

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO APLICANDO CINETICA DE  
CRECIMIENTO MICROBIANO A PARTIR DE *Aspergillus niger* Y COMO  
MEDIO DE CULTIVO, DULCE DE ATADO

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR**  
JOEL ALEXANDER MENDEZ ALVAREZ

**PARA OPTAR AL GRADO DE**  
**LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA**

ABRIL, 2013

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

**SECRETARIA GENERAL**

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANA**

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

**SECRETARIO**

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ

## COMITE DE TRABAJO DE GRADUACION

### **COORDINADORA GENERAL**

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

### **ASESORAS DE AREA DE ANALISIS DE ALIMENTOS:**

#### **MICROBIOLOGICO:**

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

### **DOCENTES DIRECTORES**

Licda. María Elsa Romero de Zelaya

Lic. Guillermo Antonio Castillo Ruiz

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A LOS DOCENTES DIRECTORES**

Licda. María Elsa Romero de Zelaya y Lic. Guillermo Antonio Castillo Ruiz por haberme asesorado en mi trabajo de graduación, por su disponibilidad, paciencia y dedicación; por ser mis guías para la realización de este trabajo en el que culminó uno de mis sueños realizados. De manera especial a la MSc. María del Carmen Guillén de Medrano, por haber sido la persona que me proporcionó el tema, me guió y asesoró al inicio, por haber estado presente en la primera defensa; persona a quien estimo mucho y le doy las gracias por estar siempre disponible, por su tiempo y dedicación.

MSc. Leví Naum Méndez A. Persona muy especial que me orientó en el diseño de la investigación, me realizó correcciones en el trabajo de investigación desde el inicio hasta final; fue un asesor externo que dió su aporte como metodista en esta investigación.

### **A LAS PERSONAS QUE ME COLABORARON**

Dr. Marvin José Núñez, Dra. Tania Cuadra, Lic. Henry Alfredo Hernández Contreras, Lic. José Paulino Díaz Mejía, Lic. Juan Pablo Rodríguez, Daniel Morán, Sr. Wilber Ernesto Guzmán, Sr. Oscar Gerardo Corea, Sr. Jaime Pascual González Chávez, Sr. Luis Alonso Abrego, Sr. José Víctor Sánchez Sánchez, Sr. Jesús Antonio Reymundo Lemus y Sr. Mateo Eugenio Díaz.

De manera especial a los alumnos de la Cátedra de Microbiología Aplicada IV Carmen Alicia Urrutia Cruz, Evelyn Elizabeth Benítez y Daniela Astrid Calderón

A la COORDINADORA GENERAL Lic. María Odette Rauda y ASESORES DE AREA: MSc. María Evelin Sánchez de Ramos, MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez. Por sus observaciones, correcciones y recomendaciones hechas para mejora de este trabajo de investigación.

## DEDICATORIA

A Dios todo poderoso y a los grandes Maestros Cósmicos, G.L.H. ROSAE CRUCIS AMORC, Fr. Alvarado. Por ser mis guías, mi inspiración y fortaleza para no desmayar en los momentos que me sentí vencido por los obstáculos que se presentan a lo largo de la vida; aprender a superarme y a ser mejor persona cada día para conmigo mismo y culminar lo que un día comencé.

A mis queridos y apreciables padres: Nicolasa Alvarez y Juan Méndez Vásquez (Q. D.D.G), por su apoyo incondicional, sus consejos, paciencia y de cómo han sabido transmitirme fortaleza para superarme a mí mismo. Aunque mi padre no podrá estar presente físicamente para ver uno de mis grandes logros obtenidos gracias a ellos; se que desde lo alto del cósmico estará por siempre conmigo.

A todos mis hermanos que se mencionan a continuación: Imna Isua, Oseas Harvey, Iris Denni, Leví Naum, Bessi Yaneth, Juan y Euclides Heráclito por su apoyo y confianza brindada, por sus consejos que me han sido muy útiles para obtener este logro que comparto con todos ellos.

A mis cuñadas y cuñados, mis sobrinos: Gerson, Karla Isua, Nicole, Fernando, Gabriela, Mariana, Iris Yaneth, Oseas, Sídney, Alexandra, Rubidia, Víctor, Elizabeth y Adriana.

De manera especial a mis amigos: Eligio, Rodny, Norman, Jesús, Eunice, Rigo, Marvin, Juan José, Mayra, Lisette, Silvia, Marcos, Verónica, Keny, Samuel y otros. Por compartir el mismo logro alcanzado, por los desvelos y aflicciones compartidas durante toda la carrera profesional.

Lic. René Antonio Rodríguez Soriano (Q.D.DG.). Que se encuentra en la Gloria.

**“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece”. Filipenses 4:13**

**“Yo solo sé que no sé nada”. ARISTOTELES.**

## INDICE

|   | Pág. |
|---|------|
| Resumen   |      |
| Capítulo I  |      |
| 1.0 Introducción  | xxi  |
| Capítulo II   |      |
| 2.0 Objetivos   | 23   |
| Capítulo III  |      |
| 3.0 Marco teórico   |      |
| 3.1 Fermentación microbiana                               | 25   |
| 3.2 Biotecnología   | 26   |
| 3.3 Cinética del crecimiento                              |      |
| 3.3.1 Crecimiento microbiano                              | 27   |
| 3.3.2 Medición del crecimiento microbiano                 | 28   |
| 3.3.3 Crecimiento en un cultivo intermitente              | 31   |
| 3.3.4 Factores que afectan la rapidez de crecimiento      | 33   |
| 3.3.5 Evaluación de la cinética de crecimiento microbiano |      |
| 3.3.5.1 Crecimiento de microorganismos                    | 34   |
| 3.3.5.2 Consumo de nutrientes                             | 35   |
| 3.3.5.3 Formación de producto                             | 36   |

|  |    |
|--|----|
| 3.3.5.4 Rendimiento en el cultivo  | 37 |
| 3.4 Métodos analíticos   | 38 |
| 3.5 Hongo <i>Aspergillus niger</i>   | 40 |
| 3.5.1 Reproducción del <i>Aspergillus niger</i>  | 42 |
| 3.5.2 Patologías producidas  | 44 |
| 3.6 Ácido Glucónico  |    |
| 3.6.1 Generalidades  | 45 |
| 3.6.2 Fuentes naturales del Ácido Glucónico  | 46 |
| 3.6.3 Descripción  | 46 |
| 3.6.4 Ruta metabólica del <i>Aspergillus niger</i> que lleva a la formación del Ácido Glucónico y sus respectivas gluconas | 47 |
| 3.6.5 Aplicaciones del Ácido glucónico y sus respectivas sales   | 48 |
| 3.7 Medio de cultivo para la producción del Ácido Glucónico: Dulce de atado  |    |
| 3.7.1 Caña de azúcar   | 49 |
| 3.7.2 Dulce de atado   | 51 |
| Capítulo IV  |    |
| 4.0 Diseño metodológico  |    |
| 4.1 Investigación de campo   | 55 |
| 4.2 Parte experimental   | 55 |
| 4.2.1 Medio de cultivo de mantenimiento de Agar Sabouraud de la cepa <i>Aspergillus niger</i>                              | 56 |



Capítulo VI

6.0 Conclusiones 115

Capítulo VII

7.0 Recomendaciones 118

Bibliografía

Glosario

Anexos

## INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Glosario
2. Esquemas de metodología analítica
3. Determinación del número inicial de colonias de *Aspergillus niger* en el biorreactor mediante el método de recuento en placa
4. Preparación de estándar de Ácido Glucónico para cromatografía en capa fina (T.L.C)
5. Procedimiento para calibrar el pH-metro
6. Reactivos, medios de cultivo, material y equipo
7. Preparación de reactivos
8. Estandarización de la solución de NaOH 0.1N
9. Preparación de medios de cultivo
10. Métodos analíticos. Farmacopea española
11. Certificado de análisis del Ácido Glucónico
12. Espectro del estándar de Ácido Glucónico
13. Fotografías del trabajo de investigación

## INDICE DE CUADROS

| Cuadro N°   | Pág. |
|---|------|
| 1. Medios de cultivo para el mantenimiento del <i>Aspergillus niger</i> | 44   |
| 2. Composición de la caña de azúcar                                     | 50   |
| 3. Contenido de nutrientes de la panela                                 | 52   |

## INDICE DE FIGURAS

| Figura N°  | Pág. |
|--|------|
| 1. Ciclo de crecimiento intermitente. Fases del crecimiento  | 32   |
| 2. Morfología de <i>Aspergillus niger</i>  | 40   |
| 3. Conidióforos del género <i>Aspergillus niger</i>  | 43   |
| 4. Estructura química del Ácido Glucónico  | 45   |
| 5. Síntesis del Ácido Glucónico durante la fermentación  | 47   |
| 6. Caña de azúcar  | 50   |
| 7. Dulce de atado  | 51   |
| 8. Curva de pH vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico                                       | 73   |
| 9. Curva de Acidez total vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico                             | 76   |
| 10. Curva de grados °Brix vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico                            | 77   |
| 11. Curva de biomasa por peso seco Ln(X) vs Tiempo (horas) para la producción del Ácido Glucónico            | 80   |
| 12. Curva de velocidad volumétrica de biomasa (g/Lh) vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico | 82   |
| 13. Curva de velocidad específica de biomasa (g/Lh) vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico  | 85   |
| 14. Curva estándar de glucosa. Absorbancia vs concentración (mg/mL)  | 88   |

|  |     |
|--|-----|
| 15. Curva de concentración de azúcares totales en muestras (mg/mL).<br>Método Fenol-Sulfúrico                                  | 90  |
| 16. Curva de velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/Lh) vs<br>Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico    | 94  |
| 17. Curva de velocidad específica de consumo de sustrato (g/Lh) vs<br>Tiempo (horas) para la producción de Ácido glucónico     | 97  |
| 18. Curva de pH vs Tiempo (horas) de los ensayos de producción de<br>Ácido Glucónico (E1, E2 y E3)                             | 102 |
| 19. Curva de acidez total (Ácido Glucónico) vs Tiempo (horas) de los<br>ensayos E1, E2 y E3                                    | 104 |
| 20. Curva de resultados de grados °Brix vs Tiempo (horas) de los<br>ensayos de producción de Ácido Glucónico (E1, E2 y E3)     | 106 |
| 21. Curva de biomasa por peso seco Ln(x) vs Tiempo (horas) de los<br>ensayos E1, E2 y E3 para la producción de Ácido Glucónico | 108 |
| 22. Curva de concentración de azúcares totales en muestras (mg/mL)<br>vs Tiempo (horas) de los ensayos E1, E2 y E3             | 110 |

## INDICE DE TABLAS

|   | Pág. |
|---|------|
| Tabla N°  |      |
| 1. Curva estándar de glucosa  | 62   |
| 2. Preparación de la solución estándar de Ácido Glucónico   | 66   |
| 3. Parámetros de cinética de crecimiento del ensayo E1  | 70   |
| 4. Parámetros de cinética de crecimiento del ensayo E2  | 72   |
| 5. Resultados de pH en muestras durante el proceso de producción de Ácido Glucónico   | 72   |
| 6. Resultados de la acidez total en muestras durante la producción de Ácido Glucónico   | 75   |
| 7. Resultados de grados °Brix en muestras durante la producción de Ácido Glucónico  | 77   |
| 8. Transformación de la biomasa de las muestras a logaritmo natural, usando la formula $\ln(x)$   | 78   |
| 9. Resultados de velocidad Volumétrica de biomasa por peso seco durante el proceso de producción de Ácido Glucónico                             | 81   |
| 10. Resultados de velocidad específica de biomasa por peso seco durante el proceso de producción de Ácido Glucónico                             | 84   |
| 11. Resultados de la estandarización de la glucosa  | 87   |
| 12. Resultados de azúcares totales en muestras por el método Fenol-Sulfúrico mediante la aplicación de la formula obtenida por regresión lineal | 89   |

|  |     |
|--|-----|
| 13. Resultados de azúcares totales aplicando regresión polinomial a las muestras   | 92  |
| 14. Resultados de velocidad volumétrica de consumo de sustrato durante el proceso de producción de Ácido Glucónico   | 93  |
| 15. Resultados de velocidad específica de consumo de sustrato  | 96  |
| 16. Parámetros de cinética de crecimiento del ensayo E3  | 100 |
| 17. Resultados de pH para los tres ensayos   | 101 |
| 18. Resultados de volúmenes gastados de NaOH 0.1N en los ensayos E1, E2 y E3 para la determinación de la acidez total  | 103 |
| 19. Resultados de acidez total de los ensayos E1, E2 y E3 durante la producción de Ácido Glucónico   | 103 |
| 20. Resultados de grados °Brix en los ensayos E1, E2 y E3  | 105 |
| 21. Resultados de biomasa en los ensayos E1, E2 y E3   | 107 |
| 22. Resultados de biomasa aplicando a los datos experimentales logaritmo natural en los ensayos E1, E2 y E3  | 107 |
| 23. Resultados de los ensayos 1, 2 y 3 de la aplicación de regresión lineal al análisis de muestras por el método Fenol-Sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales | 110 |

## ABREVIATURAS

°C = Celsius

Conc. = Concentrado

Std = Estándar

F. C. = Factor de corrección

Rf = Factor de retardación

g = Gramo

GR = Grado reactivo

h = Horas

L = Litro

Meq = Miliequivalentes

mg = Miligramos

min = Minutos

mL = Mililitros

µg = Microgramo

mm = Milímetros

Mx = Muestra

µL = Microlitros

N = Normalidad

nm = Nanómetro

PM = Peso molecular

rpm = Revoluciones por minuto

T° = Temperatura

uV = Ultravioleta

V = Volumen

## RESUMEN

En la investigación realizada se evaluó la cinética de crecimiento microbiano del hongo *Aspergillus niger*, utilizando como medio de fermentación el dulce de atado para la producción del Ácido Glucónico. El método de fermentación utilizado fue por lotes en un sistema cerrado, debido que durante su realización no se le suministró al medio más sustrato; el sustrato del medio de cultivo es la sacarosa. Antes de ser consumida la sacarosa por el hongo, primero la desdobra a glucosa y fructosa, obteniendo la glucosa como sustrato principal para la obtención de la energía necesaria para su crecimiento y formación del Ácido Glucónico.

