación de los perfiles de evolución de la longitud radial del micelio *A. niger* a las diferentes concentraciones de glucosa inicial, los puntos representan los datos experimentales y las líneas las predicciones del modelo.

La Figura 7.8 muestra la predicción con el modelo de crecimiento radial de la evolución del radio del micelio de *A. niger* para las diferentes concentraciones iniciales de glucosa utilizadas. Al comparar los datos experimentales con estas predicciones se puede apreciar que el modelo de crecimiento radial desarrollado predice adecuadamente las observaciones experimentales, para todo el rango de concentraciones iniciales de glucosa.

Este resultado da la pauta para la realización de un estudio sobre la interacción del transporte de nutrientes en el medio sólido y en el agua que rodea al microorganismo, sobre la producción de biomasa; ya que el modelo también permite predecir los perfiles axial y radial de concentración de glucosa, tanto en el medio sólido como en el agua que rodea al micelio.

7.2.4. La predicción de los perfiles concentración de biomasa y glucosa

En las Figuras 7.9 a 7.11 se presentan los resultados de la simulación para una concentración inicial de glucosa de 100 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 agua que rodea al micelio, tanto axial como radialmente.

El modelo propuesto de crecimiento radial de la colonia supone que la reacción de crecimiento se da en la periferia del micelio, no considera la acumulación de biomasa en el centro del micelio; por tanto como lo muestran los perfiles de producción de biomasa, el crecimiento micelial se concentra en la periferia de la colonia. En la Figura 7.9 se observa que al comienzo del crecimiento micelial, la producción de biomasa se incrementa radial y homogéneamente desde la zona centro de la superficie del agar (29 horas); a medida que transcurre el tiempo (47 horas), este crecimiento es mayor en la zona periférica del micelio, hasta que a largos tiempos esta producción se mantiene (142 horas). Experimentalmente se ha demostrado [37], que la

Resultados y Discusión

concentración de biomasa de la colonia se incrementa de forma lineal en la periferia del micelio y permanece constante: o con una pequeña disminución en la región central de la colonia; por lo que el modelo nos da una idea del comportamiento radial del crecimiento de biomasa.

Axialmente los perfiles de producción de biomasa no presentan gradientes importantes, esto puede deberse a que la longitud axial del micelio es mucho menor con respecto a la longitud radial y el crecimiento no tiene efecto sobre esta coordenada.

