UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGIA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Modelamiento matemático de la cinética de crecimiento de *Lecanicillium lecanii* en cultivo sumergido para la producción de ácido glicólico.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autora: Valeria Esther Acosta Lescano

Tutora: Mg. María Eugenia García Pazmiño

Ambato – Ecuador

Julio – 2025

APROBACIÓN DEL TUTOR

Mg. María Eugenia García Pazmiño

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 23 de junio de 2025



Mg. María Eugenia García Pazmiño

2100248505

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Valeria Esther Acosta Lescano, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Valeria Esther Acosta Lescano

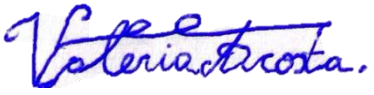
1850752021

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Valeria Esther Acosta Lescano

1850752021

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LORENA DE LOS ANGELES NUNEZ VILLACIS
Validar únicamente con FirmaEC

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
JUAN DE DIOS ESPINOZA MOYA
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. Juan de Dios Espinoza Moya

1803201431

Firmado electrónicamente por:
MARIA DANIELA GARCES MONCAYO
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

1803571585

Ambato, 07 de Julio de 2025

DEDICATORIA

*A mi padre **Ángel** y a mi madre **Aída**, pilares fundamentales en mi vida, quienes con su amor, esfuerzo incondicional y ejemplo constante han sido la luz que ha guiado cada uno de mis pasos.*

*A mi familia en general, por ser refugio en los momentos difíciles y celebración en los logros alcanzados. En especial a mis tías **Margoth** y **Cristina**, quienes desde la distancia me brindan su cariño y apoyo incondicional.*

*A **Kevin Urrutia**, mi mejor amigo, cuya amistad sincera y apoyo constante fueron esenciales en este camino lleno de momentos y experiencias inolvidables. Esta travesía no habría sido igual sin su acompañamiento.*

*A mi querida amiga **Estefany Córdova,** quien desde la infancia fue mi confidente y confió siempre en mí, llevo en mi corazón el recuerdo de tan leal amistad.*

*A mis apreciados amigos y colegas: **Fernando, Jael, Paúl y Nicole,** con quienes compartí experiencias maravillosas a nivel personal y académico a lo largo de la carrera.*

*A la memoria del **Lic. Miguel López,** su enseñanza vive en mi esfuerzo, gracias por los consejos y por creer en mí, su legado late en cada paso que doy.*

A todos ustedes, dedico con gratitud y cariño el fruto de este esfuerzo. Con mucho amor, Valeria.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por la vida, la familia y las experiencias que me ha dado, por obrar en mí para bien, ser mi guía y hacer que cada día sea bendecido.

A la Mg. María Eugenia García Pazmiño, mi tutora de tesis, por su orientación, dedicación y paciencia a lo largo de este proceso. Sus consejos, tanto académicos como personales, han sido fundamentales para el desarrollo de este trabajo y para mi crecimiento profesional.

A las Ingenieras Samantha Cabezas e Isabel Guerrero, técnicos de laboratorio, por su constante predisposición para ayudarme con los materiales y equipos empleados en la fase experimental. Su apoyo fue esencial para llevar a cabo las pruebas y procedimientos necesarios con éxito.

A mi compañero de carrera Kevin Urrutia por su colaboración, acompañamiento y apoyo sincero durante toda la etapa universitaria, sobre todo en el desarrollo experimental de este proyecto.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por brindarme las herramientas académicas y el ambiente propicio para el desarrollo de mi investigación.

Finalmente, a la Universidad Técnica de Ambato, por ser el lugar en el que he podido formarme como profesional y desarrollar mi pasión por la ciencia y la Biotecnología.

A todos ustedes, muchas gracias por su apoyo, confianza y por ser parte de este logro.

Valeria Esther Acosta Lescano

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ..... **ii**

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN ..... **iii**

DERECHOS DE AUTOR ..... **iv**

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO ..... **v**

DEDICATORIA ..... **vi**

AGRADECIMIENTO ..... **vii**

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS ..... **viii**

ÍNDICE DE TABLAS ..... **x**

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **xi**

ÍNDICE DE ECUACIONES ..... **xii**

RESUMEN EJECUTIVO ..... **xiv**

ABSTRACT ..... **xv**

CAPÍTULO I **1**

MARCO TEÓRICO **1**

1.1 Antecedentes investigativos 1

1.1.1 Justificación 1

1.1.2 Hongos entomopatógenos 2

1.1.3 Descripción del microorganismo Lecanicillium lecanii 4

1.1.4 Ácido glicólico 6

1.1.5 Modelos matemáticos 8

1.2 Objetivos 10

1.2.1 Objetivo general 10

1.2.2 Objetivos específicos 10

CAPÍTULO II **11**

2 METODOLOGÍA **11**

2.1 Materiales 11

2.2 Métodos 12

2.2.1 Desarrollo de un cultivo sumergido para el crecimiento de *Lecanicillium lecanii* en condiciones referenciales 12

2.2.2 Empleo de métodos analíticos para el control de las variables de proceso y la producción de ácido glicólico 13
2.2.3 Ajuste de la cinética de crecimiento de la biomasa en función del tiempo a los modelos matemáticos referenciales. 14
CAPÍTULO III 17
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN 17
3.1 Cultivo sumergido para el crecimiento de *Lecanicillium lecanii* 17
3.2 Monitoreo de variables del proceso fermentativo 18
3.2.1 Cinética de crecimiento de *L. lecanii* 18
3.2.2 pH 20
3.2.3 Acidez 21
3.2.4 Azúcares reductores 22
3.2.5 Determinación cualitativa de la producción de ácido glicólico. 23
3.3 Ajuste de la cinética microbiana a los modelos matemáticos referenciales 24
3.3.1 Ajuste al modelo matemático de Gompertz 24
3.3.2 Ajuste al modelo matemático Logístico 25
3.3.3 Ajuste al modelo matemático de Richards 27
CAPITULO IV 30
4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 30
4.1 Conclusiones 30
4.2 Recomendaciones 31
MATERIALES DE REFERENCIA 32
ANEXOS 39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de Lecanicillium lecanii. **5**

Tabla 2. Ácidos orgánicos y fenólicos producidos en fermentación sumergida..... **6**

Tabla 3. Modelos matemáticos referenciales empleados en microbiología predictiva. **9**

Tabla 4. Recursos materiales empleados en la fase experimental. **11**

Tabla 5. Parámetros calculados a partir del ajuste al modelo matemático de Gompertz. **24**

Tabla 6. Parámetros calculados a partir del ajuste al modelo matemático Logístico. **26**

Tabla 7. Parámetros calculados a partir del ajuste al modelo matemático de Richards. **28**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología para la identificación de *Lecanicillium*. **4**

Figura 2. Inóculo de *Lecanicillium lecanii.* **17**

Figura 3. Biorreactores experimentales de lote alimentado. **17**

Figura 4. Curva de crecimiento para *L. lecaniii.* **18**

Figura 5. Fase exponencial del crecimiento experimental de *L. lecaniii.* **18**

Figura 6. Variación del pH durante el proceso fermentativo. **20**

Figura 7. Variación de la acidez del medio durante el proceso fermentativo. **21**

Figura 8. Consumo de sustrato vs el crecimiento microbiano a través del tiempo. **22**

Figura 9. Cambio de color al emplear la reacción colorimétrica. **23**

Figura 10. Fase exponencial según Gompertz. **24**

Figura 11. Valores predichos vs observados. **24**

Figura 12. Fase exponencial con el modelo Logístico. **26**

Figura 13. Valores predichos vs observados. **26**

Figura 14. Fase exponencial según Richards. **28**

Figura 15. Valores predichos vs observados. **28**

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Ecuación de la recta obtenida de la curva de glucosa. **14**

Ecuación 2. Coeficiente de determinación (r2). **15**

Ecuación 3. Error medio estimado. **15**

Ecuación 4. Porcentaje de desvío medio relativo. **16**

Ecuación 5. Modelo matemático de Gompertz. **24**

Ecuación 6. Modelo matemático Logístico. **25**

Ecuación 7. Modelo matemático de Richards. **27**

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Tabla de absorbancias de la biomasa y sus respectivas concentraciones. **39**

Anexo 2. Tabla de valores de pH obtenidos durante el proceso. **40**

Anexo 3. Tabla de registro de la titulación ácido-base durante el proceso fermentativo..... **41**

Anexo 4. Tabla de evaluación del consumo de azúcares reductores durante el proceso fermentativo. **42**

RESUMEN EJECUTIVO

El ácido glicólico es un compuesto de alta demanda en la industria cosmética y farmacéutica debido a sus propiedades exfoliantes y regenerativas sobre la piel, el mismo es producido industrialmente por síntesis química, un método tradicional que presenta desventajas y limitaciones tanto ambientales como económicas, por lo que surge la necesidad de buscar procesos biotecnológicos sostenibles y eficientes. En este contexto, la presente investigación se enfocó en desarrollar un cultivo sumergido de *Lecanicillium lecanii* empleando miel final de caña como sustrato para la producción de ácido glicólico, y monitoreando rigurosamente las variables de proceso como pH, acidez, concentración de azúcares reductores, y producción de biomasa mediante técnicas analíticas, incluyendo la espectrofotometría y la titulación ácido-base. Asimismo, se aplicaron modelos matemáticos de crecimiento microbiano (Gompertz, Logístico y Richards) para ajustar la cinética de crecimiento del microorganismo y determinar el modelo con mejor capacidad predictiva mediante coeficientes de determinación (R cuadrado), error medio estimado (SEE) y porcentaje de desvío medio relativo (PRE). Los resultados sugieren que *L. lecanii* es capaz de producir ácido glicólico en condiciones controladas, con una mayor producción registrada bibliográficamente respecto a otros metabolitos secundarios, lo cual valida su potencial como sistema biológico alternativo y sostenible. Además, el modelamiento matemático en los tres referenciales empleados permitió establecer patrones de crecimiento útiles para futuras escalas de producción, proponiendo una base científica para optimizar los procesos orientados a la obtención de ingredientes activos de interés industrial empleando sustratos de bajo costo y generando menor impacto ambiental.

Palabras claves: *Lecanicillium lecanii*, Ácido glicólico, Fermentación sumergida, Modelamiento cinético, Biotecnología sostenible.

ABSTRACT

Glycolic acid is a compound in high demand in the cosmetic and pharmaceutical industries due to its exfoliating and regenerative properties on the skin. It is produced industrially by chemical synthesis, a traditional method that presents disadvantages and limitations both environmentally and economic, so there is a need to search for sustainable and efficient biotechnological processes. In this context, the present research focused on developing a submerged culture of *Lecanicillium lecanii* using final sugarcane molasses as a substrate to produce glycolic acid, and rigorously monitoring process variables such as pH, acidity, concentration of reducing sugars, and biomass production through analytical techniques, including spectrophotometry and acid-base titration. Likewise, mathematical models of microbial growth (Gompertz, Logistic and Richards) were applied to adjust the growth kinetics of the microorganism and determine the model with the best predictive capacity through coefficients of determination (R squared), estimated mean error (SEE) and percentage of relative mean deviation (PRE). The results suggest that L. lecanii can produce glycolic acid under controlled conditions, with a higher production rate than other secondary metabolites reported in the literature, validating its potential as an alternative and sustainable biological system. Furthermore, mathematical modeling in the three frameworks used allowed for the establishment of growth patterns useful for future production scales, providing a scientific basis for optimizing processes aimed at obtaining active ingredients of industrial interest using low-cost substrates and generating a lower environmental impact.

Keywords: *Lecanicillium lecanii*, Glycolic acid, Submerged fermentation, Kinetic modeling, Sustainable biotechnology.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 Justificación

La industria cosmética y farmacéutica experimentan una creciente demanda de productos cuyos ingredientes activos sean obtenidos de manera sostenible y eficiente, priorizando la mejora continua de las características ambientales, sociales, biológicas y físicas de los procesos cosméticos (**Rocca et al., 2022**). Un compuesto muy cotizado globalmente es el ácido glicólico, el cual es ampliamente utilizado en tratamientos dermatológicos porque actúa como exfoliante y tiene la capacidad de inducir a la regeneración celular, mejorando el aspecto de la piel. La síntesis química es el método convencional para producir este ácido a escala industrial, sin embargo, se conoce que este proceso, a más de presentar limitaciones económicas, durante el mismo se generan elevados niveles de acidez, lo que plantea un riesgo potencial tanto para la estabilidad de las fórmulas como para el medio ambiente (**Bom et al., 2020**).

En este contexto, la producción biológica de compuestos de interés comercial como el ácido glicólico surge como una alternativa prometedora. El uso de microorganismos como *Lecanicillium lecanii* ofrece un proceso más sostenible influenciado por variables que necesitan ser estudiadas a profundidad, como la composición del medio de cultivo y las condiciones de operación (**Rojas et al., 2020**). A pesar de que ya se ha estudiado el potencial que tiene *L. lecanii* para producir una variedad de metabolitos secundarios, entre ellos el ácido glicólico, aún existen lagunas en el conocimiento sobre los mecanismos de producción y las condiciones óptimas de cultivo (**Blaszczyk et al., 2021**). Si bien el mercado global demanda de ingredientes cuya actividad biológica contribuya al bienestar humano y que sus procesos de producción sean sostenibles (**Santos et al., 2023**), la producción biológica de ácido glicólico aún enfrenta desafíos relacionados con la optimización de los procesos de cultivo y la escalabilidad (**Silva, 2022a**).