El estudio fue mediante tres ensayos (E1, E2 y E3); realizados bajo condiciones estériles a temperatura de 28°C; las muestras fueron extraídas cada 24 horas, obteniendo un total de siete muestras por duplicado, el pH fue variado de 3.0 a 1.0. La cinética para cada ensayo fue evaluada a través de los siguientes parámetros: pH, grados °Brix, biomasa por peso seco, azúcares totales (método Fenol-Sulfúrico) y Ácido Glucónico. El ensayo E1 se trabajó a un pH de 2.67 y una concentración de sacarosa de 30 g/L de medio de cultivo de fermentación, se agitó y suministró oxígeno al medio; estas dos últimas condiciones (agitación y suministro de oxígeno) no fueron posibles llevarlas de forma simultánea; de manera que se tuvo que intercalar cada 24 horas, el mantenimiento a la cepa del hongo *Aspergillus niger* fue por 15 días en medio de cultivo de Agar Sabouraud; bajo estas condiciones el Ácido Glucónico producido fue de 0.1844% en las primeras 48 horas, obteniéndose la máxima producción de Ácido Glucónico a las 168 horas, la cual fue de 0.2152%.

El ensayo E2 fue realizado bajo las siguientes condiciones: concentración de sacarosa de 80 g/L,  $2 \times 10^{-3}$  UFC (unidades formadoras de colonia) y el pH fue de 3.02. Antes de ser inoculado el hongo *Aspergillus niger* al medio de fermentación se le dió mantenimiento en Agar Sabouraud por un mes, el

oxígeno fue suministrado durante todo el proceso de fermentación, obteniéndose el máximo rendimiento de ácido glucónico hasta las 192 horas y fue de 0.4919%, se obtuvo una mejor cinética y un mejor rendimiento de ácido formado para este ensayo.

El ensayo E3 la concentración de sacarosa, período de mantenimiento de la cepa de ***Aspergillus niger*** en Agar Sabouraud y oxigenación fue igual que el ensayo E2, el pH fue de 1.95 y  $26 \times 10^{-3}$  UFC. Este ensayo E3 no dió Ácido Glucónico porque el pH es muy bajo, solo fue observado a través de su cinética, que el ***Aspergillus niger*** pierde características porque estuvo mucho tiempo en el medio de mantenimiento, el cual fue de un mes. Se recomienda dar mantenimiento a la cepa del hongo en estudio de quince días antes de ser inoculado al medio de fermentación.

El desarrollo de la investigación fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador por un período de 8 meses.

**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

La presente investigación tuvo como finalidad producir el ácido glucónico e identificar en qué fase de la cinética de crecimiento microbiano del hongo *Aspergillus niger* se dió la mayor producción del Ácido Glucónico; emplee como medio de cultivo el dulce de atado para un período de fermentación de seis días. El método utilizado para la obtención de este ácido es una fermentación microbiana en un cultivo por lotes de un sistema cerrado, para dar respuesta al problema que surgió en esta investigación se evaluó la cinética de crecimiento del hongo *Aspergillus niger* durante todo el proceso de fermentación por medio de las muestras del fermento que fueron extraídas del biorreactor cada 24 horas; partiendo del tiempo "0" a las que se les procedió a realizar las siguientes determinaciones analíticas: identificación del ácido glucónico por cromatografía en capa fina, determinación del pH, cuantificación del ácido glucónico mediante el espectrofotómetro de absorción ultravioleta / visible; además se determinó la biomasa por el método de peso seco, azúcares totales por el método fenol-sulfúrico, y la acidez total por volumetría ácido-base. En base a la evaluación de los parámetros cinéticos anteriores del hongo *Aspergillus niger* se determinó que en las muestras del medio de cultivo fermentado hubo producción de Ácido Glucónico y la producción del ácido en estudio fue entre la fase de latencia y muerte.

Es importante destacar que el desarrollo de la parte experimental de esta investigación se llevo a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador por un período de 8 meses.

**CAPITULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Producir ácido glucónico aplicando cinética de crecimiento microbiano a partir de *Aspergillus niger* y como medio de cultivo, el dulce de atado.

### 2.2 Objetivos específicos.

2.2.1 Determinar en el proceso de fermentación cada 24 horas, por 6 días los parámetros cinéticos siguientes: pH, grados °Brix, azúcares totales, biomasa por peso seco y ácido glucónico.

2.2.2 Identificar la fase de mayor producción de ácido glucónico por medio de la cinética de crecimiento microbiano.

2.2.3 Identificar el ácido glucónico aplicando la técnica de cromatografía en capa delgada.

2.2.4 Determinar la acidez total en el medio de fermentación, utilizando una valoración volumétrica ácido-base con Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N.

**CAPITULO III**  
**MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1 Fermentación microbiana. <sup>(10)</sup>

El concepto fermentación es de origen latino y en sentido estricto se ha usado para designar la transformación del jugo de la uva en vino. El químico francés Louis Pasteur dió la primera explicación bioquímica del proceso por el cual el azúcar en solución acuosa es descompuesto en alcohol y gas carbónico, en virtud de las células vivas de levadura. Pasteur vió que mientras se descompone el azúcar en ausencia del aire, las células de levadura viven y se propagan en el líquido en fermentación. Llamó a este proceso de fermentación alcohólica “vida sin oxígeno”.

A partir de la interpretación bioquímica de la fermentación alcohólica hecha por Pasteur, el concepto fermentación designa hoy la desasimilación o catabolismo anaeróbico de compuestos orgánicos por la acción de microorganismos u otras células o de extractos celulares. Sin embargo, en muchos artículos técnicos y en mayor grado, aun en el uso corriente en laboratorios y fábricas, el término fermentación denota la acción microbiana regulada por el hombre. En sentido más amplio, la palabra fermentación no sólo designa los procesos de desasimilación anaeróbica como la formación de alcohol, butanol-acetona, ácido láctico, etc., sino también la producción industrial de vinagre, ácido cítrico, enzimas, penicilinas y otros antibióticos, riboflavina y otras vitaminas. Todos estos productos son el resultado de procesos microbianos y se llaman “productos de fermentación”.

En condiciones de laboratorio para que se dé el proceso de fermentación se requiere de un fermentador, término con que se designa no sólo los recipientes en los cuales se realiza la fermentación con exclusión del aire, sino también los tanques en los cuales se producen oxidaciones microbianas aeróbicas y los tanques de propagación en los cuales se propagan levaduras y otros microorganismos en presencia del aire.

En todo proceso de fermentación se dan procesos de catabolismo. Estos últimos son de naturaleza oxidante y pueden realizarse de tres formas: a) por adición de oxígeno; b) por eliminación de hidrógeno; y c) por pérdida de un electrón.

Lo frecuente en el catabolismo es la segunda forma, o sea la eliminación de hidrógeno (deshidrogenación) de la sustancia madre que a la vez es la donante de hidrógeno. En este proceso el aceptor de hidrógeno puede ser el oxígeno atmosférico con uno o varios de los compuestos intermedios formados por catabolismo u otro compuesto reducible presente en el substrato. Si el oxígeno atmosférico, tomando parte en la reacción, actúa como aceptor de hidrógeno, el proceso de desasimilación es aeróbico (u oxibiótico). Por ejemplo si el substrato es la glucosa, puede ser completamente oxidado por desasimilación aeróbica para dar agua y dióxido de carbono, pero puede ser oxidado en grados variables para dar productos de oxidación incompleta, como ácido glucónico, ácido sacárico, ácido cítrico y ácido oxálico.

### **3.2 Biotecnología.**

La biotecnología es el empleo de organismos vivos para la obtención de algún producto o servicio útil para el hombre. Así, la biotecnología tiene una larga historia, que se remonta a la fabricación del vino, el pan, el queso y el yogurt. Además del descubrimiento de que el jugo de uva fermentado se convierte en vino, que la leche puede convertirse en queso o yogurt; o que se puede hacer cerveza fermentando soluciones de malta y lúpulo fue el comienzo de la biotecnología, hace miles de años. Aunque en ese entonces los hombres no entendían cómo ocurrían estos procesos, podían utilizarlos para su beneficio. Estas aplicaciones constituyen lo que se conoce como biotecnología tradicional y se basa en el empleo de los microbios o de los productos que ellos fabrican<sup>(17)</sup>.

Los avances actuales en ciencia y tecnología han permitido transformar los procesos de fermentación microbiana, desarrollando nuevos métodos y técnicas que han permitido integrar los conocimientos en ingeniería, bioquímica y microbiología para conseguir la aplicación tecnológica (industrial) de las capacidades de los microorganismos, células de tejido cultivado y sus partes; surgiendo así una nueva disciplina científica llamada: Biotecnología. Con esta disciplina se ha logrado aplicar los agentes biológicos a la industria manufacturera y en operaciones de servicio <sup>(13)</sup>.

La biotecnología moderna, en cambio, surge en la década de los '80, y utiliza técnicas, denominadas en su conjunto "ingeniería genética", para modificar y transferir genes de un organismo a otro. De esta manera es posible producir insulina humana en bacterias y, consecuentemente, mejorar el tratamiento de la diabetes. Por ingeniería genética también se fabrica la quimosina, enzima clave para la fabricación del queso y que evita el empleo del cuajo en este proceso. La ingeniería genética también es hoy una herramienta fundamental para el mejoramiento de los cultivos vegetales. Por ejemplo el maíz Bt. En este caso, los bacilos del suelo fabrican una proteína que mata a las larvas de un insecto que normalmente destruye los cultivos de maíz, fabrican esta proteína y por lo tanto resulta refractaria al ataque del insecto <sup>(17)</sup>.

### **3.3 CINETICA DEL CRECIMIENTO.** <sup>(13)</sup>

#### **3.3.1 Crecimiento microbiano.**

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo. En los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población.

Se puede considerar el crecimiento al nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de crecimiento). El crecimiento de las poblaciones celulares se puede subdividir en

sistemas cerrados, como el cultivo intermitente y en sistemas abiertos, como el cultivo alimentado por lotes y el cultivo continuo.

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. En una célula microbiana no viable 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, aún 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.

Las células microbianas requieren un alto grado de adaptabilidad para responder a cambios tanto en el medio físico como en el químico. A diferencia de las formas de vidas diferenciadas, multicelulares, los organismos unicelulares responden a cambios en el medio al exhibir un conjunto diferente de actividades metabólicas. Así, un microbio facultativo inducirá las enzimas necesarias para el metabolismo oxidativo (respiratorio), cuando el oxígeno sea suministrado a un medio anaerobio.

### **3.3.2 Medición del crecimiento microbiano.**

Se conocen 7 métodos para medir el crecimiento de las poblaciones de células microbianas: a) Peso seco celular, b) Absorción, c) Peso húmedo, d) Volumen de células empacadas, e) Número de células, f) Masa de un componente celular, y g) Mediciones físicas.

#### **a) Peso seco celular.**

Este método consiste en secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que

sedimentan rápidamente, como las levaduras, esto usualmente implica los siguientes pasos: centrifugación ( $4-6 \times 10^3$  rpm) de muestras del cultivo en tubos de centrifuga prepesados; lavado de la pastilla celular concentrado con solución salina isotónica seguida por centrifugación a  $4-3 \times 10^3$  rpm; las células concentradas se colocan en un horno a  $90^\circ\text{C}$  durante unas 20 horas ó a  $105^\circ\text{C}$  durante 6 a 10 horas, hasta que hayan alcanzado un peso constante.

Para las células bacterianas difíciles de concentrar por centrifugación, las muestras de cultivo se filtran a través de membranas hidrofílicas con un tamaño de poro de  $0.2 \mu\text{m}$ . Las células, retenidas en el filtro, se lavan con solución salina isotónica y los filtros se colocan en horno a  $90^\circ\text{C}$  ó a  $105^\circ\text{C}$  hasta obtener un peso constante. El peso de las células secas usualmente se expresa en términos de  $\text{g} \times \text{l}^{-1}$ .

En las determinaciones del peso seco celular existen fuentes de error importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrifuga 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.

#### **b) Absorción.**

Consiste en introducir en una celda espectrofotométrica células microbianas. Estas células desvían la luz de modo que la cantidad de ésta llega al detector del espectrofotómetro, está relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra de cultivo de acuerdo con la ley de Beer. Por lo general se emplean longitudes de onda de alrededor de  $600\text{nm}$ . Es importante entender que como la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de estas cambian durante el crecimiento.

**c) Peso húmedo.**

Consiste simplemente en la centrifugación o filtración de muestras seguida por el pesado directo. Aunque 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.

**d) Volumen de células empacadas.**

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrifuga 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.

**e) Número de células.**

Consiste en medir el número total de células, colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre portaobjetos 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, sin embargo se cuenta con contadores de células automáticos.