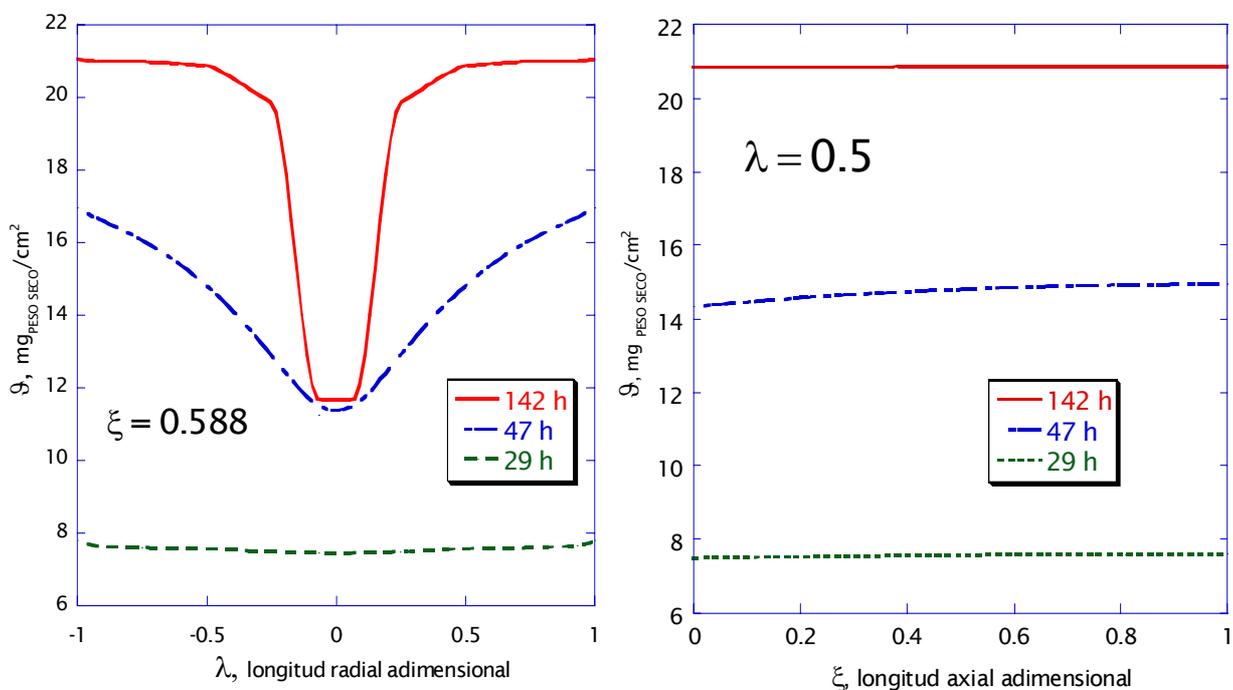


Figura 7.9. Perfiles radial (izquierda) y axial (derecha) del peso seco de biomasa por cm², a diferentes tiempos del crecimiento fúngico.

En la Figura 7.10 se presentan los perfiles de la concentración de glucosa en el agua que rodea al micelio; los perfiles radiales nos muestran que la máxima concentración de nutrientes siempre se encuentra en la periferia del micelio en crecimiento, esto se ve reflejado en una mayor producción de biomasa en esta zona. Este comportamiento es consecuencia del transporte por difusión que se lleva a cabo en el medio sólido.

Los perfiles axiales de glucosa en el agua que rodea al micelio presentaron gradientes insignificantes, lo que deja claro que el microorganismo crece más radialmente debido a que la mayor fuente de alimentación se encuentra en la frontera radial.

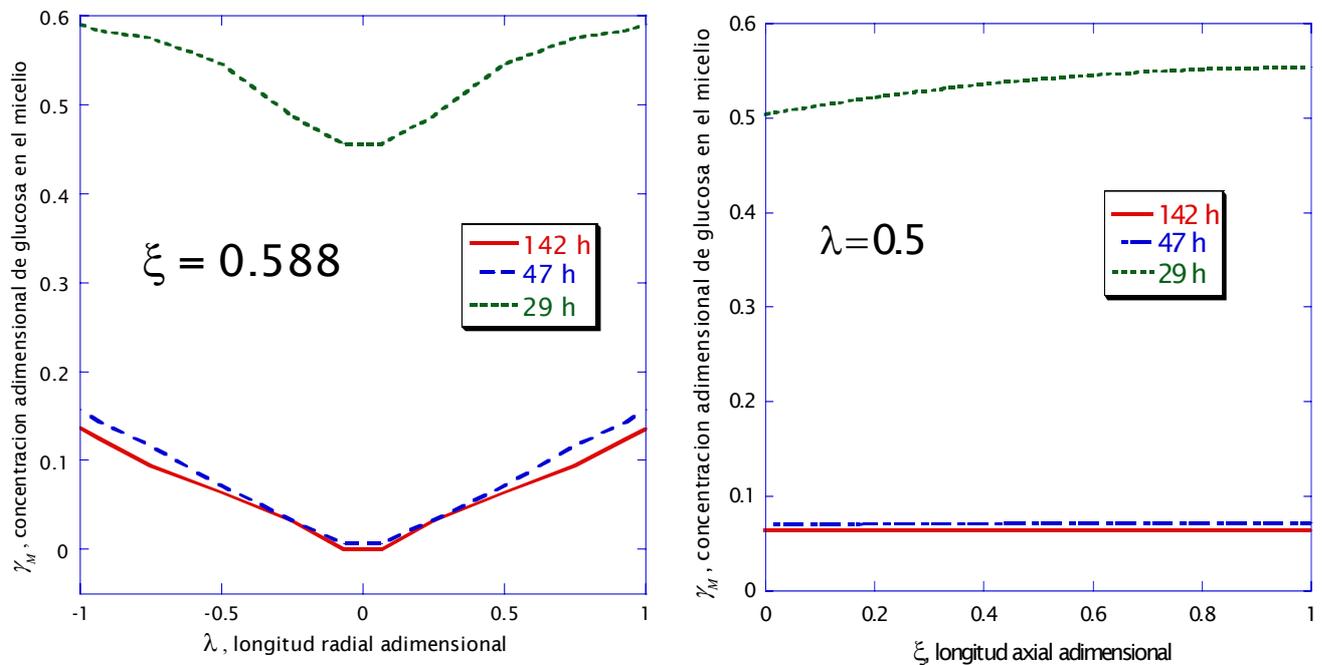


Figura 7.10. Perfiles radial (izquierda) y axial (derecha) de la concentración adimensional de glucosa en el agua que rodea al micelio, a diferentes tiempos del crecimiento fúngico.

