

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR MEDIO DE FERMENTACIÓN
SUMERGIDA A PARTIR DE *Aspergillus niger* ATCC 16404 UTILIZANDO
SUERO DE LECHE COMO MEDIO DE CULTIVO DE FERMENTACIÓN

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR

BERTA EUNICE LORENA ELIZONDO GÓMEZ
ROBERTO SALVADOR MANZANARES ESTRADA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

DICIEMBRE DE 2009

SAN SALVADOR, EL SALVADOR CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ

SECRETARIO GENERAL

LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

SECRETARIA

MSc. MORENA LIZETTE MARTÍNEZ DE DÍAZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE ÁREA DE APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES

MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez

ASESORA DE ÁREA DE MICROBIOLOGÍA

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

DOCENTES DIRECTORAS

MSc. María del Carmen Guillén de Medrano

Licda. María Elsa Romero de Zelaya

AGRADECIMIENTOS

A NUESTRAS DOCENTES DIRECTORAS:

MSc. María del Carmen Guillen de Medrano y Licda. María Elsa Romero de Zelaya. Por su asesoría, tiempo, motivación, paciencia, y dedicación para poder realizar este trabajo de graduación.

A LA COORDINADORA GENERAL Y ASESORES DE AREAS:

Licda. María Odette Rauda, MSc Sonia Maricela Lemus, MSc Coralia de los Ángeles González de Díaz. Por sus observaciones y recomendaciones que fueron de una ayuda indispensable en esta investigación, ya que fueron un aporte importante en la realización de este trabajo de investigación.

A todas las personas, amigos y familiares que de una u otra forma colaboraron en la investigación de este trabajo nuestros más sinceros agradecimientos.

Eunice y Salvador

DEDICATORIA

- **A DIOS PADRE TODOPODEROSO:**

Por su protección y múltiples bendiciones recibidas, por darme la fortaleza necesaria para no dejarme vencer frente a las adversidades.

- **A MIS PADRES:**

Guillermo Antonio Elizondo y Elsa Mirela Gómez de Elizondo por amarme y por guiarme por el buen camino para lograr este triunfo.

- **A MI HERMANO:**

Guillermo Danilo Elizondo Gómez, por ser un hermano maravilloso y ser importante en mi vida, aparte de estar a mi lado en todo momento.

- **A MI SEGUNDA MADRE:**

Nilda Lorena Gómez de Galdámez, por quererme como a una hija y por sus oraciones y apoyo recibido.

- **A MIS ABUELOS:**

Ricardo Gómez y Bertha H. de Gómez (Q.D.D.G) a quienes quiero mucho y agradezco sus valiosos y sabios consejos para seguir adelante.

- **A MIS TIAS:**

Gloria América, Ana Evelia, Karen Osmara, Ana Armida por su apoyo y por las palabras de aliento para cumplir mi meta.

- **A MIS PRIMAS Y PRIMOS:**

Sandra Roxana, Lorena Abigail, Jaime Ernesto, Carlos Fernando y Eduardo Antonio (Q.D.D.G) por su cariño y apoyo recibido.

- **A MI NOVIO:**

Y futuro esposo, Nilson Alberto Bernal Rajo, por su amor, respeto y confianza, además de ser una persona tan especial en mi vida y compartir el mismo triunfo.

“Dando gracias siempre por todo a nuestro Dios en el nombre de nuestro Señor Jesucristo” Efesios 5:20

Eunice Lorena

DEDICATORIA

- **A DIOS PADRE, DIOS HIJO Y DIOS ESPIRITU SANTO,**

Por el don de la vida cada día, por regalarme fortaleza y entendimiento en gratitud por su magnánimo e infinito amor. Por iluminar la vereda que tengo que seguir y llenarla de bendiciones

- **A MARIA SANTISIMA MADRE DE DIOS Y MADRE NUESTRA,**

Por su intercesión amorosa, por la protección de su manto, y el comfortable arrullo de sus brazos.

- **A MI QUERIDA MADRE,**

Teresa de Jesús por el infinito amor que me ha regalado toda mi vida, su confianza incondicional, su consejo e instrucción; sus oraciones y el invaluable apoyo que me ha brindado hasta el culmen de mi carrera universitaria.

- **A MIS ABUELITAS,**

Andrea Avelar de Estrada e Inés Manzanares Mayen de grata recordación por su amor y su ejemplo de vida.

- **A MIS HERMANOS,**

Silvia Jannette, Jaime Roberto y Roxana Evelin por cada momento compartido durante toda mi vida, por sus cuidados, paciencia y apoyo que me han brindado..

- **A TODOS MIS FAMILIARES Y HERMANOS ESPIRITUALES,**

Que en una o en otra forma me han brindado su apoyo y me han acompañado con sus oraciones.

- **A MIS AMIGAS Y AMIGOS,**

Claudia Raquel, Gladis Elizabeth, Roberto Escamilla, Carlos Guerrero por su amistad de casi una vida; Karina H, Marisol Dali, Eloísa Mary, Carol Margarita, Ariana, Brenda, Raquel, Veralinda, Willber, Christian, Mauricio F. por compartir el mismo objetivo y sus inherentes preocupaciones, amargas alegrías y éxitos.

“Aunque se consuma mi cuerpo y mi mente tu eres mi roca mi refugio, Dios por siempre”

Salmo 73, 26

Salvador M. Estrada.

INDICE

	Páginas
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxiv
Capítulo II	
2.0 Objetivo	27
2.1 Objetivo General	27
2.2 Objetivo Específico	27
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	29
3.1 Biotecnología Microbiana	29
3.1.1 Microorganismos Industriales	31
3.1.2 Requisitos de un Microorganismo Industrial	34
3.1.3 Productos Microbianos de Interés Industrial	35
3.1.4 Clasificación de Productos según su Uso	35
3.2 Género <i>Aspergillus</i>	36
3.2.1 <i>Aspergillus niger</i>	37
3.3 El Suero de Leche	40
3.3.1 Origen y Definición del Suero Lácteo	40
3.3.2 Composición del Suero Lácteo	40
3.3.3 Tipos de Suero Lácteo	42
3.3.3.1 Lactosuero Dulce	43
3.3.3.2 Lactosuero Acido	44
3.3.4 Aprovechamiento del Suero Lácteo	44

3.3.5 Contaminación producida por el Suero Lácteo	46
3.4 Aditivos Alimentarios Industriales	48
3.4.1 Clasificación según su Actividad Especifica	49
3.4.2 Principales Funciones de los Aditivos Alimentarios	50
3.5 Acido Cítrico	50
3.5.1 Producción Biotecnológica	52
3.5.1.1 Proceso de Fermentación Superficial	53
3.5.1.2 Proceso de Fermentación Sumergida	54
3.5.2 Existencia y Significado Económico	55
3.6 Crecimiento Microbiano	59
3.6.1 Medición del Crecimiento Microbiano	59
3.6.1.1 Peso Seco Celular	60
3.6.1.2 Absorción	62
3.6.1.3 Peso Húmedo	62
3.6.1.4 Volumen de Células Empacadas	63
3.6.1.5 Número de Células	63
3.1.6 6 Masa de un Componente Celular	63
3.1.6.7 Mediciones Físicas	64
3.6.2 Crecimiento en Cultivo Intermitente	64
3.6.3 Factores que Afectan la Rapidez de Crecimiento	67
3.6.4 Evaluación de la Cinética de Crecimiento Microbiano	67
Capítulo IV	
4.0 Diseño Metodológico	69
4.1 Tipo de Estudio	69
4.2 Investigación Bibliográfica	69

4.3 Investigación de Campo	70
4.3.1 Universo	70
4.3.2 Muestra	70
4.3.3 Microorganismo	70
4.4 Método Experimental	70
4.4.1 Preparación del Inóculo	71
4.4.2 Preparación del Biorreactor	72
4.4.3 Preparación de la Fuente de Oxígeno	72
4.4.4 Pretratamiento del Suero Lácteo	73
4.4.5 Preparación del Medio de Fermentación	74
4.4.6 Preparación de los Matraces	75
4.4.7 Tratamiento de las Muestras	75
4.5 Determinaciones Analíticas	78
4.5.1 Determinación de Biomasa por el Método de Peso Seco	78
4.5.2 Determinación de pH	79
4.5.3 Determinación de Grados Brix	80
4.5.4 Elaboración de Curva Estándar de Glucosa	81
4.5.5 Determinación de Azúcares Totales a las Muestras por el Método de Fenol – Sulfúrico	83
4.5.6 Cuantificación de Acido Cítrico por el Método de Saffran – Densted.	84
4.5.7 Fórmulas utilizadas para la Cinética de Crecimiento de Microorganismos.	86
4.5.7.1 Velocidad Volumétrica de Generación de Células Microbianas por Peso Seco	86

4.5.7.2 Velocidad Específica de Generación de Células Microbianas por Peso Seco	86
4.5.7.3 Consumo de Nutrientes	87
4.5.7.3.1 Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato.	87
4.5.7.3.2 Velocidad Específica de Consumo de Sustrato	88
4.5.7.4 Formación de Producto	88
4.5.7.4.1 Velocidad Volumétrica de Formación de Producto	88
4.5.7.4.2 Velocidad Específica de Formación de Producto	89
4.5.7.5 Rendimiento en el Cultivo	90
Capítulo V	
5.0 Resultados y Análisis de Resultados	92
5.1 Resultados de Procesos Experimentales Ensayos E1, E2, E3 y ER3	92
5.2 Análisis de Procesos Fermentativos E1, E2, E3 y ER3	108
5.3 Determinación de Biomasa por Peso Seco	109
5.3.1 Velocidad Volumétrica de Biomasa por Peso Seco	110
5.3.2 Velocidad Específica de Biomasa por Peso Seco	113
5.4 Consumo de Sustrato	115
5.4.1 Curva Estándar de Glucosa	115
5.4.2 Cálculo de la Concentración de Azúcares por el Método Espectrofotométrico	118
5.4.3 Velocidad volumétrica de consumo de Sustrato	119

5.4.4 Velocidad específica de consumo de Sustrato	122
5.5 Determinación de Rendimiento de Acido Cítrico	125
5.5.1 Curva Estándar de Acido Cítrico	125
5.5.2 Cálculo de la Concentración de Acido Cítrico por el Método Espectrofotométrico	128
5.5.3 Velocidad Volumétrica de Formación de Producto	129
5.5.4 Velocidad Específica de Formación de Producto	132
5.6 Rendimiento en el Cultivo	134
5.7 Determinación de pH	137
5.8 Determinación de Grados Brix	139
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	142
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	146
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Página
1. Composición Mineral del Lactosuero	41
2. Composición Media de Lactosuero en Extracto Seco	43
3. Valores Medios de DBO para la Leche y de algunos Sub- productos Lácteos	48
4. Crecimiento de Producción de Acido Cítrico a Razón Porcentual Anual por Sector	57
5. Determinación de Azucares Totales por el Método de Fenol – Sulfúrico	82
6. Resultados de pH en Ensayos E1, E2, E3 y ER3	93
7. Resultados de Grados Brix en Ensayos E1, E2, E3 y ER3	94
8. Resultados de Biomasa en Ensayos E1, E2, E3 y ER3	96
9. Resultados de Logaritmo Natural de Biomasa en Ensayos E1, E2, E3 y ER3	97
10. Resultados de Absorbancias en Muestras para Determinación de Azucares por Fenol – Sulfúrico	99
11. Resultados de Concentración de Azucares en Ensayos E1, E2, E3 y ER3	100
12. Resultado de Absorbancias de Acido Cítrico en Ensayos E1, E2, E3 y ER3	102

13. Resultados de Concentración de Acido Cítrico en Ensayos E1, E2, E3 y ER3	104
14. Resultados del Análisis de Muestras por Peso Seco durante el proceso de Producción de Acido Cítrico	109
15. Resultados de Velocidad Volumétrica de Biomasa por Peso Seco durante el Proceso de Producción de Ácido Cítrico	111
16. Resultados de Velocidad Específica de Biomasa por Peso Seco Para el Proceso de Producción de Acido Cítrico	114
17. Resultado de Curva Estándar de Glucosa mediante la Aplicación del Método Fenol- Sulfúrico para la Cuantificación de Azucares Totales	115
18. Resultado de la Aplicación de la Regresión Lineal al Análisis de Muestra por el Método de Fenol – Sulfúrico para la Cuantificación de Azucares Totales	117
19. Resultados de Concentración de Azucares Totales Durante el Proceso de Producción de Acido Cítrico	119
20. Resultados de Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato Durante el Proceso de Producción de Acido Cítrico	120
21. Resultado de Velocidad Específica de Consumo de Sustrato Durante el Proceso de Producción de Acido Cítrico	123
22. Resultado de curva Estándar de Acido Cítrico Mediante el Método de Saffran – Densted para Cuantificación de de Acido Cítrico	125

23. Resultado de la Aplicación de la Regresión Lineal al Análisis de Muestra por el Método de Saffran- Densted para la Cuantificación de Acido Cítrico	127
24. Resultado de Concentración de Acido durante el Proceso de Fermentación ER3 para Producción de Acido Cítrico	129
25. Resultado de Velocidad Volumétrica del Proceso Fermentativo ER3 para Producción de Acido Cítrico	130
26. Resultado de Velocidad Específica del Proceso Fermentativo ER3 para Producción de Acido Cítrico	133
27. Resultado de Rendimiento de Acido Cítrico en el Medio de Fermentación	135
28. Resultado de pH Durante el Proceso de Producción de Acido Cítrico	137
29. Resultado de Grados Brix Durante el Proceso de Producción de Acido Cítrico	139
30. Resultado de Proceso Fermentativo E1	191
31. Resultado de Proceso Fermentativo E2	191
32. Resultado de Proceso Fermentativo E3	192
33. Resultado de Proceso Fermentativo ER3	192

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Página
1. Hifas de <i>Aspergillus</i>	37
2. <i>Aspergillus niger</i>	38
3. Estructura Microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	38
4. Aprovechamiento del Suero de Queso	45
5. Ciclo de Crecimiento Intermitente	65
6. Cepa de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404 en Agar PDA	71
7. Preparación del Inoculo	72
8. Preparación de la Fuente de Oxígeno Adaptada al Biorreactor	73
9. Preparación del medio de Fermentación	75
10. Tratamiento de las Muestras	76
11. Determinación de Biomasa por Método de Peso Seco	78
12. Determinación de pH	79
13. Determinación de Grados Brix, Refractómetro Modelo ATAGO	80
14. Elaboración de Curva Estándar de Glucosa	81
15. Azucares Totales Método Fenol – Sulfúrico	83
16. Curva de Resultados de pH Vrs. Tiempo para Ensayos de Producción de Acido Cítrico	93
17. Curva de Resultados de Grados Brix Vrs. Tiempo para Ensayos de Producción de Acido Cítrico	95

18. Curva de Resultados de Biomasa Vrs. Tiempo para Ensayos de Producción de Acido Cítrico	97
19. Curva de Resultados de Concentración de Azucres Vrs. Tiempo para Ensayos de Producción de Acido Cítrico	101
20. Curva de Resultados de Absorbancias de Acido Cítrico Vrs. Tiempo para Ensayos de Producción E2, E3 y ER3	103
21. Curva de Resultados de Concentración de Acido Cítrico Vrs. Tiempo para Ensayos de Producción de E2, E3 y ER3	105
22. Curva de Resultados de Concentración de Acido Cítrico Vrs. Tiempo para Ensayos de Producción E1, E2, E3 y ER3	106
23. Curva de Peso Seco Ln (x) Vrs. Tiempo para la Producción de Acido Cítrico	109
24. Curva de Velocidad Volumétrica de Biomasa Vrs. Tiempo para la Producción de Acido Cítrico	112
25. Curva de Velocidad Específica de Biomasa Vrs. Tiempo para Producción de Acido Cítrico	114
26. Curva Estándar de Glucosa	116
27. Curva de Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato Vrs. Tiempo para la Producción de Acido Cítrico	121
28. Curva de Velocidad Específica de Consumo de Sustrato Vrs. Tiempo para la Producción de Acido Cítrico	124
29. Curva Estándar de Acido Cítrico	126
30. Curva de Velocidad Volumétrica de Producción de Acido Cítrico Vrs. Tiempo (g/ L. h)	131

31. Curva de Velocidad Específica de Producción de Acido Cítrico Vrs. Tiempo (g/L. h)	133
32. Curva de rendimiento de producción de Acido Cítrico en el cultivo Vrs Tiempo (horas)	136
33. Curva de pH Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Acido Cítrico	138
34. Curva de Grados Brix Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Acido Cítrico	139
35. Frotis de Cepa de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	162
36. Principio de Método de Saffran – Densted	177
37. Factor de Dilución para Proceso Fermentativo ER3	179
38. Toma de Muestra para Filtración	181
39. Proceso de Obtención de Biomasa (filtración al vacío)	181
40. Toma de Mx de Filtrado para determinación de azucares totales	183
41. Adición de ZnSO ₄ y NaOH 0.5 M	183
42. Adición de Fenol 80 % y H ₂ SO ₄ en Baño de Hielo	184
43. Muestras Tratadas y Lecturas de Absorbancias en Espectrómetro Visible, Spectronic 20	184
44. Toma de Mx de Filtrado para cuantificación de ácido cítrico	186
45. Adición de Piridina y Anhídrido Acético en Cámara de Extracción	186
46. Muestras Tratadas en Reposo	188
47. Lecturas de Absorbancias en Espectrómetro Visible, Spectronic 20	188

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Página
1. Productos de origen biotecnológico en diferentes áreas	31
2. Acido Cítrico Anhidro USP XXVIII (United States Pharmacopeia)	51
3. Mayores Firmas Productoras de Acido Cítrico	56
4. Usos del Acido Cítrico por Sector Industrial	58
5. Métodos para la Cuantificación de Crecimiento de Poblaciones Microbianas	60
6. Producción de Acido Cítrico a partir de Suero de Leche por Diferentes autores	158
7. Producción de Acido Cítrico a partir de sustancias Tradicionales y Diferentes Cepas de <i>Aspergillus niger</i>	158
8. Empresas Lácteas en El Salvador con Capacidad Económica de Innovar Productos y Desarrollar Tecnologías	160
9. Rangos de Volúmenes de Producción de Queso de las Empresas Entrevistadas (balance mensual)	160
10. Volumen de Suero Lácteo (balance mensual)	160
11. Disposición Final del Suero Lácteo	160

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Cepas Estudiadas en la Producción de Acido Cítrico
2. Industrias Lácteas de El Salvador, Balance de volúmenes de Producción y descarga de suero Lácteo
3. Frotis de cepa *Aspergillus niger* ATCC 16404
4. *Aspergillus niger* ATCC 16404, ficha técnica comercial
5. Preparación del Inóculo
6. Agar Glucosa 4% según Sabouraud
7. Calibración de pH □ metro
8. Principio del Método de Saffran – Densted para la Cuantificación de Acido Cítrico
9. Especificaciones para las Determinaciones Analíticas
10. Proceso de Obtención de Biomasa
11. Determinación de azucares Totales (fenol-sulfúrico)
12. Cuantificación de Acido Cítrico por el Método de Saffran – Densted.
13. Resultados Generales de Muestras para Procesos Fermentativos.

ABREVIATURAS

ATCC: Colección Tipo de Cultivos Americanos

°C: Grados Centígrados

Lb: Libras

Nº: Número

FD: Factor de Dilución

Ln: Logaritmo Natural

Vrs: Versus

mL: Mililitros

PDA: Papa Dextrosa Agar

t : Tiempo

g: Gramos

L: Litros

h: horas

DBO: Demanda Bioquímica de oxígeno

nm: Nanómetros

µg: Microgramos

mg: .Miligramos

M_x: Muestra

S_t: Estándar

C: Concentración

A: Absorbancia

RESUMEN

En la presente investigación se evaluó el proceso de fermentación por el método sumergido, para la obtención de ácido cítrico usando como microorganismo la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16404 y como medio fermentativo suero de leche, que es una fuente de carbono de bajo costo.

Se realizaron tres procesos de fermentación E1, E2 y E3 cada uno con diferente valor de pH en el rango de 3 a 4, bajo las mismas condiciones de agitación y suministro de oxígeno. Con el fin de poder determinar las condiciones de fermentación más adecuadas para la producción de ácido cítrico.

A cada una de las muestras se les determinó pH, grados brix, biomasa (peso seco), azúcares totales (fenol – sulfúrico) y producción de ácido cítrico (Saffran - Densted).

El proceso fermentativo E3 presentó una mejor cinética microbiana obteniéndose un rendimiento máximo de 0.38 mg/ml a las 144 horas de iniciado el proceso de fermentación, por lo que se reprodujo nuevamente como proceso fermentativo ER3 obteniéndose entonces un rendimiento máximo de 0.37 mg/ml igualmente a las 144 horas del proceso de fermentación.

No obstante la producción de ácido cítrico obtenida en esta investigación, en el proceso de fermentación sumergido al utilizar la cepa *Aspergillus niger* ATCC 16404 no es la adecuada, siendo esta muy baja en comparación a la reportada

en otras investigaciones. La cepa catalogada como ***Aspergillus niger*** ATCC 16404 no es buena productora de ácido cítrico.

El ácido cítrico es una materia prima importante en la industria farmacéutica y alimenticia, por lo cual se propone que se realicen otros estudios sobre esta investigación a fin de mejorar su obtención y a la vez disminuir el daño ambiental que el suero de leche produce como desecho agroindustrial.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN:

La biotecnología es la disciplina que se refiere al uso de los organismos vivos o de sus productos en procesos industriales a gran escala. Esta tecnología ha permitido desarrollar procesos microbianos para la producción de numerosos metabolitos o productos farmacéuticos, así mismo, ofrece una excelente alternativa en la biodegradación de desechos industriales y residuos contaminantes, como lo es el suero de leche, convirtiéndolos a la vez en materias primas para la obtención de importantes productos de consumo.

En esta investigación se estudió y se presento el comportamiento cinético de fermentación por método sumergido, para producción de ácido cítrico usando como fuente de carbono el suero de leche el cual es un medio complejo, nutritivo y de bajo costo; que actualmente no recibe el uso apropiado en el país y su mal descarte genera un grave daño al medio ambiente.

Previamente se realizaron ensayos correspondientes al pH del medio, aireación, agitación y nutrimento, para determinar las condiciones de crecimiento mas adecuadas para el proceso. Tomando como base, datos bibliográficos reportados en estudios anteriores.

El microorganismo utilizado en el estudio cinético de producción de ácido cítrico es el *Aspergillus niger* ATCC 16404 y el medio de propagación de la cepa es agar Sabouraud. Una vez que se obtuvo el crecimiento favorable de la cepa se procedió a inocularlo en el medio de fermentación es decir en el suero de leche.

Durante el proceso de fermentación sumergida, se tomo una muestra por día, durante siete días y se le realizaran los análisis correspondientes a la cinética de crecimiento y cuantificación de ácido cítrico en el caldo de fermentación.

Con los resultados experimentales obtenidos se analizó el comportamiento cinético mostrado por el microorganismo en el suero lácteo y también el tiempo óptimo de producción del metabolito; a la vez que se comparo con datos reportados en estudios anteriores (2) y (5).

De esta manera se logro concluir en que medida la cepa de ***Aspergillus niger*** ATCC 16404 es productora de ácido cítrico y si las condiciones de crecimiento reportadas en la bibliografía son las adecuadas.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Obtener ácido cítrico por medio de fermentación sumergida con *Aspergillus niger* ATCC 16404 utilizando suero de leche como medio de cultivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Producir ácido cítrico con la cepa *Aspergillus niger* ATCC 16404, aprovechando el suero de leche como medio de fermentación.
- 2.2.2 Evaluar la cinética de crecimiento microbiano controlando el pH, azúcares totales, biomasa, grados brix y cuantificar el ácido cítrico obtenido en el caldo durante el proceso de fermentación en intervalos de 24 horas. durante 7 días.
- 2.2.3 Determinar el tiempo en el cual se alcanza la mayor producción de ácido cítrico en relación a la cinética de fermentación del microorganismo.
- 2.2.4 Cuantificar el ácido cítrico obtenido en el caldo de cultivo por medio del método de SAFFRAN - DENSTED.

CAPITULO III

MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA ⁽¹⁸⁾

“La ciencia de los métodos que permite la obtención de productos a partir de materia prima, mediante la intervención de microorganismos vivos”

La biotecnología es la disciplina que se refiere al uso de los organismos vivos o de sus productos en procesos industriales a gran escala. En ese aspecto se refiere a los procesos en los que intervienen microorganismos. La biotecnología microbiana, a veces llamada microbiología industrial ha sido innovada en años recientes debido a la adición de técnicas de ingeniería genética que ha permitido desarrollar procesos microbianos para la producción de numerosos metabolito o productos farmacéuticos como enzimas, antibióticos, vitaminas, y otros.

Esta tecnología ha sido utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia. Procesos tales como la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos implican el uso de bacterias o levaduras con el fin de convertir un producto natural como leche o jugo de uvas, en un producto de fermentación más apetecible como el yogurt o el vino.

Otras aplicaciones incluyen la producción y uso de agentes farmacéuticos (antibióticos y vacunas) para prevenir enfermedades humanas y animales,

aditivos alimentarios (aminoácidos), enzimas y sustancias químicas industriales (butanol y ácido cítrico).

La Biotecnología Microbiana se puede dividir en dos fases:

- Tecnología microbiana tradicional: la cual parte con los primeros desarrollos tecnológicos como la destilación alcohólica, la preparación y conservación de alimentos y bebidas por fermentación (pan, queso, cerveza, vino, y vinagre) hasta la obtención biotecnológica de antibióticos y metabolitos. Implica la fabricación a gran escala de productos que los microorganismos son capaces de producir, para la cual se modifica el organismo o proceso para obtener el rendimiento más alto del producto.

- Tecnología microbiana con organismos alterados por ingeniería: Esta innovada tecnología trabaja en estrecha asociación con la ingeniería genética modificando microorganismos en los que son insertados genes extraños. Para desarrollar un organismo adecuado para producir un producto nuevo o una sustancia que normalmente no genera y que puede ser cultivado a gran escala, necesaria para su explotación comercial.

Esta tecnología permite la transformación, perfeccionamiento y diversificación de muchas industrias basadas en el carbono, como fuente de energía, productos químicos y farmacéuticos además del manejo de residuos o desechos. Tiene un enorme impacto potencial, porque la investigación en ciencias biológicas está efectuando avances vertiginosos y los resultados no

solamente afectan una amplitud de sectores sino que también facilitan enlace entre ellos. Por ejemplo, resultados exitosos en fermentaciones de desechos agrícolas, podrían afectar tanto la economía del sector energético como la de agroindustria y adicionalmente ejercer un efecto ambiental favorable.

Cuadro N°1. Productos de origen biotecnológico en diferentes áreas.

Industria	Ácidos, vitaminas, enzimas, glicerol, etc.
Medio ambiente	Recuperación de petróleo, biorremediación (tratamiento de aguas residuales y de basura), eliminación de contaminantes
Alimentación	Panificación, lácteos (quesos, yogurt, bebidas lácteas), bebidas (cerveza, vino, licores), y aditivos diversos (antioxidantes, glutamato de sodio, edulcorantes, etc.), proteínas (PUC) para reacciones, alimentos de origen transgénico.
Salud	Antibióticos, hormonas, vacunas, medicamentos, reactivos y pruebas de diagnóstico.

3.1.1 MICROORGANISMOS INDUSTRIALES ⁽²⁰⁾

Existen una serie de características que comparten todos los microorganismos y que suponen ciertas ventajas para su uso en la industria. La más fundamental de ellas es el pequeño tamaño de sus células y su correspondiente alta relación de superficie a volumen. Esto facilita la rápida absorción de nutrientes al interior de la célula y una elevada tasa metabólica, por lo que permite que algunos microorganismos se reproduzcan en períodos mínimos de tiempo. En general los microorganismos se hallan capacitados para acometer una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse así a muchas fuentes de

nutrición y en variadas condiciones de crecimiento. Versatilidad que hace posible el que las fermentaciones industriales se basen en nutrientes baratos. Los microorganismos que sintetizan productos útiles para el hombre representan solo unos pocos centenares de las muchas especies registradas en la naturaleza y son apreciados por elaborar sustancias que no pueden obtenerse de manera fácil o rentable por otros métodos.

- Levaduras

Las levaduras se vienen utilizando desde hace miles de años para la fabricación de pan y bebidas alcohólicas. La levadura que sin duda fue la primera y aún hoy en día sigue siendo la más utilizada por el hombre es ***Saccharomyces cerevisiae*** de la que se emplean diferentes cepas para la fabricación de cerveza, vino, sake, pan y alcoholes industriales. ***Kluyveromyces fragilis*** fermenta la lactosa para la producción de alcohol a partir del suero de la leche. ***Trichosporum cutaneum*** desempeña un importante papel en los sistemas de digestión aeróbica de aguas residuales debido a su enorme capacidad de oxidación de compuestos orgánicos.