La originalidad de esta investigación radica en la combinación de la microbiología con el modelamiento matemático para comprender la cinética de crecimiento de *L. lecanii* en un cultivo sumergido con condiciones establecidas que permiten la producción de ácido glicólico. De manera que se sentarán las bases para que a futuro se establezcan las condiciones óptimas para maximizar el rendimiento tanto del crecimiento de la biomasa como de la producción del metabolito.

Además, se espera que los resultados de esta investigación puedan contribuir al desarrollo de procesos de producción más sostenibles y eficientes para la industria cosmética y farmacéutica, permitiendo la obtención de ácido glicólico de alta calidad a un menor costo y con un menor impacto ambiental.

1.1.2 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son biopesticidas, empleados también como nutracéuticos y actualmente forman parte del desarrollo de medicamentos y otros ingredientes activos para la industria farmacéutica; son productores de varios metabolitos secundarios que ayudan en la infección de insectos, protegiéndolos de otros depredadores microbianos, permitiendo la comunicación entre sí y posibilitando la resistencia al estrés ambiental. (**Zhang et al., 2020**). Además, se conoce que infectan también a artrópodos, insectos y especies que no necesariamente son plagas de cultivos vegetales (**Shah & Pell, 2003**). Y aunque se encuentran naturalmente en el suelo, suelen ser aislados a partir de los cadáveres de artrópodos (**Behie & Bidochka, 2014**).

1.1.2.1 Producción biológica de hongos entomopatógenos

La producción masiva de estos hongos se puede realizar mediante dos métodos principales: *in vitro* e *in vivo*; el cultivo *in vitro* es el más común para hongos con necesidades nutricionales relativamente simples y generalmente implica la multiplicación en medios artificiales, por otro lado, la producción *in vivo* se reserva para patógenos obligados con requerimientos nutricionales más complejos que requieren un hospedador vivo para su desarrollo **(Manfrino et al., 2020)**. De acuerdo con **Muñiz et al. (2017)**, para lograr una producción a gran escala de conidios fúngicos es importante la aplicación de técnicas de conservación a largo plazo y el desarrollo inóculos adecuados que promuevan una rápida germinación y una colonización eficiente del sustrato, además se deben ajustar factores como la combinación de sustratos, los niveles de humedad, la textura, la aireación y un estrés moderado, esencial mantener la calidad de la cepa.

Cultivo in vitro

La producción *in vitro* puede llevarse a cabo en sustratos sólidos, líquidos o en sistemas bifásicos. Los biorreactores son sistemas con un ambiente controlado diseñados para optimizar procesos biológicos, donde microorganismos o enzimas catalizan reacciones de interés. Para favorecer el crecimiento celular o la producción de metabolitos, se considera importante mantener las condiciones homogéneas mediante la manipulación precisa de parámetros como pH, agitación y oxigenación **(Michel et al., 2022)**.

El cultivo masivo de hongos entomopatógenos sigue siendo un reto, se pueden emplear diversos medios de cultivo, tanto sintéticos como de residuos agrícolas económicos o industriales, en cualquier caso, sirven para la producción de propágulos (**Khachatourians & Qazi, 2008**). También, estudios como el de **Feng et al. (2000a)** han demostrado que la forma y el tamaño de las esporas varía morfológicamente cuando el medio de cultivo es líquido o sólido. Se suele emplear la fermentación sumergida en sustrato líquido y sólido, en ambos casos se forman conidios aéreos y sumergidos; los métodos empleados son similares a los de los géneros *Beauveria* y *Metarhizium*. Se ha identificado que existen diferencias en la germinación y los patrones de crecimiento entre ambos tipos de sustrato, pero al momento, en la literatura no hay una información clara sobre su tolerancia relativa a la desecación (**Jaronski, 2023**).

Fermentación en sustrato sólido

De acuerdo con **Shi et al. (2009)**, para una producción de hongos entomopatógenos, el bagazo de caña de azúcar residual con porosidad y absorción de agua altas proporcionan un ambiente ideal para una fermentación sólida debido a que favorece la producción de esporas. Según **Feng et al. (2000b)**, el rendimiento y la productividad del crecimiento de los hongos depende del contenido de agua del sustrato sólido, un claro ejemplo es el salvado de trigo, el cual produce mayor cantidad de esporas. En otro estudio, se indicó que el material sintético PUF (espumas de poliuretano) y el bagazo de caña de azúcar, como recurso orgánico, aportan de mejor manera al el crecimiento y la producción de esporas de hongos entomopatógenos en fermentación sólida (**Xu et al., 2011**).

Fermentación en sustrato líquido

Los cultivos líquidos son fundamentales para estudiar los requerimientos nutricionales y las condiciones óptimas de crecimiento de los hongos entomopatógenos que, al ser organismos quimioheterótrofos, dependen de fuentes de carbono como los azúcares para obtener energía y construir sus biomoléculas. Además, permiten controlar con precisión la disponibilidad de nutrientes, facilitando la investigación sobre el metabolismo de estos organismos, garantizando un abundante crecimiento micelial y la eficacia biológica del hongo **(Osorio et al., 2024)**.

1.1.2.2 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios en hongos entomopatógenos son compuestos orgánicos que no son esenciales para su crecimiento y desarrollo, pero que desempeñan un papel crucial en su interacción con el medio ambiente. Los hongos son una fuente invaluable de metabolitos secundarios con

propiedades bioactivas de gran interés para diversos sectores, su aplicación en la industria podría reducir la dependencia de productos químicos y promover prácticas más sostenibles (**León et al., 2024**).

1.1.3 Descripción del microorganismo Lecanicillium lecanii

Lecanicillium lecanii, antiguamente denominado como *Verticillium lecanii* (se cambió la nomenclatura de *Verticillium lecanii* como especie para referirse al género *Lecanicillium* que actualmente incluye un complejo de tres especies: *lecanii*, *muscarium*, y *longisporum*) y conocido también como "hongo de halo blanco", es un hongo filamentoso que forma parte de la familia *Cordycipitaceae* **(Hanan et al., 2020)**. Se caracteriza por tener actividad entomopatógena (**Gharsallah, 2020**). Su tipo de reproducción es asexual mediante esporas denominadas conidios cuya morfología se describe como esférica y compacta **(Monica et al., 2024)**. También, es reconocido morfológicamente por presentar una ramificación verticilada de los conidióforos, con ramas que surgen en verticilos en la parte superior del conidióforo (**Omkar, 2016**).

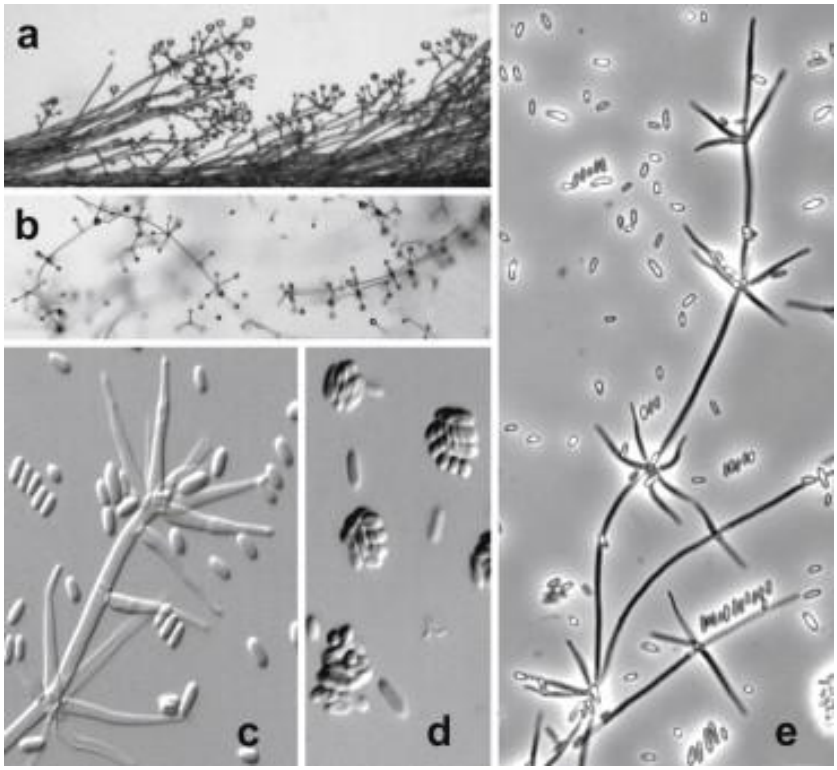


Figura 1. Morfología para la identificación de *Lecanicillium*.

Nota: *Lecanicillium* a,b. Conidióforos con fiálides verticiladas y solitarias con bolas mucilaginosas apicales c, e. Células conidiógenas ahusadas, solas o en verticilos. d. Bolas de conidios en el moco. Conidios 2,5 a 3,5 y 1 a 1,5 mm, de tamaño consistente, fiálides 11 a 20 mm de largo. Reproducido de **Humber (2012).**

1.1.3.1 Clasificación taxonómica

.

Tabla 1.

Taxonomía de *Lecanicillium lecanii*.

Dominio	***Eukaryota***
Reino	*Fungi*
Filo	*Ascomycota*
Clase	*Sordariomycetes*
Orden	*Hypocreales*
Familia	*Cordycipitaceae*
Género	*Lecanicillium*
Especie	*lecanii*

Nota: *L. lecanii* es también conocido en otras literaturas por su sinónimo *Torrubiella confragosa* Mains. La información se recuperó de la Base de Datos de las Especies de Galápagos, Fundación Charles Darwin **(Cannon, 2004)**.

1.1.3.2 Aplicaciones

L. lecanii es ampliamente utilizado en cultivos vegetales como agente de control biológico contra una variedad de insectos y enfermedades **(Subramaniam et al., 2021)**, tiene la capacidad de infectar pulgones, cochinillas, moscas blancas, trips, mildiú, nematodos, polvoroso, entre otros **(Hajji et al., 2023)**. Además, este hongo es capaz de producir metabolitos como proteasas, lipasas y antibióticos, algunos de los compuestos más estudiados por su actividad insecticida y antimicrobiana son la bassianolida, el éster metílico de vertilecanina A y la vertilecanina C **(Błaszczyk et al., 2021)**. Actualmente, a través de la ingeniería genética, se puede expresar en *L. lecanii* los genes virulentos de otros hongos entomopatógenos para tratar las plagas de manera más eficiente, tales como *Bbchitl* de *Beauveria bassiana*, e *Ifu - chit2* de *Cordyceps fumosorosea* (**Huang et al, 2024**). También se ha descubierto que esta especie puede tener aplicaciones potenciales en la industria alimentaria, debido a que la especie puede aportar en fermentaciones naturales o usarse como inóculo, y se ha llegado a catalogar que esta cepa puede ser potencialmente útil en el proceso de maduración del queso (**Bourdichon et al., 2012**).

1.1.3.3 Metabolitos secundarios producidos por L. lecanii

Estudios previos han demostrado que el hongo entomopatógeno *L.lecaniii* cuando se encuentra creciendo en una fermentación sumergida es productor de metabolitos secundarios como ciertos antibióticos y enzimas con actividad proteolítica y lipolítica. Además, se indica que en sus efluentes se pueden encontrar ácidos orgánicos y fenólicos, como los descritos en la *Tabla 2,* pero también puede producir otros ácidos, como el ácido dipicolínico, y el ácido oxálico. También es productor de otros compuestos secundarios como las amilasas y quitinasas (**Borges et al., 2010**).

Tabla 2.

Ácidos orgánicos y fenólicos producidos en fermentación sumergida.

Ácidos orgánicos (mg/mL)			
Ácido glicólico	8,1580	Ácido cítrico	0,2909
Ácidos fenólicos (mg/mL)			
Ácido Gálico	0,842	Furfural	0,006
Ald. Protocateíco	0,303	Ácido P-H benz	2,632
Ácido vainillinico	0,791	Ácido siringico	0,750
Ácido ferúlico	0,249	Ácido P-Coumárico	0.,153

Nota: Los datos anteriores se obtuvieron en un ensayo realizado por **Santiesteban et al., (2004)**, en donde se caracterizaron algunos componentes producidos por *L. lecanii* en fermentación sumergida empleando miel final de caña como sustrato. Aquí se evidencia que existe una producción mayoritaria de ácido glicólico que es el metabolito de interés en el presente trabajo.

1.1.4 Ácido glicólico

El ácido glicólico (AG) también conocido como ácido hidroxiacético, ácido 2-hidroxiacético, ácido hidroxietanoico, ácido acético hidroxi-, entre otros, es un alfa hidroxiácido cuya estructura molecular es CH2OHCOOH, tiene un peso molecular de 76,05 g/mol, es inodoro, incoloro y translúcido; además, es considerado como un compuesto corrosivo y su pH varía dependiendo de su pureza: 2,5 (0,5%), 2,33 (1,0%), 2,16 (2,0%), 1,91 (5,0%), 1,73 (10,0%) (**Guillory et al., 2007**). Su punto de ebullición es 100°C y su punto de fusión bordea los 75°C, es soluble en agua y en otros solventes orgánicos como el etanol, metanol, acetona y éter etílico (**Haynes, 2013**).

Se encuentra formando parte de la estructura de algunas frutas como la caña de azúcar, el tomate, la uva y la remolacha (**Bhalla et al., 2014**), pero también puede ser sintetizado de manera química o con métodos enzimáticos, por ejemplo, tratando formaldehído o trioximetileno con monóxido de carbono y agua en presencia de catalizadores ácidos a una presión superior a 30 MPa (**Ono & Erhard, 2011**). Se trata de una molécula involucrada en la fotosíntesis y la respiración de las plantas y es un precursor del oxalacetato en los humanos (**Maurino & Engqvist, 2015**).