Para la medición de células viables en un cultivo, se puede hacer diluyendo muestras del mismo con solución salina estéril y colocando en seguida volúmenes de 0.1 mL sobre la superficie de un medio adecuado de apoyo como el agar. Después de la incubación, se puede contar el número de colonias suponiendo que cada colonia se origina de una célula individual. Además de requerir de aproximadamente 24 horas para el crecimiento de las colonias, este método requiere de una buena técnica de esterilización y de cuidado en la dilución de las muestras.

**f) Masa de un componente celular.**

En el caso donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular 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 ATP celulares.

**g) Mediciones físicas.**

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor.

Se ha demostrado que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido y la concentración 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 escala pequeña puede ser demasiado pequeña para ser medida adecuadamente.

Para cultivos aeróbicos es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado la relación directa con la concentración de biomasa.

**3.3.3 Crecimiento en un cultivo intermitente.**

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

Cuando a un medio de crecimiento adecuado se inocula con células, tiene lugar una secuencia de eventos característicos, llamado ciclo de crecimiento, el cual se puede describir por medio de una gráfica del peso seco celular,  $(X)$ , ( $g\ l^{-1}$ ) contra el período de incubación en horas. (Ver figura N° 1)

El ciclo de crecimiento se puede dividir en varias fases distintas:

- 1) Fase lag: 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.

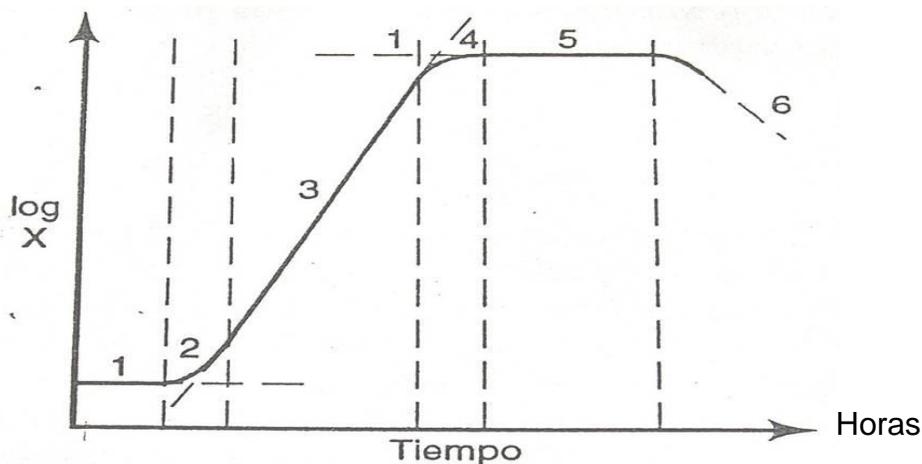


Figura N° 1. Ciclo de crecimiento intermitente. Fase del crecimiento: 1, lag; 2, aceleración; 3, exponencial; 4, desaceleración; 5, estacionaria; 6, declinación. X, peso seco celular ( $g l^{-1}$ )

- 2) Fase exponencial o fase log. Frecuentemente se habla de ésta como la fase de "crecimiento equilibrado", donde la síntesis de todos los constituyentes celulares aumenta a una rapidez constante, de modo que la población de células se duplica y continúa duplicándose a intervalos regulares.
- 3) Fase estacionaria. Ésta 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 metabolismo endógeno, 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 el medio físico.
- 4) Fase de declinación. 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.
- 5) Fase de aceleración y desaceleración. Éstas 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.

#### **3.3.4 Factores que afectan la rapidez de crecimiento.**

Los factores principales que afectan la rapidez de crecimiento son: a) la concentración de sustrato, b) la temperatura, c) el pH, y d) la inhibición por producto.

##### **a) Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento.**

Monod fue el primero en investigar el efecto de la concentración de sustrato sobre la rapidez de crecimiento. Encontró que el ciclo de crecimiento procedía cuando se inoculaba medio nuevo con glucosa como única fuente de carbono y energía y con todos los otros nutrientes en exceso.  $\mu$  (rapidez específica de crecimiento) es constante durante la fase exponencial, luego tiende a cero en la fase de desaceleración, donde la concentración del sustrato se vuelve no saturante.

##### **b) Efecto de la temperatura.**

Como en todas las reacciones químicas, el crecimiento microbiano es afectado por la temperatura. Así el aumento de la rapidez de mortalidad y disminución de  $\mu$  (rapidez específica de crecimiento) a temperaturas altas, se debe principalmente a la desnaturalización termal de las proteínas, la cual provoca un aumento en el requerimiento energético del mantenimiento celular para mecanismos de reparación. A bajas temperaturas, los mecanismos regulatorios de la célula son afectados, además de las limitaciones difusionales como el transporte de sustrato hacia y dentro de la célula. Como resultado la producción de biomasa decae a temperaturas extremas.

### c) Efecto del pH.

Los microorganismos tienden a crecer en un intervalo limitado de pH, aun dentro de este intervalo frecuentemente cambian su metabolismo como resultado de un cambio de incluso 1 – 1.5 unidades de pH. En general las bacterias crecen en un intervalo de pH de 4 a 8, las levaduras de 3 a 6, los mohos de 3 a 7 y las células eucarióticas superiores de 6.5 a 7.5.

### d) Efecto de la concentración alta de sustrato o de producto.

Si la concentración inicial de sustrato es aumentada a un valor considerablemente más alto que la concentración mínima de saturación, la rapidez de crecimiento puede disminuir debido a la inhibición por sustrato. Probablemente se debe al alto esfuerzo osmótico impuesto a las células, el cual causa la deshidratación y problemas difusionales.

A concentraciones bajas de sustrato puede ser el resultado de la inhibición de enzimas metabólicas claves.

## 3.3.5 EVALUACION DE LA CINETICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO.

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

### 3.3.5.1 Crecimiento de microorganismos.

Es posible relacionar el consumo de sustrato y la formación de producto con el crecimiento al hacer balances del material para cada uno.

#### a) Velocidad volumétrica de generación de células microbianas por peso seco.

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

Donde:

$\mu$ : 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

**b) Velocidad específica de generación de células microbianas por peso seco.**

$$\mu^1 = \frac{1}{x} * \frac{dLn x}{dt}$$

Donde:

$\mu^1$ : velocidad específica

$x$ : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$dLn x / dt$ : velocidad volumétrica de biomasa

**3.3.5.2 Consumo de nutrientes**

**a) Velocidad volumétrica 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/Litro\*hora

**b) Velocidad específica de consumo de sustrato.**

$$q_s = -\frac{1}{X} * \left( -\frac{ds}{dt} \right)$$

Donde:

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

$-ds / dt$ : velocidad volumétrica de consumo de sustrato

$x$ : gramos de biomasa: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

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

**3.3.5.3 Formación de producto.**

**a) Velocidad volumétrica de formación 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 glucónico (g / L.h)

$P_2$ : Concentración (g /L) final de ácido glucónico

$P_1$ : Concentración (g/L) inicial de ácido glucónico

$t_2$ : tiempo final

$t_1$ : tiempo inicial

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

### **b) Velocidad específica de formación de productos.**

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

Donde:

$q_p$ : velocidad específica de producción de ácido glucónico

$x$ : gramos de biomasa / litros de muestra analizada

$dp/dt$ : velocidad volumétrica de producción de ácido glucónico

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

### **3.3.5.4 Rendimiento en el cultivo.**

#### **Rendimientos de biomasa y de producto.**

Son parámetros muy importantes, ya que representan la eficacia de conversión del sustrato en biomasa y productos. Se define como la masa de biomasa o producto formado por unidad de masa de sustrato consumido.

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

Donde:

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

$dp$ : gramos de ácido glucónico

$-ds$ : gramos de sustrato consumido

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

### 3.4 METODOS ANALITICOS.

#### a) Valoración volumétrica <sup>(27)</sup>.

El procedimiento operativo consiste en hacer reaccionar dos disoluciones. Una en la cual se encuentra la sustancia que se desea cuantificar convenientemente disuelta en un disolvente adecuado; otra de la cual se conoce exactamente su concentración. A esta última disolución se le denomina “disolución patrón valorante” (también, disolución valorante) y la de concentración desconocida “disolución a valorar” o “disolución valorada”. Una de las dos, generalmente la valorante, deberá colocarse en una bureta para ir añadiendo volúmenes sucesivos de la misma hasta finalizar la valoración. El volumen exacto de la otra disolución debe ser previamente fijado y medido exactamente con una pipeta. La concentración de la disolución patrón se expresa, usualmente, en mol por litro de disolución (mol/L), y representa la concentración de cantidad de sustancia de equivalentes o normalidad de dicha disolución.

La valoración culmina cuando se alcanza el punto estequiométrico o punto de equivalencia, es decir cuando la cantidad de sustancia de equivalentes de la especie que se valora ha reaccionado completamente con una idéntica cantidad de sustancia de equivalentes del patrón (o agente) valorante adicionado.

El punto de equivalencia de la valoración es un concepto teórico, en la práctica, solo se puede apreciar una aproximación a este punto a la que se denomina **punto final de la valoración**. La detección del punto final de la valoración se realiza con la ayuda de un indicador, nombre con el cual se conocen aquellas sustancias que provocan un cambio físico visible (variación de color, aparición de un precipitado u otras señales perceptibles al ojo humano) en la disolución que se valora. Este cambio físico apreciable es lo que indica que debe detenerse la adición de la disolución patrón valorante, es decir, que debe darse por concluida la valoración.

La diferencia que existe entre el volumen de valorante que corresponde al punto final y el que corresponde al punto de equivalencia constituye el error de valoración. Las causas fundamentales de error en una valoración pueden ser: a) error químico, debido a la diferencia entre el punto final y el punto de equivalencia; b) error visual, que es una medida de la dispersión causada por la limitada capacidad del ojo para recordar o comparar colores; y c) error del indicador, debido al consumo de valorante por el propio indicador.

Dentro de la gama de valoración volumétrica, se tiene un tipo que se llama: **Volumetría de Neutralización (o volumetría Ácido-Base)**. Esta comprende las determinaciones basadas en reacciones entre ácidos y bases. La ecuación química general que caracteriza a la volumetría de neutralización es:

$H^+ + OH^- \rightleftharpoons H_2O$ . La Volumetría de Neutralización posee una enorme aplicación en el campo del análisis de las materias primas, y productos farmacéuticos para la determinación de compuestos con características ácidas o básicas.

**b) Espectroscopía de absorción ultravioleta / visible.** <sup>(38)</sup>

El principio de la espectroscopía ultravioleta / visible involucra la absorción de radiación ultravioleta / visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado. La absorción de radiación ultravioleta / visible por una especie se da en 2 etapas:

- 1) Excitación electrónica.
- 2) Relajación. En esta se puede dar otras fases:
  - Emisión de calor
  - Reacción fotoquímica.
  - Emisión de fluorescencia / fosforescencia.

### c) Cromatografía de capa delgada.

La cromatografía de capa fina o TLC (thin layer chromatography), fue introducida como una técnica práctica por Kirchnel, pero tuvo muy poco uso hasta que E. Stahl la popularizó de 1950 <sup>(33)</sup>.

Esta técnica consiste en la separación de las sustancias de una mezcla por migración diferencial sobre una capa delgada de un adsorbente o gel, con o sin aglutinante, embadurnado en un soporte rígido o flexible.

La cromatografía de capa delgada es un método fisicoquímico fundado en la separación de los componentes en una mezcla, por migración diferencial de solutos transportados por una fase móvil, que son retenidos selectivamente por una fase estacionaria (inmóvil). La fase inmóvil o estacionaria puede ser sólida o líquida. Este método se ha aplicado en la separación y análisis de muchas clases de compuestos, como son: vitaminas, numerosos alcaloides, carbohidratos, ácidos grasos, ácidos orgánicos, aceites esenciales, esteroides y esteroides, etc. <sup>(3)</sup>

### 3.5 HONGO *Aspergillus niger*.



A. Colonias de *A. niger*



B. Conidias

Figura N° 2. Morfología de *Aspergillus niger*

#### Clasificación científica:

Dominio: Eucaryota

Reyno: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Pezizomycotina

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: ***Aspergillus***

Especie: ***Aspergillus niger***

El ***Aspergillus*** es un género de alrededor de 200 hongos. Puede existir en dos formas básicas: levaduras e hifas. El ***Aspergillus*** es filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas, el tipo de hongos opuesto a las levaduras, que se componen de una sola célula redonda) <sup>(20)</sup>.

La reproducción es asexual: género característico, fue descrito en 1729 por el italiano P:A: Micheli, en su célebre obra “ nova plantarum genera”. Le dió el nombre ***Aspergillus***, derivado de la palabra latina asper = áspero. Su distribución geográfica es amplia, y se han observado en una amplia gama de hábitat, pueden establecer sus colonias en una extensa variedad de sustratos<sup>(12)</sup>.

El ***Aspergillus niger*** se encuentra comúnmente como un hongo saprofita, crece en hojas muertas, granados almacenados, el compostaje, heno. Además crece en vegetales como: la lechuga, el tomate o la acelga; en los cuales produce un moho negro <sup>(20)</sup>.

El género ***Aspergillus*** se definen generalmente como hongo saprófitos asexuales que producen grandes conidios negros o marrón por hialinas que

están organizados en una cabeza globosa radiada de una vesícula o conidióforos esféricos.

Ramper y Fennell (1965) designó la existencia de 15 especies comprendidas en el grupo de *Aspergillus niger* que incluyen todos los *Aspergillus* con conidios negros <sup>(21)</sup>.