- Hongos filamentosos

Los hongos tienen una gran importancia económica, no tan sólo por su utilidad, sino también por el daño que pueden causar. Los hongos son responsables de la degradación de gran parte de la materia orgánica de la Tierra, una actividad enormemente beneficiosa ya que permite el reciclaje de la materia viva.

Los hongos son la base de muchas fermentaciones a nivel industrial son también la fuente de muchos enzimas comerciales (amilasas, proteasas, pectinasas), ácidos orgánicos (cítrico, láctico), antibióticos (penicilina), quesos especiales (Camembert, Roquefort) y, evidentemente, de las setas.

- Bacterias

Entre las especies bacterianas de interés industrial están las bacterias del ácido acético, ***Gluconobacter*** y ***Acetobacter*** que pueden convertir el etanol en ácido acético. El género ***Bacillus*** es productor de antibióticos proteasas e insecticidas. Del género ***Clostridium*** destaca el ***Clostridium acetobutylicum*** que puede fermentar los azúcares originando acetona y butanol. Las bacterias del ácido láctico incluyen, entre otras, las especies de los géneros ***Streptococcus*** y ***Lactobacillus*** que producen yogur. El olor característico a tierra mojada se debe a compuestos volátiles (geosmina) producidos por ***Streptomyces*** aunque su principal importancia radica en la producción de antibióticos como anfotericina B, neomicina, estreptomina, tetraciclina, etc

Los microorganismos industriales gozan de la peculiaridad de ser especialistas metabólicos, capaces de producir metabolitos específicos y con alto rendimiento. Son aislados directamente del ambiente y modificados in-vitro por cambios en el medio y por condiciones de crecimiento, mutaciones y selección, para obtener un mejoramiento progresivo en la generación del producto.

3.1.2 REQUISITOS DE UN MICROORGANISMO INDUSTRIAL ⁽³⁾

- El microorganismo se debe obtener de un cultivo puro, ser estable genéticamente y desarrollarse en cultivos a gran escala.
- El microorganismo debe crecer en un medio de cultivo relativamente barato, disponible en grandes cantidades y su cultivo debe ser fácilmente sostenible por largos periodos en el laboratorio y en la planta industrial.
- El microorganismo debe crecer rápidamente y fabricar el producto deseado en un período corto, para que:
 - a) En un equipo de gran escala, costoso, no permanezca mucho tiempo ocupado, ya que el producto se forma rápidamente.
 - b) Si el microorganismo crece rápido hay menos probabilidad de contaminación en el fermentador y es más fácil controlar los factores ambientales en este.
- No debe ser patógeno para el hombre ni para los animales o plantas.
- Debe estar libre de toxinas o deben poder ser inactivadas con facilidad.
- Debe poder retirarse del medio de cultivo con facilidad a gran escala. Los más favorables son aquellos de mayor tamaño celular (hongos, levaduras y bacterias filamentosas) ya que estas células sedimentan más fácilmente
- Que las bacterias unicelulares son más fácil de separar por filtración.
- Debe ser susceptible de manipulación (por mutación y selección) y precombinación genética, que permite la incorporación de un genoma único de rasgos genéticos de más de un microorganismo.

3.1.3 PRODUCTOS MICROBIANOS DE INTERÉS INDUSTRIAL ⁽²⁰⁾

- Células microbianas.

Suelen denominarse proteínas unicelulares, por el alto contenido proteínico de los microbios, pueden utilizarse como alimentos o como productos para la inoculación, donde las células microbianas en si, son de interés, en semillas o plantas y para fermentación.

- Enzimas.

Se producen a gran escala por procesos microbianos. Incluyen enzimas digestoras de almidón (amilasas), de proteínas (proteasa, renina) y de grasa (lipasas).

- Metabólitos microbianos.

Pueden ser:

- Productos de fermentación
- Factores de crecimiento (aminoácidos, vitaminas)
- Agentes activos farmacológicamente.

3.1.4 CLASIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS SEGÚN SU USO ⁽²⁰⁾

- Productos químicos - farmacéuticos y aditivos alimentarios:

La industria química y farmacéutica utiliza los metabólitos microbianos y tecnología genética para producir: esteroides, agentes antivirales, antibióticos, hormonas, aminoácidos, vacunas, antioxidantes, vitaminas, etc.

- Uso en agricultura:

Los productos de uso farmacéuticos se pueden aplicar a la medicina veterinaria.

En la agricultura vegetal, la biotecnología se utiliza para alterar por ingeniería genética la misma planta. Utilizando micro-organismos como portadores genéticos para transferir genes de una planta a otra no relacionada.

- Productos químicos comerciales y producción de energía:

Los productos químicos son fabricados microbiológicamente y se utilizan como materia prima para la síntesis de moléculas más complejas, o como combustible para motores por ejemplo: etanol, ácido acético, ácido láctico y glicerol.

- Aplicaciones ambientales:

Utilizando los microorganismos como agentes para la degradación de sustancias de desecho tóxicas o indeseables.

3.2 GENERO ASPERGILLUS. ⁽¹⁷⁾

En 1729 el ***Aspergillus*** fue catalogado por primera vez en 1729 por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli. El cual lo bautizó con el nombre de "***Aspergillus***" por parecerse al instrumento usado para dispersar agua bendita. La descripción hecha por Micheli de este género de hongo en su obra "***Nova Plantarum Genera***" tiene importancia histórica, al ser reconocido como el punto inicial de la ciencia de la micología.

El ***Aspergillus*** es un género de alrededor de 200 hongos (mohos), y es ubicuo. Los hongos se pueden clasificar en dos formas morfológicas básicas: las levaduras y las hifas.

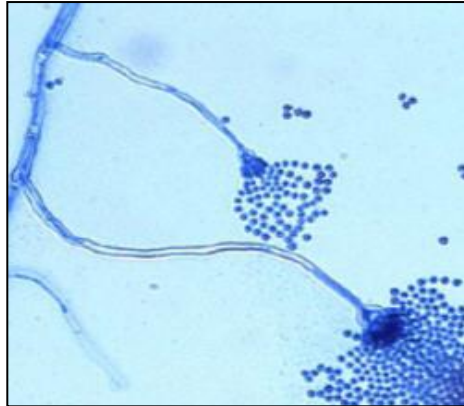


Fig.Nº 1. Hifas de
Aspergillus

El ***Aspergillus*** es un hongo filamentoso compuesto de cadenas de celulares, llamadas hifas, a diferencia de las levaduras que están compuestas de una sola célula redondeada. Generalmente el hábitat natural del ***Aspergillus*** son el heno y el compostaje.

3.2.1 ***Aspergillus niger***.

Es un hongo filamentoso, su nombre ***Aspergillus niger*** hace referencia al color negro de sus esporas. Se clasifica dentro de la familia Trichocomaceae, orden Eurotiales, clase Eurotiomycetes, filum Ascomycota

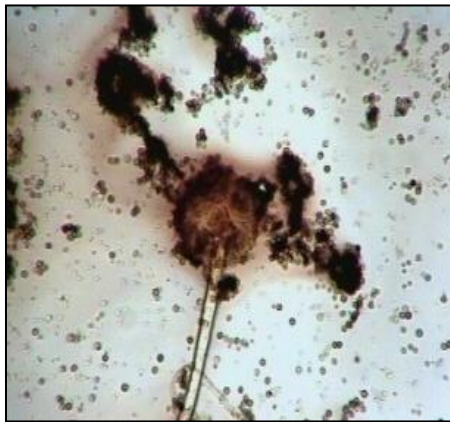


Fig. N° 2. *Aspergillus niger*.

La estructura microscópica del *Aspergillus niger* es única. Tiene hifas tabiculares y conidioforas cuya cabeza está localizada en el extremo de una hifa, compuesta por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella directamente insertadas sobre la vesícula. De las fiálides se desprenden las esporas (conidios).

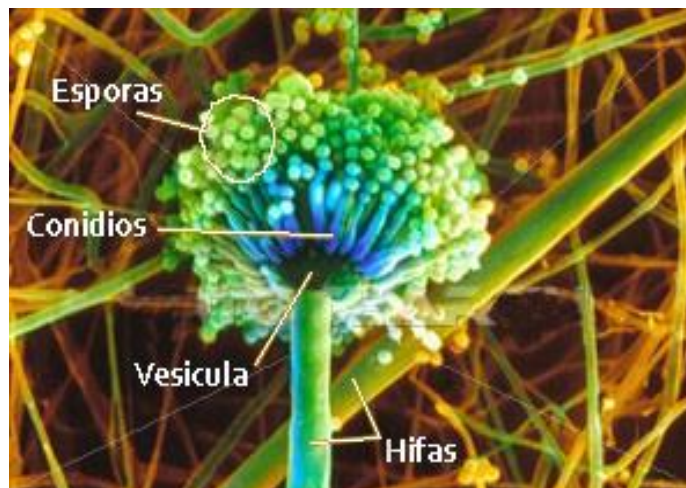


Fig.N° 3. Estructura microscópica de *Aspergillus niger*.

Geográficamente tiene una amplia distribución mundial, su ocurrencia ha sido documentada desde la región ártica hasta el trópico. Se encuentra distribuido en suelos con pH entre 4 a 8 y su abundancia relativa aumenta luego de las actividades de labranza y fertilización del suelo, tolera altas concentraciones de herbicidas (35 mg/g de Dalapon). Habita en una variedad de sustratos incluyendo: granos, forraje, frutos, vegetales, semillas y en la rizósfera de una gran variedad de plantas como banano, trigo, arroz, algodón, café, papa, caña de azúcar, cebada, avena, maíz y guisantes entre otros.

Este hongo es empleado en varios procesos industriales, por la variedad de enzimas que produce y por que no necesita medios exigentes ni condiciones estrictas para su crecimiento.

Los ácidos cítrico y glucónico son obtenidos comercialmente por el uso de este microorganismo. Así mismo se producen preparaciones enzimáticas y algunos antibióticos. (Ver anexo N° 1)

- La cepa de referencia ATCC® 12845™ produce ácido cítrico y degrada melazas
- La cepa de referencia ATCC® 11414™ produce ácido cítrico, 6 fosfofructo -2-kinasa, ATP citrato liasa, carnitina acetiltransferasa y poligalacturonasa.
- La cepa de referencia ATCC® 10864™ produce grandes cantidades de maltasa y pequeñas cantidades de alfa-amilasa. También produce etanol a

partir de almidón de papa cuando se cocultiva con ***Saccharomyces cerevisiae*** ATCC 26603 y degrada almidón de papa.

- Las cepas de referencia ATCC® 13496™ y 13497™ producen glucoamilasa.

3.3 SUERO DE LECHE

3.3.1 ORIGEN Y DEFINICIÓN DEL SUERO LÁCTEO ⁽¹⁰⁾

El láctosuero, suero lácteo o suero de queso es el líquido que se separa de la leche cuando ésta se coagula para la obtención del queso, son todos los componentes de la leche que no se integran en la coagulación de la caseína. Se estima que a partir de 10 litros de leche de vaca se puede producir de 1 a 2 Kg de queso y un promedio de 8 a 9 Kg de suero.

3.3.2 COMPOSICIÓN DEL SUERO LÁCTEO.⁽²¹⁾

Al representar cerca del 90% del volumen de la leche, contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta, el 95% de lactosa (azúcar de la leche), el 25% de las proteínas y el 8% de la materia grasa de la leche. Su composición varía dependiendo del origen de la leche y el tipo de queso elaborado, pero en general el contenido aproximado es de 93.1% de agua, 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas (minerales), 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles. Cerca del 70% de la proteína cruda que se encuentra en el suero corresponde a proteínas con un

valor nutritivo superior al de la caseína, como son β -lactoglobulina, α -láctoglobulina, inmunoglobulinas, proteosapeptonas y enzimas nativas. (21)

Tiene un perfil de minerales en el que se destaca sobretodo la presencia de potasio y sodio que favorece la eliminación de líquidos y toxinas. Cuenta con una cantidad relevante de otros minerales como calcio (50% más que el contenido en la leche), fósforo, magnesio y oligoelementos como zinc, hierro, cobre, formando todos ellos sales de gran biodisponibilidad para nuestro organismo.

Tabla N° 1. Composición mineral del láctosuero (6)

Elemento	Concentración
Azufre (%)	0.230
Cobre (ppm)	0.010
Fósforo (ppm)	71.000
Hierro (ppm)	1.000
Magnésio (ppm)	97.000
Manganeso (ppm)	0.001
Nitrógeno (%)	0.123
Potasio (%)	0.170
Zinc (ppm)	0.200

Para la fermentación cítrica utilizando *Aspergillus niger* es de gran importancia el control de los metales; los cationes divalentes deben estar en concentraciones muy bajas, sin llegar al punto de su ausencia.

El ***Aspergillus niger*** consume el ácido cítrico en medios con presencia del ión Mn^{+2} ($5 \times 10^{-5} \mu$), mientras que en medios con ausencia de éste la secreción aumenta significativamente. Se ha reportado que niveles de 1ppm de Mn^{+2} reduce el rendimiento del ácido cítrico en un 10 %. Además, el Mn^{+2} tiene efectos sobre la morfología del microorganismo favoreciendo la formación de pequeños pellets esponjosos y redondeados, que son los deseados para una máxima productividad de ácido cítrico. Altos niveles de zinc en cultivos de hongos mantienen el microorganismo en fase de crecimiento y el ácido cítrico no se acumula; se citan como valores óptimos 0,3 ppm de Zn^{+2} y 1,3 ppm de Fe^{+2} . También se ha reportado que la adición de Mg^{+2} y Cu^{+2} , en pequeñas cantidades, aumenta significativamente la producción de ácido cítrico. (6) y (2)

Para el caso del suero de leche como medio de crecimiento, la remoción de metales divalentes no es necesaria ya que los elementos de mayor influencia como el manganeso, el zinc y el hierro que se encuentran en concentraciones de 0,001, 0,2 y 1 ppm, respectivamente, están dentro de los intervalos recomendados para la producción de ácido cítrico con ***Aspergillus niger***. (6) y (2)

3.3.3 TIPOS DE SUERO LÁCTEO (4)

El suero se clasifica generalmente en dos grupos de acuerdo a su acidez, el suero se divide en dulce (pH mayor de 5.8 – 6.6) y ácido (pH menor a 4.5 – 5.0) Como se menciono anteriormente el suero de leche contiene la mitad de los

nutrientes de la leche original y representar cerca del 90% del volumen de la leche.

El 54% de los nutrientes de la leche se encuentran en el suero líquido dulce (pH 5.8 - 6.6) y el 73% de los nutrientes de la leche descremada aparecen en el suero líquido ácido (pH 4.5 – 5.0). El suero ácido contiene más calcio y fosfato que el suero dulce; debido a la acción disolvente del ácido que se utilizó para precipitar la caseína.

Tabla N° 2. Composición media de láctosuero en extracto seco ⁽¹⁰⁾

Propiedad	Lactosuero dulce	Lactosuero ácido
pH	5.8 - 6,6	4,5 - 5,0
% de Agua	93 – 94	94 – 95
% Lactosa	4.5 - 5.0	3.8 - 4.4
% Proteínas	0.9	0.9
% Materia grasa	0,8	0.0
% Materias minerales	0.5 – 0.7	0.7 – 0.8
% Calcio	0,45	1,05
% Ácido láctico	0.0	0.8

3.3.3.1 LACTOSUERO DULCE ⁽²²⁾

Procedente de fabricaciones de coagulación enzimática por uso de enzima coagulante. La precipitación de las proteínas se produce por hidrólisis específica de la caseína. Por lo tanto el pH es próximo al de la leche inicial y no

hay variación de la composición mineral. El suero dulce es el más empleado por la industria y tiene una composición química más estable, lo que permite estimar los valores medios de composición.

3.3.3.2 LACTOSUERO ÁCIDO ⁽²²⁾

Obtenido de una coagulación ácida o láctica de la caseína, presentando un pH próximo a 4,5. Se produce al alcanzar el punto isoeléctrico de la caseína con anulación de las cargas eléctricas que las mantienen separadas por las fuerzas de repulsión que generan, impidiendo la floculación. Conlleva una total desmineralización de la micela y la destrucción de la estructura micelar (gel muy frágil). Es un suero muy mineralizado pues contiene más del 80% de los minerales de la leche de partida. En éste, el ácido láctico secuestra el calcio del complejo de paracaseinato cálcico, produciendo lactato cálcico.

3.3.4 APROVECHAMIENTO DEL SUERO LACTEO ⁽⁷⁾

El suero lácteo es considerado, en general, como un subproducto molesto de difícil aprovechamiento. La fig. N° 4. Nos muestra algunos de sus posibles aprovechamientos. En primer lugar, es práctica común separar la grasa y los finos de caseína que aún pueda contener.

Los productos que tradicionalmente se han obtenido a partir de suero han sido:

- Suero en polvo, a base de condensar los sólidos por evaporación y secado.
- Suero en polvo desmineralizado, donde se eliminan previamente las sales

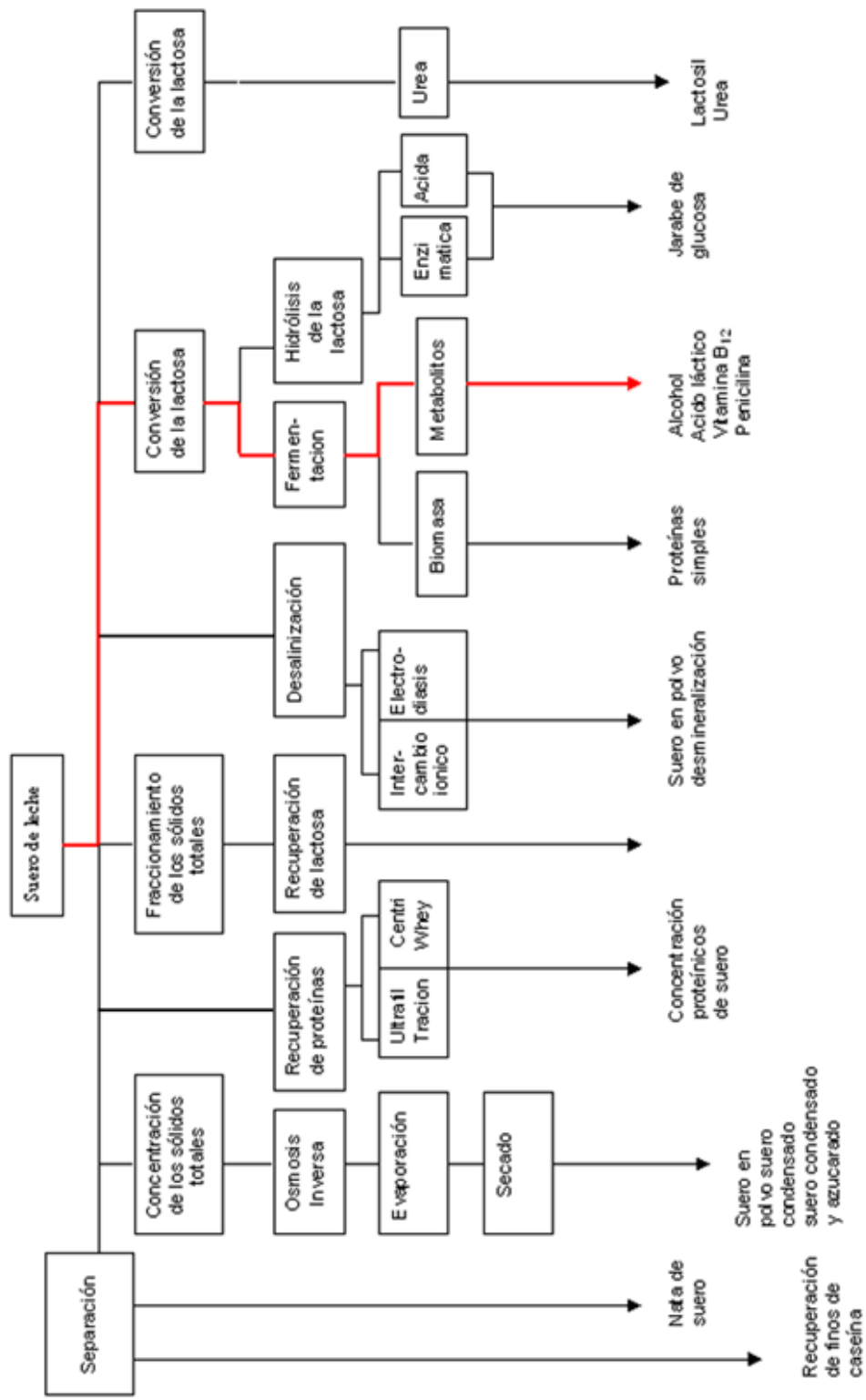


Fig. N° 4: Aprovechamiento del suero de leche.

minerales por intercambio iónico o por electrodiálisis.

- Lactosa, obtenida por concentración, cristalización y separación.
- Concentrados proteínicos, obtenidos por ultrafiltración y enriquecimiento.

En la actualidad se ha experimentado con nuevos aprovechamientos, tales como la producción de alcohol, vitaminas, ingredientes para la preparación de helados, también como componente de enriquecimiento de medios de cultivo para la extracción de penicilina y otros antibióticos. Se utiliza el suero lácteo en combinación con la producción de metano a partir de excreto animal para el uso como combustible, para la industria quesera se convierte en un sistema industrial verdaderamente ecológico. El suero se puede también utilizar como alimento para los animales agrícolas especialmente el ganado porcino. Se han desarrollado métodos para utilizar el suero lácteo como un fertilizante potencial para el suelo, rociándolo sobre los campos, que podría ser también solución para problemas de la salinidad o de la acidez de los suelos agrícolas.

3.3.5 CONTAMINACIÓN PRODUCIDA POR EL SUERO LÁCTEO

En general se puede decir que todos los productos y sub-productos lácteos poseen una elevada carga de contaminación, y para ver el grado de contaminación que genera no se toma en cuenta su composición química, si no que el verdadero valor significativo es la D.B.O., es decir “demanda biológica de oxígeno”, que se expresa en miligramos de oxígeno exigidos para la

destrucción, por oxidación microbiana, de las materia orgánicas contenidas en un litro de líquido. (7)

El láctosuero o suero lácteo representa el 22.9% de las aguas residuales generada por las empresas lácteas. El suero lácteo dulce produce una Demanda Química de Oxígeno (DQO) de aproximadamente 55,200 mg/L.

Se ha reportado que la producción anual estimada de productos de quesería es de 21,424,000 Kg. por lo que a nivel nacional el volumen promedio de descarga de suero lácteo generado es de 128,544m³ (128,544,000 Litros). El cual, el 47% de láctosuero es descargado directamente a un cuerpo receptor (río, suelo, quebrada, drenaje, entre otros) sin un previo tratamiento, causando un problema serio de contaminación (ver anexo N° 2). La descarga continua de suero en estos ecosistemas altera sus propiedades fisicoquímicas. En el caso de los suelos, disminuye el rendimiento de las cosechas, pero además se observa el fenómeno de lixiviación. Este fenómeno se presenta porque el láctosuero contiene nitrógeno soluble en agua, el cual es arrastrado a través de diversas capas llegando hasta los mantos freáticos y convirtiéndose en un peligro para la salud de los animales y humanos.

Una industria quesera media que produzca diariamente 4,000 litros de suero sin depurar genera una contaminación diaria similar a una población de 125,000 habitantes. Por ello es importante buscar nuevas alternativas enfocadas a la

utilización de este sub-producto lácteo que sean provechosas y a la vez amigables con el medio ambiente.

La alta capacidad contaminante del suero de leche, con una DBO que varía entre 30,000 a 50,000mg/L, sumada a la cantidad de ácido láctico presente en él y la cantidad de suero que se va agregando, alteran significativamente los procesos biológicos que se llevan a cabo en las plantas de tratamiento abriendo la posibilidad de que sea más caro tratar de eliminarlo que operar su eficiente industrialización. (10)

Tabla N° 3. Valores medios de DBO para la leche y de algunos sub-productos lácteos (7)

PRODUCTO	D.B.O
Leche completa	100,000 mg de oxígeno
Lactosuero	40,000 mg de oxígeno
Aguas residuales	2,817.600 mg de oxígeno
Leche de consumo	1,000 mg de oxígeno
Mantequería	2,500 mg de oxígeno
Quesería	6,000 mg de oxígeno

3.4 ADITIVOS ALIMENTARIOS INDUSTRIALES (16)

Los aditivos alimentarios son sustancias que se añaden a los alimentos intencionadamente durante el procesado o envasado, con el fin de modificar sus características físicas, químicas, biológicas o sensoriales, aumentar el tiempo de su conservación o mejorar su adaptación al uso a que estén destinados, así como su técnica de elaboración. No se incluyen las sustancias

nutritivas que se emplean para mantener o mejorar las propiedades nutricionales ni, por supuesto, los contaminantes. En ningún caso tienen un papel enriquecedor del alimento, ni tampoco les infiere una mayor calidad con respecto a los alimentos que no los llevan.

Los aditivos alimentarios que más se utilizan son la sal (cloruro sódico), los mono y diglicéridos (emulsionantes), el caramelo (colorante), el ácido cítrico (secuestrante y acidificante), el ácido acético (acidificante y conservante), el bicarbonato sódico (para las levaduras químicas), el ácido fosfórico y el glutamato sódico (potenciador del sabor).

3.4.1 CLASIFICACIÓN SEGUN SU ACTIVIDAD ESPECÍFICA:

- Sustancias que impiden las alteraciones químicas o biológicas (antioxidantes, sinérgicos de antioxidantes y conservantes)
- Sustancias correctoras de las cualidades plásticas (mejoradores de la panificación, correctores de la vinificación, reguladores de la maduración)
- Sustancias estabilizadoras de las características físicas (emulgentes, espesantes, gelificante, antiespumantes, antipelmazantes, antiaglutinantes, humectantes, reguladores de pH)
- Sustancias modificadoras de los caracteres organolépticos (colorantes, potenciadores del sabor, edulcolorantes artificiales, aromas).

3.4.2 PRINCIPALES FUNCIONES DE LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS

- Asegurar la seguridad y la salubridad
- Contribuir a la conservación
- Hacer posible la disponibilidad de alimentos fuera de temporada
- Aumentar o mantener el valor nutritivo
- Potenciar la aceptación del consumidor
- Facilitar la preparación del alimento.

3.5 ACIDO CÍTRICO ⁽¹⁶⁾

El ácido cítrico es uno de los aditivos más utilizados y apreciados por la industria alimentaria como conservante y antioxidante natural de muchos alimentos preparados y enlatados.

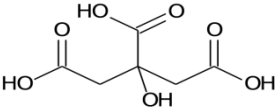
El ácido cítrico (nombre IUPAC del ácido cítrico es ácido 3-hidroxi-1,3,5-pentanotricarboxílico.), o su forma ionizada, el citrato, es un ácido orgánico tricarboxílico sintetizado y oxidado en procesos metabólicos normales del organismo animal, el suero sanguíneo contiene 25 mg/Lt de ácido cítrico. Está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. Su fórmula química es $C_6H_8O_7$.

Es un sólido translucido o blanco, de forma granular; es inodoro, de sabor ácido no desagradable; cristaliza en soluciones acuosas concentradas calientes en forma de grandes prismas rómbicos, con una molécula de agua, la cual pierde

cuando se calienta a 100°C, fundiéndose al mismo tiempo.

La acidez del ácido cítrico es debida a los tres grupos carboxilos -COOH que pueden perder un protón en las soluciones. Si sucede esto, se produce un ión citrato. Los citratos son unos buenos controladores del pH de soluciones ácidas. Los iones citrato forman sales llamadas citratos con muchos iones metálicos. El ácido cítrico puede existir en una forma anhidra (sin agua), o como monohidrato que contenga una molécula de agua por cada molécula de ácido cítrico. La forma anhidra se cristaliza en el agua caliente, mientras que la forma monohidrato cuando el ácido cítrico se cristaliza en agua fría. El monohidrato se puede convertir a la forma anhidra calentándolo sobre 74 °C. Químicamente, el ácido cítrico comparte las características similares de otros ácidos carboxílicos. se Descompone a 175°C, produciendo dióxido de carbono y agua

Cuadro N° 2. Ácido cítrico anhidro USP XXVIII (United States Pharmacopeia)

Formula $C_6H_8O_7$	
Peso molecular: 92.13 g/mol	Ceniza Menos de 0.05%
Ensayo de pureza 99.5% mínimo	Constante de Ionización 8.2×10^{-4}
Humedad 0.5 % máximo	Punto de ebullición 153 °C
Metales pesados Menos de 10 ppm	Calor de disolución 6,4 cal
Arsénico Menos de 3 ppm	Calor de combustión 474,6 cal

3.5.1 PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA ⁽¹⁶⁾

El ácido cítrico se reconoce también como una sustancia orgánica producto del metabolismo de la mayoría de los seres vivos. Industrialmente se obtiene por fermentación de distintas materia primas, especialmente la melaza de caña.