1.1.4.1 Aplicaciones y usos

El AG es un compuesto con gran demanda en industrias como la cosmética y la farmacéutica, está catalogado como una sustancia química con elevado volumen de producción, teniendo un consumo anual total a nivel mundial de aproximadamente 2000-3000 toneladas de solución (**Ono & Erhard, 2011**)**.** Es un monómero clave en la producción de polímeros biocompatibles, utilizados ampliamente en aplicaciones biomédicas, además, se utiliza como materia prima en la fabricación de productos, entre los que se encuentran las oxamidas, los oxalatos y los ésteres de oxalato, lo cuales son compuestos que se encuentran en fármacos, colorantes y pesticidas (**Liu et al., 2024a**). También es conocido por sus propiedades exfoliantes, actúa disolviendo las uniones entre las células muertas de la piel, favoreciendo así su renovación. Una de sus características principales es su bajo peso molecular, lo que le permite penetrar profundamente en la epidermis, estimulando la producción de colágeno y elastina. Además, el ácido glicólico tiene propiedades hidratantes y ayuda a unificar el tono de la piel, reduciendo manchas y líneas de expresión (**Perugini, 2000**).

1.1.4.2 Síntesis del AG

El AG se puede obtener por rutas naturales o sintéticas, se encuentra en fuentes naturales, pero también puede producirse por medios industriales a partir de petróleo o mediante procesos biotecnológicos que involucran bacterias y levaduras (**Lui et al., 2024b**). A pesar de que se conoce que la producción biológica utilizando levaduras modificadas genéticamente se considera actualmente como el método más eficiente y sostenible para obtener AG de alta pureza, si es importante investigar en el diseño de posibles rutas metabólicas que utilicen simultáneamente fuentes de carbono provenientes de materias primas económicas y renovables como los residuos industriales y agrícolas; además, los métodos de síntesis química considerados como menos sostenibles siguen siendo relevantes en la industria debido a su mayor rendimiento y menor costo en algunos casos, es por ello que la producción biológica y la eficiencia de estos procesos aún presenta desafíos y es objeto de investigación continua (**Salusjärvi et al., 2019**).

1.1.5 Modelos matemáticos

Los modelos matemáticos permiten estudiar un sistema o fenómeno del mundo real mediante el uso de gráficas, símbolos, simulaciones y construcciones experimentales. Sirven como herramientas de análisis de datos experimentales, estableciendo relaciones significativas entre las variables involucradas en un proceso. Al cuantificar estas relaciones, los modelos permiten una comprensión más profunda del fenómeno estudiado. Su valor radica en su capacidad predictiva, lo cual optimiza la planificación de experimentos futuros y reduce los recursos necesarios en el laboratorio (**Kapur, 2023**).

Para comprender los sistemas microbianos se hace uso de modelos matemáticos, los cuales logran representar de manera formal la realidad, generando hipótesis comprobables y prediciendo el comportamiento celular; esto ayuda a comprender los sistemas biológicos de mejor manera porque abarca las representaciones generales desde varios niveles de complejidad y precisión, que en combinación con el análisis teórico y experimental permiten llegar a la modularidad, la optimalidad y la robustez, lo que convierte el modelado matemático en una herramienta clave para descifrar los mecanismos que rigen la vida microbiana (**Stelling, 2004**).

1.1.5.1 Modelo de Gompertz

Describe una ecuación más compleja que la de Monod y requiere más parámetros para ajustarse a los datos experimentales. Permite analizar el crecimiento microbiano, a través del cálculo del tiempo de retraso inicial y, la tasa o cantidad máxima de crecimiento alcanzado. No se limita al estudio del crecimiento microbiano puro, sino que también se aplica a la cinética de producción de sustancias por organismos vivos. Es útil para optimizar procesos biológicos y maximizar la producción de bioproductos (**Wang & Guo, 2024a**).

1.1.5.2 Modelo Logístico

Predice el crecimiento de las poblaciones de microorganismos y también anticipa cuándo su crecimiento se detiene o se invierte. Este modelo describe el crecimiento microbiano en forma sigmoidal, donde el crecimiento se ralentiza a medida que la población se acerca a su límite máximo, influenciado por factores como la presencia de nutrientes y el espacio. Los componentes del modelo tienen significados biológicos importantes. Incluso se pueden usar las primeras etapas del crecimiento para estimar el punto máximo de multiplicación. La linealización del modelo se ajusta muy bien a los datos de crecimiento de microorganismos tanto en ambientes con oxígeno como sin él (**Wachenheim et al., 2003**).

1.1.5.3 Modelo de Richards

Se trata de un modelo sigmoidal empleado en microbiología predictiva. Destaca por su versatilidad, al incorporar un cuarto parámetro adicional a los otros modelos por lo que requiere un manejo cuidadoso y una validación rigurosa, sin embargo, esto le permite adaptarse con mayor precisión a variedad de curvas de crecimiento. Se caracteriza por modelar el comportamiento de microorganismos en condiciones variables, haciendo que sus predicciones se ajusten más a la realidad (**Castro et al., 2008**).

Tabla 3.

Modelos matemáticos referenciales empleados en microbiología predictiva.

Modelo	Ecuación	Fuente
Gompertz	$y(t) = y_0 + (y_m - y_0)e^{\left\{-e^{\left[\frac{\mu_m \cdot e}{y_m - y_0}(\lambda - t) + 1\right]}\right\}}$	**(Wang & Guo, 2024b)**
Logístico	$y(t) = y_0 + \frac{y_m - y_0}{\left\{1 + e^{\left[\frac{4 \cdot \mu_m}{y_m - y_0}(\lambda - t) + 2\right]}\right\}}$	**(Lo Grasso et al., 2023)**
Richards	$y(t) = y_0 + (y_m - y_0)\left\{1 + \nu \cdot e^{(1+\nu)} \cdot e^{\left[\frac{\mu_m}{y_m - y_0}(1+\nu)\cdot\left(1+\frac{1}{\nu}\right)\cdot(\lambda - t)\right]}\right\}^{\left(-\frac{1}{\nu}\right)}$	**(López et al., 2004)**

Nota: Donde $\boldsymbol{t}$ es el tiempo (días), $\boldsymbol{\lambda}$ es la duración de la fase de latencia (días), $\boldsymbol{y(t)}$ representa el logaritmo natural de la biomasa (UFC/mL) del microorganismo, dependiendo de la cantidad medida considerada, $\boldsymbol{y_0}$ es el recuento inicial de microorganismos, $\boldsymbol{y_m}$ es el recuento microbiano en la fase estacionaria, $\boldsymbol{\mu_m}$ es el crecimiento máximo específico ($días^{-1}$) y $\boldsymbol{\nu}$ es el parámetro de forma.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Modelar matemáticamente la cinética de crecimiento de *Lecanicillium lecanii* mediante un cultivo sumergido para la producción de ácido glicólico.

1.2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un cultivo sumergido para el crecimiento de *Lecanicillium lecanii* en condiciones referenciales.

- Emplear métodos analíticos para el seguimiento a las variables del proceso y la determinación de la presencia del ácido glicólico.

- Ajustar la cinética de crecimiento de la biomasa en función del tiempo a los modelos matemáticos referenciales.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se llevó a cabo en los laboratorios académicos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En la Tabla 4, se enlistan los reactivos, material fungible y equipos que se utilizaron durante la investigación:

Tabla 4.

Recursos materiales empleados en la fase experimental.

Material	Cantidad
Reactivos	
Agua destilada estéril	5 L
NaOH 0,1 N	50 ml
Fenolftaleína	20 ml
Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).	20 ml
Fosfato de amonio	5,0 g
Ácido glicólico (patrón)	3 ml
Cloruro férrico hexahidratado 98%	20 ml
L-triptófano 93%	15 ml
Ácido sulfúrico al 95-98%	40 ml
Material Fungible	
Matraz Erlemeyer 1 L	4
Tubos Eppendorf	3
Papel aluminio	1
Vaso de precipitación 25 mL	4
Probeta volumétrica 10 mL	3
Micropipeta	1
Frascos ámbar	1
Papel industrial	1
Placas Petri	3
Bureta 50 mL	1

Equipos	
Agitador magnético	1
Autoclave	1
Balanza analítica	1
Baño de agua	1
Centrífuga	1
Espectrofotómetro	1
Incubadora	1
Potenciómetro	1
Refrigerador	1

2.2 Métodos

2.2.1 Desarrollo de un cultivo sumergido para el crecimiento de *Lecanicillium lecanii* en condiciones referenciales

2.2.1.1 Preparación del medio de cultivo y el sistema de lote alimentado

Los ensayos se realizaron por triplicado utilizando matraces Erlenmeyer de 1 litro de capacidad como fermentador (500 mL de volumen efectivo), empleando un medio compuesto por miel final de caña (comercialmente conocida como melaza) al 3,0% y difosfato de amonio (NH4)2HPO4 al 1,8% disueltos en agua destilada estéril. Se empleó un sistema de lote incrementado, con dos adiciones de melaza a concentración de 2,5% (**Santiesteban et al., 2004**).

2.2.1.2 Activación e inoculación del microorganismo

Se activó un cultivo puro de *Lecanicillium lecanii* a partir de una placa con medio sólido (PDA). El cultivo se transfirió a los tres matraces Erlenmeyer con medio líquido fresco y se cerró herméticamente; un cuarto matraz con medio sirvió como control negativo. El volumen del inóculo fue de 50 mL correspondiente al 10% del volumen de trabajo, a una concentración inicial de UPC/ml de $1x10^8$. Posteriormente, se incubó a 24∘C durante 14 días para obtener una suspensión conidial de alta densidad (**Błaszczyk et al., 2021**).

2.2.2 Empleo de métodos analíticos para el control de las variables de proceso y la producción de ácido glicólico.

2.2.2.1 Monitoreo y control del proceso fermentativo

Biomasa

La concentración de Biomasa se controló diariamente (cada 24h). Primero se homogenizó manualmente el contenido de los matraces. Luego se tomó como muestra 1 ml de cada matraz procurando que esta sea de zonas representativas del fermentador: zona central-inferior. Se centrifugó las muestras a 6000 rpm durante 20 minutos, el sedimento se lavó 2 veces con agua destilada. Luego se resuspendió la biomasa en agua destilada estéril y se homogenizó empleando un bortex. Finalmente, las muestras se colocaron en las cubetas y se midió la absorbancia empleando el método de espectrofotometría una longitud de onda de 600 nm. Para corroborar el crecimiento de biomasa se realizó un conteo en la cámara de Neubauer (**Ramírez et al., 2014**). Los datos se anotaron en una bitácora.

pH

El pH de los cultivos se midió diariamente (cada 24 horas). Se tomaron muestras del medio líquido y se preparó una mezcla en proporción 1:10 (muestra:agua destilada), se homogeneizó y se dejó reposar unos minutos. Luego, el pH se midió utilizando el potenciómetro digital previamente calibrado (**Marín & Bustillo, 2002**).

Acidez

La acidez se determinó mediante titulación ácido-base. Para ello, se tomaron 1 mL del medio de cultivo, los cuales se filtraron para eliminar células o residuos, y se realizó una dilución 1:10 con agua destilada. Se agregaron dos gotas de fenolftaleína como indicador. La titulación volumétrica se realizó dispensando desde la bureta una disolución de NaOH 0,1 N sobre la muestra, agitando continuamente la mezcla de reacción (**Morales et al., 2019**). Se registraron los volúmenes dispensados de NaOH hasta alcanzar un cambio de color estable. La acidez se expresó como miliequivalentes de ácido producido por litro (meqU/L).

Azúcares reductores

Los azúcares reductores se cuantificaron mediante el método de **Miller (1969)** con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Se preparó un extracto filtrado del medio de cultivo, del cual se tomaron alícuotas de 1 mL para reaccionar con 2 mL de reactivo DNS. Las muestras se calentaron a 90∘C durante 10 minutos y se enfriaron rápidamente en baño de agua con hielo. La absorbancia se midió a 540 nm utilizando un espectrofotómetro. La concentración de azúcares reductores se calculó mediante una curva estándar utilizando glucosa como sustancia patrón. La preparación de la curva estándar se detalló a continuación: Las soluciones patrón de glucosa se prepararon empleando las siguientes concentraciones: 0; 0,5; 0,7; 1,0; 1,5; 1,7 y 2,0 mg/L. Se mezclaron 0,25 mL de cada solución y 0,25 mL del reactivo DNS preparado. Se colocó en tubos bacteriológicos cubiertos con papel aluminio para proteger la reacción de la luz. Los tubos se colocaron en un baño termostático a 92∘C durante 5 minutos. La reacción se detuvo enfriando los tubos en hielo durante 5 minutos, luego se agregaron 2,5 mL de agua destilada a cada tubo y se agitaron. Finalmente, la absorbancia se midió a 540 nm en un espectrofotómetro.