Como se ha mencionado el modelo de crecimiento radial permite predecir los gradientes de glucosa generados en el medio debido al consumo del microorganismo. En la Figura 7.11 se observa que radialmente la glucosa disminuye en mayor proporción en la zona céntrica por debajo de la colonia hasta llegar al 40% de la concentración inicial de glucosa en el medio. En la periferia de la colonia la concentración es mayor presentando una disminución de hasta el 50% de la concentración inicial a tiempos largos del crecimiento.

En la coordenada axial los gradientes de concentración de glucosa son pronunciados, observándose que la producción de biomasa a través del tiempo tiene un efecto

Resultados y Discusión

importante sobre la concentración de glucosa en el medio sólido. Estos resultados validan los comportamientos observados tanto para la producción de biomasa como para los perfiles de glucosa en el agua que rodea al micelio.

Los resultados mostrados hasta el momento concuerdan con los estudios experimentales realizados por varios investigadores. En el estudio desarrollado por Robson y colaboradores [36], 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 [37], 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.

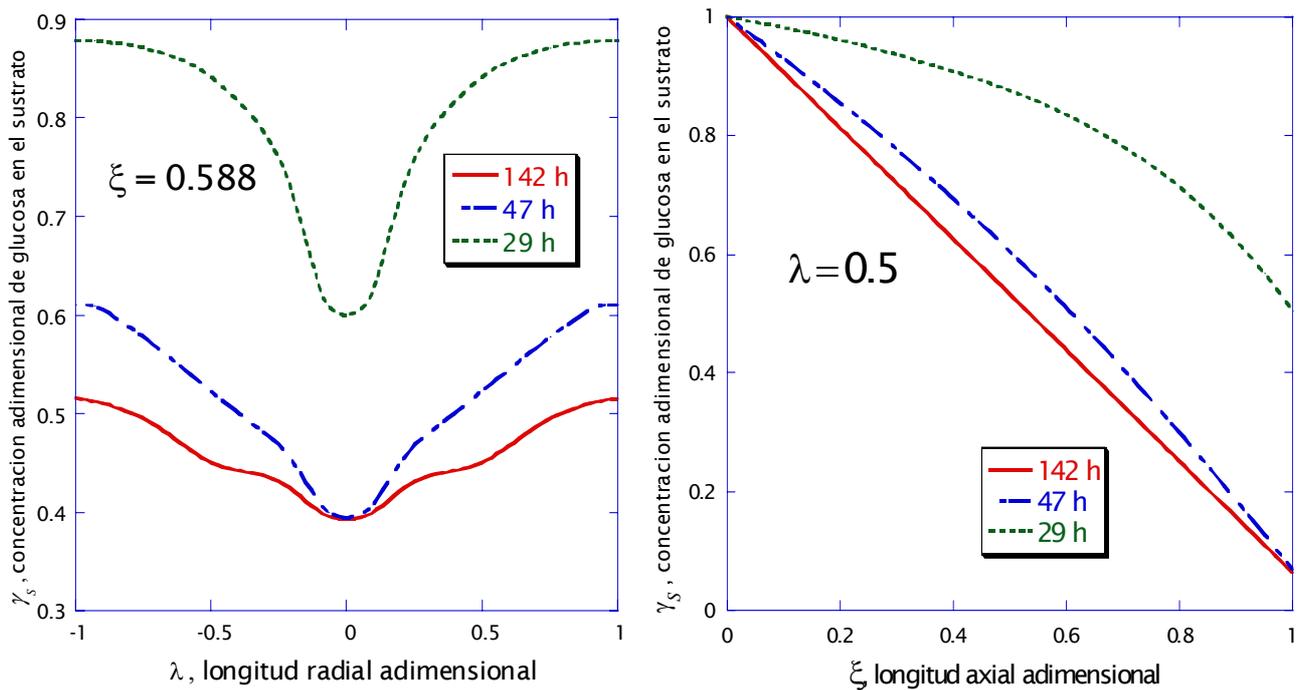


Figura 7.11. Perfiles radial (derecha) y axial (izquierda) de la concentración adimensional de glucosa en el sustrato, a diferentes tiempos del crecimiento fúngico.