En 1860 comenzó a obtenerse el ácido cítrico de las frutas mediante el uso de sales de calcio. Este proceso tenía un rendimiento muy bajo. Eran necesarias de 30 a 40 toneladas de limones para obtener una tonelada de ácido cítrico. Tres décadas después, en 1893, C. Wehmer descubrió que cultivos de ***Penicillium*** podían producir ácido cítrico a partir de la sacarosa molecular. Esto resultó de fundamental importancia para la actual industria del ácido cítrico. En 1917, el químico americano James Currie descubrió que ciertos cultivos de ***Aspergillus niger*** podían ser productores más eficientes de ácido cítrico. Dos años después, en 1919, comenzó a utilizarse el método de fermentación superficial, por medio del hongo ***Aspergillus niger***, que representó un enorme salto en la productividad. En la década de 1950, comenzó a utilizarse la fermentación sumergida con el mismo microorganismo, lográndose un incremento aún mayor de los rendimientos.

Desde 1920 en adelante fueron desarrollados con éxito procesos de fermentación, en donde se utiliza generalmente cepas del hongo ***Aspergillus niger***. Como sustrato de fermentación la materia prima más conveniente es la melaza de caña, dado que por su composición permite un perfecto desarrollo de

los microorganismos, aunque también se ha utilizado azúcar, hidrolizado de almidón, melaza de remolacha y caldo de caña. En los últimos años se a experimentado con otros medios de fermentación como desechos de piña, glucosa, fructuosa, desechos de cervecería y suero de leche.

3.5.1.1 PROCESO DE FERMENTACION SUPERFICIAL ⁽¹⁾

El proceso fermentativo, consta de varias fases: primeramente la solución nutritiva (medio de crecimiento) es esterilizada y llevada a un pH de 5. Con esta solución se cargan las bandejas de aluminio contenidas en la cámara de fermentación, previamente desinfectada; por la cual se hace circular aire filtrado y enfriado a unos 25°C, en caso de que la temperatura ambiente es mayor.

Sobre la superficie de cada bandeja se pulveriza la suspensión de esporas de mohos, manteniéndose la temperatura a 30-32°C se consigue así la germinación del micelio necesitándose para ello de 3 a 5 días. Después de este período se inicia la fermentación elevándose la temperatura hasta 35°C, desprendiéndose CO₂. Después de 12 a 13 días se obtiene un líquido que contiene de 8 a 12% de ácido cítrico. El micelio se lava, originando una solución con 2.5 a 3.5% de ácido cítrico que junto con el licor directo de las bandejas, pasa a la planta de purificación y cristalización.

3.5.1.2 PROCESO DE FERMENTACION SUMERGIDA ⁽¹⁾

El proceso de fermentación sumergida consta de tres etapas:

Etapa 1: Comprende la preparación del inóculo mediante la germinación de esporas del *Aspergillus niger*, la producción y acumulación de estos en la masa de semillamiento.

Etapa 2: Consta de la transferencia de parte del inóculo a la masa principal de fermentación con el fin de que los microorganismos alcancen los requisitos de crecimientos.

Etapa 3: Retraso en el crecimiento del microorganismo, con el fin de promover la fermentación y la producción de ácido cítrico, esto se logra limitando la concentración de uno de los elementos de nutrición tales como: fósforos, magnesio, hierro o zinc.

Con respecto a la preparación del inóculo, este se prepara utilizando esporas de *Aspergillus niger* inyectadas en el sustrato de crecimiento en condiciones estériles, al cual se le han agregado los nutrientes de enriquecimiento y se le ha regulado las condiciones de pH. Una vez sembradas las esporas, la mezcla requiere suficiente aireación y agitación las cuales se logran burbujeando aire en la mezcla del inóculo.

El período de duración de la incubación es de 18 a 30 horas y una temperatura de entre 20 y 35° C. El inóculo puede ser en forma de esporas o en forma de pequeños gránulos de micelio.

El sustrato de crecimiento, debe de ajustarse a un pH entre 4.0 y 2.8 para que las esporas alcancen un crecimiento y concentración adecuada, siendo esto necesario para obtener buenos resultados en la producción del ácido cítrico. El inóculo debe ser el 10% de la masa principal

Si la temperatura en el fermentador no se mantiene entre el rango de 28-30° C la producción de ácido cítrico disminuye y la acumulación de ácido oxálico aumenta. Si la agitación en el fermentador no es la adecuada, se produce una estratificación del micelio dentro del fermentador; esto ocurre en el período en el cual el crecimiento del hongo se inhibe y la producción del ácido cítrico se incrementa. La formación de esta estratificación produce que la velocidad de formación del ácido cítrico decrezca, en cambio con suficiente agitación se previene este comportamiento obteniendo buena eficiencia.

3.5.2 EXISTENCIA Y SIGNIFICADO ECONOMICO ⁽¹⁶⁾

La producción de ácido cítrico a incrementado notablemente en las últimas décadas. En 1950, alcanzaba las 50.000 toneladas/año. Posteriormente, se registró una importante expansión debido al desarrollo del proceso de

fermentación sumergida, mucho más económico. Actualmente, la producción mundial es de 750.000 tn/año, con una producción real de 550.000 tn/año.

El ácido cítrico se fabrica en más de 20 países en el mundo. La Unión Europea, Estados Unidos y China reúnen el 88% del total de producción mundial. Las primeras firmas productoras a nivel mundial son Bayer y ADM, cada una con el 17% del mercado, aproximadamente. Seguidas por Jungunzlauter, Cargill y Citrique Belge.

Cuadro N° 3. Mayores firmas productoras de ácido cítrico. ⁽¹⁶⁾

Compañía	Localización	Capacidad total (tn/año)
Miles Inc.	EEUU, Brasil, México, Colombia	120,000
Chas Pfizer	EEUU, Irlanda	115,000
A.G. Junbunzlauer	Austria, Alemania, Francia, Indonesia	100,000
Citrique Belge	Bélgica	60,000
Biacor	Italia	28,000
John Sturge	Reino unido	25,000
Cargill	EEUU	25,000

El aumento y expansión de la demanda mundial de ácido cítrico se debe, fundamentalmente, a su utilización como aditivo en la industria de alimentos y bebidas. Por ejemplo, en Estados Unidos este sector demanda el 72% del total global, con una tasa de crecimiento del 7% anual. El consumo de ácido cítrico en el mundo crece a razón de 5-8% anual y la tendencia parece mantenerse estable.

Tabla N° 4. Crecimiento de producción de ácido cítrico a razón porcentual anual, por sector. ⁽¹⁶⁾

Sector consumidor	Rendimiento anual porcentual
Alimentos y bebidas	5-8
Fármacos	2-3
Detergentes	6-7
Cosméticos	2-3
Otros	9-10

El Salvador actualmente importa el 100% de ácido cítrico y sus derivados de países como Estados Unidos, Alemania, Francia, China, Colombia, y México representando una inversión importante en exportación con valores anuales de millones de dólares. ⁽¹⁶⁾

Cuadro N° 4. Usos del ácido cítrico por sector industrial. (16)

Sector	Uso
Bebidas	Saborizante y regulador de pH; incrementa la efectividad de los conservantes microbianos.
Dulces, conservas y caramelos	Acidulante y regulador de pH para lograr óptima gelificación.
Lácteos	Estabilizante en cremas batidas
Verduras procesadas	En combinación con ácido ascórbico, previene la oxidación
Alimentos congelados	Antioxidantes e inhibe el deterioro del sabor y el color.
Frutas y hortalizas enlatadas	Disminuye el pH, al actuar como quelante; previene la oxidación enzimática y la degradación del color, resalta el sabor.
Aceites y grasas	Previene la oxidación.
Carnes	Auxiliar del procesado y modificador de textura
Bebidas	Saborizante y regulador de pH; incrementa la efectividad de los conservantes microbianos.
Quesos pasteurizados y procesados	Se adiciona en forma de sal, como emulsificante y texturizante
Pescado y productos del mar	Regulador de pH en presencia de otros conservantes o antioxidantes

3.6 CRECIMIENTO MICROBIANO ⁽¹³⁾

La microbiología comprende el estudio de una amplia variedad de sistemas vivientes “inferiores” que incluyen virus, bacterias, algas, hongos simples como las levaduras y los mohos así como los hongos superiores altamente diferenciados más grandes como las “setas”.

En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado, los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y por último se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación. De hecho, una célula microbiana no viable se define como aquella que, incubada en medio de apoyo para el crecimiento por un período suficientemente largo, es incapaz de aumentar su tamaño o de multiplicarse. Es importante entender que una célula que aparentemente no crece, aun puede ser viable, pero el medio es incapaz de apoyar el crecimiento debido a la disminución de un nutriente esencial, la presencia o producción de materiales tóxicos o un cambio en el medio físico, como la disminución de oxígeno, pH o temperatura. A menudo, las células pueden vivir en este estado sin crecimiento particularmente como esporas o quistes, por períodos largos.

3.6.1 MEDICION DEL CRECIMIENTO MICROBIANO ⁽¹³⁾

Existen muchos métodos para la determinación del crecimiento de células microbianas entre los cuales podemos mencionar: peso seco, absorción, peso

húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de componente celular, mediciones físicas.

Cuadro N^o 5. Métodos para la cuantificación de crecimiento de poblaciones microbianas

Métodos	Fundamento	Observaciones
Recuento de celda	Conteo directo del numero de células	Requiere células individuales y medio limpio
Recuento de placa	Conteo del numero de colonias	Requiere células individuales, incidencia de las condiciones de incubación
N.M.P	Estadístico	Requiere células individuales y medio limpio
Peso seco	Medición directa	No admite sólidos en el medio
Turbidimetría	Transmisión de la luz	Requiere células individuales y medios limpios.
Volumen empacado	Centrifugación	Poco preciso

3.6.1.1 PESO SECO CELULAR ⁽¹³⁾

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se tratan de células que sedimentan rápidamente como levaduras, esto usualmente implica centrifugación ($4-6 \times 10^3$ rpm). Luego, las células

concentradas se colocan en un horno a 90⁰C durante unas 20 horas o a 105 ⁰C durante 6 a 10 horas, hasta que hayan alcanzado un peso constante.

Para células bacterianas difíciles de concentrar por centrifugación, la muestra de cultivo se filtra a través de membranas hidrofílicas con un tamaño de poro de 0.2µm.

Las células, retenidas en el filtro, se lavan con solución salina isotónica y los filtros se colocan en un horno a 90 ⁰C o a 150⁰C hasta obtener un peso constante. El peso de las células secas usualmente se expresa en términos de $g \times 1^{-1}$.

En determinaciones de peso seco celular existen fuentes de errores importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrífuga o las membranas durante el enfriamiento. Esto se puede evitar al enfriar en un desecador o mediante la determinación de la cantidad de agua absorbida por las membranas o tubos y con la corrección adecuada del peso seco medido. La presencia de sólidos en el medio, los cuales se encuentran frecuentemente en muchos medios industriales importantes, requiere que el peso seco medido sea corregido con respecto al peso de los sólidos.

La desventaja principal de estos métodos es que son lentos y requieren de muestras relativamente grandes del cultivo.

3.6.1.2 ABSORCION ⁽¹³⁾

A menudo se obtiene ventaja del hecho de que en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro, está relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo con la ley de Beer. Por lo general se emplean longitudes de onda alrededor de 600nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre las absorbancia y el número de células cambia si el tamaño y la forma de estas cambian durante el crecimiento del cultivo.

Es común que la absorción de la luz por una suspensión de células se relacione con el peso seco celular. Esto se lleva a cabo al medir tanto la absorbancia como el peso seco de muestras de cultivo y graficar uno contra el otro. La pendiente de esta grafica producirá un coeficiente que relacione la absorbancia con el peso seco celular que puede usarse para experimentos posteriores con el mismo organismo criado en condiciones similares.

3.6.1.3 PESO HUMEDO ⁽¹³⁾

Este quiere decir simplemente la centrifugación o filtración de muestras del cultivo seguida por el pesado directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar correctamente el procedimiento ya que se mide el agua tanto intracelular como extracelular, lo cual puede ocasionar errores considerables.

3.6.1.4 VOLUMEN DE CÉLULAS EMPACADAS ⁽¹³⁾

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrífuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas (VCE). Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular.

3.6.1.5 NUMERO DE CÉLULAS ⁽¹³⁾

El crecimiento se puede determinar también en términos del número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre porta objetos de microscopios graduados como los de Helber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio.

Aunque este método es relativamente rápido y exacto no distingue entre células viables y no viables, también muy agotador, sin embargo se cuenta con contadores de células automáticos.

3.1.6.6 MASA DE UN COMPONENTE CELULAR ⁽¹³⁾

En el caso donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular, la cual es una cantidad constante del peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han usado componentes como el nitrógeno, proteína, RNA, DNA y TPA celulares. Pueden surgir dificultades ya que varía la cantidad de estos componentes en la

célula, a menudo considerablemente, durante el crecimiento de las células, especialmente cuando las condiciones de éste son diferentes.

3.6.1.7 MEDICIONES FISICAS ⁽¹³⁾

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor. Recientemente se demostró que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido y la cantidad de biomasa. Este método es directo, no requiere de muestreo y es instantáneo pero es más adecuado para biorreactores a gran escala puesto que la cantidad de calor generado en una escala corta puede ser demasiado pequeña para ser medida adecuadamente.

Para cultivos aerobios es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado esta directamente relacionada con la concentración de biomasa. Es obvio que este método no es adecuado para cultivos anaerobios

3.6.2 CRECIMIENTO EN CULTIVO INTERMITENTE ⁽¹³⁾

El cultivo por lotes o intermitente representa el crecimiento en un sistema cerrado puesto que no se añade medio nuevo al cultivo.

Cuando un medio de crecimiento adecuado se inocula con células, tiene lugar una secuencia de eventos característicos llamados ciclo de crecimiento el cual se puede describir por medio de una grafica del peso seco celular (x) ($g\ l^{-1}$) contra el período de incubación en horas (h).



Fig.Nº 5: Ciclo de Crecimiento Intermitente. Fases de crecimiento (a) latencia; (b) aceleración; (c) exponencial; (d) desaceleración; (e) estacionaria; (f) declinación.

El ciclo de crecimiento se puede dividir en varias fases distintas

Fase latencia “a”:

Inmediatamente después de la inoculación no es posible que exista crecimiento aparente durante algún tiempo. La longitud de la fase lag es variable y depende de los antecedentes previos de crecimiento de las células. Representa un período de adaptación para el crecimiento en un medio nuevo y significa la síntesis de las enzimas requeridas para la evolución en este medio.

Fases de aceleración y desaceleración “b” y “d”:

Estas se mencionan ocasionalmente en las publicaciones. La fase de desaceleración es importante porque el crecimiento está “equilibrado” y la

rapidez de crecimiento varía en función de la concentración de sustrato residual en cultivos limitados por el sustrato.

Fase exponencial o fase log “c”:

Frecuentemente se habla de esta como la fase de “crecimiento equilibrado”, donde la síntesis de todos los constituyentes celulares aumentan a una rapidez constante, de modo que la población de células, se duplica y continua duplicándose a intervalos regulares. Esta no es una verdadera fase de crecimiento equilibrado o estado estacionario, ya que los nutrientes son consumidos constantemente (la concentración del sustrato varía con el tiempo) y los productos finales del metabolismo se acumulan. En consecuencia, el medio cambia continuamente.

Fase estacionaria “e”:

Esta se caracteriza por ningún crecimiento neto. De hecho, el crecimiento puede estar ocurriendo, pero está equilibrado por la rapidez de muerte o lisis celular. Las células pueden permanecer viables por períodos largos en esta fase con existencia de metabolitos endógenos, oxidación y almacenamiento de polímeros, proteínas, etc. Es común que la población entre a la fase estacionaria como resultado de la disminución de algún nutriente esencial, formación de productos tóxicos o de un cambio en medio físico.

Fase de declinación “f”:

Durante la fase estacionaria la rapidez de desaparición (muerte) puede volverse más alta que la rapidez de crecimiento, en cuyo caso disminuye la densidad de células.

3.6.3 FACTORES QUE AFECTAN LA RAPIDEZ DE CRECIMIENTO

Los factores principales que afectan la rapidez del crecimiento son: la concentración del substrato, la temperatura, el pH, las condiciones nutricionales y de crecimiento, así como la inhibición por producto. ⁽¹³⁾

En la producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* los niveles de los nutrientes y las condiciones ambientales, como pH, agitación, temperatura, iones metálicos, concentración de fosfato, nitrógeno, carbono y aditivos, son factores importantes que regulan la morfología del microorganismo y el proceso fermentativo. ⁽⁶⁾

3.6.4 EVALUACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO ⁽¹³⁾

La evaluación de la cinética de crecimiento microbiano de un cultivo por lote (crecimiento en cultivo intermitente) implica la medición del crecimiento de los microorganismos, consumo de nutrientes y formación de productos.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Retrospectivo, prospectivo y experimental.

Retrospectivo porque tomó en cuenta investigaciones ya antes realizadas;

Prospectivo porque es una base para futuras investigaciones acerca del tema.

Experimental ya que se obtuvo datos experimentales que fueron analizados para determinar las mejores condiciones en el proceso de fermentación.

La investigación se llevó a cabo en tres etapas: Investigación bibliográfica, investigación de campo y parte experimental

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador (UES).
- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia, Dr. Benjamín Orozco, de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Facultad de Ingeniería Ing. Miguel Mármol, de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Universidad Centroamericana Dr. J. Simeón Cañas (UCA).
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Internet.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

4.3.1 UNIVERSO

Suero de leche líquido proveniente de las empresas industriales y artesanales de la zona central.

4.3.2 MUESTRA

Se utilizaron 6 litros de suero de leche, proveniente de leche tratada por métodos semi-industriales y procede de la Cremería “DELMY” ubicada en 27 calle poniente N° 404, Col. Layco, San Salvador.

4.3.3 EL MICROORGANISMO

La cepa utilizada en la investigación cinética de producción de ácido cítrico pertenece al género *Aspergillus niger* ATCC 16404 la cual fue proporcionada por un laboratorio acreditado a nivel nacional. (Ver anexo N° 3)

4.4 MÉTODO EXPERIMENTAL

El microorganismo que se utilizó para el estudio cinético de producción de ácido cítrico pertenece a la cepa del *Aspergillus niger* ATCC 16404 proveniente de ATCC™ (The Global Bioresource Center). (Ver anexo N° 4)

La cepa patrón de ***Aspergillus niger*** con la que se trabajó fue suministrada en Agar Papa Dextrosa y dispensadas en placas de petri selladas e incubadas a una temperatura de 25°C durante 15 días.

Posteriormente se realizaron 10 resiembras en placas de Agar Sabouraud selladas e incubadas a una temperatura de 25°C por 8 a 15 días.

(Ver anexo N° 6)

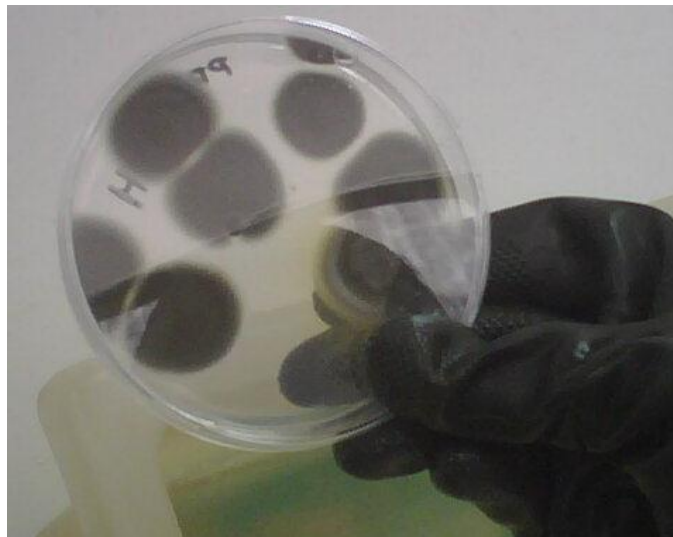


Fig. N° 6: Cepa de ***Aspergillus niger***
ATCC 16404 en Agar PDA

4.4.1 PREPARACIÓN DEL INOCULO. (Ver anexo N° 5)

Del cultivo realizado en Agar Sabouraud se tomó la cantidad de 5.16 g (raspado) para luego transferirla a un Erlenmeyer conteniendo 120 mL de agua destilada estéril (1); (11) y (6)

Esta suspensión de esporas constituye el inóculo del sustrato (10% de sustrato) contenido en un biorreactor de 1200 mL.



Fig. N° 7: Preparación del Inóculo

4.4.2 PREPARACION DEL BIORREACTOR

- Lavar con agua y jabón el biorreactor de 1.5 litros (1500 mL) de capacidad.
- Enjuagar con agua hirviendo.
- Limpiar el interior con alcohol isopropílico; dejar evaporar el alcohol.
- Agregar agua destilada estéril para eliminar los restos de alcohol isopropílico.
- Dejar escurrir hasta que este completamente seco.

4.4.3 PREPARACION DE LA FUENTE DE OXIGENO ⁽⁸⁾

- Lavar con agua y jabón las mangueras de la bomba de oxígeno.
- Enjuagar con agua hirviendo.

- Limpiar con alcohol isopropílico y dejar evaporar el alcohol.
- Lavar con agua destilada estéril para eliminar los restos de alcohol isopropílico. Dejar escurrir hasta que este completamente seca.

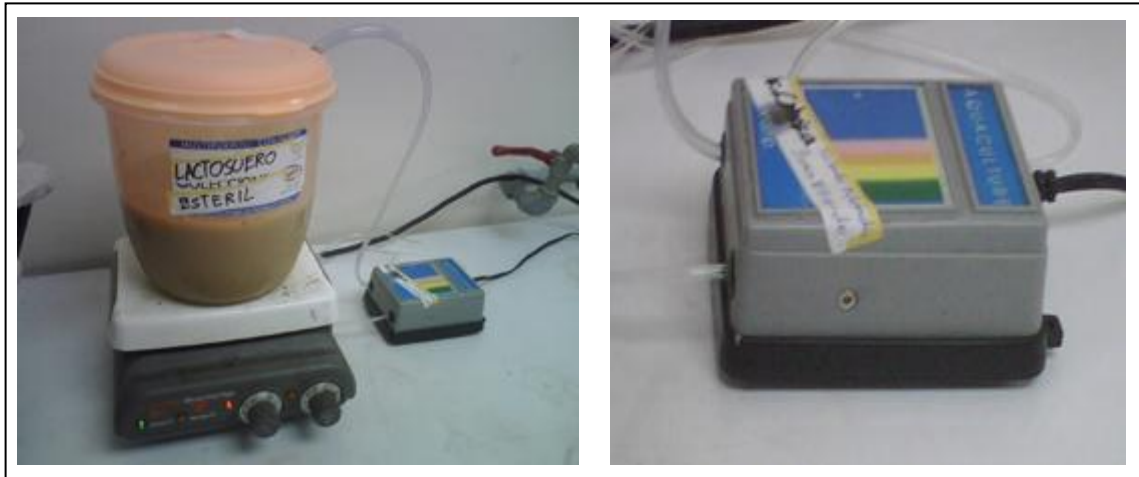


Fig. Nº 8: Preparación de la Fuente de Oxígeno Adaptado al Biorreactor.

4.4.4 PRETRATAMIENTO DEL SUERO LACTEO.

Para cada ensayo se utilizó un biorreactor con capacidad de 1500 ml se colocaron en él 1080 ml del suero de leche se realizaron tres ensayos y se nombraron en el siguiente orden E1, E2 y E3, cada uno de los cuales corresponde a un ensayo por semana.

Para cada uno de ellos se midió la cinética de crecimiento microbiano y se trabajaron en las siguientes condiciones correspondientes:

Al biorreactor E1 conteniendo 1080 ml de suero de leche se le reguló a pH 4.0 con HCl 1.0 N y se le adicionó el inóculo.

Al biorreactor E2 conteniendo 1080 ml de suero de leche se le reguló el pH 3.0 con HCl 1.0 N y se le adicionó el inóculo.

Al biorreactor E3 conteniendo 1080 ml de suero de leche se le reguló el pH 4.0 con HCl 1.0 N y fue enriquecido con 0.0122g de KH_2PO_4 , y se le adicionó el inóculo. (6)

De los ensayos realizados se escogió el que presentó el mejor comportamiento cinético y mayor rendimiento en la producción de ácido cítrico, bajo las mismas condiciones se reprodujo un cuarto proceso fermentativo nombrado como ER3, debido a que fue el proceso fermentativo E3 en el cual se obtuvo mejores resultados y se le realizaron las determinaciones analíticas ya antes mencionadas.

Es importante mencionar que para los procesos fermentativos E2 y E3 se tuvo el cuidado adicional de colar y filtrar higiénicamente el suero de leche para la remoción de la nata, grasa láctea y otros sólidos en suspensión.

4.4.5 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN.

En un biorreactor de 1500 mL conteniendo 1080 mL de suero de leche se adicionó la suspensión preparada (inóculo) anteriormente, que estaba constituida por 0.43 g de *Aspergillus niger* ATCC 16404 por 100 mL de sustrato. (11)

De la misma manera se le proporcionaron las condiciones necesarias de agitación por medio de un agitador magnético y aireación por medio de un suministro de oxígeno.



Fig. N° 9: Preparación del Medio de Fermentación.

4.4.6 PREPARACION DE LOS MATRACES.

Se utilizó una serie de 12 balones fondo plano de 100 mL lavados higiénicamente con agua y jabón, los cuales fueron tapados y esterilizados a 121°C por 15 minutos, y 15 libras de presión. Una vez fríos se recolectaron en ellos muestras del medio fermentativo, bajo condiciones asépticas.

4.4.7 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Del biorreactor conteniendo 1200 ml del medio fermentativo (suero de leche), se tomaron muestras de 100 ml por duplicado a intervalos de 0 horas, 24 horas, 48

horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas, 168 horas (7 días). Se llevó una muestra control (sin inóculo) a la par de cada preparación del medio fermentativo.

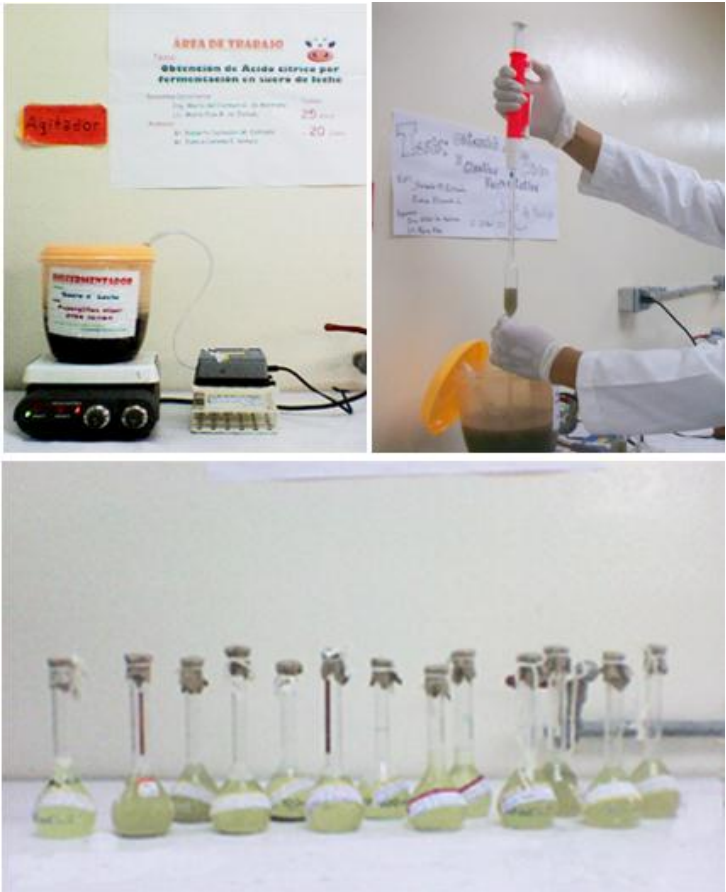


Fig. N° 10: Tratamiento de las Muestras

FORMATO DE TABLA PARA LA TOMA DE RESULTADOS

RESULTADOS DE MUESTRAS (muestras por duplicado)								
Parámetros	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
Grados Brix								
pH								
Biomasa (g)								
Azúcares totales (g/L)								
Ac. Cítrico (g/L)								

De cada muestra tomada por su correspondiente tiempo específico, se separó la biomasa obtenida por filtración usando el método de peso seco detallado en las determinaciones analíticas.