Ecuación 1. Ecuación de la recta obtenida de la curva de glucosa.

$$y = 0{,}2788x + 0{,}0091$$

Determinación de ácido glicólico utilizando espectrofotometría

Se formó un producto cromógeno coloreado empleando la reacción de Hopkins-Cole. Se sugiere que el ácido glicólico reacciona con dos moléculas de triptófano para generar un color rojizo carmesí. En tubos de ensayo, se colocaron 1 ml de la muestra, 0,6 ml de solución de L-triptófano 0,016 M 93% y 2 ml de solución fresca de cloruro férrico hexahidratado 0,025 M 98%. Después se vertió 5 ml de ácido sulfúrico concentrado 98%, dividido en porciones de aproximadamente 1 ml, en agitación continua en un baño de agua corriente fría durante 30 minutos con el fin de mantener la temperatura a menos de 50 °C. Inmediatamente, se leyó la absorbancia a 570 nm. La interpretación cualitativa, se pudo realizar observando la presencia de un color rojo carmesí y una absorbancia significativamente mayor que el blanco, lo que representaría una respuesta positiva para presencia de ácido glicólico, por el contrario, la ausencia de color o de absorbancia representaría una respuesta negativa. (**Abdulwahed et al., 2020**)

2.2.3 Ajuste de la cinética de crecimiento de la biomasa en función del tiempo a los modelos matemáticos referenciales.

2.2.3.1 Ajuste a modelos matemáticos referenciales de Gompertz, Logístico y Richards

Se utilizaron los datos experimentales correspondientes a la zona del crecimiento exponencial identificadas en la curva de cinética de crecimiento de la biomasa de *L. lecanii*, mediante el seguimiento periódico de las variables experimentales. El tiempo fue la variable independiente, mientras que el recuento de biomasa fue la variable dependiente, mismas que están descritas para cada ecuación en la Tabla 3. Los modelos matemáticos se linealizaron para encontrar los parámetros de ajuste, usando el software estadístico STATISTICA 7.0.

2.2.3.2 Evaluación de la bondad de ajuste a los modelos matemáticos empleando estadísticos referenciales

Para determinar el mejor ajuste de los modelos propuestos a los datos experimentales, se empleó el coeficiente de determinación (R^2). Aquel modelo que presentó el valor más alto de R^2 fue el seleccionado, indicando una mayor capacidad para explicar la variabilidad de los datos. Además, se complementó esta evaluación analizando el error estándar de la estimación (SEE) y el porcentaje de error relativo promedio (PRE), los cuales permitieron cuantificar la precisión de las predicciones del modelo en comparación con los valores observados. Un valor menor de SEE y PRE sugirió un ajuste más preciso del modelo (**Silva et al., 2022b; Morata et al., 2015**).

Ecuación 2. Coeficiente de determinación (r2).

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(Y_i - \hat{Y}_i)^2}{\sum_{i=1}^{n}(Y_i - \bar{Y})^2}$$

Donde r^2 es el coeficiente de determinación; Y_i, es el valor de la variable dependiente de la observación i; $\hat{Y}_i$, es el valor aproximado por el modelo de regresión para la observación de i; $\bar{Y}$, es la media de la variable dependiente de todas las observaciones.

Ecuación 3. Error medio estimado.

$$SE = \sqrt{\frac{\sum(V_{exp} - V_p)^2}{GRL}}$$

Donde SE, es el error medio estimado; V_{exp} la observación experimental, V_p el valor predicho (calculado a partir del modelo matemático) y GRL corresponde al número de observaciones.

Ecuación 4. Porcentaje de desvío medio relativo.

$$P = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} \frac{|X_{ei} - X_{ci}|}{X_{ei}}$$

Donde P, es el porcentaje de desvío medio relativo; X_{ei} es la observación experimental, X_{ci} el valor predicho (calculado a partir del modelo matemático) y n el número de observaciones.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Cultivo sumergido para el crecimiento de *Lecanicillium lecanii*



Figura 2. Inóculo de *Lecanicillium lecanii.*

Nota: Se prepararon 250 mL del medio referencial y se inoculó con el hongo activo, se incubó durante 5 días, el número de UFC/mL que se registró en este punto fue de $1{,}16x10^{8}$.

.



Figura 3. Biorreactores experimentales de lote alimentado.

Nota: Los matraces con el cultivo microbiano. (A) Primeros días después de inocular en 250 mL de medio de cultivo. (B) Último día de la fase experimental con un volumen mayor después de la adición de medio por sistema fed-batch.

3.2 Monitoreo de variables del proceso fermentativo

3.2.1 Cinética de crecimiento de *L. lecanii*

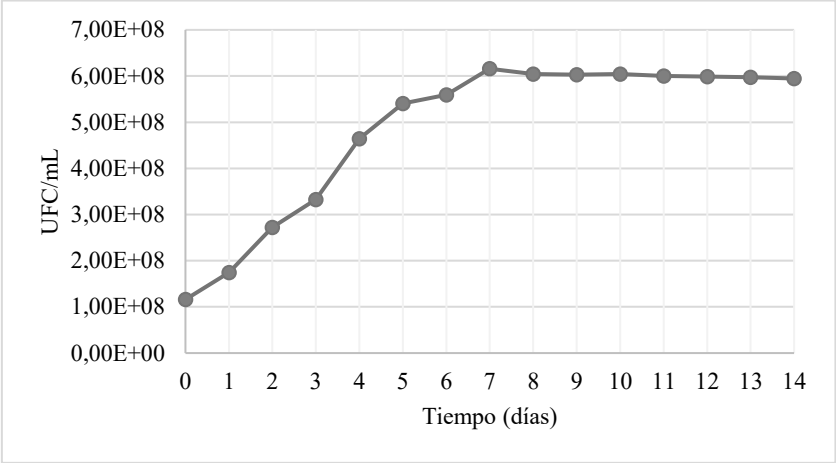


Figura 4. Curva de crecimiento para *Lecanicillium lecaniii.*

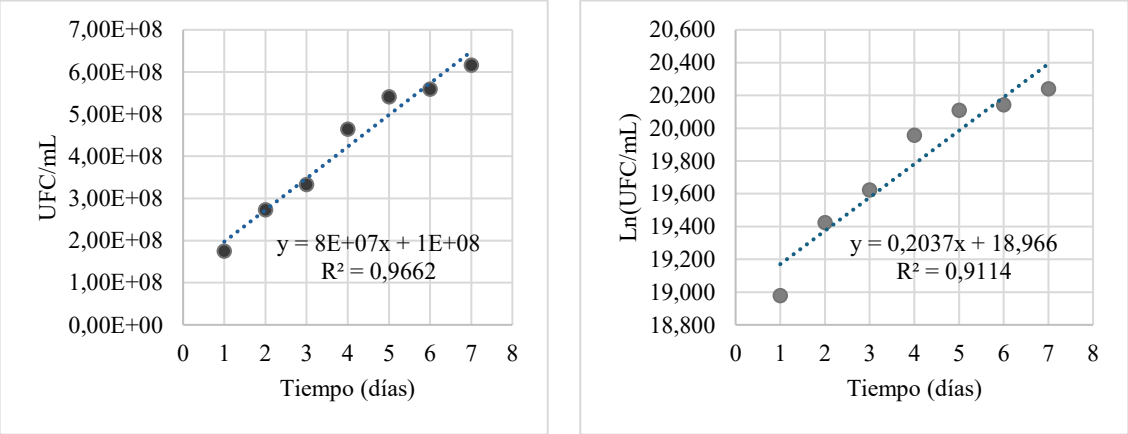


Figura 5. Fase exponencial del crecimiento experimental de *L. lecaniii.*

Nota: A la izquierda, se observa la gráfica de la concentración de biomasa expresada en UFC/mL de cultivo, mientras que a la derecha se encuentra la gráfica expresada en el Logaritmo natural de las UFC/mL, la cual servirá para ajustar a los modelos matemáticos referenciales.

Se determinó que la curva de crecimiento de *L. lecanii* se puede capturar en un período de tiempo correspondiente a 14 días empleando espectrofotometría y conteo de las unidades formadoras de colonia en placa; las fases de latencia (día 0-1), exponencial (día 1-7) y estacionaria (día 8-14), se disciernen claramente en la curva de crecimiento sigmoidea obtenida durante el presente estudio y mostrado en la Figura 4. La fase de crecimiento lineal que mostró un coeficiente de determinación alto (R^2=0,9662) tal como se observa en la Figura 5, todo ello con base en los parámetros especificados para el medio y la

concentración inicial explicada en la metodología, este resultado nos brinda la posibilidad de percibir a la melaza como un medio de cultivo propicio para el hongo, considerándolo también como un sustrato de bajo costo y con alto rendimiento. Según **Lima et al. (2024),** emplear subproductos agroindustriales como fuente de nitrógeno orgánico mejora el crecimiento de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* en cultivo sumergido, lo que permite optimizar la producción de biomasa y de metabolitos o esporas producidas. Al igual que en el estudio de **Gao et al. (2025)**, donde se afirma que el sistema bifásico entre sumergido-líquido seguido de un cultivo sólido para potenciar la esporulación es común en producción a escala industrial, mejora el tiempo en los procesos y eleva el rendimiento de conidios. En la Figura 3 se muestra el sistema de biorreactor empleado, lo que coincide con el estudio de **Beck et al. (2022)**, donde se reporta un método de cultivo de lote alimentado aplicado a hongos entomopatógenos y señala que la alimentación controlada de sustrato en medio sumergido permite un incremento de hasta 3 veces en la concentración final de biomasa seca.

Este comportamiento es representativo de un crecimiento microbiano controlado, en donde inicialmente el microorganismo se adapta al medio, incrementando progresivamente la biomasa hasta alcanzar una tasa máxima que llega a estabilizarse reflejo de una limitación progresiva de nutrientes o acumulación de metabolitos tóxicos. **Slowik et al. (2023)**, indica que este patrón es común en cultivos sumergidos de hongos entomopatógenos, y coincide con lo descrito por los mismos autores, quienes emplearon las mediciones de densidad óptica para generar curvas de crecimiento que lograron describir con precisión las fases de latencia, exponencial y estacionaria en especies del género *Metarhizium* y en el mismo estudio llegaron a sugerir que la técnica se puede utilizar también con otros géneros de hongos entomopatógenos como una herramienta confiable y reproducible para evaluar el crecimiento en condiciones líquidas controladas, entre los que incluían a *Lecanicillium spp.*

Usar el método de turbidimetría para estimar la concentración celular, midiendo la absorbancia a 600 nm, y compararla con el método de recuento en placa con diluciones seriadas permitió transformar linealmente los datos a través de un factor de correlación con las UFC/mL, esto coincide con lo indicado por **Mauerhofer et al. (2019)**, quienes señalan que la densidad óptica medida con espectrofotómetro a una longitud de onda específica se puede correlacionar directamente con la biomasa celular cuando se establezca una curva de calibración adecuada para la cepa y condiciones del cultivo, es decir que la combinación de estas metodologías aporta robustez cuantitativa al análisis y facilita su uso para ajuste de modelos cinéticos.

3.2.2 pH

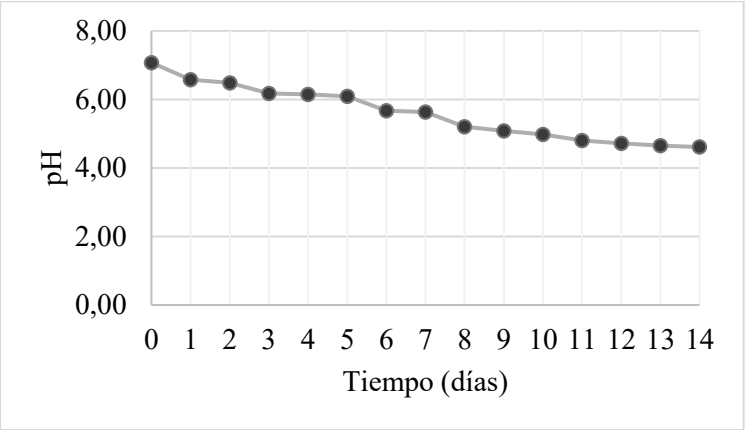


Figura 6. Variación del pH durante el proceso fermentativo.

Nota: La muestra control se mantuvo en un pH estable de aproximadamente 6,70.

Durante el monitoreo del cultivo, se evidenció una clara disminución progresiva de los valores de pH iniciando en un punto relativamente neutro hasta llegar a condiciones de acidez al finalizar el experimento. Este descenso que se visualiza en la Figura 6 podría ser un indicio de la producción de metabolitos ácidos, como resultado del metabolismo primario del hongo, que se encarga de la fermentación de azúcares presentes en el medio, en este caso, la melaza. El perfil descendente del pH, que se muestra en la Figura 6, llega a correlacionarse con la fase exponencial y estacionaria de crecimiento del hongo, pudiendo indicar que hay una mayor producción de compuestos orgánicos como ácidos, los cuales alteran la acidez del medio durante esta etapa. Según **Feng et al. (2000c)**, este fenómeno es muy común en fermentaciones líquidas de *Verticillium lecanii*, sobre todo cuando el medio de cultivo contiene sales de amonio como fuente de nitrógeno porque este compuesto promueve una caída del pH como resultado de la liberación de aniones ácidos durante la asimilación de amonio por parte del microorganismo, lo que además promueve la esporulación y por tanto el crecimiento fúngico. Por ejemplo, de acuerdo con **Mascarin et al., (2021)** la disminución del pH del medio provoca la activación de genes relacionados con la síntesis de metabolitos bioactivos como quitinasas y proteasas durante la fase exponencial a estacionaria en un cultivo de *Beauveria bassiana*. Por otro lado, **Liu et al. (2003)** indicaron que una disminución brusca del pH, tanto en fermentaciones sólidas como líquidas, pueden inducir a fenómenos de autólisis y vacuolización, lo que podría relacionarse con la estabilización en la biomasa que se visualiza a partir del día 8 en el presente estudio. De esta manera, se reafirma que el monitoreo del pH es crucial para las mediciones de la actividad metabólica microbiana y que, además, es un indicador indirecto del estado fisiológico del cultivo.