Las colonias de *Aspergillus niger* aisladas en agar Czapeck o agar Sabouraud, inicialmente son cubiertas por un micelio aéreo blanco, veloso. A medida que la colonia madura, se observa un efecto de sal y pimienta, la superficie finalmente es cubierta por esporas negras. El reverso de la colonia permanece con un color tostado claro, que lo distingue de otros hongos. La coloración negra de las colonias se debe a las conidias negras. Estas son soportadas por conidióforos largos no septados, cuyos extremos hinchados miden 80 $\mu$  de diámetro. Los esterigmas están ramificados y dispuestos en pisos. Los esterigmas primarios son largos, mientras que los secundarios (y en algunos casos los terciarios) son cortos. El extremo es fuertemente abultado, los esterigmas ramificados dan origen a que la umbela de las conidias adquiera un aspecto diferente de todas las restantes especies de *Aspergillus* <sup>(12)</sup>.

### 3.5.1 Reproducción del *Aspergillus niger* <sup>(12)</sup>

La reproducción de este microorganismo es asexual y se da cuando es joven y vigoroso, el micelio produce abundantes conidióforos (ver figura N° 3). Estos no se organizan de ninguna manera, sino que nacen aislados directamente de las hifas somáticas. La célula hifal que se ramifica para dar lugar al conidióforo recibe el nombre de célula basal. Los conidióforos son hifas largas, erguidas, cada una termina en una cabeza, llamada vesícula.

Sobre toda la superficie de la vesícula multinucleada se desarrolla una gran cantidad de esterigmas que la cubren completamente.

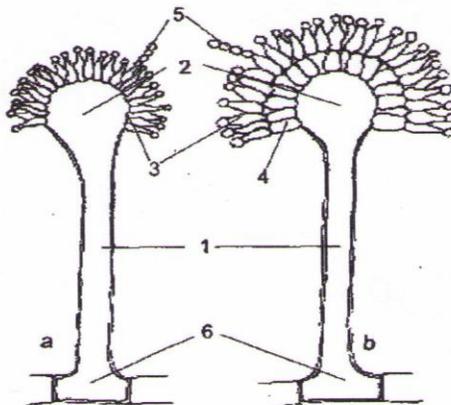


Figura N° 3. Conidióforos del género *Aspergillus*. a: uniseriado; b: biseriado; 1: estipe o “parte media del conidióforo”; 2: vesícula o “ápice hinchado del conidióforo”; 3: fiálide o “célula conidiógena”; 4: métula o “célula soporte”; 5: conidio; 6: célula pie o “parte basal del conidióforo”. Adaptada y ampliada de Klich y Samson (1996)

A medida que maduran los esterigmas, comienzan a formarse conidios en sus extremos, uno debajo del otro, en cadenas. Los conidios son globosos y unicelulares, con paredes externamente rugosas. Al principio unicleados, en muchas especies, por divisiones nucleares sucesivas, pronto se hacen multinucleados; sin embargo, en la mayoría de las especies los conidios permanecen unicleados.

Los conidios de los *Aspergillus* se forman dentro del extremo del esterigma, un tabique transversal delimita una porción del protoplasma con un núcleo. El protoplasto se redondea y segrega una pared propia dentro del esterigma tubular, además llega a desarrollar un conidio. La pared conidial puede fusionarse parcial o completamente con la pared del esterigma. Entre tanto un segundo protoplasto, debajo del primero, crece para formar otra espora y empuja la primera espora hacia el exterior, de manera que se forma una cadena de esporas a medida que el protoplasma del esterigma continúa creciendo y nuevos conidios se organizan uno debajo del otro.

Como los conidióforos se producen en gran abundancia, es su color predominante sobre las colonias que cubren. De manera que parecen ser negras.

El color de sus colonias es uno de los criterios que se utilizan para su determinación, pero no se puede dejar de destacar la importancia de elegir un medio idóneo para su cultivo en laboratorio.

### 3.5.2 Patologías producidas.

El *Aspergillus niger* no causa tantas enfermedades como otras especies de *Aspergillus*, pero en altas concentraciones puede producir aspergilosis, que provoca alteraciones pulmonares.

Históricamente es seguro el uso del *Aspergillus niger* principalmente en la industria alimentaria para la producción de muchas enzimas como: amilasa, glucosa-oxidasa, celulasas, lactasa, invertasa, ácido proteasa; así como en la producción de ácidos orgánicos como: el ácido cítrico y glucónico por medio de procesos de fermentación (21). Otros medios de cultivo utilizados a nivel de laboratorio para su mantenimiento son: el medio 19<sup>(15)</sup>, Papa dextrosa y Agar Czapeck. (Ver cuadro N° 1)

CUADRO N° 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA EL MANTENIMIENTO DEL *Aspergillus niger*

| MEDIO    | COMPOSICION                                      | CANTIDAD (g / L) |
|----------|--|------------------|
| MEDIO 19 | Glucosa comercial                                | 5.0              |
|          | Agua de cocimiento de maíz                       | 0.18             |
|          | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O             | 0.016            |
|          | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                  | 0.12             |
|          | Urea   | 0.011            |
|          | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.042            |
|          | Agar   | 2.0              |

CUADRO N° 1. CONTINUACION

|              |      |           |
|--------------|------|-----------|
| MEDIO 19     | pH   | 6.0 – 6.5 |
| PAPADEXTROSA | Agar | -         |
| Czapeck      | Agar | -         |

### 3.6 ACIDO GLUCONICO.

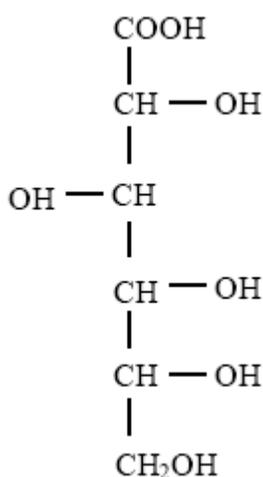


Figura N° 4. Estructura Química del Ácido Glucónico

#### 3.6.1 Generalidades.

Este es un ácido orgánico que se obtiene por fermentación microbiana, siendo uno de los métodos más económicos, con el uso de la D-glucosa, pero también es obtenida por una oxidación electroquímica o catalítica.

Además se ha descrito un proceso para la inmovilización de células o de glucosa-oxidasa que conduce a rendimientos del 93%; cuando se utiliza oxígeno puro.

El ácido glucónico ha tenido una larga historia en la Microbiología Industrial. En 1911 Alsberg describió la producción de este ácido con *pseudomonas*. Luego en 1928 se realizó el primer proceso con un hongo, un proceso en superficie

utilizando *penicillium luteum purpurogenum*. En este proceso los rendimientos ascendieron del 80 – 87% del teórico.

Otros organismos que han sido optimizados para producir ácido glucónico, pero que no han sido utilizados comercialmente, utilizan los hongos: *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Gonatotryps*, *Endomycopsis* y *Pullularia* y las bacterias *Vibrio* y *Pseudomonas*. En la actualidad para su producción a nivel industrial se utilizan cepas superproductoras como: el hongo *Aspergillus niger*, de manera especial la cepa de elección es la NRRL3; debido que no produce paralelamente ácidos cítrico y oxálico bajo condiciones de operación y la bacteria *Acetobacter suboxidans* (16, 37).

### 3.6.2 Fuentes naturales del Ácido Glucónico.

El ácido glucónico es un ácido azucarado de 6 átomos de carbono que se suele encontrar en el intestino de animales carnívoros procedentes bien de la propia dieta, o a partir de las secreciones de las células del epitelio intestinal en forma de “mucus”; los ácidos glucónico y cetoglucónico se encuentran en tejido muscular, siendo generados por proceso de oxidación (Farber y Idziak, 1982)<sup>(31)</sup>.

El ácido glucónico se encuentra en alimentos y bebidas como el vino, refrescos, vinagre, carne, zumo de frutas, productos lácteos, arroz y miel. Este ácido no volátil imparte un sabor amargo, pero refrescante y dada su aparición en los alimentos naturales y en el metabolismo humano se le ha concedido el estatus de GRAS <sup>(26)</sup>.

### 3.6.3 Descripción.

El ácido glucónico al 50% es una solución acuosa de ácido hidroxicarboxílico, de una mezcla estable de ácido glucónico y lactonas gamma y delta <sup>(36)</sup>.

Otras denominaciones con las que se conoce este ácido son: ácido D-glucónico, ácido dextrónico <sup>(40)</sup>.

### 3.6.4 Ruta metabólica del *Aspergillus niger* que lleva a la formación del ácido glucónico y sus respectivas gluconas.

El *Aspergillus niger*, contiene una enzima llamada glucosa-oxidasa que es la responsable de convertir el azúcar a ácido glucónico. Esta enzima es una flavoproteína; ésta a su vez, ha sido identificada como un antibiótico en los caldos de fermentación, por tanto es conocida bajo los nombres de notatina y penicilina B, debido a que en su actividad conduce a la formación de peróxido de hidrógeno que tiene actividad antimicrobiana (16).

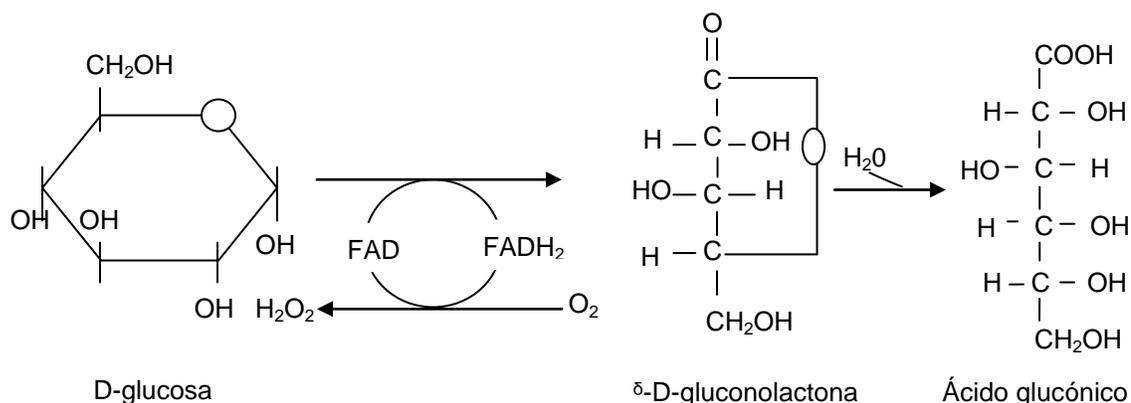
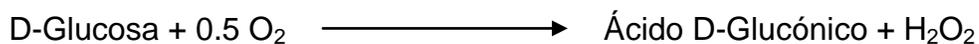


Figura N° 5. Síntesis del Ácido Glucónico durante la fermentación (16)

La glucosa oxidasa remueve dos hidrógenos de la glucosa, reduciéndose la enzima. La forma reducida de la enzima se reoxida con oxígeno molecular resultando agua oxigenada que luego es hidrolizada por una catalasa. La ecuación neta se puede escribir:



Se ha demostrado que para el *Aspergillus niger*, la glucosa oxidasa y la catalasa se encuentran en peroxisomas evitándose de esta forma la toxicidad por  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

El último paso para la obtención del glucónico es la hidrólisis de la  $\delta$ -lactona. Esta puede ocurrir espontáneamente o por intermedio de una lactonasa (que se halla presente en el *Aspergillus niger*). La acumulación de la lactona reprime la producción de glucónico. La hidrólisis de la lactona ocurre espontáneamente a alta velocidad a un pH neutro o alcalino. El pH ácido es importante para la actividad de la lactonasa.

El pH es un factor importante para favorecer la ruta metabólica que lleva a la producción de glucónico, ya que a valores de este neutros o alcalinos, el *Aspergillus niger* produce este ácido casi exclusivamente. Además, a valores de pH entre 1 y 3, el glucónico es rápidamente metabolizado por este microorganismo <sup>(37)</sup>.

### **3.6.5 Aplicaciones del ácido glucónico y sus respectivas sales.**

En el campo médico, las sales férricas y cálcicas del glucónico se utilizan para proporcionar los correspondientes cationes en pacientes con anemia y deficiencia de calcio. El gluconato de zinc se utiliza en el tratamiento del acné vulgar y el gluconato de magnesio se ha descrito como un potente protector celular debido que actúa como agente reductor frente a radicales libres <sup>(31)</sup>.

El gluconolactato de calcio, es obtenido a partir de la reacción de ácido láctico y glucónico en medio acuoso; puede ser usado como un calcificante en general, para prevenir la hipocalcemia, hipoparatiroidismo, la osteomalacia, tratamiento sintomático de osteoporosis en especial en la menopausia, calcificar en la lactancia y la niñez <sup>(35)</sup>.

La sal sódica del ácido glucónico es el derivado con mayor importancia comercial, por ser un excelente agente acomplejante, se le utiliza en soluciones lavadoras de material de vidrio, soluciones alcalinas de NaOH, particularmente en el caso de botellas retornables; los carbonatos de metales di y trivalentes son fácilmente removidos por estas soluciones. Además es útil en cementos

mezclas, donde modifican las propiedades de fraguado e incrementa la dureza y resistencia al agua del cemento <sup>(37)</sup>. Otra aplicación de esta sal es en procesos técnicos, especialmente en acabados de superficie metálica.

En la industria textil, la sal sódica del ácido glucónico se le utiliza para inhibir precipitaciones en fibras y remover incrustaciones; por su acción secuestrante de esta sal <sup>(40)</sup>.