Y posteriormente con el filtrado obtenido se realizaron las determinaciones analíticas correspondientes mencionadas para pH, azúcares totales, biomasa, grados brix y cuantificación de ácido cítrico utilizando el método de Saffran – Densted. (Ver anexo N° 13)

4.5 DETERMINACIONES ANALITICAS

4.5.1 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO

(ver anexo N° 10)

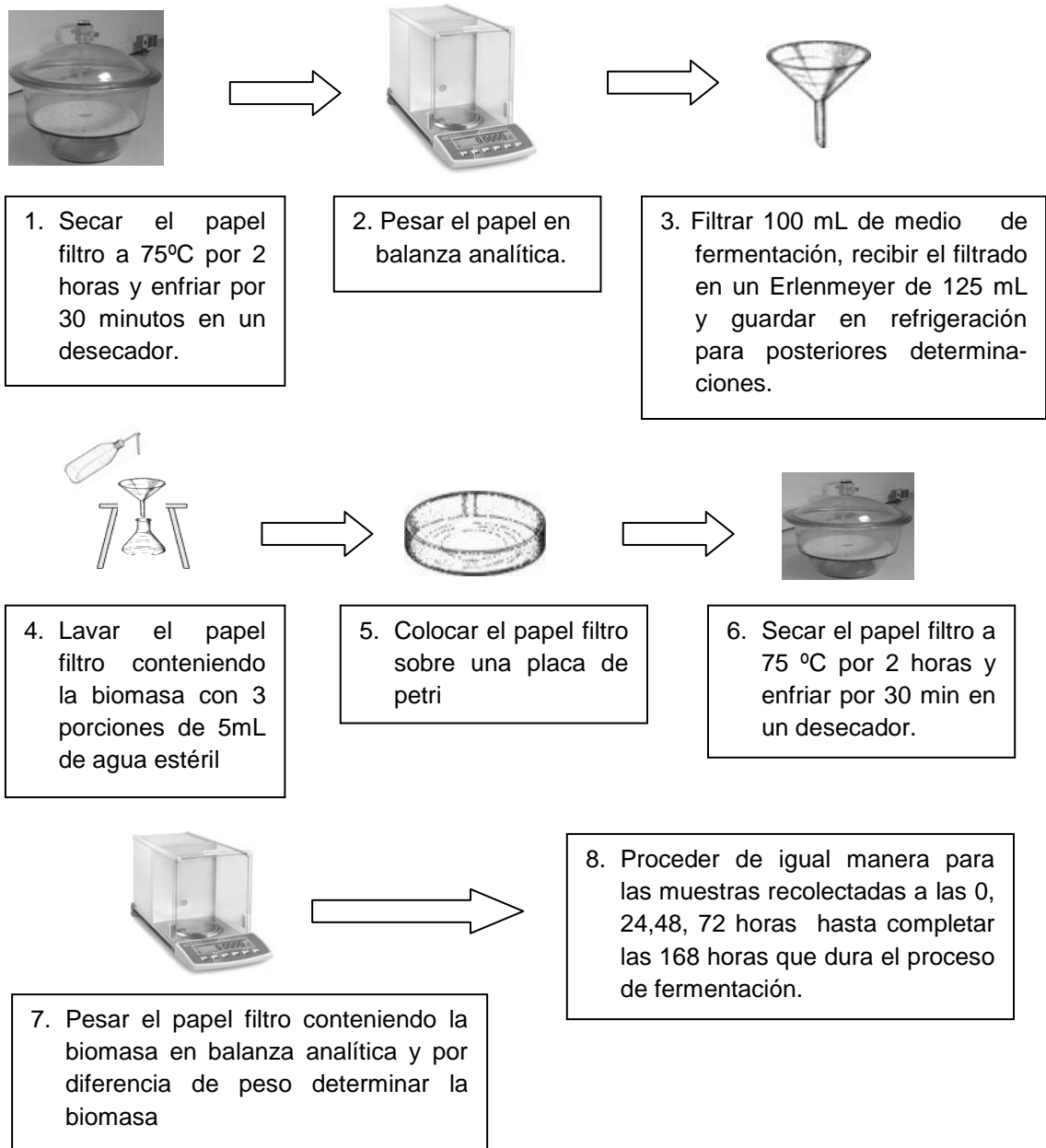


Fig. N°11: Determinación de Biomasa por el Método de Peso Seco.

4.5.2 DETERMINACION DE pH

- Medir una alícuota de 20mL del filtrado obtenido en el proceso de determinación de crecimiento celular y transferirlo a un beaker plástico de 30mL
- Ajustar el pH-metro (Ver anexo N° 7) y a continuación lavar los electrodos varias veces con agua destilada dejando que los electrodos escurran el agua y secar con papel absorbente.
- Enjuagar los electrodos 3 o 4 veces con la solución de prueba.
- Sumergir los electrodos en el recipiente con la solución de prueba y efectuar la determinación de pH.
- Repetir el procedimiento para las demás muestras, por duplicado. La diferencia no deberá ser mayor a 0.05.



Fig. N° 12: pH – metro, Modelo METROHM 632 para determinación de pH

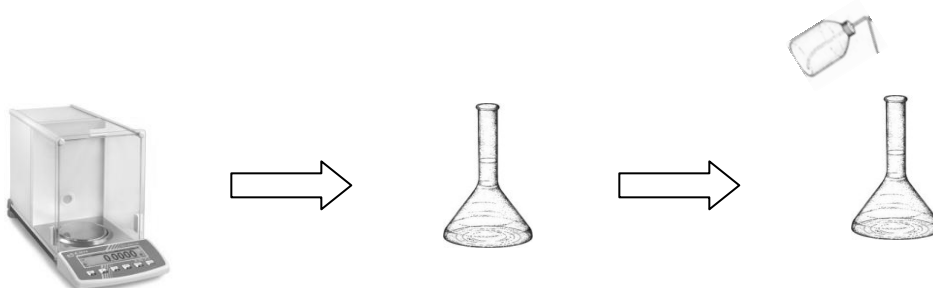
4.5.3 DETERMINACION DE GRADOS BRIX.

- Conectar el refractómetro y dejar que este caliente por 15 minutos.
- Limpiar el porta muestras del refractómetro usando algodón impregnado con alcohol, dejando que este se evapore.
- Verificar si el refractómetro esta calibrado usando una gota de agua estéril, y luego secar con una torunda de algodón seca o con un pañuelo desechable.
- Colocar una gota de filtrado obtenido en la determinación de biomasa en el porta muestra del aparato.
- Verificar la temperatura a la que se encuentra la muestra.
- Proceder a realizar la lectura de grados Brix.



Fig. N° 13: Refractómetro Modelo ATAGO,
para determinación de Grados Brix.

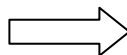
4.5.4 ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE GLUCOSA



1. Pesar 0.02g de Glucosa anhidra en balanza analítica

2. Transferirla a un frasco volumétrico de 100.0 mL

3. Adicionar 30ml de agua destilada, agitar y aforar con agua destilada



4. Preparar a partir de la solución estándar de glucosa las soluciones que se detallan en la tabla N^o 5.

5. Llevarlas a temperatura ambiente y leer en el Espectrometro visible, Spectronic 20, a una longitud de onda de 490 nm.

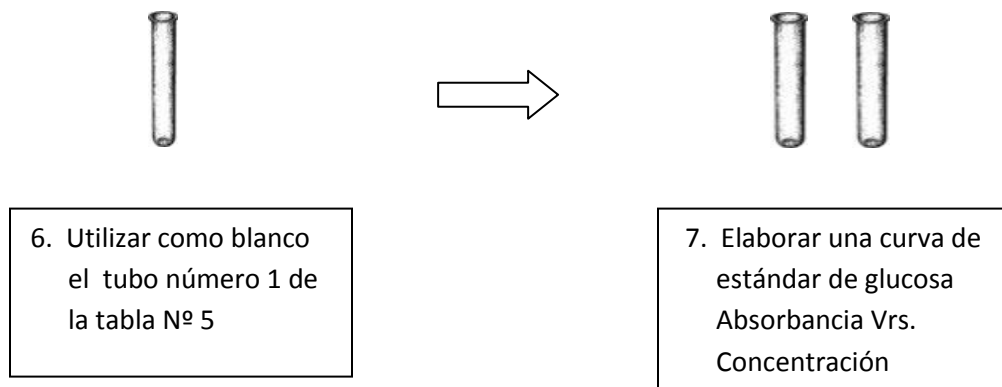


Fig. N° 14: Elaboración de la Curva Estándar de Glucosa

Tabla N° 5: Determinación de azúcares totales por el método de fenol sulfúrico.

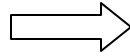
Tubo N°	mL. de Soln. de glucosa anhidrida	mL. de Agua estéril	mL. de Fenol 80%	mL. de H ₂ SO ₄ concentrado
1	0.0	2.0	0.1	5.0
2	0.1	1.9	0.1	5.0
3	0.2	1.8	0.1	5.0
4	0.4	1.6	0.1	5.0
5	0.6	1.4	0.1	5.0
6	0.8	1.2	0.1	5.0
7	1.0	1.0	0.1	5.0

Nota: cada tubo se colocó en baño de hielo y el ácido sulfúrico fue añadido lentamente por las paredes del tubo.

4.5.5 DETERMINACION DE AZUCARES TOTALES EN LAS MUESTRAS
POR EL METODO DE FENOL – SULFURICO. (Ver anexo N° 11)



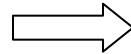
1. Colocar en un tubo 10 mL del filtrado obtenido durante la determinación de Biomasa



2. Adicionar al filtrado 1.0mL de Sulfato de Zinc 10% p/v y 1.0mL de Hidróxido de sodio 0.5 M.



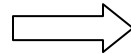
3. Dejar reposar por 15min a temperatura ambiente



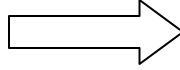
4. Centrifugar por 15min a 1000 rpm



5. Tomar 2.5mL del sobrenadante obtenido en paso 4 y adicionar 1.1 mL de agua destilada + 0.1mL fenol al 80% p/v y agitar



6. Adicionar 5.0mL de H_2SO_4 concentrado en baño de hielo agitar y reposar por 30 minutos exactos



7. Determinar la Absorbancia de las soluciones en el espectrómetro visible, Spectronic 20, previamente calibrado una longitud de onda de 490nm.

8. Interpolar los valores obtenidos en la curva de glucosa previamente elaborada de acuerdo a tabla N° 5

Fig. N° 15: Azucares Totales Método de Fenol -Sulfúrico

4.5.6 CUANTIFICACION DE ACIDO CITRICO POR EL METODO DE SAFFRAN – DENSTED. (Ver anexo N° 12)

Principio del método:

Se obtiene un filtrado de la muestra y éste se trata con piridina y anhídrido acético y se forma con el ácido cítrico un compuesto de color amarillo, el color obtenido se mide por espectrofotometría. (Ver anexo N° 8)

1. Construir la curva patrón.

Procedimiento:

1.1 Disolver 400 mg de ácido cítrico en 1000 ml de agua destilada.

1.2 De la solución anterior efectuar diluciones en tubos con tapón de rosca, que contengan 0.0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml de la solución de ácido cítrico.

Luego completar hasta un mL de agua destilada. Como blanco utilizar agua destilada y tratarlo como las diluciones anunciadas.

1.3 A cada tubo preparado en el literal 1.2 adicionar 8 ml de anhídrido acético y colocar a 60°C en un baño maría durante 10 minutos.

1.4 Seguidamente agregar un mL de piridina a cada tubo y colocándolo nuevamente en baño María por 40 minutos.

1.5 Enfriar y realizar las lecturas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 418 nm.

1.6 Construir la curva de calibración.

2. Tomar 2 mililitros del filtrado obtenido del proceso de obtención de biomasa, (Ver página N° 78) y tratarlo como se detalla en los literal 1.3 hasta 1.5, luego interpolar en la curva de calibración y determinar la cantidad de ácido cítrico producida.

Notas:

En los numerales 1.3 y 1.5 hay que mantener cerrados los tubos para que no se evapore en anhídrido acético.

4.5.7 FORMULAS UTILIZADAS PARA LA CINETICA DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.⁽³⁾

4.5.7.1 Velocidad volumétrica de generación de células microbianas por peso seco

Ecuación N° 1

Donde :

μ : velocidad volumétrica (g/ L.h)

x_2 : gramos de biomasa en tiempo final

x_1 :gramos de biomasa en tiempo inicial

t_1 : tiempo inicial

t_2 :tiempo final

$$\mu = \frac{\text{Ln}x_2 - \text{Ln}x_1}{t_2 - t_1} = \frac{d\text{Ln}x}{dt}$$

4.5.7.2 Velocidad específica de generación de células microbianas por peso seco.

Ecuación N° 2

Donde:

μ^i : velocidad específica

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$$\mu^i = \frac{1}{x} \times \frac{d\text{Ln}x}{dt}$$

$\frac{dLnx}{dt}$: velocidad volumétrica de biomasa

4.5.7.3 Consumo de nutrientes.

4.5.7.3.1 Velocidad volumétrica de consumo de sustrato

Ecuación N° 3

$$Q_s = \frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} = -\frac{ds}{dt}$$

Donde:

Q_s : velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g / L.h)

S_2 : Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo final

S_1 : Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo inicial

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Las unidades son: gramos de sustrato consumido / Litroxhora

4.5.7.3.2 Velocidad específica de consumo de sustrato.

Ecuación N° 4

$$q_s = -\frac{1}{x} \times \left(-\frac{ds}{dt} \right)$$

Donde:

q_s : velocidad específica de consumo de sustrato(g/L.h)

$-\frac{ds}{dt}$: velocidad volumétrica de consumo de sustrato

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

Las unidades son : gramos de sustrato consumido / gramos de biomasa.hora

4.5.7.4 Formación de producto.

4.5.7.4.1 Velocidad volumétrica de formación de productos.

Ecuación N° 5

$$Q_p = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} = \frac{dp}{dt}$$

Donde:

Q_p : velocidad volumétrica de producción de ácido cítrico (g / L.h)

P_2 : Concentración (g/L) de ácido cítrico

P_1 : Concentración (g/L) de ácido cítrico

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Las unidades son : gramos de producto formado / Litro \times hora

4.5.7.4.2 Velocidad específica de formación de productos.

Ecuación N° 6

$$q_p = \frac{1}{x} \times \frac{dp}{dt}$$

Donde:

dp : velocidad específica de producción de ácido cítrico

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

dp/dt : velocidad volumétrica de producción de ácido cítrico

Las unidades son : gramos de producto formado / gramos de biomasa \times hora

4.5.7.5 Rendimiento en el cultivo.

Ecuación N° 7

$$Y_{p/s} = \frac{dp}{-ds}$$

Donde:

$Y_{p/s}$: gramos de ácido cítrico / gramos de sustrato consumido

dp : gramos de ácido cítrico

$-ds$: gramos de sustrato consumido

Las unidades son : gramos de producto / gramos de sustrato consumido

CAPITULO V
RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DE PROCESOS EXPERIMENTALES ENSAYOS E1, E2, E3 Y ER3.

Para el análisis de resultados obtenidos durante el proceso fermentativo de producción de ácido cítrico, se presentó la composición de cada uno de los medios de fermentación expresados en el diseño metodológico y que han sido estudiados experimentalmente con la finalidad de seleccionar el más apropiado para la obtención de ácido cítrico.

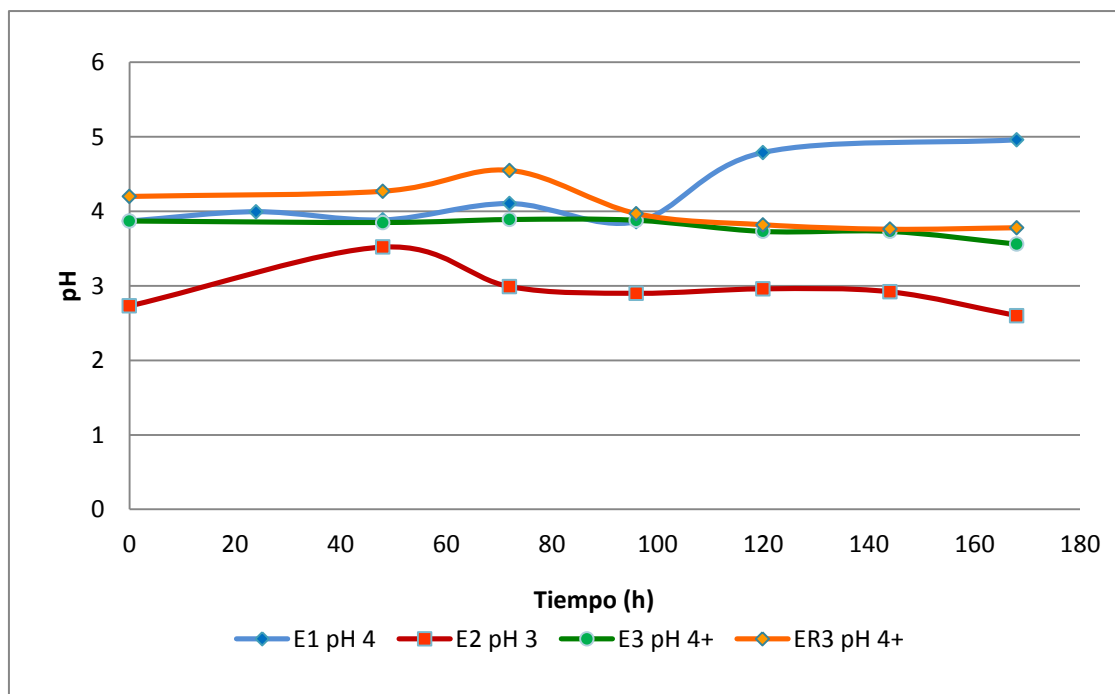
Se presentó las gráficas comparativas del comportamiento cinético con respecto al tiempo de las variables siguientes: crecimiento celular (biomasa), pH, grados Brix, azúcares totales y concentración de ácido cítrico, cuyos datos provienen de los procesos fermentativos E1, E2, E3 y ER3.

Una vez seleccionado el proceso de fermentación más apropiado, el cual fue el ensayo E3 por reunir las mejores condiciones de trabajo adaptadas a esta investigación y con el que se obtuvo el mejor rendimiento de producción de ácido cítrico, se reprodujo un cuarto proceso fermentativo denominado ER3 en donde su composición y condiciones de fermentación fueron semejantes a las del proceso fermentativo E3. Posteriormente se llevó a cabo el análisis de resultados de cada proceso fermentativo y se determinó las variables cinéticas en su correspondiente tiempo analizado.

Tabla N° 6: Resultados de pH en ensayos E1, E2, E3 y ER3

Tiempo (h)	E1 pH	E2 pH	E3 pH	ER3 pH
0 h	3.87	2.73	3.87	4.20
24 h	3.99	---	---	---
48 h	3.88	3.52	3.85	4.27
72 h	4.11	2.99	3.89	4.55
96 h	3.86	2.90	3.88	3.97
120 h	4.79	2.96	3.73	3.82
144 h	---	2.92	3.73	3.76
168 h	4.96	2.60	3.56	3.78

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras



(+): Enriquecimiento con Fosfato ácido de Potasio (KH_2PO_4)

Fig. N° 16: Curva de Resultados de pH Vrs Tiempo (horas) para Ensayos de Producción de Ácido Cítrico.

La figura N° 16 muestra las diferentes curvas de pH obtenidas en los procesos de fermentación. Los niveles iniciales de pH para los diferentes ensayos varia de acuerdo a las condiciones deseadas respectivamente. Pudiéndose observar que el rango de pH para cada ensayo varia constantemente durante la fermentación; el cual hasta las 120 horas muestra una disminución en la acidez del medio y en adelante hasta las 168 horas esté mantiene un nivel constante o con tendencia a la acidez. Durante los ensayos E2, E3 y ER3 el nivel de pH se logro mantener dentro y del rango óptimo de producción de ácido cítrico el cual es de 2.0 a 4.0, no así en el ensayo E1 donde a partir de las 96 horas hasta el término del proceso el nivel de pH se desequilibró con tendencia a la alcalinidad.

Tabla N° 7: Resultados de grados brix en ensayos E1, E2, E3 y ER3.

Tiempo (h)	°Brix en E1	°Brix en E2	°Brix en E3	°Brix ER3
0 h	6.00	9.00	9.00	9.00
24 h	5.50	---	---	---
48 h	5.75	9.50	9.75	8.75
72 h	5.75	10.00	9.50	7.50
96 h	6.00	10.25	9.75	7.25
120 h	7.00	11.25	10.00	7.00
144 h	---	10.00	11.00	7.50
168 h	7.75	10.50	12.25	8.00

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

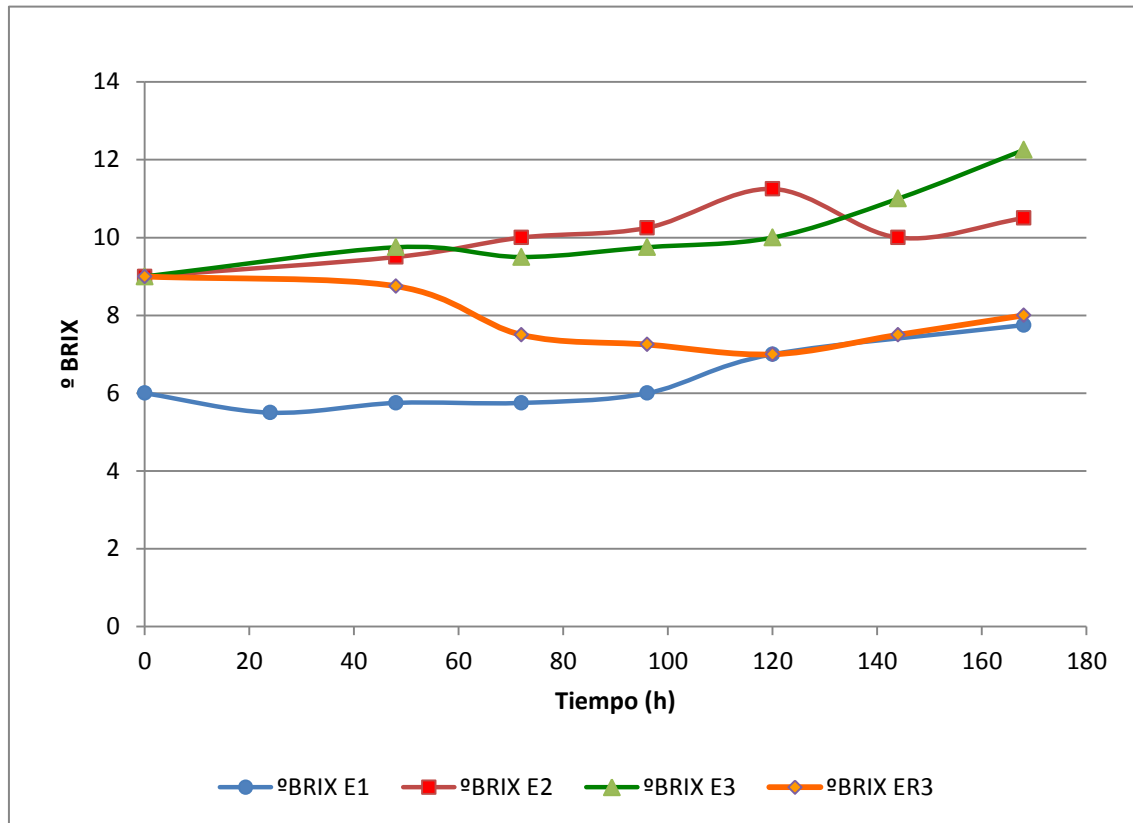


Fig. N° 17: Curva de Resultados de Grados Brix Vrs Tiempo (horas) para Ensayos de Producción de Ácido Cítrico.

En la figura N° 17 se observa el comportamiento comparativo de grados Brix de los diferentes ensayos, indica la cantidad de azúcares o sólidos consumidos por el microorganismo en el medio de fermentación con respecto al tiempo. Notándose un comportamiento heterogéneo entre incrementos y decrementos hasta las 120 horas, en adelante y hacia las 168 horas se observa un incremento leve de grados Brix. La diferencia de las lecturas obtenidas en los diferentes ensayos es influenciada por el nutrimento y condiciones inherentes al suero lácteo utilizado respectivamente en cada ensayo.

Tabla N° 8: Resultados de biomasa en ensayos E1, E2, E3₁ y ER3.

Nº Muestra	Tiempo (horas)	Biomasa en E1 (g/L)	Biomasa en E2 (g/L)	Biomasa en E3 (g/L)	Biomasa en ER3 (g/L)
1	0	11.225	1.762	1.762	1.121
2	24	11.534	---	---	---
3	48	11.996	2.26	1.826	1.312
4	72	14.784	2.5	1.913	1.542
5	96	18.128	2.754	1.946	2.409
6	120	35.206	3.191	1.984	2.739
7	144	---	3.452	2.121	3.428
8	168	21.427	3.119	2.642	4.323

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

Ejemplo para calcular el logaritmo natural de biomasa para las 48 horas en el ensayo E1.

Donde:

X: Biomasa de muestra en gramos / L. h

Ln X: Logaritmo natural de X

Sustituyendo x = 11.996 en la ecuación

$$\text{Ln} (11.996) = 2.4846$$

Tabla N° 9: Resultados de logaritmo natural de biomasa en ensayos E1, E2, E3₁ Y ER3.

Nº Muestra	Tiempo (horas)	Ln (x) en E1 (g/L)	Ln (x) en E2 (g/L)	Ln (x) en E3 (g/L)	Ln (x) en ER3 (g/L)
1	0	2.418143	0.566	0.566	0.114
2	24	2.445299	---	---	---
3	48	2.484573	0.815	0.602	0.272
4	72	2.693545	0.916	0.649	0.433
5	96	2.897458	1.013	0.666	0.879
6	120	3.561216	1.160	0.685	1.008
7	144	---	1.239	0.752	1.232
8	168	3.064652	1.138	0.972	1.464

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

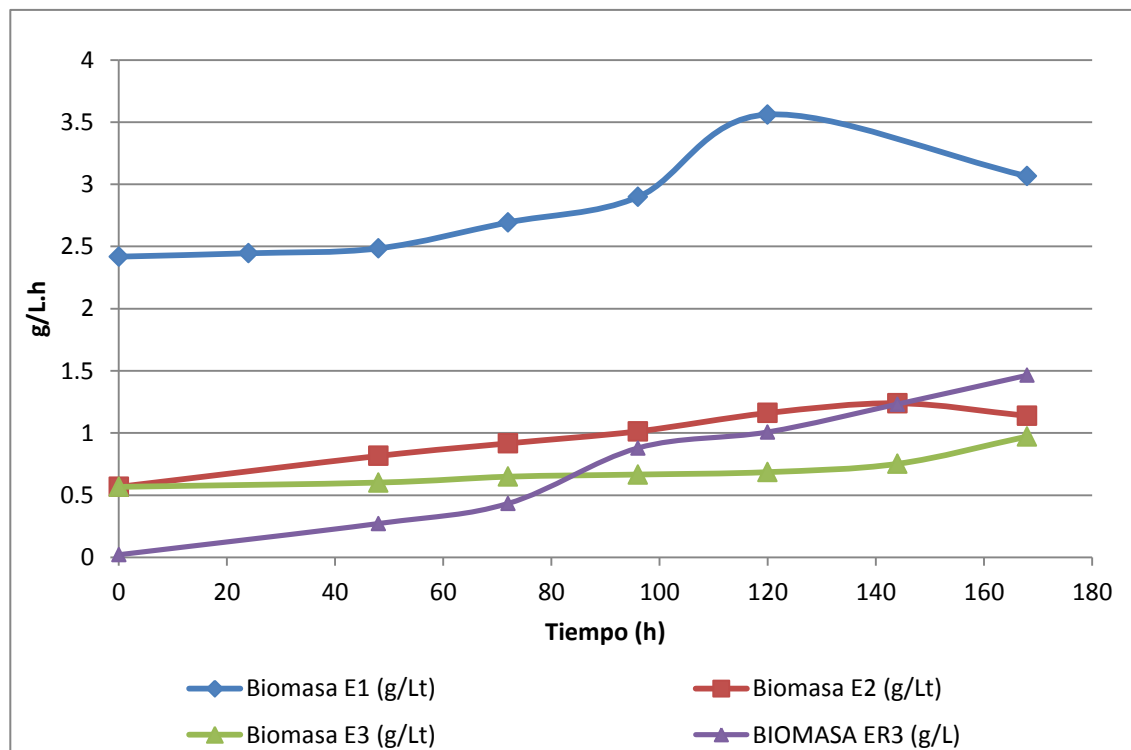


Fig. N° 18: Curva de Resultados de Biomasa (g/L) Vrs Tiempo (horas) para Ensayos E2, E3 y ER3 de Producción de Acido Cítrico.

La figura N° 18 muestra el comportamiento cinético comparativo en cuanto a generación de células microbianas de los procesos fermentativos E1, E2, E3 y ER3, pudiéndose apreciar para los procesos fermentativos E1 y E2 las diferentes fases: adaptación, logarítmica, estacionaria y muerte. Tanto en el proceso fermentativo E1 como el E2 se observa la fase de crecimiento exponencial a las 48 horas, alcanzando la fase estacionaria para el proceso fermentativo E1 a las 120 horas y para el proceso fermentativo E2 a las 144 horas con una fase de muerte para ambos procesos a las 168 horas. En el proceso fermentativo E1 se puede observar un incremento elevado en la producción de biomasa, que se debe a la interferencia causada por los sólidos suspendidos en el suero de leche (nata y grasa láctea), razón por la que no se pudo calcular con exactitud la biomasa obtenida. Con los procesos fermentativos E3 y ER3 se observa un comportamiento semejante en cuanto a la fase de adaptación larga y a un crecimiento exponencial que no es apreciado totalmente, alcanzando un aumento de biomasa en 168 horas.