3.2.3 Acidez

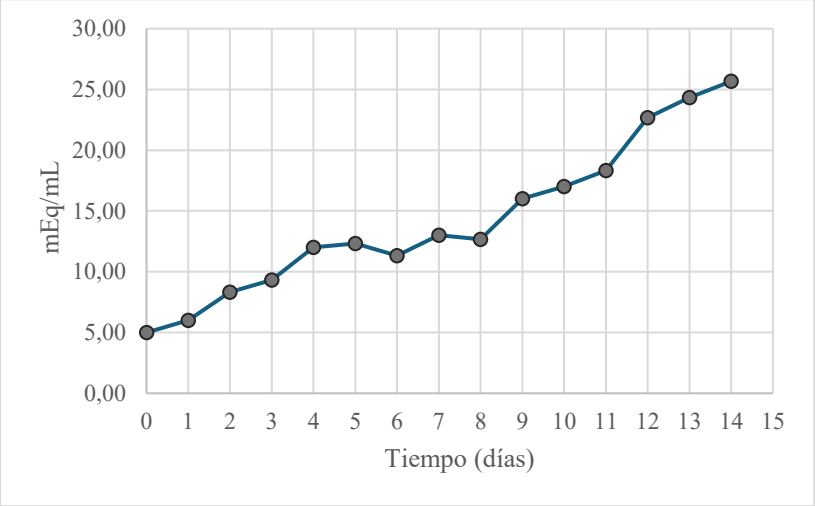


Figura 7. Variación de la acidez del medio durante el proceso fermentativo.

El incremento de la acidez del medio, la cual se midió en miliequivalentes de ácido por mL, fue evidente conforme avanzó la fermentación, así lo muestra la Figura 7. Este es un comportamiento usual en la producción de hongos. La acidificación registrada tiene relación con los valores de pH antes descritos. Según **Feng et al. (2002)**, en el cultivo con medio líquido de *V. lecanii* se forma una sustancia viscosa que coincide con el inicio de la esporulación, donde también se comienza a evidenciar cambios en la acidez del medio, respaldando la hipótesis de que la acidificación favorece a la diferenciación celular y a la liberación de estructuras reproductivas. También **Litwin et al. (2021)**, señalan que existe una estrecha relación entre la acidez del medio y la concentración de metabolitos presentes en el mismo. Además, este resultado puede asociarse con la producción de ácidos orgánicos, como en este caso, el ácido glicólico, producto de rutas metabólicas del hongo bajo las condiciones descritas que son ricas en carbono y nitrógeno.

En la Figura 7 se observa también una progresión lineal del consumo de base titulante (NaOH 1N) lo que indica un incremento acumulativo en la concentración de protones liberados en el medio, lo que también puede usarse como un indicador indirecto de la producción de ácido por la actividad metabólica del microorganismo, así lo mencionan **Tamerler et al. (1998)**, quienes concluyeron que la titulación ácido-base con NaOH 1N es un método preciso para determinar la acumulación de metabolitos ácidos o protones liberados durante la fermentación de *Metarhizium robertsii*, correlacionando la acidificación del medio con la eficiencia metabólica fúngica en ciclos de metabolismo primario y secundario.

3.2.4 Azúcares reductores

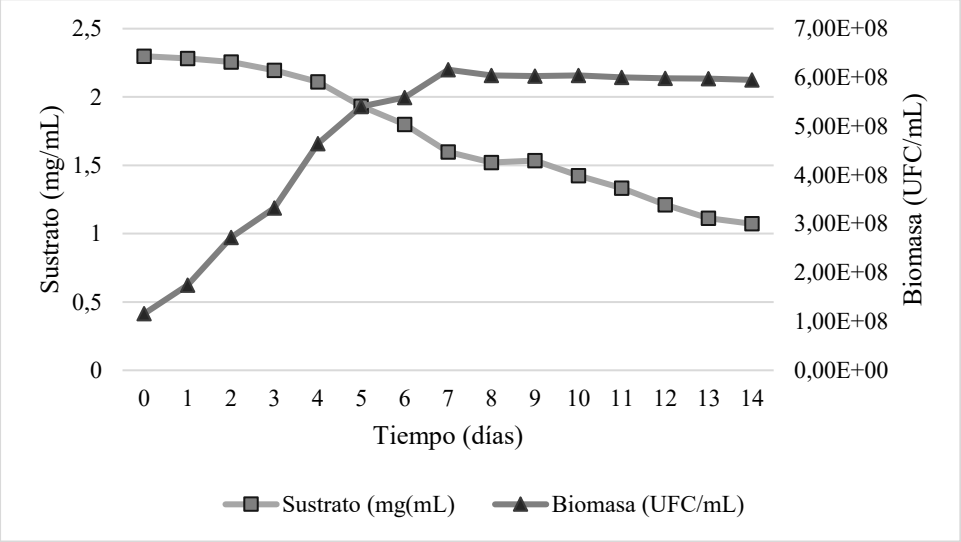


Figura 8. Consumo de sustrato vs el crecimiento microbiano a través del tiempo.

Se estableció la relación entre el consumo de sustrato, evaluado a través del método de DNS mencionado en la metodología, y la concentración de la biomasa analizada anteriormente, como resultado se obtuvo la gráfica de tres ejes, en la Figura 8 se observa una relación inversa entre ambos parámetros estudiados. El método DNS de Miller también fue empleado por **Ortega et al. (2012)** para cuantificar el consumo de sustratos y relacionarlo con la producción de biomasa y metabolitos en cultivos sumergidos de hongos basidiomicetos, a través de ello, concluyeron que la pendiente de la curva de consumo de glucosa es inversamente proporcional a la tasa de producción de biomasa, lo que es totalmente consistente con la curva del presente estudio, donde la pendiente máxima de consumo coincide con la fase exponencial de biomasa. La relación que existe entre el consumo de azúcares y el incremento de la biomasa confirma que el hongo hace uso de la glucosa como principal fuente de carbono para su crecimiento, aunque no exclusivamente para producir metabolitos secundarios. De acuerdo con **Santos et al. (2021)**, en su estudio con *Beauveria* y *Metarhizium*, se demostró que, durante la fase de mayor consumo de sustrato, la producción de metabolitos, en su caso proteínas, incrementa considerablemente lo cual coincide con el patrón observado en el presente trabajo. El sustrato empleado en este estudio fue la melaza, un subproducto de la caña que es económico y fácil de conseguir, **Tamizharasi et al. (2005)** mencionan que este contiene azúcares fermentables y compuestos orgánicos que la convierten en una alternativa sostenible frente a medios tradicionales como glucosa pura o extractos de levadura y se demostró que los cultivos en medio con melaza y sin suplementos nitrogenados, son capaces de generar biomasa y esporas viables, reduciendo significativamente los costos de producción de hongos entomopatógenos.

3.2.5 Determinación cualitativa de la producción de ácido glicólico.

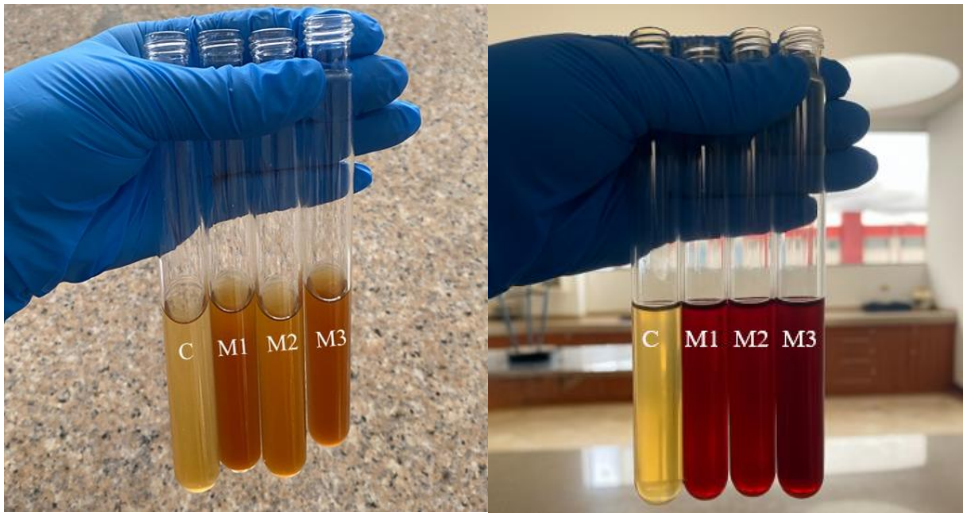


Figura 9. Cambio de color al emplear la reacción colorimétrica.

Nota: A la izquierda se observan las muestras sin sometimiento al tratamiento de calor y frío que permitiría que ocurra la reacción química esperada. A la derecha se ve el resultado después del tratamiento químico y térmico completo.

Se realizó la reacción química colorimétrica empleando los reactivos descritos en la metodología, se analizaron las muestras de cada matraz, después del tratamiento se observó el cambio de coloración de las muestras, afirmando la presencia del ácido glicólico de manera cualitativa. En este estudio no fue de particular interés el cuantificar la producción del metabolito porque bibliográficamente se ha demostrado que en el medio de cultivo y a las condiciones referenciales empleadas, *Lecanicillium lecanii* es productor de ácidos orgánicos y en mayor medida de ácido glicólico, tal como se indica en la Tabla 2. Se aplicó una metodología cualitativa que, al requerir mayor detalle, se puede establecer un patrón medir mediante espectrofotometría y relacionar cuantitativamente con la presencia del ácido. De acuerdo con **Takahashi (1972)** se puede utilizar al 2,7dihidroxinaftaleno en medio ácido fuerte (como el ácido sulfúrico concentrado) para generar un complejo coloreado con ácido glicólico, el mismo que proporciona un color púrpurarojo cuya intensidad es proporcional a la concentración de ácido glicólico, visible a 540 nm, lo que difiere con este nuestra metodología aplicada, que se midió a una longitud de onda de 570 nm, sin embargo, el autor concluye que esta reacción es altamente sensible y capaz de detectar cantidades tan bajas como 0,2 µg de ácido glicólico, convirtiendo en una metodología ideal para identificar la presencia temprana de este metabolito en muestras de interés. En este estudio se midió la absorbancia de la muestra obteniendo un valor promedio entre las 3 muestras de 0,244; sin embargo, no se estableció una correlación cuantitativa con la cantidad de ácido glicólico porque para ello se requiere la elaboración de una curva de calibración empleando un estándar del compuesto y en este estudio no fue prioridad estimar la producción del metabolito.

3.3 Ajuste de la cinética microbiana a los modelos matemáticos referenciales

3.3.1 Ajuste al modelo matemático de Gompertz

Ecuación 5. Modelo matemático de Gompertz.

$$y(t) = y_0 + (y_m - y_0)e^{\left\{-e\left[\frac{\mu m * e}{y m - y_0}(\lambda - t)+1\right]\right\}}$$

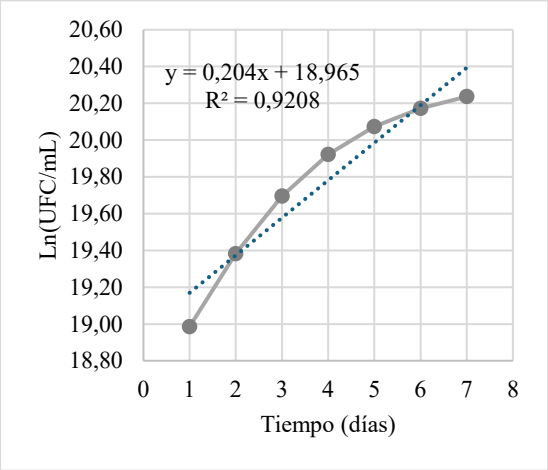


Figura 10. Fase exponencial según Gompertz.

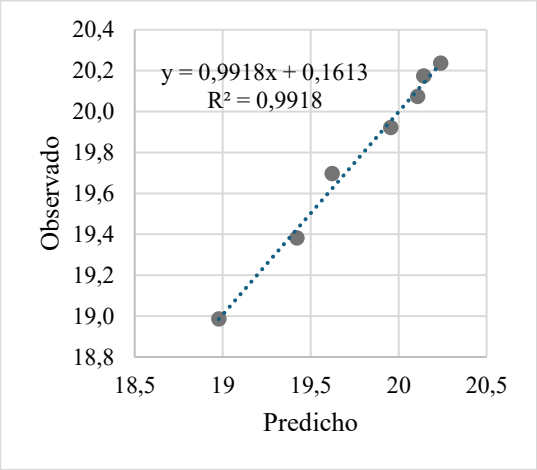


Figura 11. Valores predichos vs observados.

Tabla 5.

Parámetros calculados a partir del ajuste al modelo matemático de Gompertz.