7.2.5. La tasa específica de crecimiento

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. Del mismo modo que para el modelo de crecimiento global de biomasa, este parámetro mostró un comportamiento inverso a la concentración inicial de glucosa, obteniéndose el valor más alto (0.112 h^{-1}) para la menor concentración inicial de glucosa (50 g/L); mientras que el valor menor para μ_{\max} estimado (0.0527 h^{-1}), fue para la mayor concentración inicial de glucosa (250 g/L).

Estos resultados ratifican lo obtenido con el modelo de crecimiento global de biomasa en el se establece que μ_{\max} esta íntimamente relacionado con las propiedades morfométricas del microorganismo, las cuales juegan un papel importante en el mecanismo de obtención de nutrientes y por consecuencia en la evolución de crecimiento de biomasa.

Tabla 7.3. Valores obtenidos de la tasa específica de crecimiento para el modelo de crecimiento radial.

concentración, g/L	μ_{\max} , 1/h
50	0.1120
100	0.0932
150	0.0873
200	0.0634
250	0.0527

7.2.6. Efecto de la variación de la concentración de glucosa sobre los parámetros morfométricos y de crecimiento de *A. niger*

Como se puede ver en las Tablas 7.2 y 7.3 tanto los parámetros morfométricos de las hifas y la tasa específica de crecimiento de *A. niger* presentan una relación inversa con la concentración inicial de glucosa del medio sólido. En la Figura 7.12 se presenta la tasa máxima de crecimiento estimada con el modelo de crecimiento radial en función del diámetro promedio de las hifas; en esta figura se muestra que para las diferentes concentraciones iniciales de glucosa la tasa específica de crecimiento presenta una relación lineal con el diámetro hifal.

Los resultados presentados hasta el momento muestran la forma en que afecta la concentración inicial de glucosa las propiedades morfométricas y de transporte durante el crecimiento de *A. niger* en un medio sólido, así como la producción de biomasa total. Estos resultados concuerdan con el estudio realizado por Larralde [12], en el que se destaca el hecho de que el crecimiento de biomasa muestra inhibición debida a la concentración inicial de glucosa en el medio sólido.

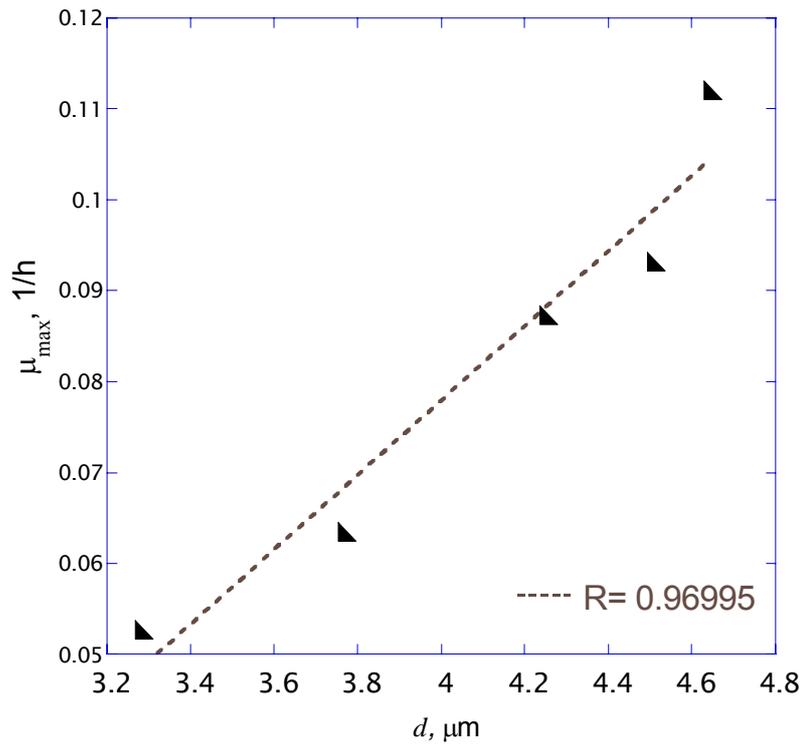


Figura 7.12. Variación de la relación de la tasa específica de crecimiento con respecto al diámetro hifal.