Tabla N° 10: Resultados de absorbancia en muestras para la determinación de azúcares por el método fenol-sulfúrico.

N° de muestras	Tiempo (h)	Absorbancia de E1	Absorbancia de E2	Absorbancia de E3	Absorbancia de ER3
1	0	0.684	0.262	0.262	0.102
2	24	0.572	---	---	---
3	48	0.278	0.374	0.115	0.113
4	72	0.380	0.325	0.1	0.187
5	96	0.240	0.395	0.133	0.644
6	120	0.945	0.396	0.065	0.204
7	144	---	0.401	0.091	0.220
8	168	0.381	0.381	0.126	0.522

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

Ejemplo: para ensayo fermentativo ER3 a las 48 horas. (Ver anexo N° 9)

Datos del estándar: (Ver pág. N° 115)

Longitud de onda utilizada: 490nm.

Standard utilizado: SIn de Glucosa anhidra 0.2 mg / mL

Concentración del estándar utilizado para el tubo N° 3: 0.04 mg / mL

Absorbancia del estándar utilizado para el tubo N° 3: 0.152

Datos de muestra:

Absorbancia de muestra para el proceso fermentativo ER3 a las 48 horas: 0.113

Factor de dilución para proceso fermentativo ER3: FD=20

$$C_{Mx} = \left[\left(\frac{A_{Mx}}{A_{St}} \right) C_{St} \right] * FD$$

$$C_{Mx} = \left[\left(\frac{0.113}{0.152} \right) 0.04 \frac{mg}{mL} \right] * 20 = 0.594737 \frac{mg}{mL}$$

$$C_{Mx} = 0.594737 \frac{mg}{mL}$$

Tabla N° 11: Resultados de concentración de azúcares en ensayos E1, E2, E3 y ER3.

Nº de muestras	Tiempo (h)	Concentración de E1 (g/L)	Concentración de E2 (g/L)	Concentración de E3 (g/L)	Concentración de ER3 (g/L)
1	0	3.507692	1.170949	2.341899	0.536842
2	24	2.923077	---	---	---
3	48	1.267236	0.394737	0.518421	0.594737
4	72	1.948718	1.602469	0.526316	1.671508
5	96	2.145251	2.025641	0.560526	6.605128
6	120	4.846154	2.030769	0.483333	1.394872
7	144	---	2.056410	0.754166	1.504273
8	168	1.953846	1.951282	0.528947	5.353846

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

(*.*): Ver datos de conversión de unidades en (Ver anexo N° 9)

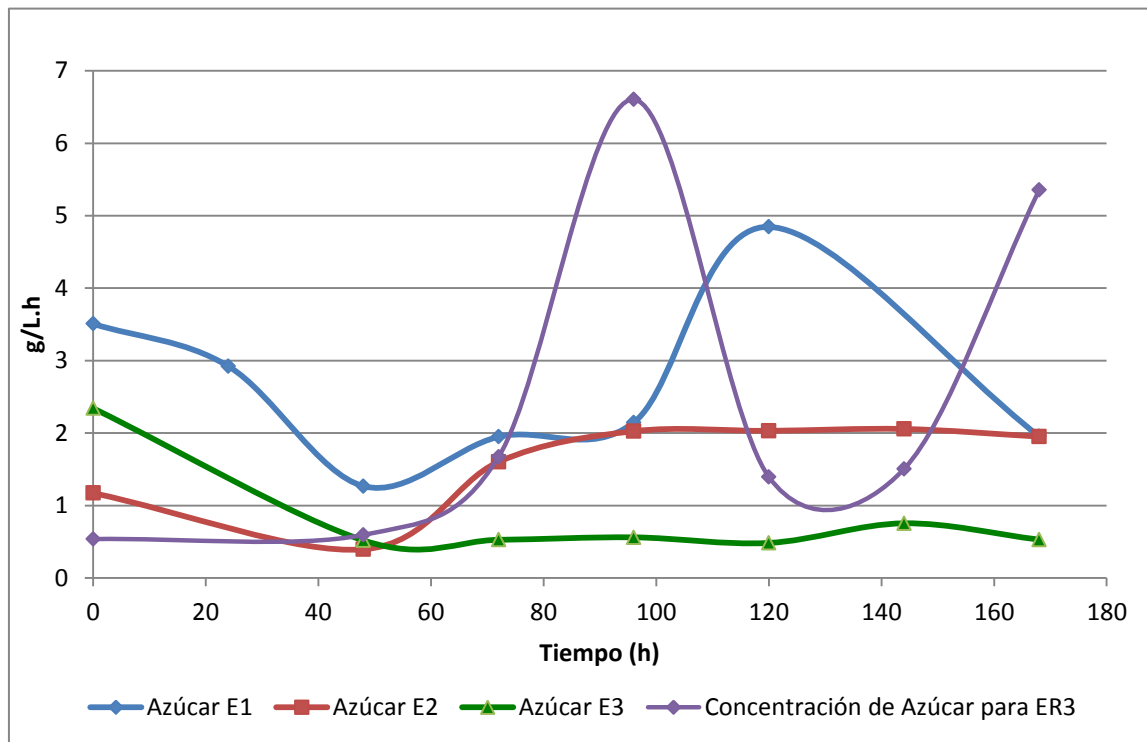


Fig. N° 19: Curva de Resultados de Concentración de Azúcar (g/L) Vrs. Tiempo (horas) para Ensayos de Producción de Acido Cítrico.

La figura N° 19 muestra el comportamiento de la concentración de azúcar obtenida por el método de fenol-sulfúrico de los diferentes ensayos con respecto al tiempo. Es de observar que de 48 y 72 horas el microorganismo tiende a desdoblarse la lactosa presente en el medio, después de las 72 horas empieza a degradar las moléculas grandes de lactosa en monosacáridos como la galactosa y la glucosa, de esta manera obtiene su fuente de energía. Los comportamientos de cada ensayo se ven influenciados por las condiciones de esterilización de cada medio, los ensayos E2 y E3 se observa un comportamiento similar con respecto al consumo de azúcares totales debido a

que ambos fueron sometidos al mismo proceso de esterilización; en cambio con el proceso fermentativo ER3 se aprecia una diferencia en el aumento de concentración de azúcares, para ER3 presenta la mayor concentración de azúcares de 96 y 168 horas, por lo que presenta un mejor comportamiento; esto se debe a la esterilidad del medio y las condiciones en que fue esterilizado sin ninguna otra interferencia en el proceso de esterilización.

Tabla N° 12: Resultados de absorbancia de ácido cítrico en ensayos E1, E2, E3 y ER3.

Nº Muestra	Tiempo (horas)	Abs.en E1	Abs.en E2	Abs.en E3	Abs en ER3
1	0	0.0000	0.000	0.000	0.000
2	24	0.1475	---	---	---
3	48	0.3765	0.012	0.025	0.027
4	72	0.6160	0.087	0.034	0.045
5	96	1.2500	0.030	0.041	0.084
6	120	---	0.088	0.058	0.173
7	144	---	0.025	0.217	0.213
8	168	---	0.034	0.129	0.128

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

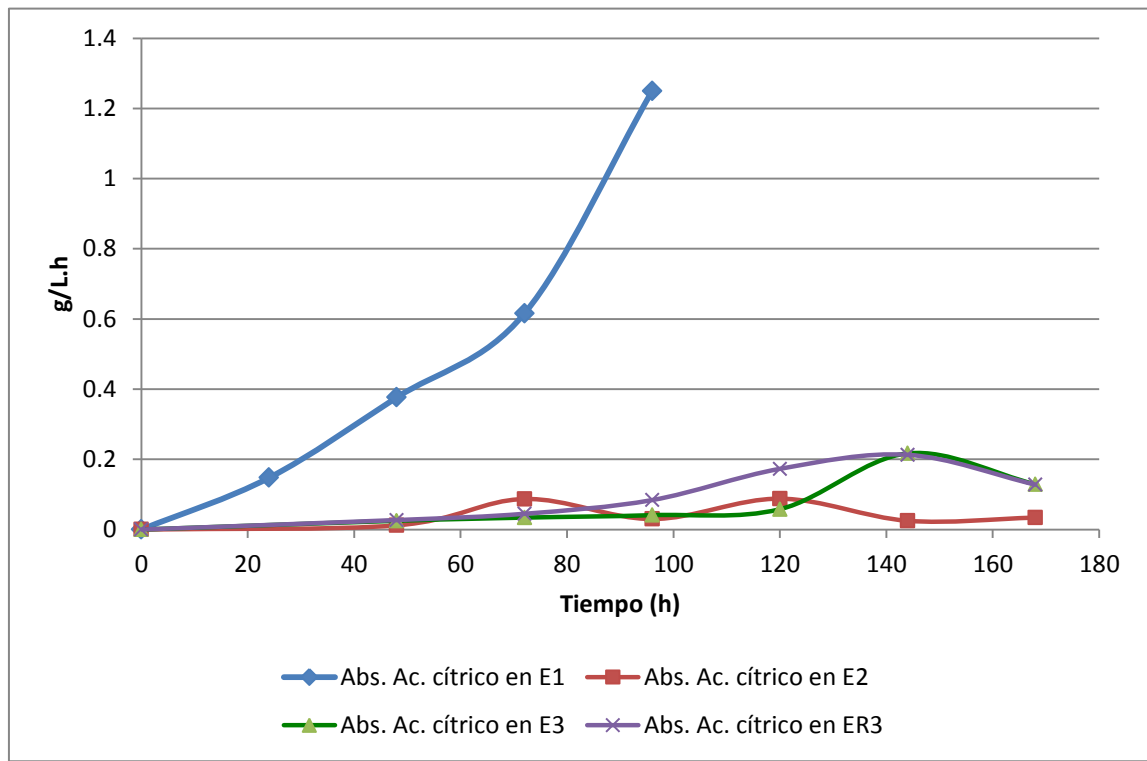


Fig. N° 20: Curva de Resultados de Absorbancia de Acido Cítrico Vrs. Tiempo en horas para Ensayos de Producción de Acido Cítrico.

Ejemplo: para ensayo fermentativo E3 a las 48 horas.

Datos del estándar: (ver pág. N° 125)

Longitud de onda utilizada: 418nm.

Estándar utilizado: Sln. de ácido cítrico 0.4 mg / mL

Concentración del estándar a utilizar para el tubo N° 2: 0.08 mg / mL

Absorbancia del estándar a utilizar para el tubo N° 2: 0.049

Datos de muestra:

Absorbancia de muestra para el proceso fermentativo E3 a las 48 horas: 0.025

$$C_{Mx} = \left(\frac{A_{Mx}}{A_{St}} \right) C_{St}$$

$$C_{Mx} = \left(\frac{0.025}{0.049} \right) 0.08 \frac{mg}{mL} = 0.040816 \frac{mg}{mL}$$

$$C_{Mx} = 0.040816 \frac{mg}{mL} \text{ de ácido cítrico}$$

Tabla N° 13: Resultados de concentración de ácido cítrico en ensayos E1, E2, E3 y ER3.

Nº Muestra	Tiempo (horas)	ác. cítrico en E1 (g/L)	ác. cítrico en E2 (g/L)	ác. cítrico en E3 (g/L)	ác. cítrico en ER3 (g/L)
1	0	0.000	0.000	0.000	0.000
2	24	0.289571	---	---	---
3	48	0.663259	0.019592	0.040816	0.044082
4	72	1.085463	0.183158	0.055510	0.073469
5	96	2.202643	0.048979	0.066938	0.176842
6	120	---	0.185263	0.276480	0.339632
7	144	---	0.040816	0.382378	0.375330
8	168	---	0.055510	0.247680	0.245760

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

(*.*): Ver datos de conversión de unidades en (Ver anexo N° 9)

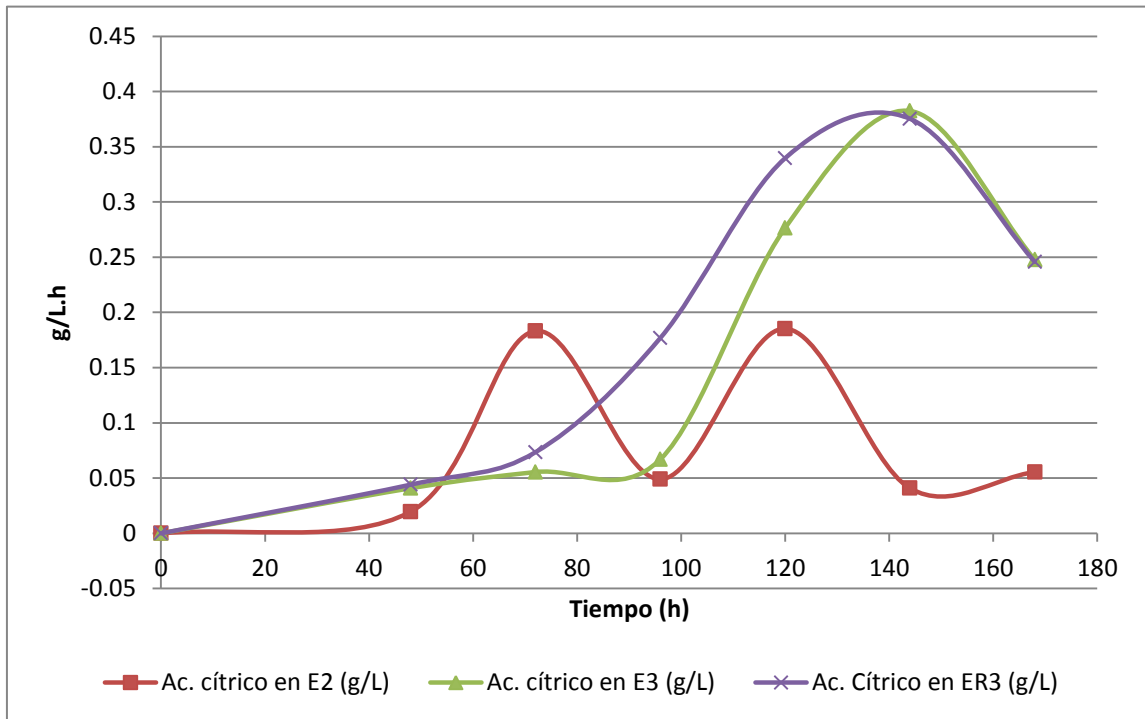


Fig. N° 21: Curva de resultados de Concentración de Acido Cítrico Vrs Tiempo (horas) para Ensayos de Producción de E2, E3 y ER3.

En la figura N° 21 permite observar la tendencia de los valores de concentración de ácido cítrico obtenidos durante los ensayos E2, E3, y ER3. Los cuales reflejan una tendencia que va en aumento constante desde las 48 horas, específicamente E3 y ER3 alcanzan su máximo valor a las 144 horas; respectivamente 0.3824 g/L en E3 y 0.3724 g/L para ER3 y luego la producción del metabolito decrece nuevamente hacia las 168 horas del proceso de fermentación.

En el ensayo E2 se observa un comportamiento que varía entre incrementos y decrementos de producción de ácido cítrico. Siendo las concentraciones obtenidas muy bajas con respecto al resto de los ensayos, cuyo valor máximo producido fue de 0.1853 g/L, lo que indica que las condiciones dadas de pH para un nivel de 3 no es la adecuada para el proceso de fermentación con este tipo de sustrato.

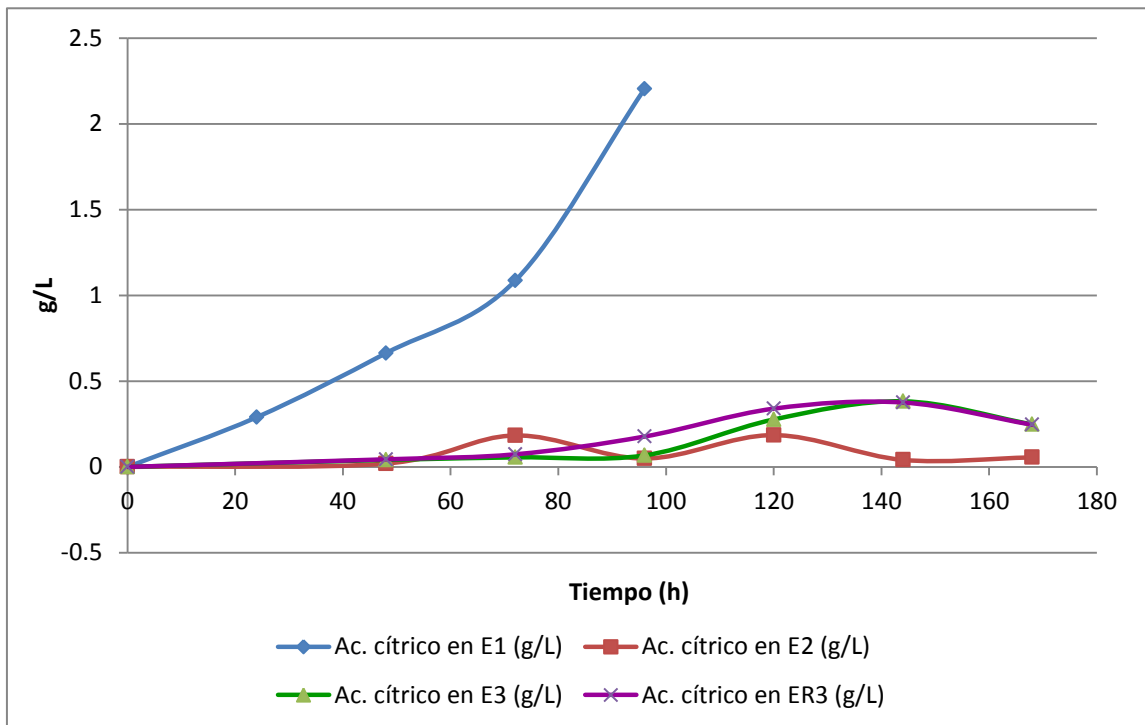


Fig. N° 22: Curva de Resultados de Concentración de Acido Cítrico Vrs Tiempo (horas) para Ensayos de Producción de E1, E2, E3 y ER3.

Figura N° 22: Muestra las concentraciones de ácido cítrico obtenidas durante el proceso de fermentación con respecto al tiempo; para los ensayos E1, E2, E3 y ER3. Es de notable apreciación la concentración de ácido cítrico obtenida de forma acelerada en el ensayo E1 a pH 4, la cual fue de 2,2026 g/L a las 96 horas del proceso. Es importante mencionar que el lote de suero lácteo con el que se trabajó en este ensayo no tuvo tratamiento previo en lo que se refiere al desnatado, remoción de grasa láctea, colado y filtrado como se procedió con los otros tres lotes del estudio, razón por la que se le ha considerado como un medio más complejo y rico en nutrientes, lo que permitió un mayor crecimiento microbiano y una producción acelerada del metabolito.

No obstante la gran cantidad de sólidos en suspensión y lo espeso del medio no permitió la cuantificación precisa de biomasa obtenida, impidiendo el control de este parámetro cinético; además de generar un desequilibrio de pH arriba de 4.5 a partir de las 120 horas por lo que no se obtuvo las lecturas restantes del ensayo para la producción de ácido cítrico.

Dados los inconvenientes mencionados y las limitantes de trabajo en el área de laboratorio, se consideró que el proceso fermentativo E1 no era reproducible en esta investigación, Sin embargo se tomó en cuenta para llevar a cabo en análisis de resultados dado que en efecto, sí hubo producción de ácido cítrico.

5.2 ANÁLISIS DE PROCESOS FERMENTATIVOS E1, E2, E3 Y ER3

Se describe de manera grafica el comportamiento cinético de fermentación y se hace una comparación de cada una de las variables como son biomasa producida, nivel de pH, grados brix, azúcares consumidos y metabolito producido, experimentando con valores diferentes de pH, y la adición de un componente enriquecedor el cual favorece la producción del metabolito.

El proceso fermentativo E1 fue trabajado a pH 4.0 bajo las condiciones de fermentación ya establecidas; para el proceso fermentativo E2, el suero de leche fue trabajado a pH 3.0 y para el proceso fermentativo E3 a parte de tener un medio tan complejo como lo es el suero de leche lleva como sustancia enriquecedora KH_2PO_4 en un medio a pH 4.0. Tanto en los procesos fermentativos E1 y E2 no cuenta con la adición de sustancias enriquecedoras, pero si con diferente valor de pH para cada medio de fermentación.

Es de mencionar que en cada uno de los procesos fermentativos el microorganismo inicio su fase de crecimiento consumiendo los azúcares simples presentes en el medio, lo que origino un aumento en el crecimiento, éste, al agotarse estos azúcares empezó a consumir el resto de los disacáridos presentes en el medio, originando una cinética desordenada, fenómeno que se conoce también como crecimiento diáuxico, lo que ocasiono que en E3 y ER3 no se apreciaran completamente las fases de crecimiento.

5.3 DETERMINACION DE BIOMASA POR PESO SECO

Tabla N°14: Resultados del análisis de muestras por el método de peso seco durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Biomasa (g/ml)	Tiempo (h)	ln X (g/L)
1.121	0	0.114221
---	---	---
1.312	48	0.271553
1.542	72	0.433080
2.409	96	0.879212
2.739	120	1.007593
3.428	144	1.231977
4.323	168	1.463950

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

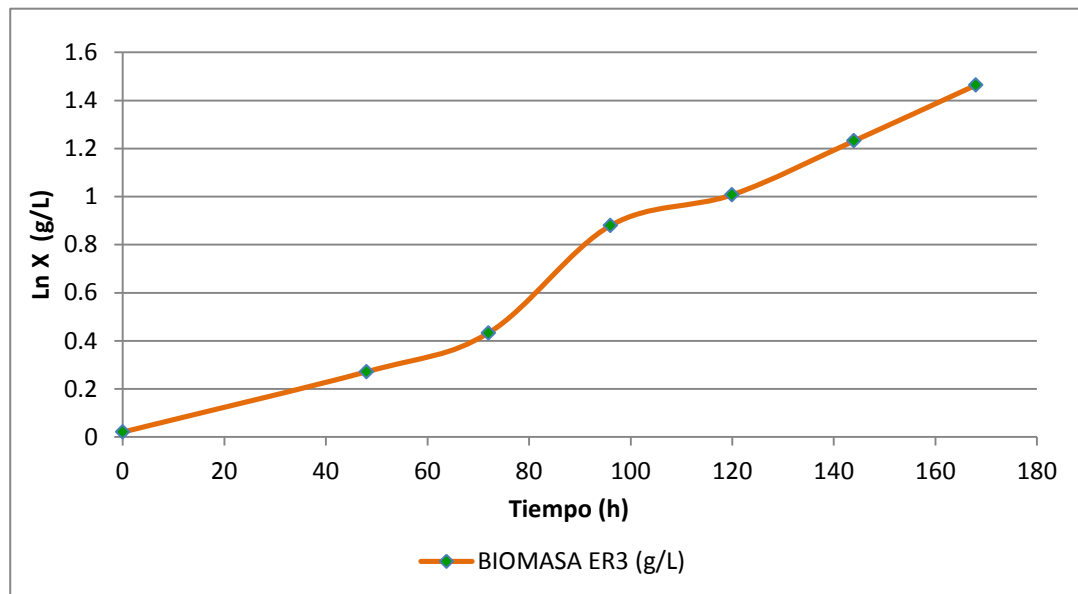


Fig. N° 23: Curva de Peso Seco Ln X Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Acido Cítrico.

La figura N° 23: muestra el aumento ordenado de cada uno de los componentes celulares con relación al tiempo de 0 a 72 horas el microorganismo se va duplicando en una forma lenta debido a la adaptación en el medio, ya que en los primeros días que ocurre la fermentación el hongo necesita desdoblar la lactosa para obtener una fuente de energía y así poder multiplicarse, seguidamente de 72 a 168 horas el microorganismo se reproduce a una velocidad que es la mayor de todas las fases de crecimiento esta se ve favorecida por la complejidad del medio y las condiciones proporcionadas.

5.3.1 VELOCIDAD VOLUMETRICA DE BIOMASA POR PESO SECO

$$\mu = \frac{\text{Ln}x_2 - \text{Ln}x_1}{t_2 - t_1} = \frac{d\text{Ln}x}{dt}$$

μ : velocidad volumétrica (g/ L.h)

x_2 : gramos de biomasa en tiempo final

x_1 :gramos de biomasa en tiempo inicial

t_1 : tiempo inicial

t_2 :tiempo final

Ejemplo para t = 72 horas. (Ver pág.109)

$$\mu = \frac{0.433080 - 0.271553}{72 - 48} = \frac{dL_{nx}}{dt}$$

$$\mu = 0.006730(g / L.h)$$

Tabla N° 15: Resultados de velocidad volumétrica de biomasa por peso seco durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Tiempo (h)	Velocidad volumétrica (g/L. h)
0	0.000
48	1.045 x10 ⁻²
72	6.730 x10 ⁻³
96	1.859 x10 ⁻²
120	5.349 x10 ⁻³
144	9.349 x10 ⁻³
168	9.666 x10 ⁻³

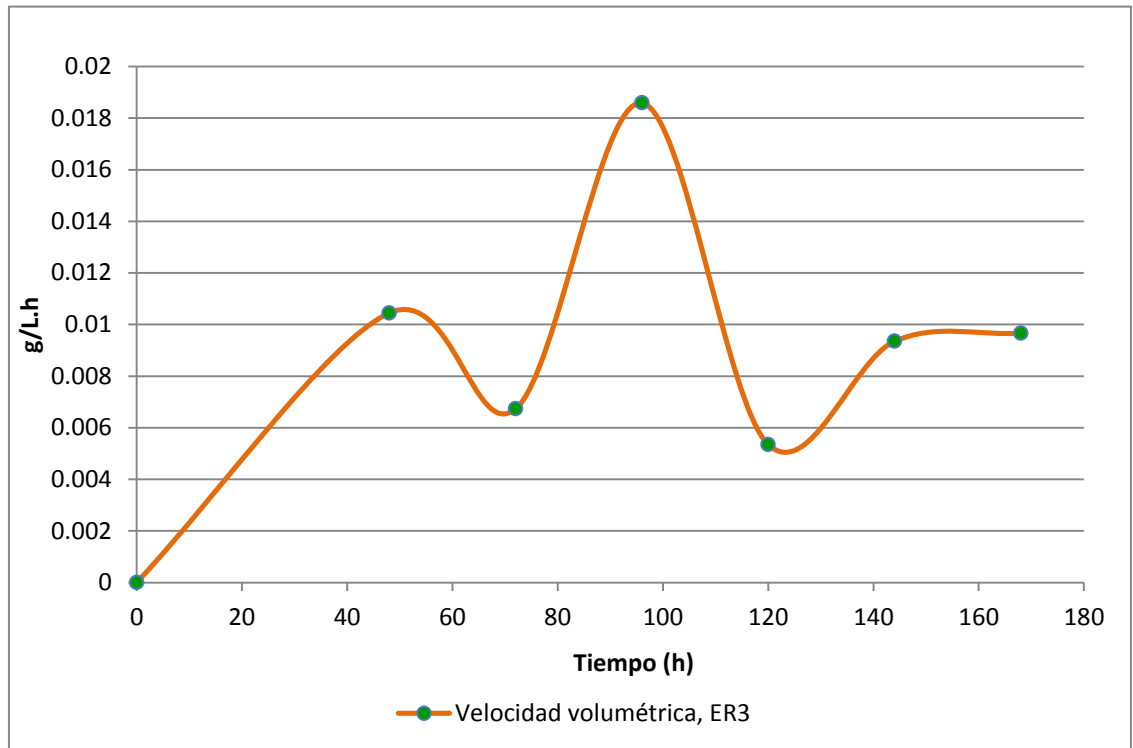


Fig. N° 24: Curva de Velocidad Volumétrica de Biomasa (g/L.h) Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Acido Cítrico.

La figura N° 24: muestra el comportamiento del crecimiento celular microbiano con relación al tiempo. El incremento ordenado de cada componente celular en un medio complejo se ve claramente afectado por las etapas mismas del proceso fermentativo notándose que cada etapa describe su propia cinética. Se puede observar que tanto en la etapa de 48 a 72 horas como en la de 96 a 120 horas muestran una declinación sin tendencia a muerte que luego se observa un crecimiento de 72 a 96 horas y de 120 a 144 horas y la máxima velocidad volumétrica se observa de las 96 horas, para luego llegar a una fase estacionaria que se logra contemplar hasta las 168 horas que dura el análisis.