Parámetros	**Valor**
$\boldsymbol{y_0}$ Valor inicial de la biomasa Ln(UFC/mL).	17,93
$\boldsymbol{y_m}$ Valor máximo de la biomasa alcanzado Ln(UFC/mL).	20,34
$\boldsymbol{\mu_m}$ Tasa de crecimiento máximo específico (días^{-1}).	1,18
λ Duración de la fase de latencia (días).	1,44
R^2 Coeficiente de Determinación.	0,9918
SEE Error Medio Estimado.	0,0385
Porcentaje de Desvío Medio Relativo.	0,1621%

Nota: Los parámetros estimados se obtuvieron a través de ajustar los datos al modelo matemático en el software STATISTICA 7.0

Los datos ajustados al modelo de Gompertz revelan una excelente concordancia con los datos observados del crecimiento de *L. lecanii*. En la Figura 11, se observa que los datos se alinean con una pendiente casi unitaria (0,9918) y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9918$. Esto indica un ajuste estadístico excelente, donde la gran mayoría de los valores predichos por el modelo coinciden con los observados en el experimento. Desde el punto de vista estadístico se interpreta que el modelo tiene un excelente ajuste, con un coeficiente de determinación R^2 cercano a 1, lo que significa que más del 99% de la variabilidad observada en los datos puede ser explicada por el modelo. El error medio estimado (SE) bajo sugiere que las predicciones del modelo son muy precisas, con una diferencia mínima entre los valores predichos y observados. Además, el porcentaje de desvío medio relativo (P) extremadamente bajo indica que el modelo predice el comportamiento del crecimiento con una gran precisión, lo que hace que el ajuste sea altamente confiable para la interpretación microbiológica del crecimiento del hongo en estudio. El crecimiento microbiano en condiciones de cultivo sumergido, como es el caso del presente trabajo, presenta típicamente una curva sigmoidea que puede ser descrita mediante modelos no lineales como Gompertz, Logístico y Richards. De acuerdo con **Tjørve & Tjørve (2017)**, estos modelos permiten la representación matemática de la evolución de la biomasa con respecto al pasar del tiempo, además, incorpora parámetros biológicos interpretables como la fase de latencia (λ), la tasa de crecimiento máximo (μ_m) y el valor máximo de biomasa alcanzado (y_m). Para **Passão et al. (2023),** el modelo de Gompertz es útil cuando se busca describir la fase de crecimiento exponencial sin asumir simetría en la curva y permite una alta sensibilidad a la hora de detectar efectos de estrés o inhibidores en hongos filamentosos, en su estudio el ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Gompertz fue muy bueno para todas las curvas de crecimiento ($r^2 > 0,98$), lo que se equipara a los resultados presentados en la Tabla 5**.** Por su parte**, Liu et al. (2015)** estudiaron la longitud de elongación de esporas y el crecimiento micelial en cultivo líquido, al emplear el modelo de Gompertz modificado encontraron que el ajuste sigmoideo representaba de manera adecuada la fase exponencial, con parámetros biológicos claramente definidos, incluso en crecimientos lentos.

3.3.2 Ajuste al modelo matemático Logístico

Ecuación 6. Modelo matemático Logístico.

$$y(t) = y_0 + \frac{y_m - y_0}{\left\{1 + e^{\left[\frac{4 \cdot \mu_m}{y_m - y_0}(\lambda - t) + 2\right]}\right\}}$$

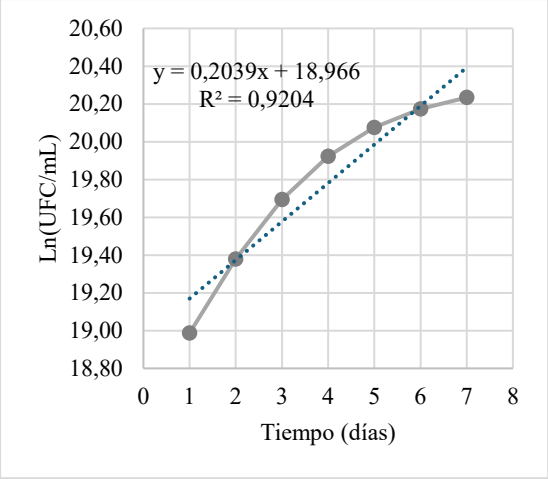


Figura 12. Fase exponencial por Logístico.

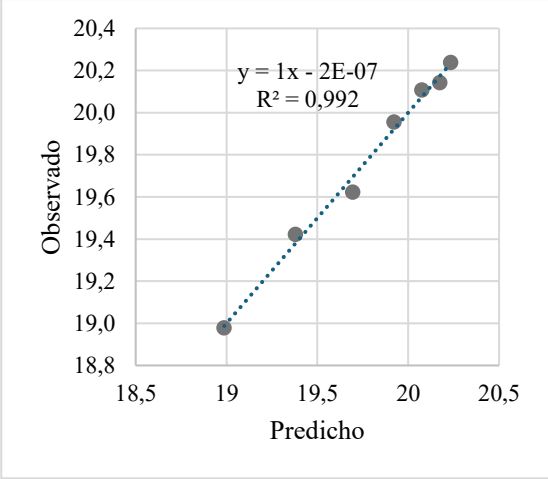


Figura 13. Valores predichos vs observados.

Tabla 6.

Parámetros calculados a partir del ajuste al modelo matemático Logístico.

Parámetros	**Valor**
y_0 Valor inicial de la biomasa Ln(UFC/mL).	17,93
y_m Valor máximo de la biomasa alcanzado Ln(UFC/mL).	20,34
μ_m Tasa de crecimiento máximo específico (días^{-1}).	1,18
λ Duración de la fase de latencia (días).	1,44
R^2 Coeficiente de Determinación.	0,9920
SEE Error Medio Estimado.	0,0413
Porcentaje de Desvío Medio Relativo.	0,163%

Nota: Los parámetros estimados se obtuvieron a través de ajustar los datos al modelo matemático en el software STATISTICA 7.0

El ajuste de los datos experimentales al modelo logístico permitió describir adecuadamente la cinética de crecimiento del hongo *L. lecanii* durante su fase exponencial. En la Figura 13, se obtuvo un ajuste similar al de Gompertz, con una pendiente igual a 1 y R^2 igual a 0,9920. La línea de regresión representa una predicción precisa del comportamiento de la biomasa, reforzando la robustez del modelo en condiciones de cultivo controlado. La calidad del ajuste se evidenció con un coeficiente de determinación R^2 de 0,992, lo que indica que el modelo explica el 99,2% de la variabilidad observada. Además, los valores bajos del error medio estimado y el porcentaje de desvío medio relativo reflejan

una alta precisión y baja desviación entre los valores observados y predichos. Estos resultados validan la utilidad del modelo logístico para caracterizar el crecimiento microbiano en condiciones controladas, esto se corrobora al comparar con el estudio realizado por **Pan et al. (2023)**, quienes emplearon el modelo logístico a comunidades fúngicas cuyo ambiente de desarrollo tenía limitaciones de sustrato, y confirmaron la aplicabilidad de este en la prevención de fases de desestabilización y competencia. De igual manera, **Wang et al. (2008)**, reportaron que al comparar los modelos de Monod y el Logístico para describir el crecimiento micelial, producción de polisacáridos y consumo de sustrato en cultivo sumergido de *Morchella*, fue el modelo logístico el que brindó un mejor ajuste con un error del 5,8%, el mismo logró capturar de forma adecuada la fase exponencial y el estancamiento en fase estacionaria, demostrando que es un modelo mayormente robusto y más preciso que Monod en ambientes con recursos limitados.

Por otro lado, **Hameed et al. (2024),** señalan que para *Aspergillus fumigatus*, el modelo logístico clásico (sin calibración) presentó un ajuste deficiente a datos de absorbancia a 600 nm, sobre todo en cultivos poco densos y que el modelo logístico mejorado (Logistic-OD-calibration) logró un ajuste preciso a toda la curva de crecimiento, estimando tasas de crecimiento que coincidieron con los valores de referencia y superando a las predicciones realizadas con Gompertz, exponencial y Gaussian Process. Estos hallazgos respaldan el uso del modelo logístico en estudios de crecimiento fúngico como *Lecanicillium lecanii*, siempre que se considere la calibración adecuada de datos indirectos como la densidad óptica. En el estudio de **Castro et al. (2011)**, se sugiere que la relación carbono/nitrógeno del medio de cultivo influye directamente en los parámetros cinéticos, como en la tasa de crecimiento específica y el tiempo de duplicación cuando se modela la cinética de crecimiento mediante el modelo logístico.

3.3.3 Ajuste al modelo matemático de Richards

Ecuación 7. Modelo matemático de Richards.

$$y(t) = y_0 + (y_m - y_0)\left\{1 + \nu \cdot e^{(1+\nu)} \cdot e^{\left[\frac{\mu_m}{y_m - y_0}(1+\nu)\cdot\left(1+\frac{1}{\nu}\right)\cdot(\lambda - t)\right]}\right\}^{\left(-\frac{1}{\nu}\right)}$$

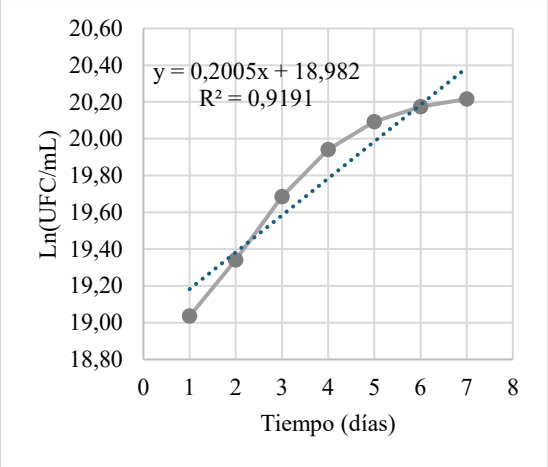


Figura 14. Fase exponencial según Richards.

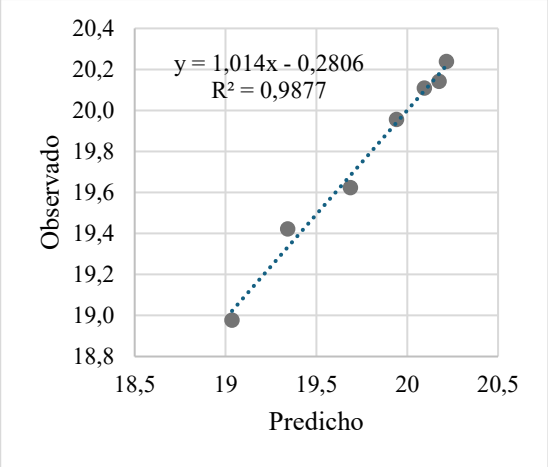


Figura 15. Valores predichos vs observados.

Tabla 7.

Parámetros calculados a partir del ajuste al modelo matemático de Richards.

Parámetros	**Valor**
$\boldsymbol{y_0}$ Valor inicial de la biomasa Ln(UFC/mL).	18,90
$\boldsymbol{y_m}$ Valor máximo de la biomasa alcanzado Ln(UFC/mL).	20,26
$\boldsymbol{\mu_m}$ Tasa de crecimiento máximo específico (días^{-1}).	0,010
λ Duración de la fase de latencia (días).	0,77
v Parámetro de forma propio del modelo de Richards	0,014
R^2 Coeficiente de Determinación.	0,9875
SEE Error Medio Estimado.	0,0478
Porcentaje de Desvío Medio Relativo.	0,210%

Nota: Los parámetros estimados se obtuvieron a través de ajustar los datos al modelo matemático en el software STATISTICA 7.0

El ajuste del crecimiento de *L. lecanii* al modelo de Richards durante su fase exponencial mostró un comportamiento microbiológicamente coherente y estadísticamente robusto. Para obtener un valor apegado a la realidad del parámetro de forma se restringió el rango durante el ajuste no lineal, mediante la definición de límites superiores e inferiores basados en los datos experimentales y el comportamiento biológico esperado del cultivo para evitar valores extremos que distorsionan la curva, tal como se

observa en la Figura 14. Los parámetros estadísticos evaluados para el modelo ajustado confirman una representación precisa y confiable del crecimiento microbiano a lo largo del tiempo, permitiendo tener una mejor interpretación biológica y asegurando la estabilidad matemática del modelo. Aunque el valor de R^2 de la Figura 15 también es elevado (0,9877), se nota una ligera dispersión de los puntos en comparación con los otros modelos. Este comportamiento también se relaciona con la eficiencia del cultivo porque el modelo permite discernir entre las fases tempranas del crecimiento y representar adecuadamente la transición hacia la fase estacionaria, lo cual fue resaltado por **Reyes et al. (2014)**, quienes recomendaron dicho modelo para describir con precisión el proceso de esporulación en *L. lecanii* gracias a su parámetro de forma ajustable.

Los mismos autores, señalaron que los modelos sigmoideos permiten una interpretación adecuada de la cinética del crecimiento fúngico y que el modelo de Richards fue particularmente útil para representar las fases iniciales del crecimiento debido a la influencia positiva que tiene el parámetro de forma que ajusta la curva al comportamiento biológico real. **López et al. (2004),** emplearon varios modelos como, el lineal de tres fases, logístico, Gompertz, Von Bertalanffy, Richards, Morgan, Weibull, France y Baranyi para evaluar el crecimiento de *Yersinia enterocolitica* a través de la medición de la densidad óptica y las unidades formadoras de colonia, concluyeron que el modelo de Richards fue el que mejor se ajustó a los datos de densidad óptica presentando un coeficiente de determinación de 0,995, aunque los demás también presentaron un valor cercano que varía en centecimales. Esto se puede relacionar con los modelos ajustados en el presente estudio, que igualmente presentar una ligera variación casi imperceptible en los valores de los estadísticos evaluados.