En la industria de alimentos el ácido glucónico es utilizado como regulador de la acidez y como potenciador del sabor. En la preparación de salsas se utiliza como equilibrador de pH <sup>(31)</sup>.

En el campo agrícola, los quelatos de hierro del ácido glucónico son útiles para tratar cultivos agrícolas con deficiencia de hierro. Algunos cultivos que se han tratado con esta sal son: el maíz, la arveja, la lechuga, los aguacates, las azaleas y las cosechas de forraje <sup>(19)</sup>.

La única forma de producir Ácido Glucónico es en estado líquido, pero la forma de comercializarlo es en líquido claro de consistencia de jarabe, entre incoloro y amarillo claro <sup>(39)</sup>.

### **3.7 MEDIO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DEL ÁCIDO GLUCÓNICO: DULCE DE ATADO.**

#### **3.7.1 Caña de azúcar.**

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). Es una planta herbácea perenne del género *Saccharum*, originaria de Asia probablemente de Nueva Guinea, para su cultivo requiere condiciones climatológicas asociadas a climas tropicales y subtropicales, con requerimientos edáficos de suelos arcillosos y profundos, y representa una amplia tolerancia a la altura; ya que se adapta desde el nivel del mar hasta los 1623 msnm (metros sobre el nivel del mar) <sup>(23)</sup>.



Figura N° 6. Caña de azúcar

Su reproducción es agamica y sus raíces muy ramificadas. Su forma es recta con tallos cilíndricos de 2 a 5 metros de altura, diámetro variable de de 2 a 4 cm y nudos pronunciados sobre los cuales se insertan alternadamente las hojas delgadas <sup>(28)</sup>.

La caña de azúcar es un cultivo que se introdujo en el mestizaje culinario, durante la época de la conquista española en América. Con la caña también llegaron los trapiches y el proceso de molienda así como sus productos <sup>(32)</sup>.

#### **Composición de la caña de azúcar** <sup>(7)</sup>.

La composición de una caña de azúcar cultivada en el trópico tiene los valores promedios siguientes: (ver cuadro N° 2)

CUADRO N° 2. COMPOSICION DE LA CAÑA DE AZUCAR

| PRODUCTO   | %    |
|--|------|
| Agua   | 74.5 |
| Cenizas (óxidos de silicio. Potasio, sodio, calcio, magnesio, hierro y fósforo). | 0.5  |
| Fibra (celulosa, pentosanas, gomas, ligninas).                                   | 10.0 |

## CUADRO N° 2. CONTINUACION

|  |      |
|--|------|
| Azúcares :   |      |
| Sacarosa   | 12.5 |
| Glucosa  | 0.9  |
| Fructosa   | 0.6  |
| Grasas y ceras                                     | 0.2  |
| Substancias nitrogenadas                           | 0.4  |
| Pectina  | 0.2  |
| Ácidos libres (málico, succínico, oxálico, tánico) | 0.08 |

**3.7.2 Dulce de Atado.**

Figura N° 7. Dulce de atado (Dulce de panela)

La Panela como es conocida en Colombia, se hace también en Venezuela, en Centro América (papelón), en México (piloncillo), en Ecuador, Bolivia y Perú (chancaca) <sup>(32)</sup>.

El proceso de producción de la panela es básicamente el mismo, en las distintas regiones donde se elabora. Sin embargo, en cada región se aplican variaciones tradicionales con respecto a la extracción del jugo, la clarificación y concentración del mismo, la operación de punteado y batido; así como en los equipos utilizados y compuestos químicos empleados para la clarificación. Es probable también que la variedad de caña de azúcar y las prácticas culturales

aplicadas sean factores importantes en la producción y calidad de la panela y en su composición química <sup>(18)</sup>.

La panela es un producto alimenticio derivado de la caña de azúcar; obtenido por la concentración del jugo de caña, y la consiguiente cristalización de la sacarosa que contiene conjuntamente con los minerales, vitaminas y otros productos orgánicos acompañantes.

Se elabora en unos veintiún países, de los cuales la India ocupa el primer lugar, con más de cuatro millones de toneladas al año; allí se le conoce con el nombre de Gur, que significa “Ciudad del Azúcar”. Le siguen en importancia Pakistán, con una producción de más de un millón de toneladas anuales, y en tercer lugar se clasifica Colombia, con un promedio de producción anual de ochocientas mil toneladas. Los demás países productores en Latinoamérica son: Brasil. Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Nicaragua (Centro América), y Panamá <sup>(7)</sup>.

CUADRO N° 3. CONTENIDO DE NUTRIENTES DE LA PANELA <sup>(7)</sup>

| Componente    | <u>Contenido en 100g</u><br>PANELA |
|---------------|------------------------------------|
| Calorías      | 312                                |
| Agua          | 12.3 g                             |
| Proteínas     | 0.5 g                              |
| Grasa         | 0.1 g                              |
| Carbohidratos | 86.0 g                             |
| Cenizas       | 1.1 g                              |
| Calcio        | 80.0 mg                            |
| Fósforo       | 60.0 mg                            |
| Hierro        | 2.4 mg                             |
| Tiamina       | 0.02 mg                            |

CUADRO N° 3. CONTINUACION

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Riboflavina     | 0.07 mg |
| Niacina         | 0.30 mg |
| Ácido ascórbico | 3..0 mg |

La panela es utilizada en Colombia como bebida o como edulcorante, se consume tanto en el área rural como urbana, debido a aporte nutritivo que ella presenta; su consumo es de varias formas: de manera directa, como dulce; como tetero, que es una mezcla de leche y agua de panela en varias proporciones; se utiliza para proporcionar el sabor dulce a las comidas; y como edulcorante en mezcla con pastillas y licores (7).

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLOGICO.

### TIPOS DE ESTUDIO:

**Retrospectivo:** Existen investigaciones anteriores que sirvieron de base para el estudio realizado.

**Prospectivo:** Debido que este trabajo de graduación podrá ser utilizado en el futuro para otras investigaciones.

**Experimental:** Porque durante el desarrollo de la investigación se utilizaron técnicas y procesos de laboratorio; los cuales fueron realizados en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

### 4.1 Investigación de campo.

Para el presente estudio no aplica una investigación de campo; debido que la cepa del hongo utilizada ya ha sido seleccionada y clasificada a nivel de laboratorio mediante estudios pertinentes establecidos. Y con respecto al medio de cultivo “Dulce de atado” utilizado para producir el ácido fue comprado directamente de las tiendas distribuidoras, siendo un producto alimenticio popular.

### 4.2 Parte experimental.

El microorganismo utilizado para la producción del Ácido Glucónico, y su respectivo estudio cinético durante la fermentación microbiana fue: una cepa del *Aspergillus niger*, proporcionado por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

Medio de cultivo utilizado para la producción del Ácido Glucónico: Dulce de atado de la caña de azúcar (Dulce de panela).

#### 4.2.1 Medio de cultivo de mantenimiento de Agar Sabouraud de la cepa *Aspergillus niger* (preparación ver anexo N° 9).

1. Tomar con un asa previamente esterilizada una colonia del *Aspergillus niger* y sembrar, usando técnica de estriado, sobre la placa de petri que contiene el medio de cultivo de Agar Sabouraud estéril por triplicado.
2. Tapar inmediatamente la placa de petri, sellar alrededor de ella con tirro.
3. Incubar las tres placas a temperatura de 28°C durante 8 días
4. Observar después de los 8 días de incubación las características morfológicas, microscópicas y macroscópicas.

#### 4.2.2 Preparación de la suspensión del inóculo (tween 80 al 0.1%, ver anexo N° 7)

**Las condiciones ambientales para la preparación del inóculo fueron las siguientes:** Temperatura de 28°C y un ambiente estéril para evitar la contaminación por agentes externos al inóculo.

1. Realizar un arrastre suavemente con un hisopo estéril al interior de la placa de petri que contiene las esporas de *Aspergillus niger*, teniendo cuidado de no arrastrar medio de cultivo al hisopar.
2. Introducir las esporas sobre un beaker estéril de 50 mL que contenga 20 mL de tween 80 al 0.1%, previamente esterilizado.

**NOTA:** Precauciones a tomar durante la manipulación de la cepa del hongo *Aspergillus niger*: utilizar gabacha manga larga, lentes protectores para la vista, mascarilla para evitar la inhalación de las esporas; además cubrir con gorro la cabeza y guantes para evitar un contacto directo con sus esporas. Esterilizar el área de trabajo con vapores de formaldehído antes y después del proceso de fermentación; esterilizar material antes y después de ser utilizado

#### **4.2.3 Preparación del Biorreactor.**

1. Lavar con agua y jabón el Biorreactor de 1.5 L de capacidad.
2. Enjuagar con agua hirviendo.
3. Limpiar el interior del Biorreactor con alcohol isopropílico; dejar evaporar el alcohol.
4. Agregar agua destilada para eliminar los restos de alcohol isopropílico.
5. Finalmente dejar escurrir hasta que esté completamente seco.
6. Preparar el equipo de fermentación: soporte, motor del fermentador, agitador de propela y bomba de oxígeno.

#### **4.2.4 Preparación de la fuente de oxígeno.**

1. Lavar las mangueras de pvc con agua y jabón.
2. Enjuagar con agua hirviendo
3. Limpiar con alcohol isopropílico; dejar evaporar el alcohol.
4. Enjuagar las mangueras con agua estéril para eliminar los restos de alcohol, dejar escurrir.

#### **4.2.5 Preparación del medio de cultivo de fermentación.**

1. Preparar 1L (30g de dulce de atado en 1000 mL de agua) de medio de cultivo productor del Ácido Glucónico (preparación ver anexo N° 9).
2. Checar el pH del medio de cultivo y ajustar a pH 3.0, con la adición de una solución de HCl 1N. Mantener a pH 3.0 durante los 6 días del proceso de fermentación.

#### 4.2.6 Cinética de producción del Ácido Glucónico.

1. Tomar una alícuota de 20 mL del medio de cultivo de fermentación y depositar en un matraz estéril de 125 mL. Rotular como matraz control, refrigerar.
2. Pipetear 20 mL de la suspensión del inóculo; previamente preparado en el numeral 4.2.2 y depositar en el Biorreactor que contiene el medio de cultivo de fermentación.
3. Realizar un control inicial de colonias de *Aspergillus niger* mediante el método recuento en placa (ver anexo N° 3).
4. Tomar una alícuota de 50 mL del medio de cultivo de fermentación, depositar en un matraz estéril de 125 mL. Tapar y rotular la muestra como hora "0"; refrigerar.
5. Agregar 10 gotas de aceite mineral al medio de cultivo de fermentación para evitar la formación de espuma en el momento de la agitación.
6. Cubrir con papel aluminio el Biorreactor de 1.5 L que contiene el medio de cultivo de fermentación inoculado.
7. Incubar a temperatura de 28°C por 6 días.
8. Mantener una agitación constante durante las primeras 72 h (3 días). Luego apagar el motor del agitador y dejar de agitar por 24 h; transcurrido este tiempo agitar nuevamente por 24 h; seguir este procedimiento de agitación hasta completar las 120 h del proceso de fermentación.
9. Tomar muestras de 50 mL c/u del fermentador al transcurrir: 0, 24, 48, 72, 96, 120 horas. Llevar por duplicado las muestras.

10. Depositar cada muestra en un matraz estéril de 125 mL. Tapar, rotular y almacenar en refrigeración cada muestra para la realización de las siguientes determinaciones analíticas:

#### **4.2.7 Determinaciones analíticas.**

##### **4.2.7.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco <sup>(2)</sup>**

1. Secar el papel filtro en una estufa a 75°C por 2 horas.
2. Enfriar en desecador por 30 minutos.
3. Pesar el papel filtro en balanza analítica.
4. Filtrar 50 mL del medio de cultivo de fermentación y recibir el filtrado en un erlenmeyer estéril de 125 mL.
5. Guardar el filtrado en refrigeración para posteriores determinaciones.
6. Lavar el papel filtro que contiene la biomasa con tres porciones de 5.0 mL de agua estéril y recibir los lavados en otro erlenmeyer.
7. Colocar el papel filtro dentro de una placa de petri.
8. Secar el papel filtro en estufa a 75 °C por 2 horas.
9. Enfriar en desecador por 30 minutos.
10. Pesar el papel filtro, conteniendo la biomasa en balanza analítica. Por diferencia de peso determinar la biomasa.
11. Proceder de igual forma para las muestras recolectadas en los siguientes tiempos de fermentación: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, llevar por duplicado las muestras

**NOTA:** Realizar esta determinación en condiciones estériles

#### 4.2.7.2 Determinación de pH <sup>(14)</sup>

1. Tomar alícuota de 10 mL del filtrado obtenido en la determinación de biomasa.
2. Depositar en un tubo de ensayo. Tapar y rotular cada muestra.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C por 30 min todas las muestras obtenidas en los tiempos de fermentación siguientes: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas.
4. Dejar enfriar las muestras a T° ambiente antes de ser extraídas del autoclave.
5. Enfriar las muestras a 25°C en baño de hielo.
6. Tomar el pH de la muestra con el pH-metro previamente calibrado (ver anexo N° 5). Llevar por duplicado las muestras; llevar a la par un control del pH con papel pH de las muestras antes de esterilizar.
7. Repetir el procedimiento para las muestras extraídas en los siguientes tiempos de fermentación: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

**NOTA:** Antes de tomar el pH de las muestras, lavar los electrodos del pH-metro con tres porciones de agua libre de CO<sub>2</sub> y después con tres porciones de la muestra

#### 4.2.7.3 Determinación de grados °Brix <sup>(2)</sup>

1. Limpiar el portamuestra del Brixómetro, usando algodón impregnado con alcohol.
2. Calibrar el Brixómetro, usando una gota de agua estéril.
3. Depositar sobre el portamuestra del Brixómetro una gota del filtrado obtenido durante la determinación de la biomasa.