5.3.2 VELOCIDAD ESPECÍFICA DE BIOMASA POR PESO SECO

$$\mu' = \frac{1}{x} \times \frac{dLnx}{dt}$$

Donde :

μ' : velocidad específica

x: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$\frac{dx}{dt}$: velocidad volumétrica de biomasa

Ejemplo para t = 72 horas. (Ver pág. 109 y 111)

$$\mu' = \left[\frac{1}{1.542} \times 6.730 \times 10^{-3} \right] = 4.364 \times 10^{-3} \text{ g / L.h}$$

Tabla N° 16: Resultados de velocidad específica de biomasa por peso seco durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Tiempo (h)	Velocidad específica (g/L.h)
0	0
48	7.964×10^{-3}
72	4.364×10^{-3}
96	7.716×10^{-3}
120	1.953×10^{-3}
144	2.727×10^{-3}
168	2.236×10^{-3}

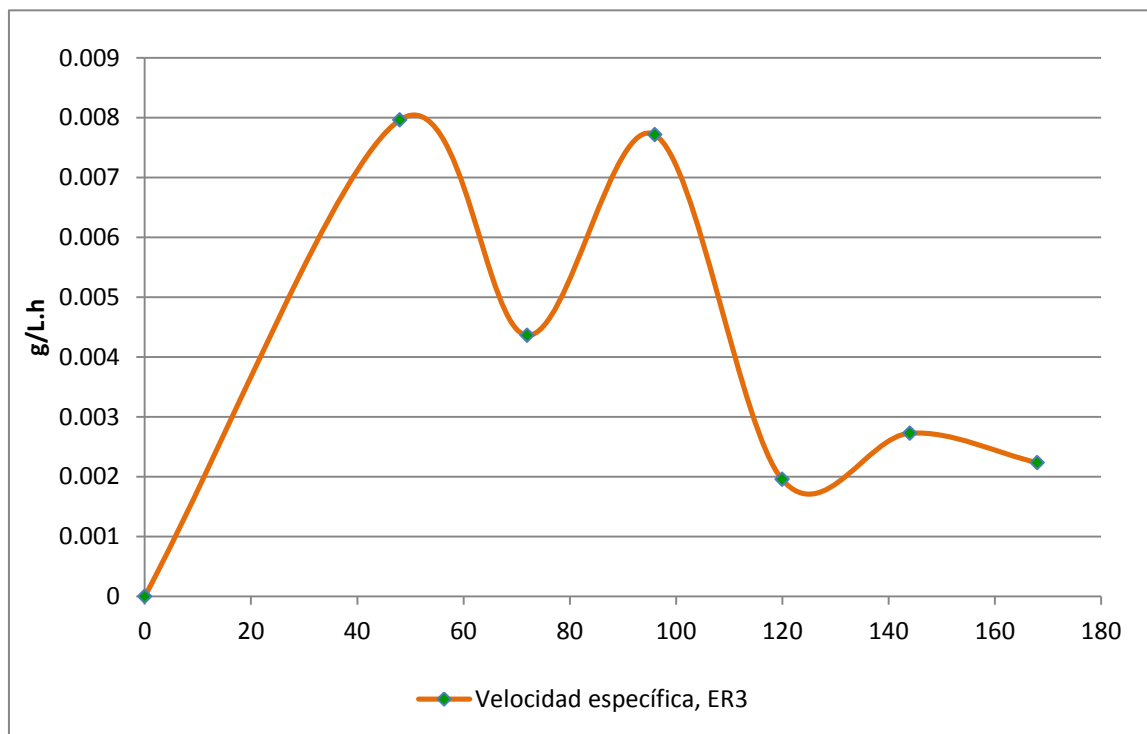


Fig. N° 25: Curva de Velocidad Específica de Biomasa (g/Lh) Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Acido Cítrico.

La figura N° 25: se observa el comportamiento cinético de generación de células microbianas para cada tiempo específico durante el proceso de

producción de ácido cítrico. La fase exponencial se lleva a cabo de 0 a 48 horas; alcanzando su máximo valor de velocidad específica a las 48 horas, de 48 a 72 horas se observa una declinación en la velocidad específica, sin tendencia a muerte, para luego observar un crecimiento de 72 a 96 horas que posteriormente muestra una declinación en la velocidad específica hasta finalizar el período de análisis de 168 horas.

5.4 CONSUMO DE SUSTRATO

5.4.1 CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA

Tabla N° 17: Resultados de curva estándar de glucosa mediante la aplicación del método fenol sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales.

Tubo N°	MI de sln. estándar	Concentración (mg/ml)	Absorbancia (nm)
1	0.0	0.00	0.000
2	0.1	0.02	0.048
3	0.2	0.04	0.152
4	0.4	0.08	0.179
5	0.6	0.12	0.351
6	0.8	0.16	0.324
7	1.0	0.20	0.390

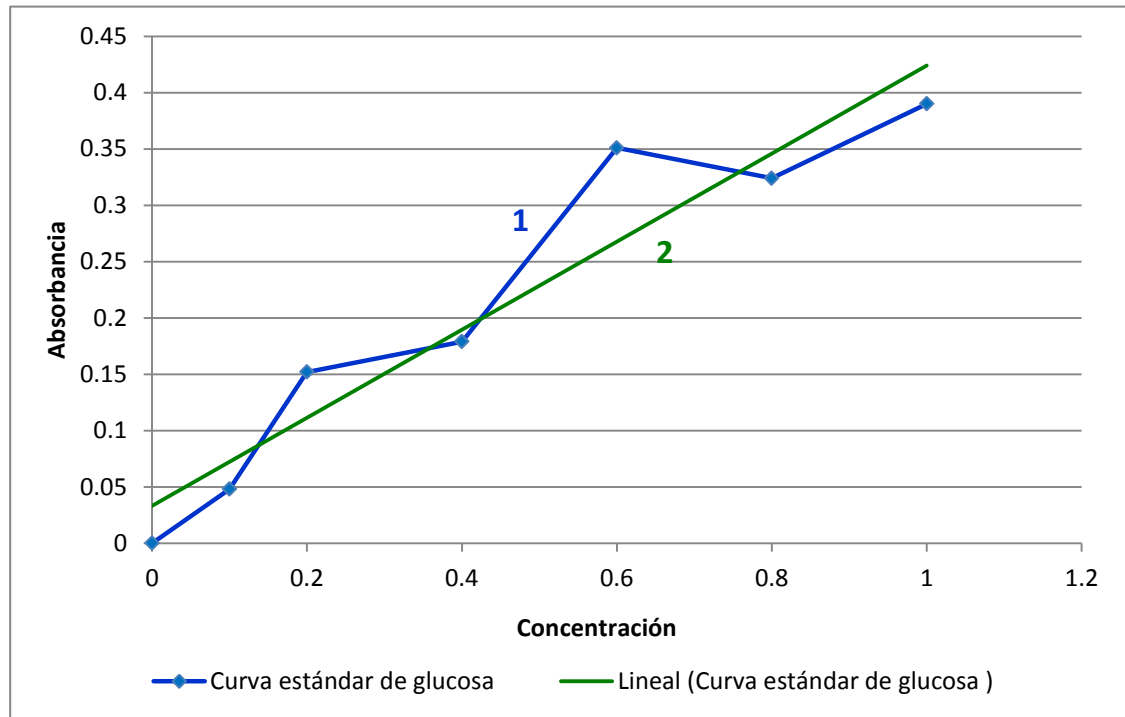


Fig. N° 26: Curva Estándar de Glucosa Anhidra

- Curva N° 1: Representa el resultado de los datos experimentales de la curva de glucosa
- Curva N° 2: Representa la curva idealizada de glucosa anhidra (datos teóricos) y la ecuación obtenida es $Y = 0.390751X + 0.033239$

La figura N° 26: representa la curva idealizada de glucosa, la cual proporciona los datos corregidos por el método de mínimos cuadrados; para interpolar la absorbancia (y) de las muestras estándar y determinar la concentración (x).

Al aplicar regresión lineal la ecuación obtenida es $Y = 0.390751X + 0.033239$

Ejemplo: para Mx N° 2; A = 0.048, y si $Y = A$

Al despejar X se tiene:

$$X = \frac{Y - 0.033239}{0.390751}$$

$$X = \frac{0.048 - 0.033239}{0.390751} = 0.037776 \text{ mg/mL}$$

Tabla N° 18: Resultados de la aplicación de la regresión lineal al análisis de muestras por el método de fenol sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales.

n° de Mx	mL de Sln.	Absorbancia	Regresión lineal $y = 0.3907x + (0.0332)$ x= mg/ml	Concentración (mg/ml)
1	0.0	0.000	0.000	0.0000
2	0.2	0.048	0.037776	0.0378
3	0.4	0.152	0.303930	0.3039
4	0.6	0.179	0.373028	0.3730
5	0.8	0.351	0.813206	0.8132
6	1.0	0.324	0.744108	0.7441

5.4.2 CALCULO DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

Ejemplo: Para ensayo fermentativo ER3 a las 144 horas. (Ver anexo N° 9)

Datos del Standard: (Ver pág. N° 115)

Longitud de onda utilizada: 490nm.

Standard utilizado: Sln de Glucosa anhidrida 0.2 mg / mL

Concentración del estándar utilizado para el tubo N° 5: 0.12 mg / mL

Absorbancia del estándar utilizado para el tubo N° 5: 0.351 nm

Datos de muestra: (Ver pág. N° 99)

Absorbancia de muestra N° 7 para el proceso fermentativo ER3 a las 144 horas:

0.220 nm

$$C_{Mx} = \left(\frac{A_{Mx}}{A_{St}} \right) C_{St} * FD$$

$$C_{Mx} = \left(\frac{0.220}{0.351} \right) 0.12 \frac{mg}{mL} * 20$$

$$C_{Mx} = 1.5043 \frac{mg}{mL}$$

Tabla N° 19: Resultados de concentración de azúcares totales durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	*. * Concentración (g/L)
0	0.102	0.5368	0.5368
24	---	---	---
48	0.113	0.5947	0.5947
72	0.187	1.6715	1.6715
96	0.644	6.6051	6.6051
120	0.204	1.3949	1.3949
144	0.220	1.5043	1.5043
168	0.522	5.3538	5.3538

(--): Hora en la que no hubo recolección de muestras

(*.*): Ver datos de conversión de unidades en (Ver anexo N° 9)

5.4.3 VELOCIDAD VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

$$Q_s = \frac{S_2 - S_1}{t_2 - t_1} = -\frac{ds}{dt}$$

Donde:

Q_s : velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g / L.h)

S_2 : Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo final

S_1 : Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo inicial

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Las unidades son : gramos de sustrato consumido / Litros* hora

Ejemplo para $t = 48$ horas

$$Q_s = \frac{0.594737 - 0.536842}{48 - 0} = -\frac{dS}{dt}$$

$$Q_s = 0.001206 \text{ g/L.h}$$

Tabla N° 20: Resultados de velocidad volumétrica de consumo de sustrato durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Q_s (g/Lh)
0	0.536842	0
48	0.594737	0.001206
72	1.671508	0.044867
96	6.605128	0.205567
120	1.394872	-0.217092
144	1.504273	0.004558
168	5.353846	0.160396

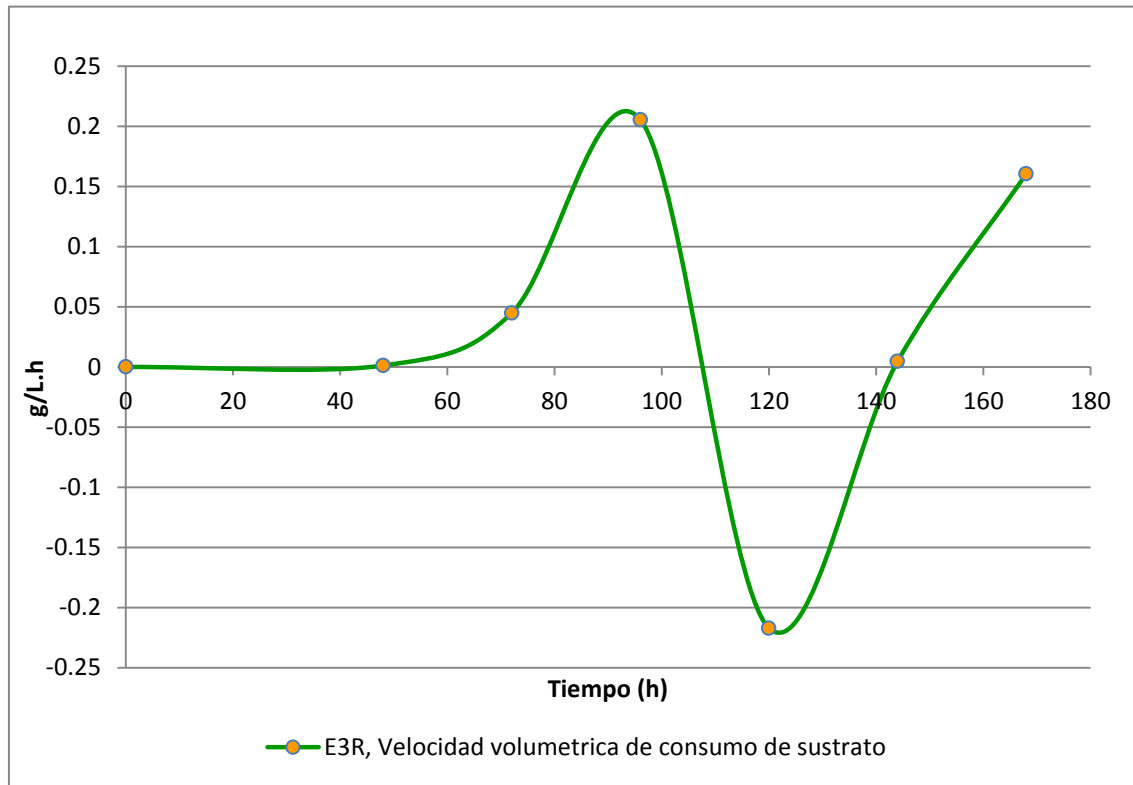


Fig. N° 27: Curva de Velocidad Volumétrica de Consumo de Sustrato (g/L.h) Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Acido Cítrico.

La fig. N° 27: nos muestra el comportamiento que sigue la cepa del ***Aspergillus niger*** ATCC 16404 en cuanto a velocidad de consumo de sustrato en el medio de fermentación que es el suero de leche para producción de ácido cítrico. El valor de Q_s en el intervalo de tiempo de 0 a 96 horas es positivo lo que indica que el hongo durante este tiempo desdobla lactosa a azúcar simple como la glucosa y la galactosa aumentando su concentración en el medio de fermentación por lo que se observa una acumulación de azúcares. Las grafica muestra que a partir de las 96 horas la concentración de azúcares tiende a disminuir notablemente ocurriendo el máximo consumo de sustrato en el medio

de fermentación a las 120 horas y manteniendo valores negativos hasta 144 horas. A partir de las 144 horas se observa un aumento en la velocidad volumétrica de consumo de sustrato esto se debe a que por la complejidad del medio por lo que este crecimiento se ve influenciado debido al crecimiento en dos etapas o crecimiento diáuxico, que utiliza dos sustratos de manera secuencial, con una fase larga durante el cambio de sustratos; por lo que en este caso la galactosa no sería utilizada para el crecimiento hasta no haber agotado la glucosa del medio, por lo cual el hongo utiliza enzimas para degradar moléculas complejas hasta convertirlas a más pequeñas, lo que indica que el sustrato es suficiente para el aumento del metabolismo del hongo.

5.4.4 VELOCIDAD ESPECIFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

$$q_s = -\frac{1}{x} \times \left(-\frac{ds}{dt} \right)$$

Donde:

q_s : velocidad específica de consumo de sustrato(g/L.h)

$-\frac{ds}{dt}$: velocidad volumétrica de consumo de sustrato

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

Las unidades son : gramos de sustrato consumido / gramos de biomasa * hora

Ejemplo para t = 144 horas (Ver págs. 109 y 120)

$$q_s = -\frac{1}{3.428} \times (0.004558)$$

$$q_s = -0.001330 \text{ (g/L.h)}$$

Tabla N° 21: Resultados de velocidad específica de consumo de sustrato durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	qs (g/L.h)
0	0.536842	0
48	0.594737	-0.000919
72	1.671508	-0.029097
96	6.605128	-0.085333
120	1.394872	0.07926
144	1.504273	-0.00133
168	5.353846	-0.037103

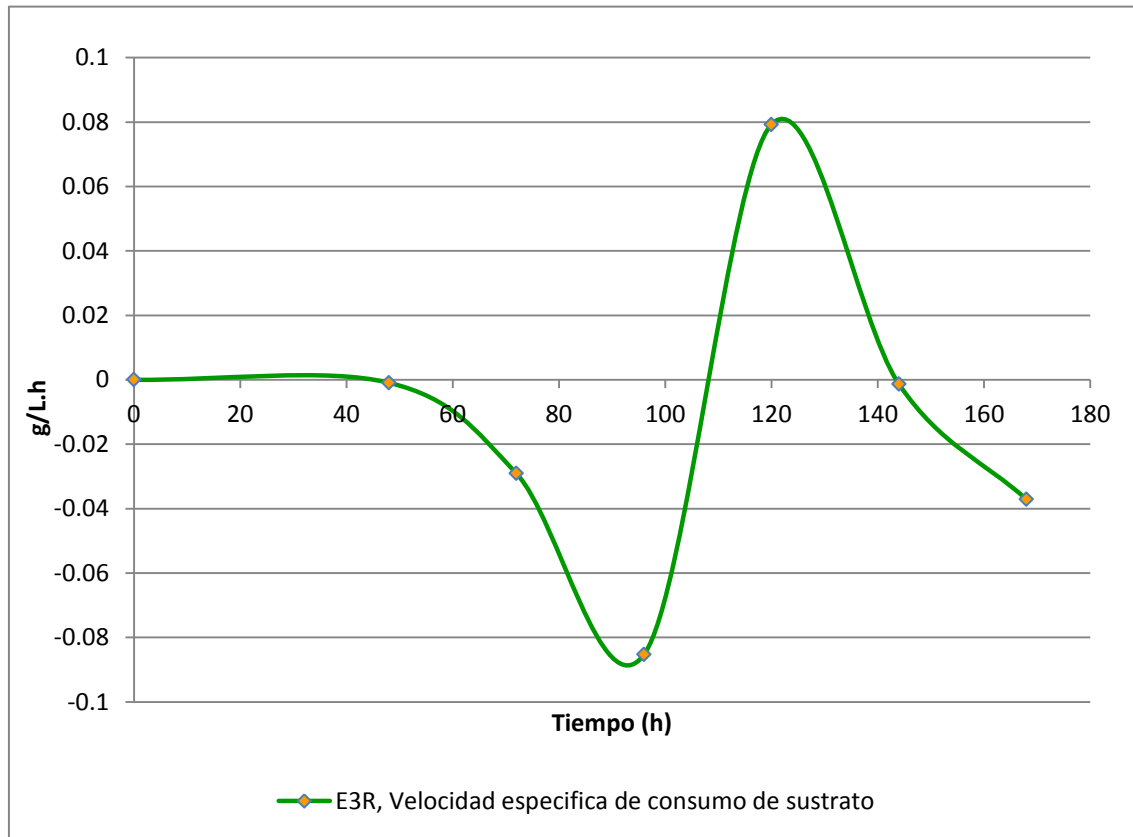


Fig. N° 28: Curva de Velocidad Específica de Consumo de Sustrato (g/L.h) Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Acido Cítrico.

La figura N° 28: describe la relación existente entre miligramos de sustrato consumido / miligramos de biomasa que se forman por litro de medio de fermentación en un tiempo específico. En las primeras 96 horas los miligramos de sustrato consumido son menores que los miligramos de biomasa que se forma esto es debido a la actividad principal del hongo de desdoblar la lactosa a azúcares simples para su posterior utilización como fuente de energía para su reproducción, notablemente se vuelve a apreciar un crecimiento diáuxico entre las 96 y 120 horas.

A partir de las 96 horas es mayor la cantidad de miligramos de sustrato consumido que los miligramos de biomasa que se forman obteniéndose la máxima velocidad específica de consumo de sustrato a las 120 horas de haber iniciado la fermentación aparte de observar un crecimiento diáuxico en el grafico. Lo que indica que en dicho tiempo los miligramos de sustrato consumido han alcanzado su máximo valor con respecto a los miligramos de biomasa que se han formado.

5.5 DETERMINACIÓN DE RENDIMIENTO DE ACIDO CÍTRICO.

5.5.1 CURVA ESTANDAR DE ACIDO CITRICO.

Tabla N° 22: Resultados de curva estándar de ácido cítrico mediante el método Saffran - Densted para la cuantificación de ácido cítrico.

Tubo N°	MI de sln. estándar	Concentración (mg/ml)	Absorbancia (nm)
1	0.0	0.00	0.000
2	0.2	0.08	0.049
3	0.4	0.16	0.076
4	0.6	0.24	0.125
5	0.8	0.32	0.163
6	1.0	0.40	0.227

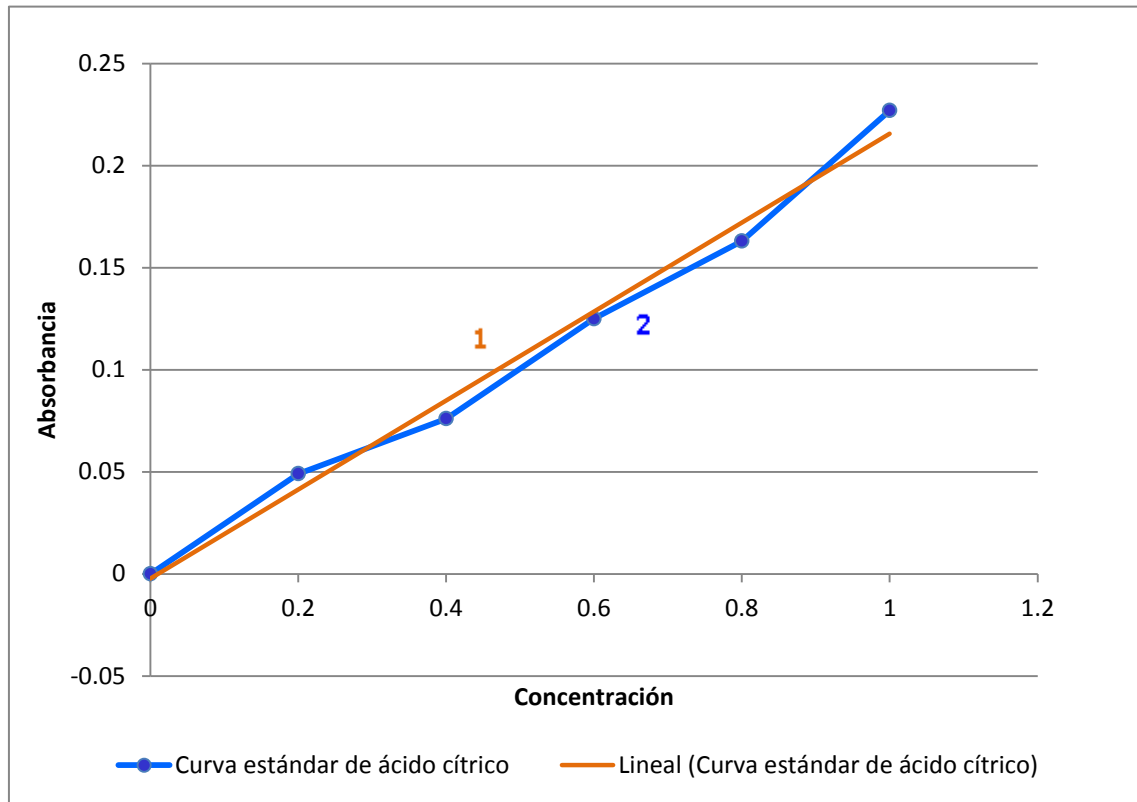


Fig. N° 29: Curva Estándar de Ácido Cítrico

- Curva N° 1: Representa el resultado de los datos experimentales de la curva estándar de ácido cítrico
- Curva N° 2: Representa la curva idealizada de ácido cítrico (datos teóricos) y la ecuación obtenida es $Y = 0.218X - (0.0023)$.

La figura N° 29: representa la curva idealizada de ácido cítrico la cual proporciona los datos corregidos por el método de mínimos cuadrados; para interpolar la absorbancia (y) de las muestras estándar y determinar su concentración (x).

Al aplicar regresión lineal la ecuación obtenida es $Y = 0.218X - (0.0023)$

Ejemplo: para Mx N° 2; A = 0.049, y si $Y = A$

Al despejar X se tiene:

$$X = \frac{Y + 0.0023}{0.218}$$

$$X = \frac{0.049 + 0.0023}{0.218}$$

$$X = 0.2355 \text{ mg / ml}$$

Tabla N° 23: Resultados de la aplicación de la regresión lineal al análisis de muestras por el método de Saffran – Densted para la cuantificación de ácido cítrico.

n° de Mx	mL de Sln.	Absorbancia	Regresión lineal $y = 0.218x - (-0.0023)$ $x = \text{mg/ml}$	Concentración (mg/ml)
1	0.0	0.000	0.0000	0.0000
2	0.2	0.049	0.2355	0.2355
3	0.4	0.076	0.3593	0.3593
4	0.6	0.125	0.5841	0.5841
5	0.8	0.163	0.7584	0.7584
6	1.0	0.227	1.0520	1.0520

5.5.2 CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE ACIDO CITRICO POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO.

Ejemplo: para ensayo fermentativo ER3 a las 144 horas.

Datos del estándar: (Ver pág. N° 125)

Longitud de onda utilizada: 418nm.

Estándar utilizado: Sln. de ácido cítrico 0.4 mg / mL

Concentración del estándar a utilizar para el tubo N° 6: 0.40 mg / mL

Absorbancia del estándar a utilizar para el tubo N° 6: 0.227

Datos de muestra: (Ver pág. N° 102)

Absorbancia de muestra N° 7 para el proceso fermentativo ER3 a las 144 horas:
0.213 nm

$$C_{Mx} = \left(\frac{A_{Mx}}{A_{St}} \right) C_{St}$$

$$C_{Mx} = \left(\frac{0.213}{0.227} \right) 0.4 \frac{mg}{mL}$$

$$C_{Mx} = 0.3753 \frac{mg}{mL}$$

Tabla N° 24: Resultados de concentración de ácido durante el proceso de fermentación ER3 para producción de ácido cítrico.

Tiempo (h)	Absorbancia	Concentración (mg/mL)	Concentración (g/L)
0	0.000	0.0000	0.0000
24	---	---	---
48	0.027	0.0441	0.0441
72	0.045	0.0735	0.0735
96	0.084	0.1768	0.1768
120	0.173	0.3396	0.3396
144	0.213	0.3753	0.3753
168	0.128	0.2458	0.2458

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

5.5.3 VELOCIDAD VOLUMETRICA DE FORMACION DE PRODUCTOS

$$Q_p = \frac{P_2 - P_1}{t_2 - t_1} = \frac{dp}{dt}$$

Donde:

Q_p : Velocidad volumétrica de producción de ácido cítrico (g / L.h)

P_2 : Concentración (g/L) de ácido cítrico en el tiempo final

P_1 : Concentración (g/L) de ácido cítrico en el tiempo inicial

t_2 : tiempo final

t_1 : tiempo inicial

Las unidades son : gramos de producto formado / Litro.hora

Ejemplo para $t = 144$ horas.

$$Q_p = \frac{0.375330 - 0.339632}{144 - 120} = \frac{dp}{dt}$$

$$Q_p = 0.001487 \text{ g / L.h}$$

Tabla N° 25: Resultados de velocidad volumétrica del proceso fermentativo ER3 para producción de ácido cítrico.