En ese trabajo se muestra la correlación existente entre la absorbancia medida a 600 nm y la cantidad de biomasa expresada en UFC/mL, la mayor parte de bibliografías reportadas emplean este método como medida indirecta de la concentración de un microorganismo. Por ejemplo, **Pla et al. (2015)** concluyeron que medir el crecimiento microbiano de cada microorganismo por densidad óptica, los modelos proporcionan una bondad de ajuste bastante alta, con un coeficiente de determinación superior a 0,93 para todas las curvas de crecimiento, además, indicaron que la tasa de crecimiento se mantiene aproximadamente constante para todas las curvas de crecimiento de cada microorganismo ajustadas a un modelo de crecimiento, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio mostrados en las Figuras 10, 12 y 14, que tiene a simple vista, gran similitud en la representación de las curvas ajustadas a los respectivos modelos matemáticos .

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Se logró establecer un cultivo sumergido exitoso de *Lecanicillium lecanii* bajo condiciones referenciales, utilizando melaza como sustrato, un compuesto caracterizado por ser económico y ahora, eficaz para el crecimiento del hongo en estudio. La dinámica del crecimiento evidenció un patrón sigmoideo típico, caracterizado por fases bien definidas de latencia, crecimiento exponencial y estacionaria, lo que demuestra que el medio propuesto proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo fúngico y permite obtener una biomasa significativa en un tiempo relativamente corto.

Tener un control integral de las variables del proceso fermentativo como la biomasa, pH, acidez y consumo de sustrato permitió tener mayor comprensión del comportamiento del hongo durante su crecimiento en las condiciones referenciales empleadas. La disminución progresiva del pH y el aumento de la acidez titulable fueron un indicador de la acumulación de metabolitos ácidos en el medio, lo cual pudo ser confirmado cualitativamente mediante la prueba colorimétrica que indicó la presencia de ácido glicólico. Estos resultados reafirman la efectividad y utilidad de los métodos analíticos empleados porque permiten relacionar los parámetros que intervienen en la cinética microbiana con la producción de metabolitos de interés.

La cinética de crecimiento de *L. lecanii* fue ajustada exitosamente a los modelos sigmoideos referenciales de Gompertz, Logístico y Richards, en todos los casos existe una alta concordancia entre los valores predichos y observados. El modelo de Gompertz presentó un ajuste estadístico sobresaliente por el coeficiente de determinación (R^2) más cercano a 1 y el bajo error medio estimado y desvío relativo que aseguran la precisión del ajuste. El modelo Logístico mostró alta robustez frente a la dinámica del crecimiento en condiciones controladas, a pesar de ser considerado como un modelo simple, pero que sería el ideal en casos de escalamiento industrial debido a que facilita el monitoreo y la eficiencia operativa. Y el modelo de Richards permitió una interpretación biológica más precisa al incorporar el parámetro de forma y adaptarse de mejor manera a la transición de fases de crecimiento de la curva, pero es un modelo complejo para ser empleado en procesos industriales que buscan repetibilidad y facilidad en el control. Esto demuestra que los tres modelos aplicados son herramientas versátiles y muy útiles para describir cuantitativamente el comportamiento del crecimiento microbiano estudiado. Y aunque cada modelo aportó un enfoque complementario, en este estudio se buscó evaluar la bondad de ajuste mediante parámetros estadísticos, y en este sentido, el modelo de Gompertz fue el que mejor

ajuste tuvo al capturar con mayor precisión la fase de latencia, el crecimiento exponencial y la desaceleración hacia la fase estacionaria, características propias del crecimiento microbiano en medios líquidos.

Con la presente investigación se ratifica la necesidad de emplear el modelamiento matemático en la cinética de crecimiento de microorganismos productores de metabolitos de interés industrial como lo es *L. lecanii* en cultivo sumergido, porque permiten sentar las bases para que a futuro se puedan optimizar los procesos biotecnológicos que intervienen, empleando diseños metodológico más accesible y escalables a producciones industriales. Finalmente, se demostró que la combinación de sustratos económicos, métodos analíticos validados y herramientas de modelado matemático proporciona una estrategia clave para futuras investigaciones sobre la búsqueda de procesos industriales centrados en la producción de metabolitos de valor comercial, que sean más económicos y amigables con el ambiente.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar estudios enfocados en la optimización del medio de cultivo, evaluando la concentración de melaza y empleando fuentes complementarias de nitrógeno, así como ajustes de parámetros físicos como pH, aireación y agitación para maximizar la producción de biomasa y del ácido glicólico, reduciendo costos y mejorando la eficiencia del proceso fermentativo para posteriormente escalar el cultivo a condiciones controladas en biorreactores de mayor volumen.

- Se sugiere estudiar el metabolismo secundario de *Lecanicillium lecanii* e implementar métodos más específicos como HPLC o espectroscopía FTIR, para medir con precisión la concentración de ácido glicólico y su correlación con el crecimiento de la biomasa.

MATERIALES DE REFERENCIA

Abdulwahed, M., Mamoly, L., & Bosnali, W. (2020). A simple spectrophotometric method for determination of glyoxylic acid in its synthesis mixture. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020(1), 5417549. https://doi.org/10.1155/2020/5417549

Beck, A., Vogt, F., Hägele, L., Rupp, S., & Zibek, S. (2022). Optimization and kinetic modeling of a fed-batch fermentation for mannosylerythritol lipids (MEL) production with *Moesziomyces aphidis*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*, 913362. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.913362

Bhalla, T. C., Kumar, V., & Bhatia, S. K. (2014). Hydroxy acids: production and applications. *Advances in Industrial Biotechnology. New Delhi: IK internationl publishing house pvt. ltd*, 56-76.

Błaszczyk, L., Waśkiewicz, A., Gromadzka, K., Mikołajczak, K., & Chełkowski, J. (2021). *Sarocladium* and *Lecanicillium* associated with maize seeds and their potential to form selected secondary metabolites. *Biomolecules*, 11(1), 98. https://doi.org/10.3390/biom11010098

Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H., & Marto, J. (2019). A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *Journal of cleaner production*, *225*, 270-290. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.255

Borges, D., Díaz, A. O., San Juan, A. N., & Gómez, E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar*, *44*(3), 49-55.

Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J. C., Gerds, M. L., Hammes, W. P., ... & Hansen, E. B. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International journal of food microbiology*, *154*(3), 87-97. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030

Cannon, P.F. Evans, H.C. (2004). A Preliminary Plant Pathogen Survey of the Galápagos Archipelago *Charles Darwin Foundation and CABI Ref: U8024*

Castro, A. M. D., Teixeira, M. M. P., Carvalho, D. F., Freire, D. M. G., & Castilho, L. D. R. (2011). Multiresponse Optimization of Inoculum Conditions for the Production of Amylases and Proteases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. *Enzyme Research*, 2011(1), 457392. https://doi.org/10.4061/2011/457392

Castro, G., Valbuena, E., Sánchez, E., Briñez, W., Vera, H., & Leal, M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp: *Lactis*. *Revista Científica,* 18(5), 582-588.

Deseure, J., Obeid, J., Willison, J. C., & Magnin, J. P. (2021). Reliable determination of the growth and hydrogen production parameters of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* in fed batch culture using a combination of the Gompertz function and the Luedeking-Piret model. *Heliyon*, *7*(7). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07394

Feng, K. C., Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2000). *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering*, *23*, 25-29. https://doi.org/10.1007/s004499900115

Feng, K. C., Liu, B. L., & Tzeng, Y. M. (2002). Morphological characterization and germination of aerial and submerged spores of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *18*, 217-224. https://doi.org/10.1023/A:1014933229314

Gao, Y. P., Shi, D. X., Li, Y. H., He, X. Z., Wang, X. Y., Lin, K., & Zheng, X. L. (2025). Development of Biphasic Culture System for an Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* PfBb Strain and Its Virulence on a *Defoliating Moth Phauda* flammans (Walker). *Journal of Fungi*, *11*(3), 202. https://doi.org/10.3390/jof11030202

Gharsallah, H., Ksentini, I., Naayma, S., Hadj Taieb, K., Abdelhedi, N., Schuster, C., ... & Leclerque, A. (2020). Identification of fungi in Tunisian olive orchards: characterization and biological control potential. *BMC microbiology*, *20*, 1-13. https://doi.org/10.1186/s12866-020-01997-z

Guillory, J., O'Neil, M., Heckelman, P., Koch, C., Roman. K., & Merck, J. (2007). The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Hoboken, NJ. *Journal of Medicinal Chemistry,* 50(3), 590. https://doi.org/10.1021/jm068049o

Hajji-Hedfi, L., Hlaoua, W., Rhouma, A., Al-Judaibi, A., Arcos, S., Robertson, L., ... & Abdel-Azeem, A. (2023). Biological and proteomic analysis of a new isolate of the nematophagous fungus *Lecanicillium* sp. *BMC microbiology*, *23*(1), 108. https://doi.org/10.1186/s12866-023-02855-4

Hameed, T., Motsi, N., Bignell, E., & Tanaka, R. J. (2024). Inferring fungal growth rates from optical density data. *PLOS Computational Biology*, *20*(5), e1012105. https://doi.org/10.1101/2024.02.27.582053

Hanan, A., Nazir, T., Basit, A., Ahmad, S., & Qiu, D. (2020). Potential of *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) as a microbial control agent for green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulzexxr)(*Hemiptera: Aphididae*). *Pakistan Journal of Zoology*, *52*(1), 131. https://dx.doi.org/10.17582/journal.pjz/2020.52.1.1.131.137

Haynes, W. M. (2013). CRC *Handbook of Chemistry and Physics (94th ed.).* CRC Press. https://doi.org/10.1201/b17118

Huang, J., Qasim, M., Zhou, R., Han, X., Ansari, M. J., Almoallim, H. S., ... & Wang, L. (2024). Role of chitinase expression in the virulence of *Lecanicillium lecanii* against citrus black aphid (*Toxoptera aurantii*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 276, 133970. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133970

Humber, R. A. (2012). Chapter VI - Identification of entomopathogenic fungi. En L. A. Lacey (Ed.), *Manual of techniques in invertebrate pathology* (2nd ed., pp. 151–187). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00006-3

Jaronski, S. T. (2023). Chapter 11-Mass production of entomopathogenic fungi—state of the art** Mention of trade names or commercial products in this chapter is solely for the purpose of providing specific information and does not imply recommendation or endorsement by the author. *Mass Production of Beneficial Organisms (Second Edition). Academic Press, San Diego*, 317-357. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00011-X

Kapur, J. N. (2023). *Mathematical modeling* (1th ed.). Mercury Learning and Information.

Khachatourians, G. G., & Qazi, S. S. (2008). Entomopathogenic fungi: biochemistry and molecular biology. In Human and animal relationships (pp. 33-61). Berlin, Heidelberg: *Springer Berlin Heidelberg*. https://doi.org/10.1007/978-3-540-79307-6

León, B., Arestegui, Y., Tarula, B., Orellana, C., Luis, J., & Flores, P. (2024). Biocontrol de *Penicillium digitatum* con metabolitos secundarios de hongos endófitos en frutos de mandarina. *Agronomía Mesoamericana*, 55682-55682. https://doi.org/10.15517/am.2024.55682

Lima, V. H., Matugawa, A. T., Mascarin, G. M., & Fernandes, É. K. K. (2024). Complex nitrogen sources from agro-industrial byproducts: impact on production, multi-stress tolerance, virulence, and quality of *Beauveria bassiana* blastospores. *Microbiology Spectrum*, *12*(6), e04040-23. https://doi.org/10.1128/spectrum.04040-23

Litwin, A., Bernat, P., Nowak, M., Słaba, M., & Różalska, S. (2021). Lipidomic response of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to pyrethroids. *Scientific Reports*, *11*(1), 21319. https://doi.org/10.1038/s41598-021-00702-y

Liu, B. L., Kao, P. M., & Tzeng, Y. M., & Feng, K. C. (2003). Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, *33*(4), 410-415. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00138-8

Liu, C., Yan, G., Gao, J., Guo, H., & Hou, Q. (2024). Advances in Valorization of Biomass-Derived Glycolic Acid Toward Polyglycolic Acid Production. *Catalysts*, *14*(12), 903. https://doi.org/10.3390/catal14120903

Liu, H., Zhao, X., Guo, M., Liu, H., & Zheng, Z. (2015). Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia. *BMC microbiology*, *15*, 1-12. https://doi.org/10.1186/s12866-015-0592-4

Lo Grasso, A., Fort, A., Mahdizadeh, F. F., Magnani, A., & Mocenni, C. (2023). Generalized logistic model of bacterial growth. *Mathematical and Computer Modelling of Dynamical Systems*, *29*(1), 169-185. https://doi.org/10.1080/13873954.2023.2236681

López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., & France, J. (2004). Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International journal of food microbiology*, *96*(3), 289-300. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.026

Manfrino, R. G., D'alessandro, C. P., Lecuona, R. E., & Lopez, C. C. (2020). Uso de los hongos entomopatógenos para el control microbiano de artrópodos en cultivos hortícolas. ISBN: 978-987-8333-43-4

Marín, P., & Bustillo, A. E. (2002). Pruebas microbiológicas y fisicoquímicas para el control de calidad de los hongos entomopatógenos. Memorias Curso Internacional Teórico-Práctico sobre entomopatógenos, parasitoides y otros enemigos naturales de la broca del café. Cenicafé, Chinchiná, 72-89.