CONCLUSIONES

Conclusiones

En este estudio se analizaron experimentalmente los efectos de la concentración inicial de glucosa en el medio sólido (agar) sobre el crecimiento de *Aspergillus niger*. Macroscópicamente, en función de la concentración de la biomasa y del diámetro de la colonia de hongo, y microscópicamente midiendo el diámetro y la longitud promedio de las hifas.

Se encontró que para concentraciones mayores a 200 g/L el crecimiento de biomasa global enfrenta un proceso de inhibición debida a la alta concentración de sustrato en el medio. También se concluyó que los parámetros morfométricos de las hifas se ven afectados de manera inversamente proporcional a la concentración inicial de glucosa, por lo que se puede decir que el crecimiento y morfología del microorganismo se encuentran determinados por la concentración inicial de glucosa del medio.

Usando los modelos de crecimiento global de biomasa y radial de la colonia, y los datos experimentales de producción de biomasa (crecimiento global de biomasa) y del cambio en el diámetro de la colonia de *A. niger* (crecimiento radial) se estimó la tasa específica de crecimiento a las diferentes concentraciones iniciales de glucosa, encontrándose que al igual que los parámetros morfométricos de las hifas, la tasa específica de crecimiento presenta una relación inversamente proporcional a la concentración inicial de glucosa.

Los dos modelos propuestos para describir el crecimiento macroscópico predicen satisfactoriamente los resultados experimentales del crecimiento global y radial de *Aspergillus niger* sobre un medio sólido. Además de que permiten predecir los perfiles de concentración de glucosa al interior del medio sólido.

En estos modelos, a diferencia de otros estudios, fueron consideradas las limitantes debidas a la glucosa como nutriente en el modelo cinético de producción de biomasa ya que, se incorpora al modelo de crecimiento de tipo logístico una cinética de Monod que incluye el efecto de la concentración de sustrato. Además en estos modelos, 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.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. <http://helios.bto.ed.ac.uk./bto/microbes/fungalwe.htm>
2. <http://www.world-of-fungi.org/>
3. Smith J.E. y Berry D.R. (1978) **The filamentous fungi**, Ed. Edward Arnold, Vol. 1, Gran Bretaña
4. Smith J.E. y Berry D.R. (1978) **The filamentous fungi**, Ed. Edward Arnold, Vol. 2, Gran Bretaña
5. Smith J.E. y Berry D.R. (1978) **The filamentous fungi**, Ed. Edward Arnold, Vol. 3, Gran Bretaña
6. <http://uab-gtip.uab.es/Apuntsmicro/hongos.pdf>
7. Gooday G.W. (1995) **The dynamics of hyphal growth**, *Mycological Research* (99) 385 - 394 Part 4
8. Nielsen J. (1996) **Modelling the morphology of filamentous microorganisms**, *TIBTECH* (14) 438 - 444
9. Pazouki M. y Panda T. (2000) **Understanding the morphology of fungi**, *Bioprocess Engineering* (22) 127- 143
10. Trinci A.P.J. (1969) **A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi**, *Journal of Biotechnology* 10 (105) 343 - 348
11. Bartnicki - García S., Hergert F. y Gierz G. (1989) **Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth**, *Protoplasma* (153) 46 - 57
12. Larralde - Corona C.P. (1996) **Cinética de crecimiento de hongos filamentosos: Morfometría de los micelios de *A. niger* y *G. Fujikuroi* y su posible utilización en la predicción de la tasa específica de crecimiento** Tesis de Doctorado UAM-Iztapalapa
13. Trinci A.P.J. (1971) **Influence of the width of the peripheral growth zone on the radial growth rate of fungal colonies on solid media**, *Journal of General Microbiology* (67) 325 - 344
14. Steele G.C. y Trinci A.P.J. (1975) **The extension zone of mycelial hyphae**, *New Phytol.* (75) 583 - 587
15. Trinci A.P.J. (1974) **A study of the kinetics of hyphal extension and branch**