4. Realizar la lectura de grados °Brix, orientando el Brixometro hacia la luz para observar mejor la escala.
5. Repetir esta operación para las muestras obtenidas en los siguientes tiempos del proceso de fermentación: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, llevar por duplicado las muestras.

#### **4.2.7.4 Elaboración de la curva estándar de glucosa** <sup>(2)</sup>

1. Pesar 0.02 g de glucosa anhidra, en balanza analítica.
2. Transferir a un frasco volumétrico de 100 mL.
3. Agregar 30 mL de agua destilada, agitar hasta disolver, aforar a volumen y homogenizar.
4. Preparar a partir de la solución estándar de glucosa, las soluciones que se detallan en la tabla N° 1.
5. Llevar a T° ambiente y leer en el espectrofotómetro uv/visible a una longitud de onda de 490 nm.
6. Utilizar como blanco el tubo de ensayo N°. 1 de la tabla N° 1

#### **4.2.7.5 Determinación de azúcares totales (Método fenol-sulfúrico)** <sup>(2)</sup>

1. Tomar alícuota de 10 mL del filtrado obtenido durante la determinación de biomasa.
2. Depositar en un tubo de ensayo.
3. Agregar 1.0 mL de sulfato de zinc al 10% más 1.0 mL de hidróxido de sodio 0.5N TS.
4. Reposar por 15 min. a temperatura ambiente.

5. Centrifugar por 15 min. a 1000 rpm.
6. Tomar 2.5 mL del sobrenadante, obtenido del paso anterior.
7. Depositar en otro tubo de ensayo, agregar 2.5 mL de agua destilada más 0.1 mL de fenol al 80%; agitar después de cada adición.
8. Colocar los tubos de ensayo en baño de hielo. Agregar 5.0 mL de ácido sulfúrico concentrado. Agitar y dejar reposar por 30 min.
9. Determinar la absorbancia en el espectrofotómetro, previamente calibrado a una longitud de onda de 490 nm. Los valores obtenidos interpolarlos en una curva tipo de glucosa de 0 a 100 µg/mL, elaborada en la tabla N° 1.
10. Repetir este procedimiento para las muestras extraídas en los siguientes tiempos: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Llevar por duplicado las muestras.

**TABLA N° 1. CURVA ESTANDAR DE GLUCOSA**

| Tubo | Sol. de glucosa (mL) | H <sub>2</sub> O estéril (mL) | Fenol 80% (mL) | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado (mL) |
|------|----------------------|-------------------------------|----------------|---|
| 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:** Una vez agregado el ácido sulfúrico por las paredes del tubo de ensayo en un baño de hielo, dejar reposar por 30 minutos

La concentración de azúcares se determinó mediante el espectrofotómetro Uv/visible; en la que se calculó las absorbancias de las muestras a una longitud de onda de 490 nm, llevando un estándar de glucosa.

#### 4.2.7.6 Determinación de la acidez total <sup>(1, 8)</sup>

1. Llenar bureta de 25 mL con la solución valorante de Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N VS (preparación, ver anexo N° 7).
2. Medir con pipeta volumétrica 5.0 mL del filtrado obtenido en la determinación de biomasa.
3. Depositar en un erlenmeyer de 125 mL, diluir con 10 mL de agua desmineralizada, agitar.
4. Agregar 1 o 2 gotas de fenolftaleína, agitar después de cada adición.
5. Titular la muestra preparada en el paso anterior con la solución valorante de Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N VS (previamente estandarizado, ver anexo N° 8). Agitar después de cada adición.
6. Titular hasta la aparición de una coloración rosado-tenué (punto final).
7. Anotar la cantidad de valorante gastado.
8. Llevar por duplicado cada muestra.

Fórmula para calcular la acidez:

$$\% \text{ de Acidez Total} = \frac{\text{mL NaOH gastado} * \text{N NaOH} * \text{Meq ac. glucónico} * 100}{\text{mL de muestra}}$$

**NOTA:** Realizar esta determinación analítica para las muestras: 0, 24, 48, 72, 96, 120 horas

#### **4.2.7.7 IDENTIFICACION DEL ACIDO GLUCONICO.**

##### **4.2.7.7.1 Identificación del Ácido Glucónico por cromatografía en capa fina (TLC)** (3, 4 y 11)

1. Cubrir con papel filtro las paredes de la cubeta cromatográfica.
2. Verter en la cubeta una cantidad de fase móvil (preparación, ver anexo N° 7) adecuada al tamaño de la cubeta para alcanzar una altura del líquido de 5 mm a 10 mm.
3. Dejar saturar el papel filtro con la fase móvil.
4. Tapar la cubeta y dejar reposar a T° ambiente durante 1 hora.
5. Depositar 20 µL de muestra sobre una placa cromatográfica, del filtrado obtenido en la determinación de biomasa y 20 µL del Std de ácido glucónico. Intercalar muestra y Std a una distancia de 10 mm para cada aplicación
6. Dejar evaporar el disolvente de las soluciones, tanto de muestra como estándar.
7. Colocar la placa cromatográfica dentro de la cubeta cromatográfica en una posición lo más vertical y por encima del nivel de la fase móvil, tapar la cubeta.
8. Dejar desarrollar el cromatograma a T° ambiente por 1 hora.
9. Sacar la placa cromatográfica e inmediatamente marcar el frente del solvente. Dejar secar la placa cromatográfica a T° ambiente.
10. Rociar la placa con el agente revelador “reactivo de tillman”
11. Dejar secar las manchas de la placa cromatográfica a T° ambiente.

12. Calcular los Rf correspondientes.

13. Repetir el procedimiento para las muestras extraídas del fermento de los siguientes tiempos: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

FORMULA:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto (mm)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (mm)}}$$

#### 4.2.7.7.2 Prueba alterna de identificación del Ácido Glucónico <sup>(6)</sup>

1. Tomar una alícuota de 0.5 mL del filtrado obtenido durante la determinación de biomasa.
2. Depositar en un tubo de ensayo.
3. Agregar 2.0 mL de agua destilada, más 0.1 mL de fenol al 80%, agitar después de cada adición.
4. Llevar a la par estándar de glucosa y ácido glucónico, tratar de igual forma que la muestra.
5. Sumergir los tubos en baño de agua fría y agregar lentamente sobre las paredes del tubo a c/u 5.0 mL de ácido sulfúrico concentrado.
6. La formación de un anillo en la interface de color salmón tanto en el estándar de ácido glucónico como en la muestra. Prueba confirmativa para ácido glucónico en la muestra.
7. Realizar esta determinación para las muestras extraídas durante los tiempos de: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

#### 4.2.7.8 Elaboración de la curva estándar de Ácido Glucónico

##### Preparación del estándar

Concentración inicial del Ácido Glucónico 50% (50 g de Ácido Glucónico en 100 mL. Concentración a la cual se comercializa).

1. Tomar 1.0 mL de Ácido Glucónico (0.5 g)
2. Depositar en un frasco volumétrico de 100 mL, aforar a volumen con agua destilada y homogenizar (5000 µg/mL).
3. Tomar 1.0 mL (5000 µg de Ácido Glucónico) de la solución anterior, depositar en balón de 25 mL. Llevar a volumen con agua destilada, homogenizar (200 µg/mL). Preparar a partir de aquí las soluciones indicadas en la tabla N° 2.
4. Leer la absorbancia de cada tubo en el espectrofotómetro uv/visible a una longitud de onda de 276 nm.
5. Utilizar como blanco la solución del tubo N°. 1, indicada en la tabla N° 2
6. Anotar las absorbancias.

TABLA N° 2. PREPARACION DE LA SOLUCION ESTANDAR DE ACIDO GLUCONICO

| Tubo N° | mL de solución estándar | mL de agua destilada | mL de fenol al 80% | mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. | Longitud de onda del St de ácido glucónico |
|---------|-------------------------|----------------------|--------------------|--|--|
| 1       | 0.0                     | 5.0                  | 0.1                | 5.0  | 276 nm.                                    |
| 2       | 0.5                     | 4.5                  | 0.1                | 5.0  |  |
| 3       | 1.0                     | 4.0                  | 0.1                | 5.0  |  |
| 4       | 1.5                     | 3.5                  | 0.1                | 5.0  |  |
| 5       | 2.0                     | 3.0                  | 0.1                | 5.0  |  |

TABLA N° 2. CONTINUACION

|   |     |     |     |     |        |
|---|-----|-----|-----|-----|--------|
| 6 | 2.5 | 2.5 | 0.1 | 5.0 | 276 nm |
| 7 | 3.0 | 2.0 | 0.1 | 5.0 |        |

**NOTA:** Antes de adicionar el ácido sulfúrico concentrado sumergir los tubos en baño de agua fría y adicionar lentamente sobre las paredes del tubo de ensayo, después dejar reposar por 30 minutos

#### 4.2.7.9 Determinación de Ácido Glucónico en las muestras

1. Tomar una alícuota de 2.5 mL del filtrado obtenido en la determinación de biomasa y seguir igual que el procedimiento del estándar según tabla N° 2.
2. Realizar esta determinación para las muestras recolectadas en los tiempos de fermentación: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, llevar por duplicado cada muestra.

**NOTA:** Seguir el ejemplo del tubo N° 6 de la tabla N° 2 para la preparación de las muestras

**CAPITULO V**  
**RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Esta etapa comprende la evaluación de la cinética de crecimiento microbiano del hongo *Aspergillus niger*, en la que se produjo el ácido glucónico utilizando como medio de cultivo productor del ácido, el dulce de atado y como medio de mantenimiento de la cepa, el Agar Sabouraud; para lo cual se llevó a cabo tres ensayos experimentales en los que se modificó la concentración inicial de sacarosa que es el sustrato principal del medio de cultivo y el pH del medio. Los tres ensayos fueron realizados en temperatura ambiente y se trabajó en condiciones estériles.

### ENSAYO No. 1

Se trabajó con una concentración inicial de sacarosa de 30 g/Litro de agua, pH de 2.67 y grados °Brix de 3.0, se le aplicó agitación con un agitador de propela y oxígeno mediante una bomba pecera. Antes de añadir el inóculo, se tomó la muestra control del medio de cultivo de fermentación, determinando en este momento la medición de los grados °Brix y pH; los cuales fueron: un pH de 2.62 y 3.0 grados °Brix. El inóculo de *Aspergillus niger* fue preparado con una suspensión de las esporas en una base de tween 80 y luego se procedió a inocular al medio de cultivo de fermentación. La hora cero inició desde el momento en que el medio de cultivo de fermentación fue inoculado, en este momento se tomó dos muestras e inmediatamente se les determinó pH y se refrigeró. El primer día de fermentación, el medio de cultivo fue agitado con un agitador de propela y en seguida se le aplicó oxígeno con una bomba de pecera. Este procedimiento se repitió el tercero y séptimo día de fermentación. El Segundo, cuarto, quinto y sexto día sólo se aplicó oxigenación. Durante este proceso se tomó una muestra por cada 24 horas excepto el quinto día que no fue posible por no tener acceso al laboratorio por ser domingo, obteniendo un total de siete muestras incluyendo las muestras iniciales de las 0 horas. Al finalizar el proceso de fermentación se procedió a determinar los siguientes

parámetros analíticos: pH, grados °Brix, biomasa, porcentaje de acidez total y azúcares totales; estos parámetros se muestran en la tabla N° 3. Es de mencionar que el ensayo N° 1 falló al no lograr determinar con la Técnica de Recuento en Placa, el número de colonias de los hongos con que inició el proceso de fermentación porque hubo un crecimiento acelerado y expansivo de las colonias. Además no se logró identificar y cuantificar el ácido glucónico; ni ensayar la curva de ácido glucónico. Este fallo se tiene dos razones: 1) El agente revelador (reactivo tillman) no reveló las manchas del ácido; Y 2) La fase móvil es muy polar y barrió la mancha del ácido de las placas cromatograficas al momento de rociar el agente revelador.

TABLA N° 3. PARAMETROS DE CINETICA DE CRECIMIENTO DEL ENSAYO E1

| PROMEDIO DE MUESTRAS DUPLICADAS SEGÚN HORAS DE FERMENTACIÓN | CINETICA DE CRECIMIENTO<br>PARAMETROS CINETICOS |       |             |          |                              |  |
|---|---|-------|-------------|----------|------------------------------|--|
|   | pH  | °Brix | Biomasa g/L | % Acidez | Azúcares Concentración mg/mL | Ácido Glucónico por cromatografía de capa fina |
| 0 horas   | 2.67  | 3.0   | 2.146       | 0.1383   | 0.3536                       | No identificado                                |
| 24 horas  | 2.63  | 3.0   | 1.345       | 0.1383   | 0.6994                       | No identificado                                |
| 48 horas  | 2.60  | 2.5   | 1.240       | 0.1844   | 0.9152                       | No identificado                                |
| 72 horas  | 2.58  | 3.0   | 1.037       | 0.1844   | 0.9594                       | No identificado                                |
| 96 horas  | 2.51  | 3.0   | 1.524       | 0.1998   | 0.6240                       | No identificado                                |
| 120 horas   | ***   | ***   | ***         | ***      | ***                          | ***  |
| 144 horas   | 2.55  | 3.5   | 2.526       | 0.1844   | 0.6968                       |  |
| 168 horas   | 2.55  | 3.5   | 1.957       | 0.2152   | 0.9906                       | No identificado                                |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo de muestras del medio de cultivo fermentación

## ENSAYO N° 2

Se trabajó con una concentración inicial de sacarosa de 80 g/Litro de agua y un pH inicial de 3.02, 7.2 grados °Brix y  $2 \times 10^{-3}$  UFC (unidades formadoras de colonias) iniciales en el proceso de fermentación. A la cepa se le dió mantenimiento en un medio de cultivo de Agar Sabouraud durante 1 mes, que consistió en proporcionarle los nutrientes esenciales para garantizar la nutrición del hongo y fortalecer sus enzimas esenciales. Se observó que el tiempo de mantenimiento fue demasiado prolongado, pues la cepa pasó de un estado de fortalecimiento y crecimiento a un estado de decrecimiento y muerte; el fallo se logró determinar por la disminución de la biomasa en las cero horas de iniciada la fermentación.