Mascarin, G. M., Kobori, N. N., & Jackson, M. A. (2021). Impact of culture pH on the production of *Beauveria bassiana* metabolites in submerged fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 48(3-4), kuab015. https://doi.org/10.1093/jimb/kuab015

Mauerhofer, L. M., Pappenreiter, P., Paulik, C., Seifert, A. H., Bernacchi, S., & Rittmann, S. K. M. R. (2019). Methods for quantification of growth and productivity in anaerobic microbiology and biotechnology. *Folia microbiologica*, *64*, 321-360. https://doi.org/10.1007/s12223-018-0658-4

Maurino, V. G., & Engqvist, M. K. (2015). 2-Hydroxy acids in plant metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, *13*. https://doi.org/10.1199/tab.0182

Michel, M. R., Aguilar, P., Durán, L. R., & Cantú, M. M. (2022). Validación del funcionamiento de un reactor de biopelícula utilizando hongos entomopatógenos. *TECTZAPIC: Revista Académico-Científica*, *8*(2), 20-27.

Miller, G.C. (1969). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry,* 31(3), 426-428.

Monica, S. S., Rajanikanth, P., Duraimurugan, P., Basha, S. A., & Chary, D. S. (2024). Characterization of Endophytic Entomopathogenic Fungal Isolates: Growth Dynamics, Viability, Density, and Morphological Attributes. *Journal of Scientific Research and Reports*, *30*(7), 74–81. https://doi.org/10.9734/jsrr/2024/v30i72124.

Morales, L., González, I., Abella, J. P., & Ahumada, D. A. (2019). Técnicas de titulación ácido-base: consideraciones metrológicas. *Revista Colombiana de Química,* 48(1), 26-34.

Morata, M., Holgado, F. P., Barbero, I., & Mendez, G. (2015). Análisis factorial confirmatorio: recomendaciones sobre mínimos cuadrados no ponderados en función del error Tipo I de Ji-Cuadrado y RMSEA. *Acción psicológica*, 12(1), 79-90

Muñiz, F., Miranda, F., & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-9. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2

Omkar, B. K. (2016). Chapter 2 - Biocontrol of insect pests. En Omkar (Ed.), *Ecofriendly pest management for food security* (pp. 25–61). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00002-6

Ono, K., & Erhard, A. (2011). Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. En Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH. https://doi.org/10.1002/14356007.o17_o02.

Ortega, E., Loera, O., & Viniegra, G. (2012). The effect of the ratio between substrate concentration and specific area of the support on the biomass yield of fungal surface cultures. *Revista mexicana de ingeniería química*, *11*(3), 485-494.

Osorio, A. C., Calvo, J. G. M., Ordoñez, M. A. Q., Mainicta, F. B. A., Quispe, M. C., Lovaton, R. L., ... & Rojas, M. E. H. (2024). Formulación de medios de cultivo líquidos para la producción de biomasa micelial de hongos entomopatógenos nativos de la Región Cusco, Perú. *Q'EUÑA*, *15*(1), 27-33. https://doi.org/10.51343/rq.v15i1.1441

Pan, J., Le, W., Wang, ZA y Chen, J. (2023). Modelo matemático para predecir el crecimiento fúngico y las tasas de descomposición basado en ecuaciones logísticas mejoradas. *Revista Internacional de Ingeniería Agrícola y Biológica*, 16 (1), 60-65. https://doi.org/10.25165/j.ijabe.20231601.7405

Passão, C., Almeida-Aguiar, C., & Cunha, A. (2023). Modelling the In vitro growth of phytopathogenic filamentous fungi and *Oomycetes*: The gompertz parameters as robust indicators of propolis antifungal action. *Journal of Fungi*, 9 (12), 1161. https://doi.org/10.3390/jof9121161

Perugini, P., Genta, I., Pavanetto, F., Conti, B., Scalia, S., & Baruffini, A. (2000). Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. *International journal of pharmaceutics*, *196*(1), 51-61. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00439-1

Pla, M. L., Oltra, S., Esteban, M. D., Andreu, S., & Palop, A. (2015). Comparison of primary models to predict microbial growth by the plate count and absorbance methods. *BioMed research international*, *2015*(1), 365025.

Ramírez, H. G., Granja, A. Z., Aguila, E. T., & Cantoral, M. T. (2014). *Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos.* Laboratorio de entomopatógenos SCB-SENASA.

Reyes, J. E., Alatorre, R., Shirai, K., Vaquera, H., Virgen, G., Medina, V., & Loera, O. (2014). Components of liquid media on the production of high spore concentrations of *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Gams and Zare. *Journal of Agricultural Science and Technology*, *4*, 767-779. http://doi.org/10.17265/2161-6256/2014.09.008

Rocca, R., Acerbi, F., Fumagalli, L., & Taisch, M. (2022). Sustainability paradigm in the cosmetics industry: State of the art. *Cleaner Waste Systems*, *3*, 100057. https://doi.org/10.1016/j.clwas.2022.100057

Rojas, J., Rocha, Z., Nájera, H., González, H., & Shirai, K. (2020). Novel transglycosylation activity of β-N-acetylglucosaminidase of *Lecanicillium lecanii* produced by submerged culture. *International journal of biological macromolecules*, 145, 759-767. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.237

Salusjärvi, L., Havukainen, S., Koivistoinen, O., & Toivari, M. (2019). Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, *103*, 2525-2535. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09640-2

Santiesteban, E. G., Fontela, R. M. Á., Vidal, R. F., Fernández, I. R., Barrios, J. H., Rodríguez, T. L., & Rodríguez, A. N. S. J. (2004). Metabolitos producidos por el hongo entomopatógeno *Verticillium lecanii*. *Biotecnología Aplicada*, 21(2), 92-95

Santos, B. P., Menezes, M. E. M., dos Santos Andrade, L., & de Oliveira, C. M. S. (2023). Controle de qualidade de séruns que possuem em sua composição ácido glicólico. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação,* 9(9), 2032-2042. https://doi.org/10.51891/rease.v9i9.11281

Santos, T. S., Passos, E. M. D., Seabra, M. G. D. J., Souto, E. B., Severino, P., & Mendonca, M. D. C. (2021). Entomopathogenic fungi biomass production and extracellular biosynthesis of silver nanoparticles for bioinsecticide action. *Applied Sciences*, *11*(6), 2465. https://doi.org/10.3390/app11062465

Shi, Y., Xu, X., & Zhu, Y. (2009). Optimization of *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Applied microbiology and biotechnology*, *82*, 921-927. https://doi.org/10.1007/s00253-009-1874-2

Silva, C. (2022). Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação do ácido glicólico por meio de espectrofotometria (Bachelor's thesis).

Singh, H., Brar, S. K., & Verma, M. (2019). Production of organic acids by *Metarhizium robertsii* and their impact on host-pathogen interactions. *Process Biochemistry*, 85, 43–50. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.016

Slowik, A. R., Hesketh, H., Sait, S. M., & de Fine Licht, H. H. (2023). A rapid method for measuring in vitro growth in entomopathogenic fungi. *Insects*, 14(8), 703. https://doi.org/10.3390/insects14080703

Stelling, J. (2004). Mathematical models in microbial systems biology. *Current opinion in microbiology*, *7*(5), 513-518. https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.08.004

Subramaniam, M. S. R., Babu, A., & Deka, B. (2021). *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Zare & Gams, as an efficient biocontrol agent of tea thrips, *Scirtothrips bispinosus* Bagnall (*Thysanoptera: Thripidae*). *Egyptian journal of biological Pest Control*, *31*, 1-14. https://doi.org/10.1186/s41938-021-00380-y

Takahashi, K. (1972). A colorimetric method for quantitative determination of glycolic acid with 2, 7-dihydroxynaphthalene. *The Journal of Biochemistry*, *71*(3), 563-565.

Tamerler, C., Ullah, M., Adlard, M. W., & Keshavarz, T. (1998). Effect of pH on physiology of *Metarhizium anisopliae* for production of swainsonine. *FEMS microbiology letters*, *168*(1), 17-23. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13249.x

Tamizharasi, V., Srikanth, J., & Santhalakshmi, G. (2005). Molasses-based medium requires no nitrogen supplement for culturing three entomopathogenic fungi. *Journal of Biological Control*. 19. 135-140.

Tjørve, K. M., & Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PloS one*, *12*(6), e0178691. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691

Wachenheim, D. E., Patterson, J. A., & Ladisch, M. R. (2003). Analysis of the logistic function model: derivation and applications specific to batch cultured microorganisms. *Bioresource Technology*, *86*(2), 157-164. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00149-9

Wang, J., & Guo, X. (2024). The Gompertz model and its applications in microbial growth and bioproduction kinetics: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, 108335. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108335

Wang, Y., Piao, M., & Sun, Y. (2008). Genetic algorithm for fermentation kinetics of submerged fermentation by *Morchella*. *Sheng wu Gong Cheng xue bao, Chinese Journal of Biotechnology*, *24*(8), 1454-1457.

Xu, X., Yu, Y., & Shi, Y. (2011). Evaluation of inert and organic carriers for *Verticillium lecanii* spore production in solid-state fermentation. *Biotechnology letters*, *33*, 763-768. https://doi.org/10.1007/s10529-010-0496-1

Zentou, H., Zainal Abidin, Z., Yunus, R., Awang Biak, D. R., Zouanti, M., & Hassani, A. (2019). Modelling of molasses fermentation for bioethanol production: A comparative investigation of Monod and Andrews models accuracy assessment. *Biomolecules*, 9(8), 308. https://doi.org/10.3390/biom9080308

ANEXOS

Anexo 1.

Tabla de absorbancias de la biomasa y sus respectivas concentraciones.

Tiempo (días)	Biomasa Abs 600nm	Desviación estándar	Biomasa UFC/mL
0	0,087	0,0276	1,16E+08
1	0,131	0,0321	1,75E+08
2	0,204	0,0165	2,72E+08
3	0,250	0,0132	3,33E+08
4	0,348	0,0515	4,64E+08
5	0,406	0,0102	5,41E+08
6	0,419	0,0266	5,59E+08
7	0,462	0,0312	6,16E+08
8	0,453	0,0197	6,04E+08
9	0,452	0,0176	6,03E+08
10	0,453	0,0159	6,04E+08
11	0,450	0,0142	6,00E+08
12	0,449	0,0161	5,99E+08
13	0,448	0,0145	5,98E+08
14	0,446	0,0121	5,95E+08

Nota: La absorbancia presentada es el promedio de las mediciones espectrofotométricas realizadas por triplicado en los tres cultivos realizados y para afirmar la confiabilidad se describe la desviación estándar de los mismos. Además, los valores se transformaron a unidades de UFC/mL empleando el factor de conversión C(UFC/mL) = Abs(600nm) * 1,33E+09 el cual se obtuvo a partir de la correlación con el conteo muestral empleando siembra en placa con diluciones seriadas.

Anexo 2.

Tabla de valores de pH obtenidos durante el proceso.

Tiempo (días)	pH	Desviación estándar
0	7,07	0,4785
1	6,57	0,0834
2	6,48	0,0638
3	6,18	0,0544
4	6,15	0,0419
5	6,09	0,0974
6	5,67	0,4271
7	5,63	0,3583
8	5,20	0,2061
9	5,08	0,4367
10	4,98	0,2565
11	4,80	0,2932
12	4,72	0,3141
13	4,65	0,3120
14	4,61	0,0403

Nota: Los valores mostrados corresponden al promedio de las mediciones y se presenta la desviación estándar como una medida de la confiabilidad de los promedios registrados.

Anexo 3.

Tabla de registro de la titulación ácido-base durante el proceso fermentativo.

Días	NaOH 1N (mL)	Desviación estándar	mEq ácido/mL
0	0,50	0,00	5,00
1	0,60	0,17	6,00
2	0,83	0,06	8,33
3	0,93	0,06	9,33
4	1,20	0,10	12,00
5	1,23	0,06	12,33
6	1,13	0,12	11,33
7	1,30	0,10	13,00
8	1,27	0,15	12,67
9	1,60	0,17	16,00
10	1,70	0,26	17,00
11	1,83	0,29	18,33
12	2,27	0,25	22,67
13	2,43	0,40	24,33
14	2,57	0,12	25,67

Nota: Los valores presentados corresponden al promedio de las tres mediciones realizadas en las muestras, se transformó a miliequivalente de ácido/mL mediante la relación estequiométrica del NaOH 1N que tiene 1 mEq y multiplicado por el factor de dilución de la muestra (1:10).

Anexo 4.

Tabla de evaluación del consumo de azúcares reductores durante el proceso fermentativo.

Tiempo (h)	Absobancia 540	Desviación estándar	Glucosa mg/mL	Biomasa UFC/mL
0	0,632	0,0358	2,29830225	1,16E+08
1	0,627	0,0330	2,28275945	1,75E+08
2	0,620	0,0367	2,25526064	2,72E+08
3	0,603	0,0384	2,19428503	3,33E+08
4	0,579	0,0363	2,11059302	4,64E+08
5	0,530	0,0705	1,93280727	5,41E+08
6	0,493	0,0552	1,79973697	5,59E+08
7	0,436	0,0225	1,59768054	6,16E+08
8	0,415	0,0261	1,52116212	6,04E+08
9	0,419	0,0555	1,53431373	6,03E+08
10	0,388	0,0437	1,42444604	6,04E+08
11	0,363	0,0477	1,33392316	6,00E+08
12	0,329	0,0629	1,211264	5,99E+08
13	0,301	0,0700	1,11190372	5,98E+08
14	0,290	0,0647	1,07210606	5,95E+08

Nota: Los datos corresponden al promedio de las Absorbancias de las tres muestras y se presenta la desviación estándar. Los valores se convirtieron a unidades de mg de sustrato/mL a través de ecuación obtenida en la curva estándar de glucosa descrita en la metodología.