-
- initiation of fungal mycelia**, *Journal of General Microbiology* (81) 225 - 236
16. Jennings D.H. (1978) **Transport and translocation on filamentous fungi**, In *Filamentous Fungi Vol 2*, Smith E. y Berry D.F. (eds), Ed. Edward Arnold 32 - 64
 17. Trinci A.P.J. (1978) **Wall and hyphal growth**, *Science Progress* 65 (257) 75 - 99
 18. Ferret E., Simeon J.H., Molin P., Jorquera H., Acuña G. y Giral R. (1999) **Macroscopic growth of filamentous fungi on solid substrate explained by a microscopic approach**, *Biotechnology and Bioengineering* 65 (5) 512 - 522
 19. 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
 20. Cox P.W. y Thomas C.R. (1992) **Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis**, *Biotechnology and Bioengineering* (39) 945 - 952
 21. Mitchell D.A., Do D., Greenfiel P. y Doelle H. (1991) **A semimechanistic mathematical model for growth of *R. Oligosporus* in a model solid - state fermentation system**, *Biotechnology and Bioengineering* (38) 353 - 362
 22. <http://sameens.dia.uned.es/Trabajos3/T1A/MorcilloRubioMP/Agente.htm>
 23. http://www.biologia.edu.ar/micologia/10_micologia.htm
 24. Smith J.E., Berry D.R. y Kristiansen B. (1980) **Fungal biotechnology**, Ed. Academic Press, Gran Bretaña
 25. Monod J. (1949) **The growth of bacterial cultures**, *Annual Review of Microbiology* (3) 371- 394
 26. Metz B., de Bruijn E.W. y van Suijdam J.C. (1981) **Methods for quantitative representation of the morphology of molds**, *Biotechnology and Bioengineering* (23) 149 - 162
 27. Packer H.L. y Thomas C.R. (1990) **Morphological Measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis**, *Biotechnology and Bioengineering* (35) 870 - 881
 28. Packer H.L., Thomas C.R., Kerhavarz - Moore E. y Lilly M.D. (1992)
-

- Estimation of cell volume and biomass of *Penicillium chrysogenum* using image analysis**, *Biotechnology and Bioengineering* (39) 384 - 391
29. Robinson T.P., Wimpenny J.W.T. y Earnshaw R. G. (1991) **pH gradients through colonies of *Bacillus cereus* and the surrounding agar**, *Journal of General Microbiology* (137) 2885 - 2889
30. 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
31. Gervais P. y Molin P. (2003) **The role of the water in solid - substrate fermentation**, *Biochemical Engineering Journal* (13) 85 - 101
32. Gervais P., Molin P., Grajek W. y Bensoussan M. (1988) **Influence of the water activity of solid substrate on the growth rate and sporogenesis of filamentous fungi**, *Biotechnology and Bioengineering* (31) 457 - 463
33. Inch J.M.M. y Trinci P.J. (1987) **Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinus* in liquid and solid media**, *Journal of General Microbiology* (133) 247 - 252
34. Deacon J.W. (1993) **Introducción a la micología moderna**, Ed. Limusa, México
35. Fiddy C. y Trinci P.J. (1975) **Kinetics and morphology of glucose - limited cultures of moulds grown in a chemostat and solid media**, *Archives in Microbiology* (103) 191- 197
36. Robson G.D., Bell S.D., Kuhn P.J. y Trinci P.J. (1987) **Glucose and penicillin concentrations in agar medium below fungal colonies**, *Journal of General Microbiology* (133) 361 - 367
37. Olsson S. (1994) **Uptake of glucose and phosphorus by growing colonies of *Fusarium oxysporum* quantified by image analysis**, *Experimental Mycology* (18) 33 - 47
38. Nagel F.J., Van H., Tramper J. y Rinzema A. (2002) **Water and glucose gradients in the substrate measured with NMR imaging during solid - state fermentation with *Aspergillus oryzae***, *Biotechnology and Bioengineering* 79 (6) 653 - 663
39. Auria R., Ortiz I., Villegas E. y Revah S. (1995) **influence of growth and high mould concentration on the pressure drop in solid state fermentations**, *Process Biochemistry* (30) 751 - 756
40. Gutiérrez - Rojas M., Córdova J., Auria R., Revah S. y Favela - Torres E. (1995)
-