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	Qp (g/L.h)
0	0	0
48	0.044082	0.000918
72	0.073469	0.001224
96	0.176842	0.004307
120	0.339632	0.006783
144	0.37533	0.001487
168	0.24576	-0.005399

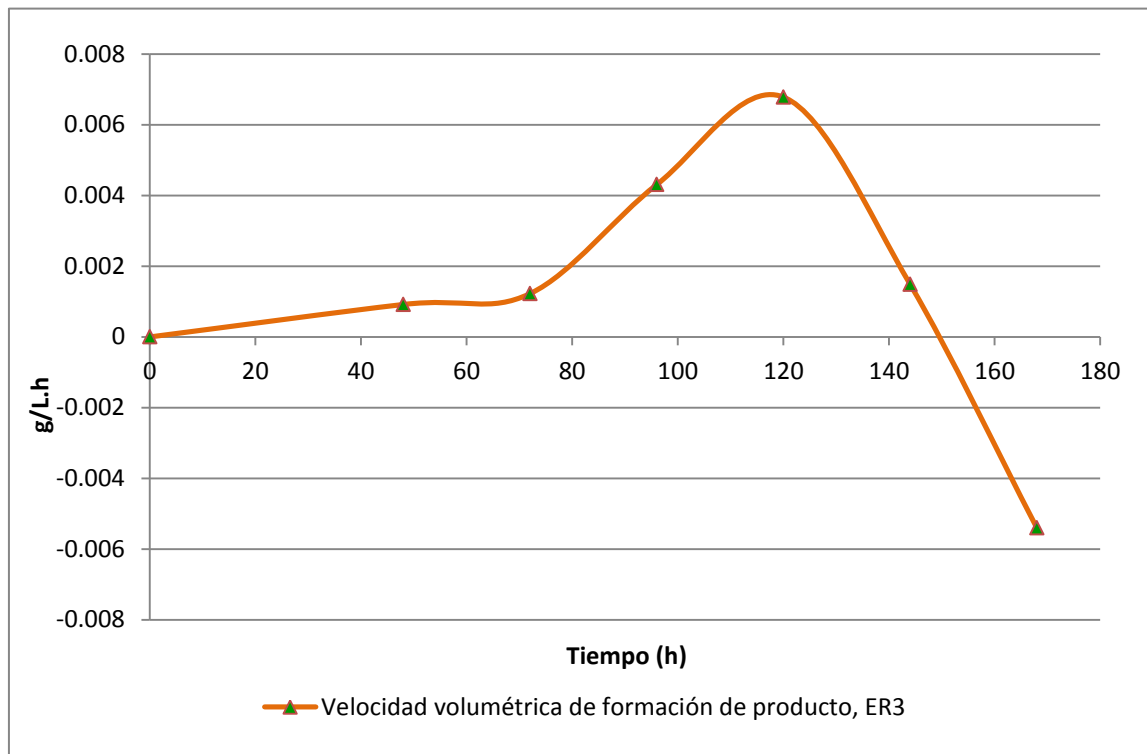


Fig. N° 30: Curva de Velocidad Volumétrica de Producción de Acido Cítrico Vrs Tiempo (g/L. h)

En la Figura N° 30: representa la tendencia de producción de ácido cítrico expresada en g /L. h presentes en las muestras analizadas en los diferentes tiempos. A partir de las 0 a 96 horas se observa un crecimiento exponencial de las células microbiana, a las 120 horas se obtiene la máxima velocidad volumétrica de producción de ácido cítrico, luego de las 120 horas a las 144 horas se observa una disminución en la velocidad volumétrica de formación de ácido cítrico la cual esta relacionada de manera directa al tiempo en que es desdoblada la lactosa por el microorganismo para poder consumir los azúcares del medio y de esta forma producir ácido cítrico; ya que entre las 120 y las 144 horas ocurrió la mayor producción de este metabolito.

5.5.4 VELOCIDAD ESPECIFICA DE FORMACION DE PRODUCTOS

$$q_p = \frac{1}{x} \times \frac{dp}{dt}$$

Donde:

q_p : velocidad específica de producción de ácido cítrico

x : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

dp/dt : velocidad volumétrica de producción de ácido cítrico

Las unidades son : gramos de producto formado / gramos de biomasa x hora

Ejemplo para $t = 144$ horas. (Ver págs. 109 y 130)

$$q_p = \frac{1}{3.428} \times (0.001487)$$

$$q_p = 0.000434 \text{ g/L. h}$$

Tabla N° 26: Resultados de velocidad específica del proceso fermentativo
ER3 para producción de ácido cítrico

Tiempo (h)	Concentración (g/L)	qp (g/L.h)
0	0	0
48	0.044082	0.000699
72	0.073469	0.000793
96	0.176842	0.001788
120	0.339632	0.002476
144	0.37533	0.000434
168	0.24576	-0.001249

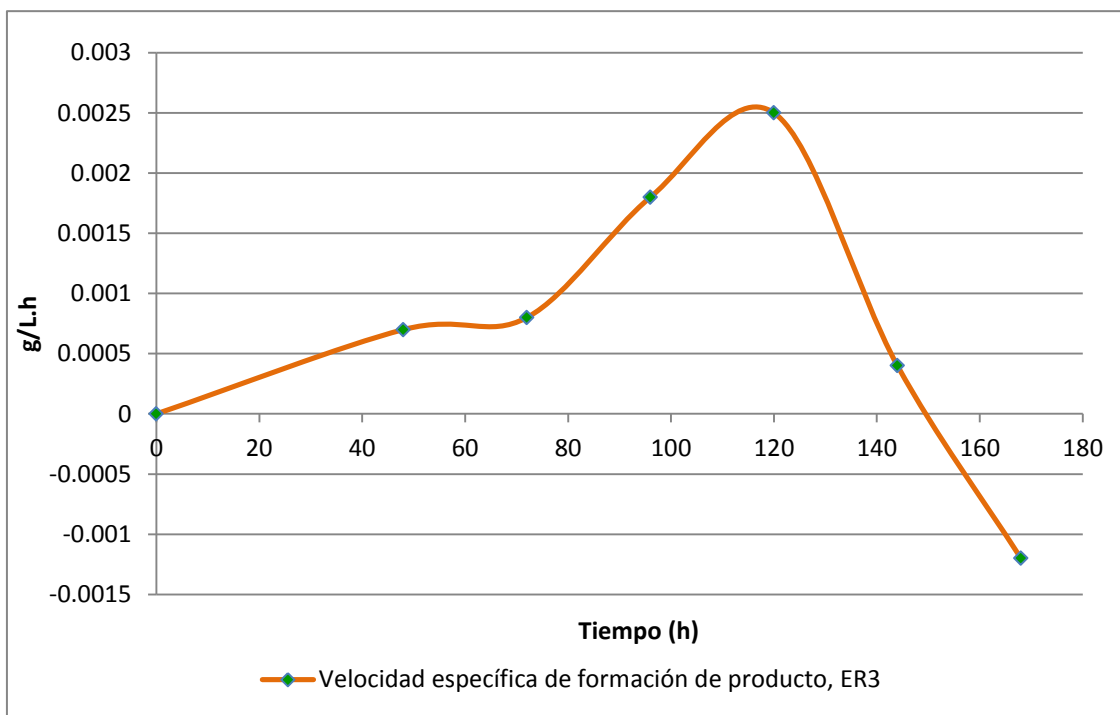


Fig. N° 31: Curva de Velocidad Específica de Producción de Acido Cítrico Vrs. Tiempo (g/L. h)

La Figura N° 31: muestra el comportamiento que experimenta la formación de producto para un tiempo específico. Se puede observar que a las 120 horas se alcanza el máximo valor de velocidad específica el cual es dependiente de la utilización de lactosa presente en el medio, a partir de las 144 horas la velocidad específica disminuye hasta entrar en la fase de muerte celular a las 168 horas que dura el análisis.

5.6 RENDIMIENTO EN EL CULTIVO

$$Y_{p/s} = \frac{P_2 - P_1}{S_2 - S_1} = \frac{dp}{-ds}$$

Donde:

$Y_{P/S}$: gramos de ácido cítrico / gramos de sustrato consumido

dp : gramos de ácido cítrico

ds : gramos de sustrato consumido

P_2 : Concentración (g/L) de ácido cítrico en el tiempo final

P_1 : Concentración (g/L) de ácido cítrico en el tiempo inicial

S_2 : Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo final

S_1 : Concentración (g/L) de sustrato en el tiempo inicial

Ejemplo: para un t = 144 (Ver págs. 119 y 129)

$$Y_{p/s} = \frac{(0.3753 - 0.3396)}{(1.5043 - 1.3949)}$$

$Y_{p/s} = 0.326325$ Gramos de producto/gramos de sustrato consumido.

Tabla N° 27: Resultados de rendimiento de ácido cítrico en el medio de fermentación.

Tiempo (h)	g/L de sustrato en ER3	g de producto /g de sustrato consumido ($Y_{p/s}$)
0	0.0536842	0.00
24	---	---
48	0.0594737	0.761658
72	0.1671508	0.027303
96	0.6605128	0.020269
120	0.1394872	-0.031246
144	0.1504273	0.326325
168	0.5353846	0.033641

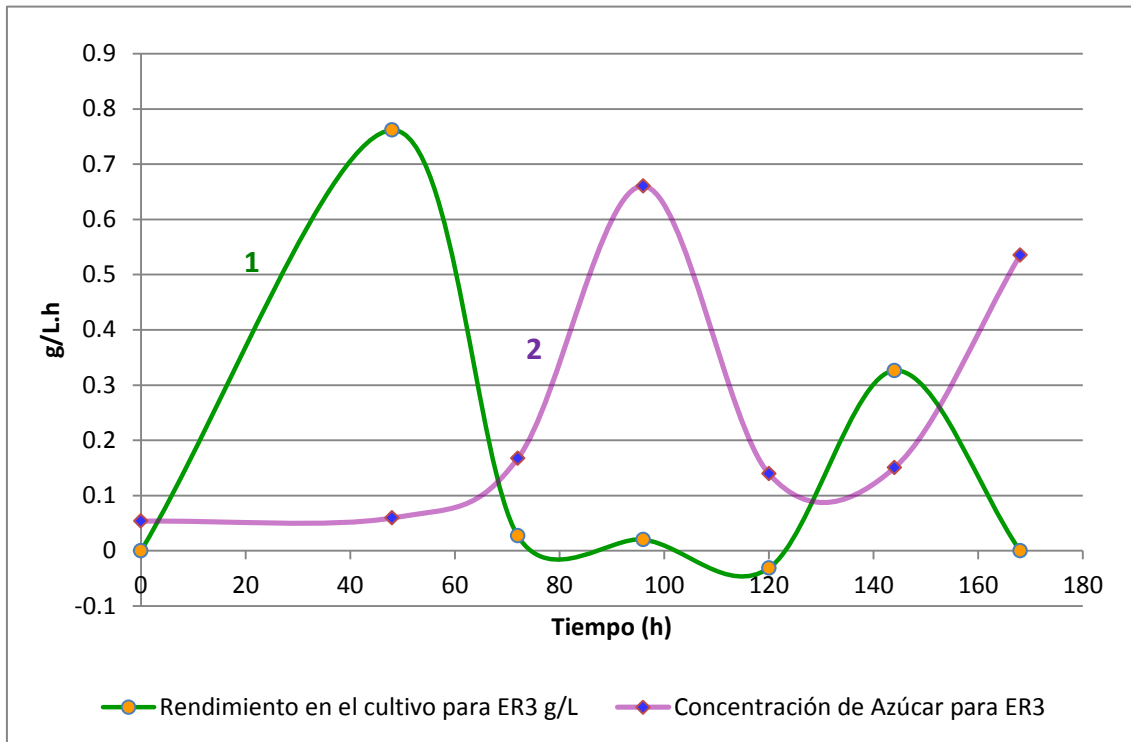


Figura N° 32: Curva de Rendimiento de Producción de Acido Cítrico en el Cultivo Vrs Tiempo (horas).

- Curva N° 1: Resultado obtenido a través de la aplicación de la fórmula de rendimiento en el cultivo ($Y_{p/s}$).
- Curva N° 2: Se obtiene de graficar el resultado de la concentración de azúcar para el proceso fermentativo ER3.

En la figura N° 32: Se observa la relación que existe en cuanto a la formación de producto y el consumo de sustrato (curva N° 1), para obtener una mejor comprensión se incorporó en el grafico la curva N° 2 para lo cual fue necesario reducir los datos obtenidos 10 veces al de su valor real, para ajustar a la misma escala ambas gráficas.

Se puede observar que en el período comprendido de las 0 a las 72 horas, el medio de fermentación inició con una gran cantidad de moléculas complejas y polisacáridos e inmediatamente el hongo comenzó a metabolizar estas moléculas hasta degradarlas a monosacáridos para producir ácido cítrico. En el periodo de 72 a 120 horas, se puede notar que hay un aumento en la concentración de azúcares por lo que no hay una producción de ácido cítrico significativa; a partir de las 120 horas se puede observar que el hongo después de haber consumido parte de la lactosa presente en el medio; éste encuentra otra fuente de carbono para seguir produciendo ácido cítrico, luego a las 144 horas por medio de los resultados obtenidos en la medición de azúcares por el método de Fenol – Sulfúrico se observa el punto en donde hubo una mayor producción de ácido cítrico en el proceso fermentativo

5.7 DETERMINACION DE pH

Tabla N° 28: Resultados de pH durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Nº Muestra	Tiempo (horas)	pH en ER3
1	0	4.2
2	24	---
3	48	4.27
4	72	4.55
5	96	3.97
6	120	3.82
7	144	3.76
8	168	3.78

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

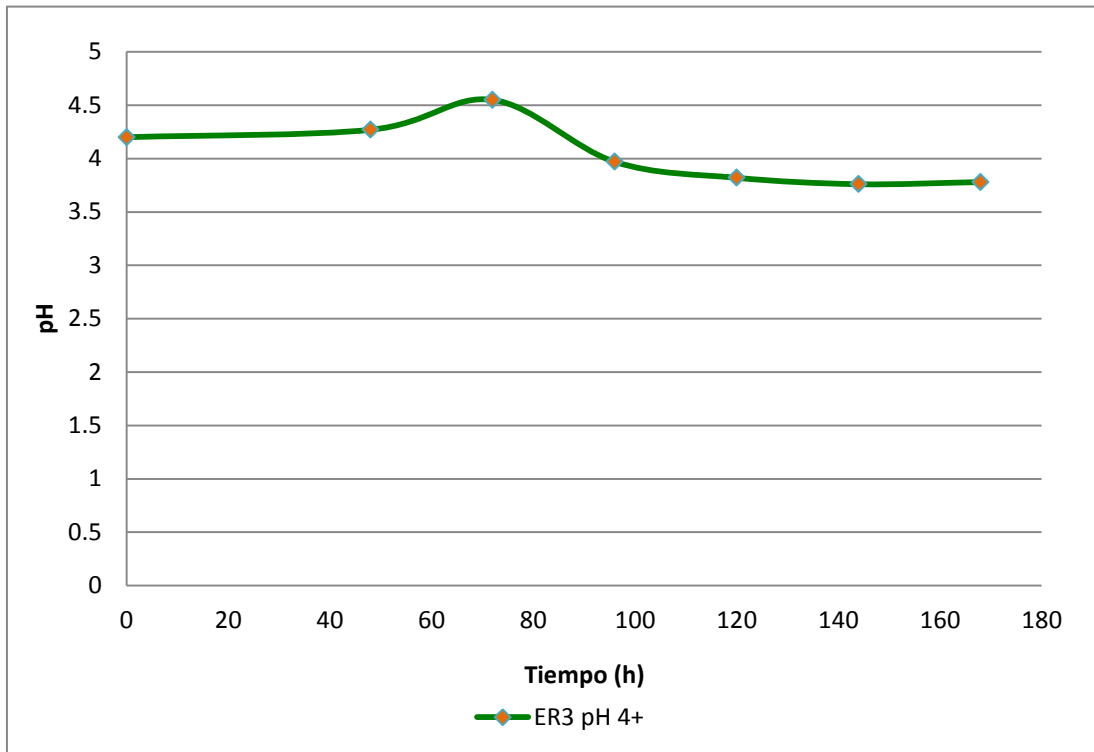


Fig. N° 33: Curva de pH Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Acido Cítrico

Figura N° 33: Muestra el comportamiento de pH respecto al Tiempo durante el proceso cinético de obtención de ácido cítrico para ER3. El cual para las primeras 120 horas observa un incremento en su valor con tendencia a la alcalinidad. El cual es regulado cada 24 horas con ácido clorhídrico al 10% para mantener su valor dentro del rango deseado que es pH 4. A las 144 horas y en adelante el valor del pH decrece y se observa una tendencia inversa es decir hacia la acidez del medio.

5.8 DETERMINACION DE GRADOS BRIX

Tabla N° 29: Resultados de grados brix durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Nº Muestra	Tiempo (horas)	Grados Brix
1	0	9
2	24	---
3	48	8.75
4	72	7.5
5	96	7.25
6	120	7
7	144	7.5
8	168	8

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

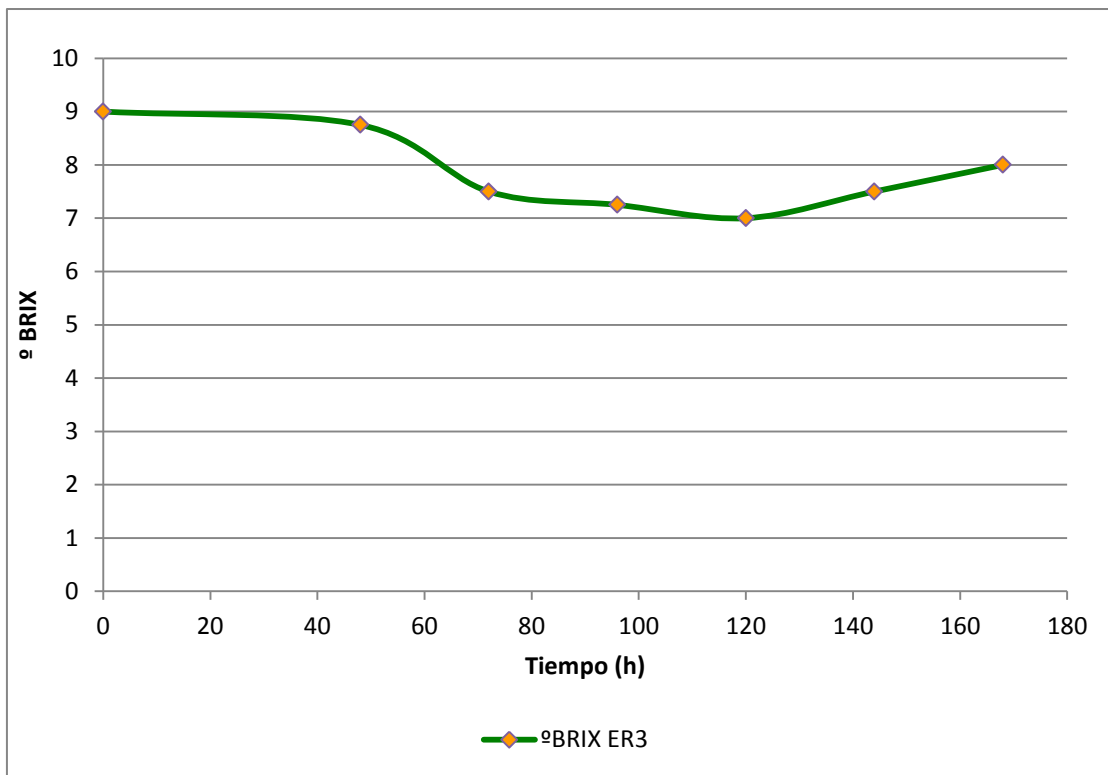


Fig. N° 34: Curva de Grados Brix Vrs Tiempo (horas) para la Producción de Ácido Cítrico.

La Figura N° 34: muestra el comportamiento de grados Brix respecto al Tiempo durante el proceso cinético de obtención de ácido cítrico para ER3. Las lecturas obtenidas en este ensayo, describen una tendencia en decremento durante las primeras 120 horas, a partir de las cuales y hacia el término del proceso fermentativo (168 horas) estos se ven incrementados a la vez que se obtienen las mayores concentraciones del metabolito y se da un nuevo incremento de azúcares y biomasa celular en el medio.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. El suero lácteo es un medio de cultivo muy adecuado para el crecimiento del *Aspergillus niger* ATCC 16404, debido a las condiciones nutricionales requeridas por el microorganismo para la biosíntesis del metabolito ácido cítrico.
2. En el tiempo evaluado para la producción del ácido cítrico (168 horas) la complementación del medio con KH_2PO_4 no presentó ventajas, ya que no hubo un incremento significativo en la producción de ácido cítrico.
3. El comportamiento cinético que se observa en el ensayo E1, comprueba que para fines netos de producción a nivel industrial, no es necesario ni conveniente la remoción de las proteínas y grasa láctea del suero de leche con el fin de lograr un mayor volumen en la producción del ácido cítrico.
4. La cinética microbiana que se observa al utilizar un medio de cultivo tan complejo como el suero de leche y la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16404, concluye que el microorganismo primero se alimenta de moléculas pequeñas como los monosacáridos, después degrada las moléculas más grandes (polisacáridos) para luego alimentarse de moléculas pequeñas, una vez que han sido degradadas las más grandes; fenómeno que se observa en los cambios de concentración de azúcar, descritas en las gráficas presentadas en esta investigación.

5. La evaluación de los parámetros cinéticos y gráficas para la medición de crecimiento microbiano (biomasa), consumo de nutrientes (azúcares), y formación de producto (ácido cítrico), permiten clasificar a la cinética de fermentación desarrollada en el cultivo por lotes, como fermentación del Tipo 1, debido a que el metabolito ácido cítrico fue producido durante el período exponencial del cultivo a medida que se observaba un mayor consumo de sustrato se obtenía una mayor producción del ácido cítrico.
6. El método de Saffran - Densted es oficial y específico para cuantificar espectrofotométricamente la concentración de ácido cítrico. La mayor producción de metabolito reportada en el período evaluado se obtuvo a las 144 horas de haber iniciado el proceso de fermentación; para el proceso E3 fue de 0.38 g/L y para el proceso ER3 fue de 0.37 g/L de ácido cítrico obtenido, respectivamente, trabajando a pH 4.0 con suero lácteo enriquecido con KH_2PO_4 .
7. En el proceso fermentativo E1, este no cumple los parámetros cinéticos para la producción de ácido cítrico considerados para esta investigación. Su comportamiento no es reproducible ni comparable con los ensayos E2, E3 ER3, sin embargo es una experiencia a considerar.
8. La cepa ***Aspergillus niger*** ATCC 16404 en fermentación sumergida con suero de leche como medio de cultivo, para la obtención de ácido cítrico

revelan un bajo rendimiento de producción, en el período evaluado en comparación con otras cepas estudiadas.

9. El suero del leche obtenido por procesos artesanales y semi-industriales, posee una adecuada y rica composición de lactosa, sales minerales, proteínas y grasas; lo que lo vuelve un desecho agroindustrial conveniente para su reaprovechamiento en procesos fermentativos en la producción de metabolitos y de esta manera se evita la contaminación ambiental.
10. La alta disponibilidad y bajo costo del suero de leche, aporta a nivel industrial un equilibrio de rentabilidad entre el volumen de metabolito obtenido y el precio de la materia prima.

CAPTITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Trabajar la etapa de crecimiento y propagación de la cepa *Aspergillus niger* bajo cabina, exclusivamente para trabajar este tipo de cepa, a la que se le debe de dar un adecuado mantenimiento que garantice esterilidad para evitar tanto la contaminación de la cepa como también la contaminación del personal que opera en el laboratorio de microbiología.
2. Tener mayor cuidado al momento de esterilizar el suero de leche, el cual debe realizarse en ausencia de otros medios de cultivo ya que esto produce un pardeamiento del suero lácteo que pueda ser indicio de la formación de sub productos más difíciles de asimilar que la glucosa y la galactosa por parte del hongo; además ocasionaría la disminución en los niveles de producción del metabolito.
3. Que debido a la alta cantidad de sólidos y proteínas en suspensión que se encuentran en el suero de leche se produce interferencia para lograr una buena cuantificación de biomasa celular, por lo que se deben considerar otras técnica más adecuadas como el recuento total de colonias, volumen de empacado celular o turbidimetría para realizar este análisis.
4. Hacer uso de un biorreactor que permita controlar de manera más eficiente los parámetros de pH, temperatura, agitación y aireación, lo que conviene para mejorar el rendimiento en la obtención de ácido cítrico en un proceso fermentativo.

5. Controlar sistemáticamente el nivel de pH del medio de fermentación, en períodos de cada 12 horas, el cual debe mantenerse de 3.5 a 4.0.

6. Que en próximas investigaciones en los procesos fermentativos, una vez esterilizado el suero de leche; se debe tener el cuidado de remover por filtración los sólidos suspendidos y la grasa láctea.

BIBLIOGRAFIA

1. Álvarez Vásquez, R. y otros, 1993, Ensayos preliminares para la obtención de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Trabajo de graduación de Ing. Química, El Salvador, Universidad Centroamericana José Simeón Cañas.
2. Betancourt Garcés, A. y otros, 2004, Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus spp.*, Tesis para optar al grado de Dr. Qca., Medellín, Universidad Nacional de Colombia.
3. Castillo Rodríguez, W. y otros, 2007, Propuesta de evaluación de la cinética de fermentación para la obtención de vitamina B₁₂ utilizando la cepa del genero *Propionibacterium freudenreichii* Trabajo de graduación Lic. Química y Farmacia, El Salvador, Universidad de El Salvador.
4. Cornejo Alfaro, H. y otros, 1997, Uso de suero lácteo para disminuir la incidencia de virosis en el tomate (*Lycopersicon sculentum*), Trabajo de graduación Ing. Agronómica El Salvador, Universidad de El Salvador
5. Cortez, E. 2009. Principio de reacción de Saffan – Densted, San Salvador E.S Universidad de El Salvador (entrevista)

6. López Ríos C. y otros, 2006, Producción de ácido cítrico con ***Aspergillus niger*** NRRL 2270 a partir de suero de leche, Tesis para optar al grado de Dr. Qca Medellín, Universidad Nacional de Colombia.
7. Martínez, C. y otros. 1999, Comparación de métodos para la extracción de lactosa a nivel piloto a partir de suero lácteo. Trabajo de graduación Lic. Qca. y Far. El Salvador, Universidad de El Salvador. 16-29 p
8. Martínez Palacios, E. 2008, Evaluación de la cinética del proceso de producción microbiológica de la rivo flavina (Vitamina B2) por medio de la acción metabólica de la ***Candida utilis***, trabajo de graduación grado de Licenciatura en Química y Farmacia, El Salvador, Universidad de El Salvador. 106p.
9. Quijano Quant, A. y otros, 2006, Propuesta de cinética de fermentación para la producción de ácido glutámico. Trabajo de graduación al grado de Licenciatura en Química y Farmacia, El Salvador, Universidad de El Salvador. 58p.
10. Recinos Rivas, L. y otros, 2006, Caracterización de suero lácteo y diagnóstico de alternativas de uso potencial en El Salvador, Trabajo de graduación Ing. Química. El Salvador, Universidad de El Salvador.

11. Reyes Valiente, L. 1989, Producción de ácido cítrico por métodos microbiológicos, utilizando los azúcares presentes en la cáscara de la piña, Trabajo de graduación Lic. Qca. y Far, El Salvador, Universidad de El Salvador.
12. Sáez Vega, A. y Otros, 2002, Caracterización de una cepa nativa de ***Aspergillus niger*** y evaluación de la producción de ácido cítrico., Trabajo de graduación Ing. Química, Colombia, Universidad EAFIT de Medellín.
13. Scragg, A 1996. Biotecnología para ingenieros sistemas biológicos en procesos tecnológicos. 1^{ra}.edición Editorial Limusa México. Trad. L.Huerta 191-197p
14. The United States Pharmacopeia Convention, Inc. The United States Pharmacopeia, 2005, Twenty-five Revision and The National Formulary. Twenty Revision, USA.
15. Veisseyre, R. 1986. Lactología Técnica; recogida, tratamiento y transformación de la leche en países templados y calientes. 2^a edición, España, Acribia
16. http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_12/12_06_citrico.htm
Ácido cítrico existencia y consumo mundial. Consultado 28 de enero 2009.

17. <http://www.aspergillus.org.uk/indexhome.htm?/species/index.php~main>
Aspergillus species search page (Catalogo de especies microbiológicas).
Consultado 10 de febrero 2009.
18. <http://www.monografias.com/trabajos11/lasvitam/lasvitam>.
Biotecnología. Consultado 14 de febrero de 2009.
19. <http://www.cect.org/vhyl.php?cect=2574&lan=es>
The Global Bioresource Center; ficha técnica comercial de microorganismos
(ATCC 16404). Consultado 27 de febrero de 2009.
20. <http://www.solociencia.com/biologia/microbiologia-microorganismos-industria>.
Microorganismos de interés industrial. Consultado 14 de marzo de 2009.
21. <http://www.hervogeminis.com/suero de leche.html>
Suero de leche, composición y características. Consultado 29 de marzo de
2009.
22. <http://www.monografias.com/trabajos13/aditi/aditi2.shtml>
Tipos de suero lácteo y composición. Consultado 09 de abril de 2009.
23. <http://www.microbiologia.com>
Especies de ***Aspergillus niger***. Consultado 18 de agosto de 2009.