En este ensayo al medio de cultivo de fermentación se le administró sólo oxígeno de forma continua durante los 8 días. Se extrajo la muestra control a la que se le determinó 7.2 grados °Brix y 3.02 de pH. Durante la fermentación se extrajeron muestras por duplicado cada 24 horas, de cada duplicado se obtuvo la media de los parámetros cinético; obteniendo 7 muestras duplicadas en total. Cada muestra fue identificada de acuerdo al tiempo de fermentación: 0, 24, 48, 96, 120, 168 y 192 horas de fermentación. No se extrajo muestras a las 72 y 144 horas de fermentación por no tener acceso al laboratorio. Las 7 muestras duplicadas fueron puestas en refrigeración para detener el crecimiento microbiano. Finalizado el proceso de fermentación, se procedió al análisis para determinar la cinética de crecimiento microbiano, considerando los siguientes parámetros: pH, grados °Brix, biomasa, porcentaje de acidez total, azúcares totales e identificación del ácido glucónico mediante cromatografía en capa fina y se utilizó la fase móvil de n-propanol: acetato de etilo: agua (5:2:3). El resultado se describe en la tabla N° 4.

**TABLA N° 4. PARAMETROS DE CINETICA DE CRECIMIENTO DEL ENSAYO E2**

| PROMEDIO DE MUESTRAS DUPLICADAS SEGÚN HORAS DE FERMENTACIÓN | CINETICA DE CRECIMIENTO<br>PARAMETROS CINETICOS |       |             |          |                              |  |
|---|---|-------|-------------|----------|------------------------------|--|
|   | pH  | °Brix | Biomasa g/L | % Acidez | Azúcares Concentración mg/mL | Ácido Glucónico por cromatografía de capa fina |
| 0 horas   | 3.02  | 7.6   | 4.897       | 0.3536   | 0.4200                       | No identificado                                |
| 24 horas  | 3.05  | 7.6   | 3.945       | 0.2459   | 0.4000                       | No identificado                                |
| 48 horas  | 3.11  | 8.0   | 6.019       | 0.2613   | 0.5550                       | No identificado                                |
| 72 horas  | ***   | ***   | ***         | ***      | ***                          | ***  |
| 96 horas  | 2.98  | 8.7   | 5.864       | 0.3228   | 0.6200                       | No identificado                                |
| 120 horas   | 2.87  | 9.3   | 4.728       | 0.3382   | 0.9200                       | No identificado                                |
| 144 horas   | ***   | ***   | ***         | ***      | ***                          | ***  |
| 168 horas   | 2.57  | 9.4   | 3.633       | 0.4612   | 0.6600                       | No Identificado                                |
| 192 horas)  | 2.54  | 10.3  | 2.687       | 0.4919   | 0.7950                       | No Identificado                                |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

## **CINETICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO EN EL ENSAYO N° 2**

### **Determinación de pH con el pH-metro en las muestras.**

Esta medición fue realizada a través del pH-metro en las muestras fermentadas y extraídas cada 24 horas, no así para las muestras que fueron extraídas en los periodos de 72 y 144 horas. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla N° 5.

**TABLA N° 5. RESULTADOS DE pH EN MUESTRAS DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO**

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | pH   |
|---------------|----------------|------|
| 1             | 0              | 3.02 |
| 2             | 24             | 3.05 |
| 3             | 48             | 3.11 |

TABLA N° 5. CONTINUACION

|   |     |      |
|---|-----|------|
| 4 | 72  | ***  |
| 5 | 96  | 2.98 |
| 6 | 120 | 2.87 |
| 7 | 144 | ***  |
| 8 | 168 | 2.57 |
| 9 | 192 | 2.54 |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

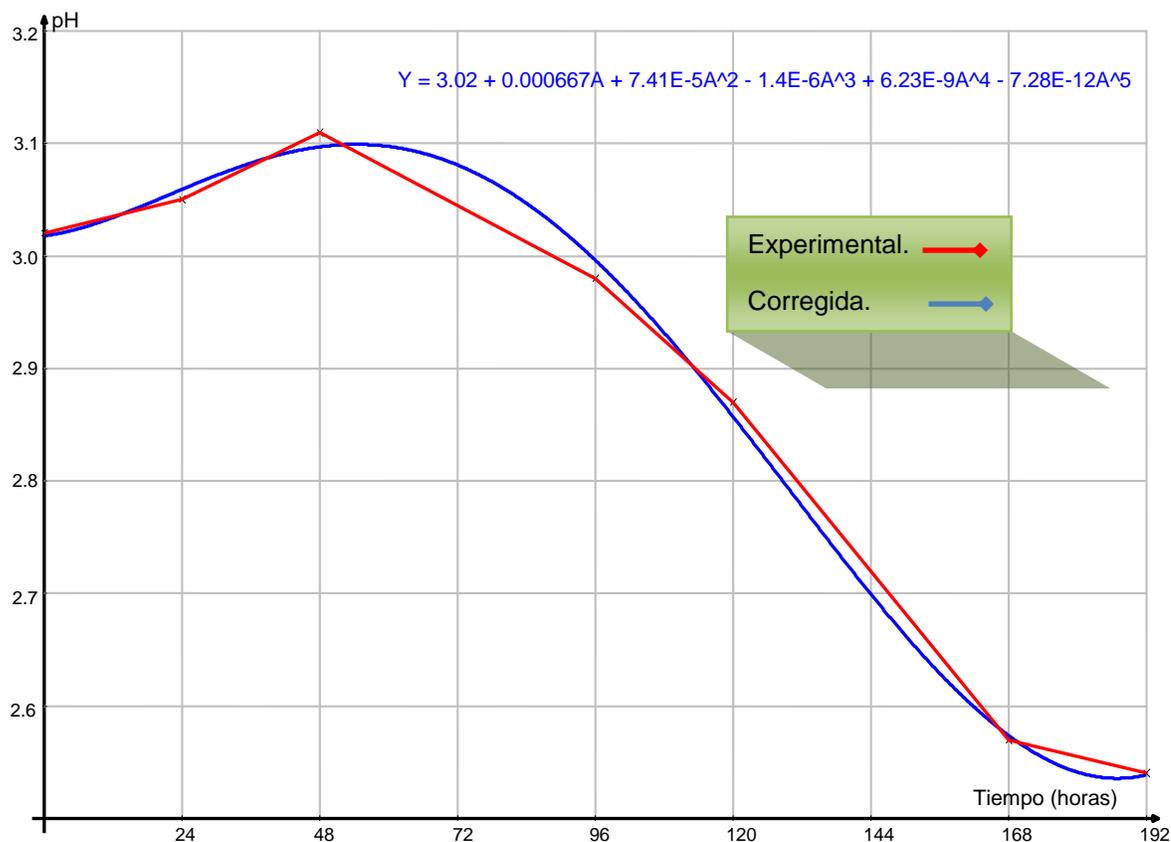


Figura N° 8. Curva de pH vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico

En la figura N° 8 se puede observar de forma grafica el comportamiento o la tendencia del pH en relación al tiempo durante todo el proceso de fermentación. La línea roja (experimental) muestra que en las primeras 48 horas de fermentación hubo un ascenso del pH de 3.02 a 3., indicando una disminución gradual de la acidez. A partir de las 48 horas hasta las 192 horas se observó un descenso del pH hasta un valor de 2.54, significando un aumento de la

acidez del medio. Al comparar la trayectoria de la línea roja con la azul, se observa una variación mínima, pues de acuerdo a la trayectoria normalizada, el descenso de pH tendría que ocurrir aproximadamente a partir de las 60 horas de fermentación. Con esta información se puede sostener que la tendencia del pH del medio de fermentación fue óptimo para el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*, favoreciendo la producción del metabolito en estudio (Ácido glucónico).

### **Medición del porcentaje de acidez en el medio de fermentación.**

El porcentaje de acidez en el medio fermentativo fue medido a través de la fórmula siguiente:

$$\% \text{Acidez Total} = \frac{\text{mL de NaOH gastado} * N_{\text{NaOH}} * \text{Meq ac. glucónico} * 100}{\text{mL de muestra}}$$

Donde la acidez total en porcentaje es el producto de los ácidos orgánicos obtenidos en todo el proceso de fermentación, incluyendo el Ácido Glucónico. La acidez total fue determinado con una solución valorante de NaOH 0.1N hasta el viraje final del indicador fenolftaleína en el fermento.

A continuación se demuestra un ejemplo de la determinación del porcentaje de acidez total en las primeras 24 horas de iniciada la fermentación:

mL de NaOH gastado: 0.6272 mL

Normalidad (N) de NaOH: 0.1N

Miliequivalentes (Meq.) de ácido glucónico: 0.1961

Muestra fermentada: 5 mL

Sustituyendo:

$$\% \text{Acidez total} = \frac{0.6272 \text{ mL} * 0.1N * 0.1961 \text{ Meq} * 100}{5 \text{ mL}} = 0.2459\%$$

% Acidez total de 24 hs.= 0.2459%

En la tabla N° 6 se observan los demás resultados expresados en porcentaje de la acidez total, obtenidos a través de la fórmula anterior en relación al tiempo (horas) de fermentación.

TABLA N° 6. RESULTADOS DE LA ACIDEZ TOTAL EN MUESTRAS DURANTE LA PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | VOLUMEN (mL)<br>GASTADO DE NaOH<br>0.1N | % DE ACIDEZ<br>TOTAL |
|---------------|----------------|---|----------------------|
| 1             | 0              | 0.9016                                  | 0.3536               |
| 2             | 24             | 0.6272                                  | 0.2459               |
| 3             | 48             | 0.6664                                  | 0.2613               |
| 4             | 72             | ***                                     | ***                  |
| 5             | 96             | 0.8232                                  | 0.3228               |
| 6             | 120            | 0.8624                                  | 0.3382               |
| 7             | 144            | ***                                     | ***                  |
| 8             | 168            | 1.1760                                  | 0.4612               |
| 9             | 192            | 1.2544                                  | 0.4919               |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

Del resultado obtenido en la tabla N° 6 se procede a trazar la siguiente gráfica con las variables de % acidez total vs tiempo (horas), estos resultados son mostrados en la figura N° 9. En la línea roja se puede observar que en 24 horas de iniciado la fermentación hubo un descenso de la acidez de 0.3536 a 0.2459. El descenso observado significa que en las primeras 24 horas no hubo formación de ácidos. Pero después de las 24 horas hasta aproximadamente 126 horas se produjo un ascenso de la acidez, llegando al valor inicial de 0.3536. Este valor es un indicador de que en este período no hubo formación de ácido glucónico a pesar de que presentó un incremento de la acidez. De acuerdo a la trayectoria de la línea experimental, se nota que después de las 120 horas hasta las 192 horas continúa el ascenso del porcentaje de acidez, presentado los valores de 0.3382 hasta 0.4919. Este ascenso afirma que aproximadamente de las 132 horas a las 192 horas se dió el mayor cúmulo de

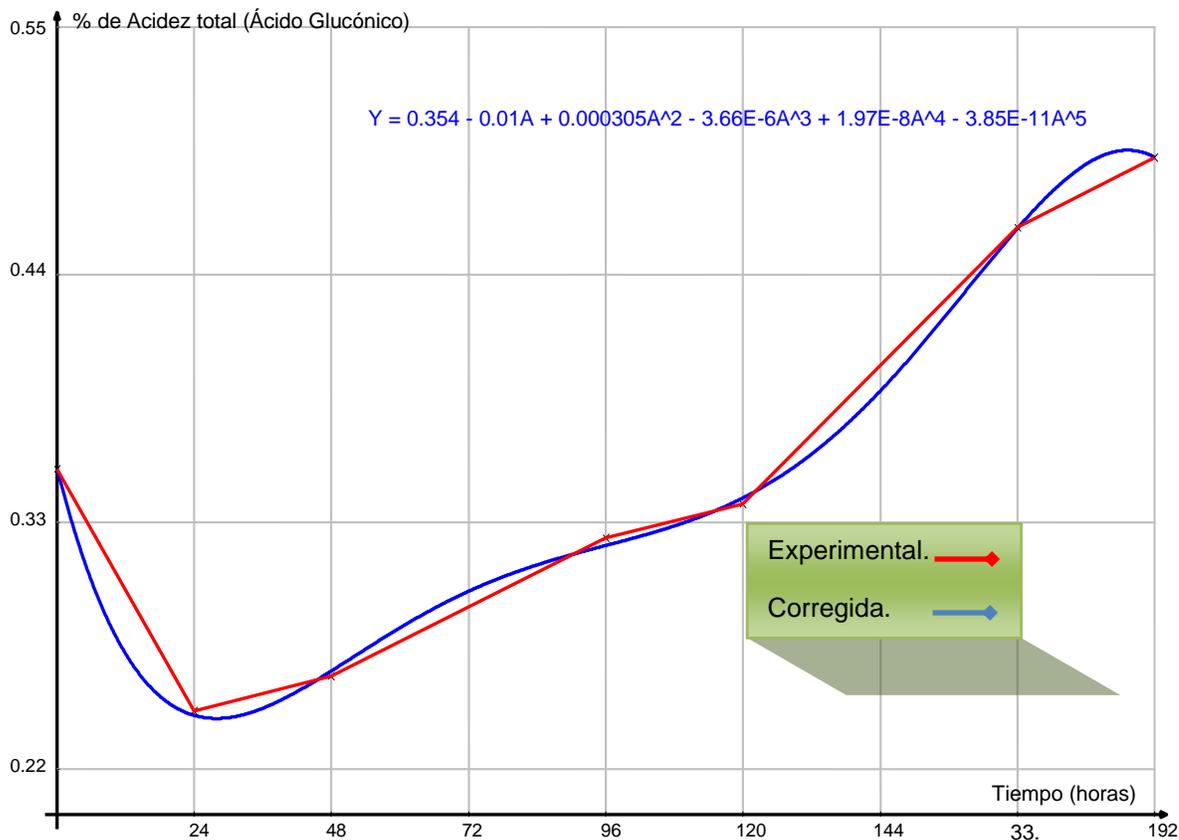


Figura N° 9. Curva de % de Acidez Total vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico

ácidos orgánicos, incluyendo el ácido glucónico. Al comparar la línea experimental con la trayectoria de la línea normalizada, no denota una variación significativa, lo que indica que los resultados experimentales están dentro de los parámetros normales de formación de ácido glucónico.