-
- Citric acid and polyols production by *Aspergillus niger* at high glucose concentration in solid state fermentation on inert support, *Biotechnology Letters* 17 (2) 219 - 224**
41. Cerda - Montalvo M.L., Rodriguez - Herrera R., Contreras - Esquivel J.C. y Aguillar C.N. (2005) **Glucose diffusion on support for solid state fermentation and its influence on tannase production profiles, *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 3 (A5)**
 42. Müller C., McIntyre M., Hansen K. y Nielsen J. (2002) **Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus oryzae* by altering chitin synthesis, *Applied and Environmental Microbiology* 68 (4) 1827 - 1836**
 43. Christiansen T., Spohr A.B. y Nielsen J. (1999) **On - line study of growth kinetics of single hyphae of *Aspergillus oryzae* in a flow - through cell, *Biotechnology and Bioengineering* 63 (2) 147 - 153**
 44. Durant G., Cox P.W., Formisyn P. y Thomas C.R. (1994) **Improved image analysis algorithm for the characterisation of micelial aggregates after staining, *Biotechnology Techniques* 8 (11) 759 - 764**
 45. Pandey A., Selvakumar P., Soccol C.R. y Nigam P. (1999) **Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Current Science* (77) 149 - 162**
 46. Carlsen M., Spohr A.B., Nielsen J. y Villadsen J. (1996) **Morphology and physiology of an α - amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations, *Biotechnology and Bioengineering* (49) 266 - 276**
 47. Nielsen J. y Krabben P. (1995) **Hyphal growth and fragmentation of *P. chrysogenum* in submerged cultures, *Biotechnology and Bioengineering* (46) 588 - 598**
 48. Bocking S.P., Wiebe M.G., Robson G.D., Hansen K., Christiansen L.H. y Trinci P.J. (1999) **Effect of branch frequency in *Aspergillus oryzae* on protein secretion and culture viscosity, *Biotechnology and Bioengineering* (65) 638 - 648**
 49. Gade A., Bundgaard M., Nielsen J. y Villadsen J. (1993) **Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*, *Biotechnology and Bioengineering* (41) 162 - 164**
 50. Johansen C.L., Coolen L. y Hunik J.H. (1998) **Influence of morphology on product formation in *Aspergillus awamori* during submerged fermentations, *Biotechnology Progress* (14) 233 - 240**
-

Bibliografía

51. Metz B., Kossen N.W.F. y van Suijdam J.C. (1979) **The rheology of mould suspensions**, *Advances in Biochemical Engineering* (11) 104 - 156
52. Yang H., King R., Reichl U. y Gilles E.D. (1992) **Measurement and simulation of the morphological development of filamentous microorganisms**, *Biotechnology and Bioengineering* (39) 44 - 48
53. Aynsley M., Ward A.C. y Wright A.R. (1990) **A mathematical model for the growth of mycelial fungi in submerged culture**, *Biotechnology and Bioengineering* (35) 820 - 830
54. Yang H., King R., Reichl U. y Gilles E.D. (1992) **Mathematical model for apical growth, septation, and branching of mycelial microorganisms**, *Biotechnology and Bioengineering* (39) 49 - 58
55. Viniegra - González G., Saucedo - Catañeda G., López - Isunza F. y Favela - Torres E. (1993) **Symmetric branching model for the kinetics of micelial growth**, *Biotechnology and Bioengineering* (42) 1 - 10
56. Nielsen J. (1993) **A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms**, *Biotechnology and Bioengineering* (41) 715 - 727
57. Meyerhoff J., Tiller V. y Bellgardt K.H. (1995) **Two mathematical models for the development of a single microbial pellet, Part I: Detailed morphological model based on the description of individual hyphae**, *Bioprocess Engineering* (12) 305 - 313
58. Paul G.C. y Thomas C.R. (1996) **A structured model for hyphal differentiation and penicillin production using *Penicillium chrysogenum***, *Biotechnology and Bioengineering* (51) 558 -572
59. Krabben P., Nielsen J. y Michelsen M.L. (1997) **Analysis of single hyphal growth and fragmentation in submerged cultures using a population model**, *Chemical Engineering Science* 52 (15) 2641 - 2652
60. Lejeune R. y Baron G.V. (1997) **Simulation of growth of a filamentous fungus in 3 dimensions**, *Biotechnology and Bioengineering* 53 (2) 139 - 150
61. Amrane A., Adour L. y Couriol C. (2005) **An unstructured model for the diauxic growth of *Penicillium camembertii* on glucose and arginine**, *Biochemical Engineering Journal* (24) 125 - 133
62. Pirt S.J. (1967) **A kinetic study of the model of growth of surface cultures of bacteria and fungi**, *Journal of General Microbiology* (47) 181 - 197