GLOSARIO

Aspergillus niger: hongo perteneciente al reino fungi, el ***Aspergillus*** es un hongo filamentoso compuesto por cadenas de hifas. Se encuentra mayormente en el heno y el compostaje. (20)

AZUCARES TOTALES: son los diferentes hidratos de carbono, como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos; compuestos solamente por carbono, oxígeno e hidrogeno, presentes en el suero. (3)

BIOMASA: es el número de células o el total de masa microbial que se forman en un proceso fermentativo con el propósito de convertir materia prima a productos y a más células (biomasa). (3)

BIORREACTOR: recipiente en el que se llevan a cabo las fermentaciones, conocido frecuentemente como fermentador. (13)

BIOTECNOLOGIA: ciencia de los métodos que permite la obtención de productos a partir de materia prima, mediante la intervención de microorganismos vivos. (18)

CINETICA DE CRECIMIENTO: describe el crecimiento de los microorganismos, la formación de productos y el consumo de nutrientes, tanto de los microorganismos que crecen activamente, sino también de los que se encuentran en estado pasivo y de los que están muriendo. (13)

CRECIMIENTO CELULAR: incremento en el número de células en una población. (13)

CRECIMIENTO DIAUXICO: El crecimiento diaúxico es un tipo de crecimiento bifásico que tiene lugar cuando hay presentes dos sustratos diferentes que pueden ser utilizados como fuente de carbono. Se observa una curva de crecimiento bifásica debido a la utilización secuencial distintas fuentes de carbono. El metabolismo del organismo es selectivo para uno de los sustratos (se usa la fuente de carbono que permite un crecimiento más rápido) y cuando la agota, comienza a metabolizar el otro. (18)

FASE DE ADAPTACION: período después de la inoculación antes de que empiece a crecer un cultivo. (18)

FASE EXPONENCIAL: periodo de crecimiento en un cultivo, en el cual, el número de células o la masa celular aumenta exponencialmente. (18)

FASE ESTACIONARIA: fase en la cual algunas células se dividen y otras mueren, manteniendo la población constante durante la fase. (18)

FASE DE MUERTE: fase donde la población celular presente no se mantiene por si misma y comienza a morir. (18)

GRADOS BRUX: Mide el cociente total de sacarosa disuelta en un líquido, se simboliza por ° Bx y puede ser medido por un sacarímetro o un refractómetro. (8)

METODO DE SAFFRAN - DENSTED: método utilizado para determinación de ácido cítrico en que la muestra se trata con piridina y anhídrido acético que se forma con el ácido cítrico un compuesto de color amarillo. Se utiliza una $\lambda = 418 \text{ nm}$. (11), (6)

METODO DE FENOL - SULFURICO: método utilizado para determinar el contenido total de carbohidratos de medios líquidos, dando un color naranja estable en presencia de fenol y ácido sulfúrico concentrado. Se utiliza una $\lambda = 490 \text{ nm}$. (11)

pH: Medida de la acidez o basicidad de una solución. El pH es la concentración de iones hidronio presentes en determinada sustancia; típicamente va de 0 a 14 en disoluciones acuosas, siendo ácidas las disoluciones con pH menores a 7.0 y alcalinas a pH mayores de este nivel.(3)

METABOLITO: También llamados productos metabólicos, son subproductos del crecimiento de los microorganismos y constituyen los materiales de la fermentación útiles al hombre. (16)

SUSTRATO DE FERMENTACION: Solución nutritiva, que contiene los elementos indispensables para conservar y multiplicar la vida de los microorganismos bajo condiciones de temperatura y pH; puede contener carbohidratos, nitrógeno y sales adecuadas propias para cada organismo. (13)

VELOCIDAD ESPECÍFICA: representa el comportamiento que experimenta el consumo de sustrato o la formación de producto para un tiempo específico en el proceso fermentativo. ⁽¹⁶⁾

VELOCIDAD VOLUMETRICA: representa la tendencia de consumo de sustrato o producción de algún metabolito de interés industrial, expresada en g / L. h presentes en las muestras que son analizadas en los diferentes tiempos del proceso fermentativo. ⁽¹⁶⁾

ANEXOS

ANEXO Nº 1
CEPAS ESTUDIADAS EN LA PRODUCCIÓN DE
ÁCIDO CÍTRICO

CEPAS ESTUDIADAS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO

Cuadro N° 6: Producción de ácido cítrico a partir de suero de leche por distintos autores ⁽⁶⁾

Autor	Tipo de cultivo	Microorganismo	Sustrato	Tiempo	Producción de ácido cítrico
Hossain 1992	Sumergido	<i>Aspergillus niger</i> MH15-15	SDD+ Lactosa	10 días	12.0 g/l
El-Samrag 1996	Sumergido	<i>Aspergillus niger</i> CAIM 167	SD+sales +CH ₃ OH	9 días	3.1 g/l
Al-Delaim 2003	Superficie	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	SE+ sacarosa	16 días	106.5 g/l
Betancourt 2003	Sumergido	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 3	SDHE	10 días	6.7 g/l
López Ríos 2005	Sumergido	<i>Aspergillus niger</i> NRRL 2270	SE+ PO ₄	10 días	38.0 g/l

Cuadro N° 7: Producción de ácido cítrico a partir de sustratos tradicionales y diferentes cepas de *Aspergillus niger* ⁽¹²⁾

Autor	Cepa de <i>A. niger</i>	Concentración máxima de ácido cítrico (g/l)	Tipo de cultivo	Fuente de carbono
Yun-Ling	TD-01	200	Sumergido	Almidón
Suzuki	C192	69,500	Zaranda	Almidón
Rugsaseel	CHM I-C3	69,400	-	Glucosa
Saha	-	68,900	MRBC	Sacarosa
Rugsaseel	WU-2223L	63,090	-	Glucosa
Suzuki	Yang #2	45,130	Zaranda	Almidón
Roukas	ATCC 9142	18	Superficie	SGL
Kirimura	Yang #2.	15,400	Zaranda	Glucosa
Pazouki	NCIM 548	12	Zaranda	Melaza
Roukas	ATCC 9142	11	Superficie	LTS
Roukas	ATCC 4967	9	Superficie	LTS
Roukas	ATCC 4967	8	Superficie	SGL
Doelger	Van Tieghem	5,280	Superficie	Sacarosa
Cadavid y Flórez	AL01	1,113	Superficie	Sacarosa
Cadavid y Florez	AL01	0,209	Zaranda	Almidón

ANEXO Nº 2

**INDUSTRIAS LÁCTEAS DE EL SALVADOR, BALANCE DE
VOLÚMENES DE PRODUCCIÓN Y DESCARGA DE SUERO LÁCTEO**

INDUSTRIAS LÁCTEAS DE EL SALVADOR, BALANCE DE VOLÚMENES DE PRODUCCIÓN Y DESCARGA DE SUERO LÁCTEO. ⁽⁸⁾

Cuadro N° 8 Empresas lácteas en el salvador con capacidad económica de innovar productos y desarrollar tecnología

Empresas	Elaboración de queso
CANVI, S.A. DE C.V.	SI
LACTEOS DEL CORRAL (LACTOSA)	SI (*)
AGROPECUARIA LA LAGUNA, S.A DE C.V.	SI (*)
LACME	SI
COOPERATIVA GANADERA DE SONSONATE DE RL. (SALUD)	SI (*)
LACTEOS DE METAPAN	SI
AGROSANIA S.A DE C.V (SAN JULIAN)	SI (*)
EMPRESAS LACTEAS FOREMOST, S.A DE C.V.	SI (*)
INDUSTRIAS LACTEAS SAN JOSE, S.A DE C.V.	SI
LUIS TORRES Y CIA (PETACONES)	SI (*)

Fuente: DIGESTYC, (2003)

(*) Empresas encuestadas

Cuadro N° 9: Rangos de volúmenes de producción de queso de las empresas entrevistadas (balance mensual)

Volúmenes de producción	N° de empresas
De 0,5 a 10 Ton	5
De 11 a 30 Ton	0
De 30 a 50 Ton	0
Mas de 51 Ton	1

Cuadro N° 10: Volumen de suero lácteo generado (balance mensual)

Volúmenes generados.	N° de empresas
De 1 a 25 m ³	4
De 26 a 50 m ³	1
De 51 a 75 m ³	0
Mas de 76 m ³	1

Cuadro N° 11: Disposición final del suero lácteo

Volúmenes generados.	N° de empresas
Se descarga a un cuerpo receptor sin tratamiento.	3
Se descarga a un cuerpo receptor con tratamiento.	2
El suero es utilizado para elaborar otros productos.	1

ANEXO Nº 3

FROTIS DE CEPA *Aspergillus niger* ATCC 16404

FROTIS DE CEPA *Aspergillus niger* ATCC 16404

Fotografía de cepa *Aspergillus niger* ATCC 16404 vista 1x en un laboratorio nacional acreditado.

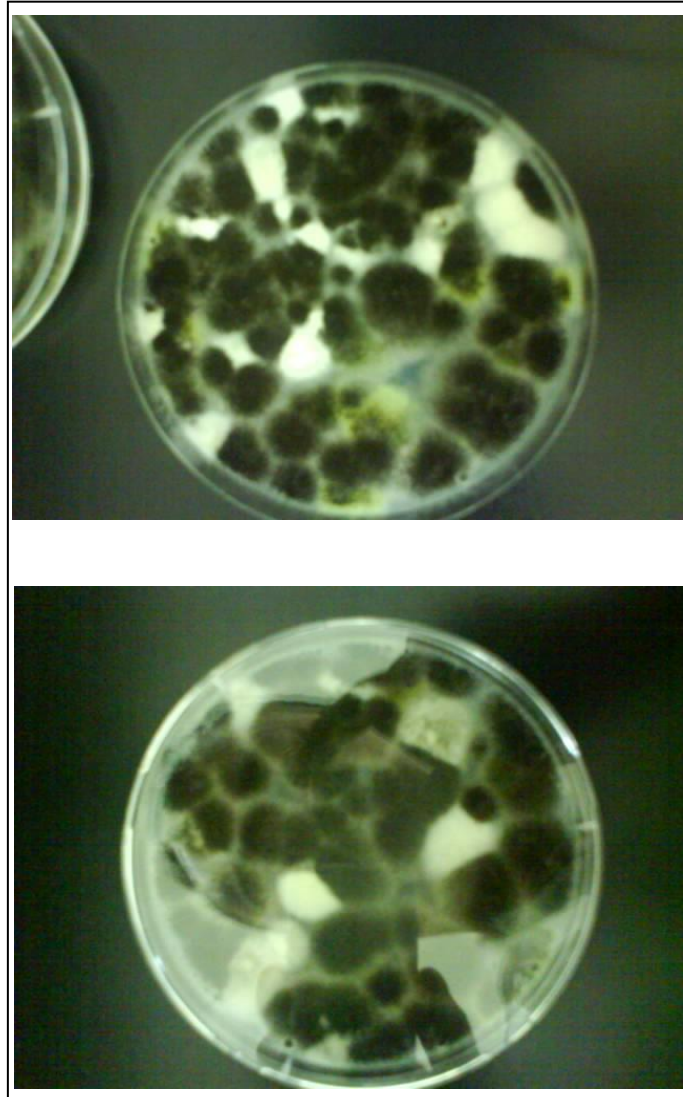


Fig. N° 35: Frotis de Cepa *Aspergillus niger* ATCC 16404

ANEXO N° 4

***Aspergillus niger* ATCC 16404, FICHA TECNICA COMERCIAL**

Aspergillus niger ATCC 16404, FICHA TECNICA COMERCIAL

ATCC ® Number:	16404 ™	Precio:	\$ 150,00
Organismo:	Aspergillus brasiliensis Varga et al. depositado como Aspergillus niger van Tieghem, anamorfo		
Designaciones:	WLRI 034 (120) [CBS 733.88, DSM 1387, DSM 1988, IFO 9455, IMI 149007, NCPF 2275]	Aislamiento:	arándanos, Carolina del Norte
		Depositantes:	SM: Ringel
<u>Nivel de seguridad de la biotecnología:</u>	1	Enviado:	Liofilizada
Condiciones de crecimiento:	Medio ATCC 336: patata dextrosa agar (PDA) Temperatura: 24.0 ° C		
Permisos:	Además de la MTA se ha mencionado		
Sub Grupos	Hongos		
Aplicaciones:	Ensayo de antimicrobianos [4101] [11020] [21514] [21603] Pruebas preparatorias de control [21613] Cepa de control de calidad [92096] [92143] [92409] Pruebas de esterilidad [21604] [92306] [92401] Pruebas [92307] [92403] Pruebas fungicidas [92443] [92784] [92789] [92802] [92824] [92831] [92836] [92837] Transformación de acogida [2027] [15182] Validación de control [92840]		

<p>Comentarios:</p>	<p>Esta variedad es recomendada por ATCC para su uso en las pruebas descritas en el Método de prueba estándar ASTM E979-91 donde sólo se especifica el taxón.</p> <p>Esta cepa fue recientemente renombrada como <i>Aspergillus brasiliensis</i> de acuerdo con la referencia Varga et al. 2007. [92930]</p> <p>uso de impedancia para las pruebas de eficacia conservante [1968]</p>
<p>Referencias:</p>	<p>4101: ASTM International Método de prueba estándar para conservantes en productos cosméticos que contengan agua. West</p> <p>15182: Wnendt S, et al. Caracterización del gen que codifica la alfa-sarcin, un ribosome-inactivar la proteína secretada por <i>Aspergillus giganteus</i>. Gene 124: 239-244, 1993. PubMed: 8444347</p> <p>21613: EE.UU. Farmacopea Suplemento Dietético Capítulos: <2021> MICROBIANA Enumeración PRUEBAS NUTRICIONAL-y los suplementos dietéticos. Rockville, MD: EE.UU. Farmacopea; USP USP28-NF23, 2005</p>

92784: Antisépticos y desinfectantes químicos - Preservación de organismos de prueba utilizados para la determinación de bactericida, fungicida y esporicida British Standards Institution; norma británica BS EN 12353:2006.

92930: Varga J, et al. Brasiliensis *Aspergillus* sp. noviembre, un negro biseriados *Aspergillus* especies con distribución en todo el mundo. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 1925-1932, 2007.

ANEXO Nº 5

PREPARACIÓN DEL INOCULO

PREPARACIÓN DEL INOCULO

En un biorreactor de 1500 mL conteniendo 1200 mL de suero de leche se adicionó el inóculo que está constituido por 0.43 g de *Aspergillus niger* ATCC 16404 por 100 mL de sustrato. (9)

0.430 g → 100 ml de Mx
0.516 g → 1200 ml de Mx

Durante el proceso de fermentación, se tomaron muestras por duplicado de 100 ml cada 24 horas. Acumulando 12 muestras durante las 168 horas del proceso; es decir una cantidad total de 1200 ml de suero.

ANEXO Nº 6

AGAR GLUCOSA 4% SEGÚN SABOURAUD

AGAR GLUCOSA 4% SEGÚN SABOURAUD ⁽²²⁾

Pesar 65 g del medio de cultivo y luego suspender en 1 L de agua desmineralizada calentando en un baño de agua hirviendo o en corriente de vapor con agitación constante; tratar en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 lbs., evitando el sobrecalentamiento. El pH 5.6 ± 0.2 a 25°C.

Para dispensar en placas de petri, una vez esterilizado el medio de cultivo, se vierte sobre dichas placas una cantidad de 30 ml a una temperatura entre 35° y 40°C, dejar solidificar el medio del cultivo para luego almacenar en refrigeración.



Certificate of Analysis

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 17.04.2008

1.05438.0500 SABOURAUD 4% dextrose agar for microbiology

Batch VM882038

	Spec. Values	Batch Values
Appearance		
clearness	clear	clear
colour	yellowish-brown	yellowish-brown
pH-value (25 °C)	5.4 - 5.8	5.7

	Spec. Values	Batch Values
Growth		
Trichophyton mentagrophytes ATCC 18748	fair to very good	fair-good
Trichophyton rubrum ATCC 28188	fair to good	fair
Trichophyton ajelloi ATCC 28454	fair to good	fair
Microsporum gallinae ATCC 12108	fair to very good	fair
Microsporum canis ATCC 36299	good to very good	good
Geotrichum candidum DSM 1240	good to very good	very good
Penicillium commune ATCC 10428	good to very good	very good

Incubation: 7 days; 28 °C

Growth promotion test in accordance with the harmonised method of EP and USP:

Spec. Values	Batch Values
--------------	--------------

Certificate of Analysis

1.05438.0500 SABOURAUD 4% dextrose agar for microbiology

Batch VM882038

	Spec. Values	Batch Values
Inoculum		
Candida albicans ATCC 10231	10 - 100	53
Aspergillus niger ATCC 16404	10 - 100	44
Colony count		
Candida albicans ATCC 10231		42
Aspergillus niger ATCC 16404		39
Recovery rate		
Candida albicans ATCC 10231	≥ 70 %	79 %
Aspergillus niger ATCC 16404	≥ 50 %	89 %

C. albicans and A. niger up to 5 days; 20-25 °C

Test date (DD.MM.YYYY): 31.10.2007

Expiry date (DD.MM.YYYY): 01.10.2012

Dr. Wolfgang Knichel

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

ANEXO N° 7

CALIBRACION DE pH - METRO

CALIBRACION DE pH - METRO (3)

Examinar los electrodos antes de usarlos observando si presentan el puente salino, previo a su uso, si es necesario, abastecer de solución salina en puente y observar las precauciones indicadas por el fabricante para el instrumento y los electrodos.

Encender el aparato y dejarlo calentar 15 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seleccionar dos soluciones reguladoras, patrón de referencia certificada para calibración, cuya diferencia en pH no exceda de cuatro unidades llenar el recipiente con una de las soluciones reguladoras para calibración, teniendo en cuenta la temperatura a la cual el material de prueba debe ser leído. Colocar el control de temperatura de la solución y ajustar el control de calibración hasta hacer que los valores observados sean idénticos a los tabulados. Acondicionar los electrodos y los recipientes con varias porciones de la segunda solución reguladora seleccionada para la calibración. Llenar los recipientes a la misma temperatura y ajustar el control de calibración hasta hacer que los valores observados sean idénticos a los tabulados.

El pH de la segunda solución reguladora debe estar dentro de 0.07 unidades de pH del valor tabulados. Si se observa mayor desviación revisar los electrodos y si están afectados, reemplazarlos. Ajustar el control de calibración para hacer que el valor de pH observado sea igual al valor tabulado.

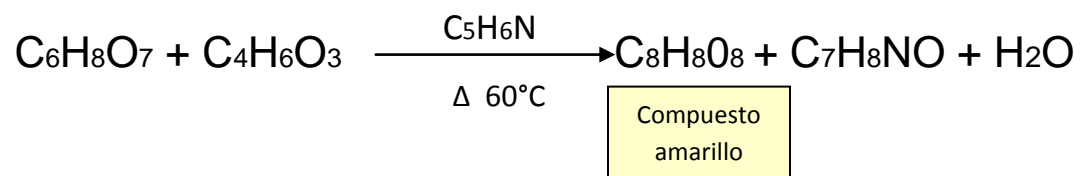
Repetir la calibración hasta que las 2 soluciones reguladoras den valores observados de pH dentro de 0.05 unidades de los valores tabulados, sin más ajuste de los controles.

ANEXO Nº 8

**PRINCIPIO DEL METODO DE SAFFRAN – DENSTED PARA LA
CUANTIFICACION DE ACIDO CÍTRICO.**

PRINCIPIO DEL METODO DE SAFFRAN – DENSTED PARA LA CUANTIFICACION DE ACIDO CÍTRICO.

Se obtiene un filtrado de la muestra y éste se trata con piridina y anhídrido acético y se forma con el ácido cítrico un compuesto de color amarillo, el color obtenido se mide por espectrofotometría. (*)



Mecanismo de reacción Safran – Densted:

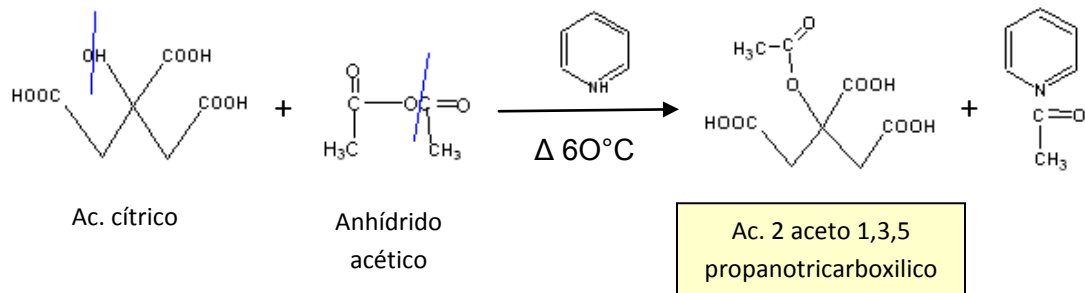


Fig. Nº 36: Principio del Método de Safran – Densted

ANEXO N° 9

ESPECIFICACIONES PARA LAS DETERMINACIONES ANALITICAS

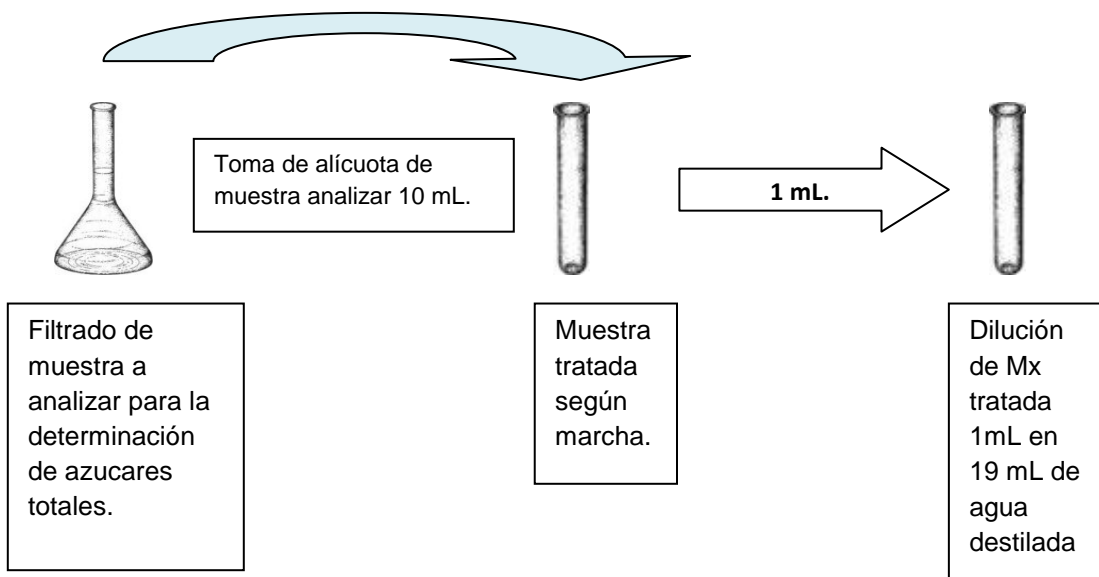
ESPECIFICACIONES PARA LAS DETERMINACIONES ANALITICAS

CONVERSIÓN DE UNIDADES:

Ejemplo: para muestra de 144 horas en ER3 (Ver pág. 55)

$$1.5043 \frac{mg}{mL} \times \frac{1g}{1000 mg} \times \frac{1000mL}{1L} = 1.5043 \frac{g}{L}$$

FACTOR DE DILUCION PARA PROCESO FERMENTATIVO ER3:



Cascada de dilución:

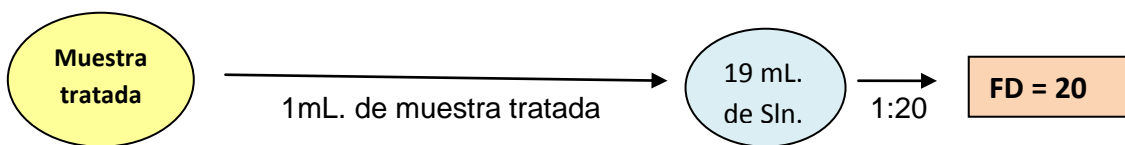


Fig. N° 37: Factor de Dilución para Proceso Fermentativo ER3

ANEXO Nº 10

PROCESO DE OBTENCION DE BIOMASA

PROCESO DE OBTENCION DE BIOMASA



Fig. N° 38: Toma de muestras para filtración



Fig N° 39: Proceso de Obtención de Biomasa (filtración al vacío)

ANEXO Nº 11

DETERMINACIÓN DE AZUCARES TOTALES (FENOL-SULFÚRICO)

DETERMINACIÓN DE AZUCARES TOTALES (FENOL-SULFÚRICO)



Fig. 40: Toma de Mx de Filtrado para determinación de azúcares totales



Fig. 41: Adición de $ZnSO_4$ y $NaOH$ 0.5 M

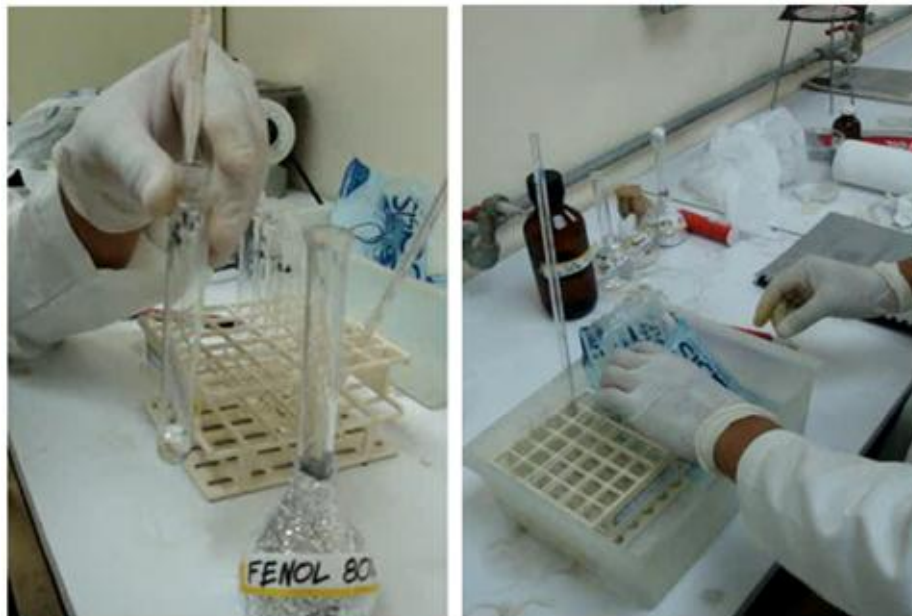


Fig. 42: Adición de Fenol 80 % y H₂SO₄ en baño de hielo



Fig. 43: Muestras Tratadas y Lectura de Absorbancias en Spectronic 20

ANEXO Nº 12

**CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR EL MÉTODO DE
SAFFRAN-DENSTED.**

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR EL MÉTODO DE SAFFRAN-DENSTED.



Fig. 44: Toma de Mx de Filtrado para cuantificación de ácido cítrico (10 mL)



Fig. 45: Adición de Piridina y Anhídrido Acético en Cámara de Extracción



Fig. 46: Muestras Tratadas en Reposo



Fig. 47: Lectura de Absorbancias en Spectronic 20

ANEXO Nº 13

**RESULTADOS GENERALES DE MUESTRAS PARA PROCESOS
FERMENTATIVOS**

**RESULTADOS GENERALES DE MUESTRAS PARA PROCESO
FERMENTATIVO E1.**

TABLA N° 30: Resultados de Proceso Fermentativo E1.

RESULTADOS DE MUESTRAS (promedio de muestras por duplicado)								
Parámetros	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
Grados Brix	6.00	5.50	5.75	5.75	6.00	7.00	--	7.75
pH	3.87	3.99	3.88	4.11	3.86	4.79	--	4.96
Biomasa (g)	11.225	11.534	11.996	14.784	18.128	35.206	--	21.427
Azúcares totales (g/L)	3.5077	2.9231	1.2672	1.9487	2.1452	4.8461	--	1.9538
Ac. Cítrico (g/L)	0.00	0.2896	0.6633	1.0855	2.2026	--	--	--

(--): Hora en la que no hubo recolección de muestras

TABLA N° 31: Resultados de Proceso Fermentativo E2.

RESULTADOS DE MUESTRAS (promedio de muestras por duplicado)								
Parámetros	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
Grados Brix	9.00	---	9.50	10.00	10.25	11.25	10.00	10.50
pH	2.73	---	3.52	2.99	2.90	2.96	2.92	2.60
Biomasa (g)	1.762	---	2.260	2.500	2.754	3.191	3.452	3.119
Azúcares totales (g/L)	1.1709	---	0.3947	1.6025	2.0256	2.0308	2.0564	1.9513
Ac. Cítrico (g/L)	0.0000	---	0.0196	0.1832	0.0490	0.1853	0.0408	0.0555

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

TABLA N° 32: Resultados de Proceso Fermentativo E3.

RESULTADOS DE MUESTRAS								
(promedio de muestras por duplicado)								
Parámetros	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
Grados Brix	9.00	---	9.75	9.50	9.75	10.00	11.00	12.25
pH	3.87	---	3.85	3.89	3.88	3.73	3.73	3.56
Biomasa (g)	1.762	---	1.826	1.913	1.946	1.984	2.121	2.642
Azucares totales (g/L)	2.3419	---	0.5184	0.5263	0.5605	0.4833	0.7542	0.5289
Ac. Cítrico (g/L)	0.0000	---	0.0408	0.0555	0.0669	0.2765	0.3824	0.2477

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras

TABLA N° 33: Resultados de Proceso Fermentativo ER3.

RESULTADOS DE MUESTRAS								
(promedio de muestras por duplicado)								
Parámetros	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	120 horas	144 horas	168 horas
Grados Brix	9.00	---	8.75	7.50	7.25	7.00	7.50	8.00
pH	4.20	---	4.27	4.55	3.97	3.82	3.76	3.78
Biomasa (g)	1.121	---	1.312	1.542	2.409	2.739	3.428	4.323
Azucares totales (g/L)	0.5368	---	0.5947	1.6715	6.6051	1.3949	1.5043	5.3538
Ac. Cítrico (g/L)	0.0000	---	0.0441	0.0735	0.1768	0.3396	0.3753	0.2458

(---): Hora en la que no hubo recolección de muestras