-
63. Mitchell D .A., von Meien O.F., Krieger N. y Dalsenter F.D. (2004) **A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation**, *Biochemical Engineering Journal* 17 (1) 15-26
 64. Koch A.L. (1975) **The kinetics of micelial growth**, *Journal of General Microbiology* (89) 209 - 216
 65. Prosser J.I. y Trinci P.J. (1979) **A model for hyphal growth and branching**, *Journal of General Microbiology* (111) 153 - 164
 66. Edelstein L., Hadar Y., Chet I., Henis Y. y Segel L.A. (1983) **A model for fungal colony growth applied to *Sclerotium rolfsii***, *Journal of General Microbiology* (129) 1873 - 1881
 67. Georgiou G. y Shuler M.L. (1986) **A computer model for the growth and differentiation of a fungal colony on solid substrate**, *Biotechnology and Bioengineering* (28) 405 - 416
 68. Molin P., Gervais P. y Lemiere J.P. (1993) **A computer - model based on reaction - diffusion equations for the growth of filamentous fungi on solid substrate**, *Biotechnology Progress* 9 (4) 385 - 393
 69. López - Isunza F., Larralde - Corona C.P. y Viniegra - González G. (1997) **Mass transfer and growth kinetics in filamentous fungi**, *Chemical Engineering Science*, 52 (15) 2629 - 2639
 70. Boswell G.P., Jacobs H., Davidson F.A., Gadd G. y Ritz K. (2002) **Functional consequences of nutrient translocation in mycelial fungi**, *Journal of Theoretical Biology* (217) 459 - 477
 71. Oostra J., le Comte E.P., van den Heuvel J.C., Tramper J. y Rinzema A. (2001) **Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation**, *Biotechnology and Bioengineering* 75 (1) 13 - 24
 72. Rahardjo Y.S.P., Weber F.J., le Comte E.P., Tramper J. y Rinzema A. (2002) **Contribution of aerial hyphae of *Aspergillus oryzae* to respiration in a model solid-state fermentation system**, *Biotechnology and Bioengineering* 78 (5) 539 - 544
 73. Mitchell D.A. y von Meien O.F. (2000) **Mathematical modeling as a tool to investigate the design and operation of the zymotis packed-bed bioreactor for solid-state fermentation**, *Biotechnology and Bioengineering* 68 (2) 127 - 135
 74. Mitchell D.A., Tongta A., Stuart D.M. y Krieger N. (2002) **The potential for**
-

- establishment of axial temperature profiles during solid-state fermentation in rotating drum bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering* 80 (1) 114 - 122**
75. Smits J.P., van Sonsbeek H.M., Tramper J., Knol W., Geelhoed W., Peeters M. y Rinzema A. (1999) **Modelling fungal solid - state fermentation: The role of inactivation kinetics, *Bioprocess Engineering* (20) 391 - 404**
76. Lejeune R. y Baron G.V. (1998) **Modeling the exponential growth of filamentous fungi during batch cultivation, *Biotechnology and Bioengineering* 60 (2) 169-179**
77. Nopharatana M., Howes T. y Mitchell D. (1998) **Modelling fungal growth on surfaces, *Biotechnology Techniques* 12 (4) 313 - 318**
78. Ikasari L. y Mitchell D.A. (2000) **Two-phase model of the kinetics of growth of *Rhizopus oligosporus* in membrane culture, *Biotechnology and Bioengineering* 68 (6) 619 - 627**
79. Smith D. (1991) **Maintenance of filamentous fungi, *In Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells, Academic Press Limited, 2nd Ed., U.K.***
80. Finlayson B.A. (1980) **Nonlinear Analysis in Chemical Engineering, Mc. Graw - Hill.**
81. http://www.ncnr.nist.gov/AnnualReport/FY2003_html/RH8.pdf
82. <http://www.lab-ferrer.com/documentacio/sorcazuc.pdf>
83. Crank J. (1984) **Free and Moving Boundary Problems, Oxford. Clarendon Press.**
84. Farkas V. (1990) **Fungal cell wall: Their structure, biosynthesis and biotechnological aspects, *Acta Biotechnology* 10 (3) 225 - 238**