### Medición de los grados °Brix.

La medición de los grados °Brix se realizó en las muestras extraídas cada 24 horas. Aclarando que no se tomó muestras del fermento a las 72 y 144 horas. La medición fue realizada con un Brixómetro, reflejando los resultados en la tabla N° 7.

TABLA N° 7. RESULTADOS DE GRADOS °BRIX EN MUESTRAS DURANTE LA PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | GRADOS °BRIX |
|---------------|----------------|--------------|
| 1             | 0              | 7.6          |
| 2             | 24             | 7.6          |
| 3             | 48             | 8.0          |
| 4             | 72             | ***          |
| 5             | 96             | 8.7          |
| 6             | 120            | 9.3          |
| 7             | 144            | ***          |
| 8             | 168            | 9.4          |
| 9             | 192            | 10.3         |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

En seguida se graficó los grados °Brix, observándose variación durante el proceso de fermentación. Se hace necesario aclarar que en este experimento, los grados °Brix representa los azúcares del medio de cultivo (dulce de atado).

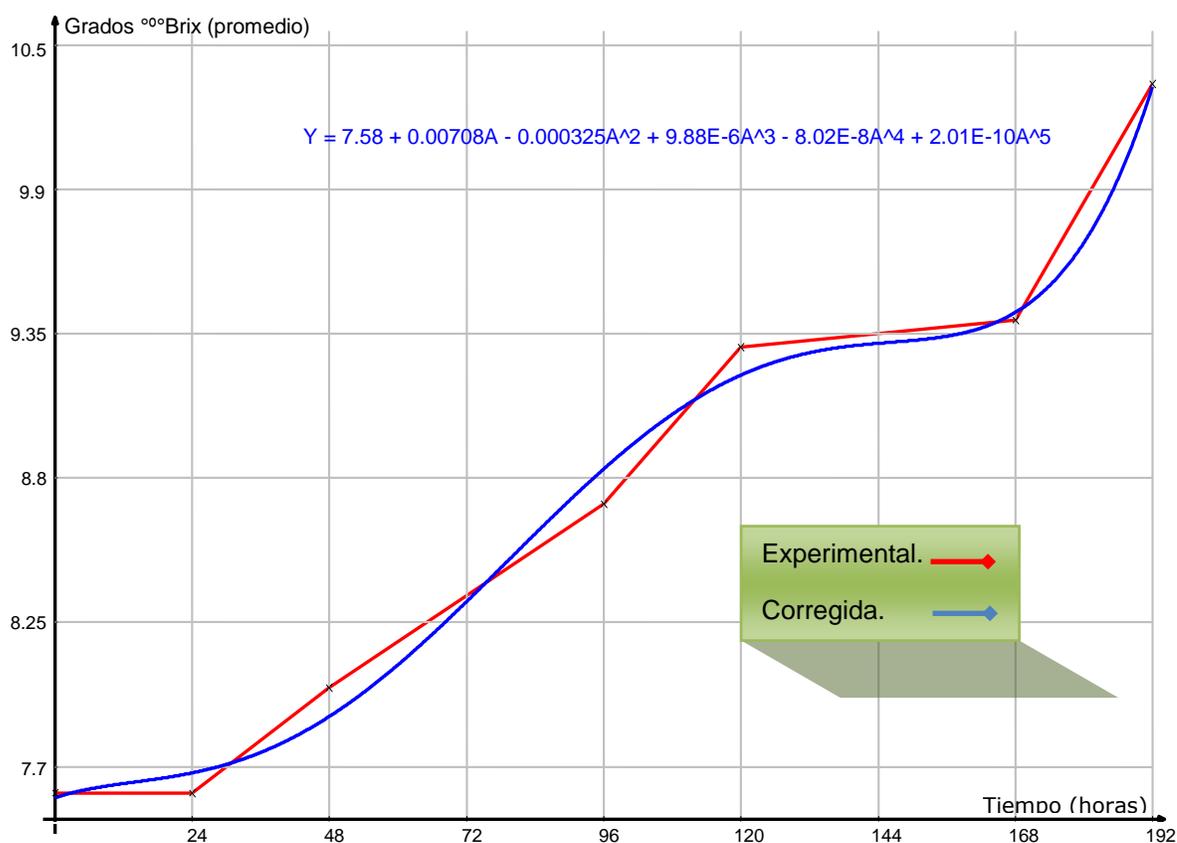


Figura N° 10. Curva de Grados °Brix vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico

En la figura N° 10 se aprecia gráficamente el comportamiento de los grados °Brix con respecto al tiempo durante la cinética de fermentación para obtener el Ácido Glucónico. Se observa que en las primeras 24 horas, los grados °Brix son constantes pues el hongo está en adaptación al medio, por tanto no consume. Sin embargo, cambia la condición después de las 24 horas, denotando un aumento de los azúcares que se extiende hasta las 192 horas a causa del desdoblamiento de la sacarosa provocado por la cepa del hongo. En este proceso sucede la separación de la glucosa, fuente principal de energía para el crecimiento del hongo y para la producción del Ácido glucónico.

### Transformación de la biomasa a logaritmo natural

La transformación de la biomasa a logaritmo natural (Ln) para determinar la curva y las fases de crecimiento del hongo, se hizo aplicando la fórmula  $\ln(X)$ , en donde (X) es la biomasa a transformar; obteniendo los datos reflejados en la tabla N° 8.

TABLA N° 8. TRANSFORMACION DE LA BIOMASA DE LAS MUESTRAS A LOGARITMO NATURAL, USANDO LA FORMULA  $\ln(X)$

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | BIOMASA (g/L) | Ln (X) |
|---------------|----------------|---------------|--------|
| 1             | 0              | 4.897         | 1.5886 |
| 2             | 24             | 3.945         | 1.3724 |
| 3             | 48             | 6.019         | 1.7949 |
| 4             | 72             | ***           | ***    |
| 5             | 96             | 5.864         | 1.7688 |
| 6             | 120            | 4.728         | 1.5535 |
| 7             | 144            | ***           | ***    |
| 8             | 168            | 3.633         | 1.2900 |
| 9             | 192            | 2.687         | 0.9884 |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo fermentación

El resultado del logaritmo natural es representado en la figura N° 11, que permite observar el cambio de la biomasa en el tiempo. Gráficamente se trazaron dos curvas, una experimental representada por la línea roja y la curva azul es la corregida, que representa el crecimiento ideal de la biomasa. En la curva experimental se observa que en las primeras 24 horas se dió un

descenso en la biomasa lo que en condiciones óptimas de desarrollo no es normal, pues debería observarse constancia o crecimiento a partir de la hora 0; por lo que el descenso, en este caso, fue causado por el tiempo demasiado prolongado del mantenimiento de la cepa (1 mes) que le ocasionó lesiones internas al hongo por el agotamiento de los nutrientes del medio de mantenimiento (Agar Sabouraud). A partir de las 24 horas se nota un crecimiento, alcanzando el hongo el máximo valor de crecimiento a las 48 horas, obteniendo el valor biomásico de 1.8, a partir de este momento se observa un decrecimiento hasta alcanzar el valor 0.99 a las 192 horas. El máximo crecimiento que representa la curva experimental permite determinar que la fase exponencial se dió hasta las 48 horas; a partir de este tiempo se nota un decrecimiento biomásico que indica el inicio lento de la fase de muerte, acelerándose a partir de las 96 horas, alcanzando el valor mínimo a las 192 horas. La curva ideal (azul), indica que el máximo crecimiento de la biomasa se logra a las 72 horas de fermentación alcanzando el valor aproximado de la biomasa 1.95; decreciendo a partir de este momento hasta llegar al valor de 0.99 a las 192 horas de fermentación. La comparación de las dos curvas, permite sostener que el experimento siguió el curso normal de crecimiento y decrecimiento de la biomasa pues se acerca a la curva ideal o de corrección, por tanto las condiciones de crecimiento del hongo fueron optimas durante este ensayo.

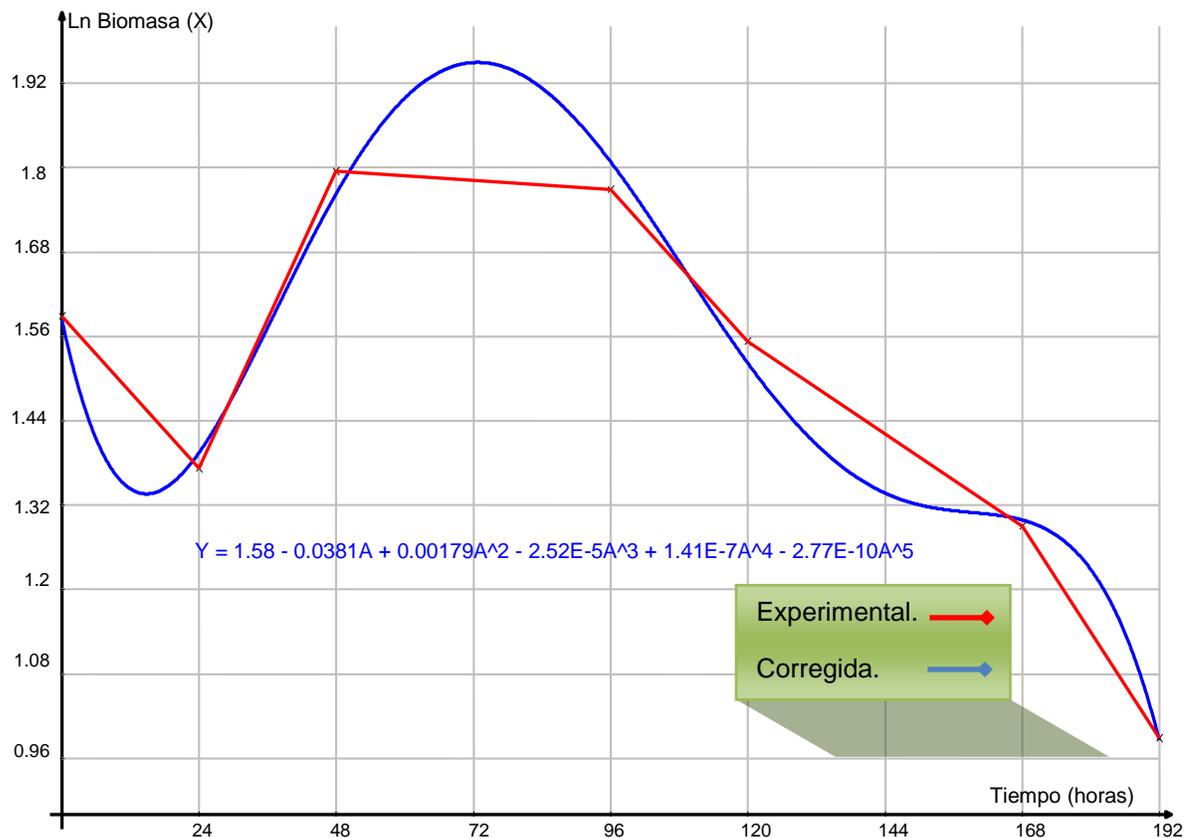


Figura N° 11. Curva biomasa por peso seco Ln(x) vrs Tiempo (horas) para la producción del Ácido Glucónico

### Determinación de la velocidad volumétrica de biomasa por peso seco

En el ensayo 2 se logró determinar la velocidad del crecimiento celular en el proceso de fermentación a través de la siguiente fórmula:

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

Donde:

$\mu$ : velocidad volumétrica (g/Lh)

$x_2$ : gramos de biomasa en tiempo final

$x_1$ : gramos de biomasa en tiempo inicial

$t_1$ : tiempo inicial

$t_2$ : tiempo final

Como ejemplo, se calculó la velocidad volumétrica para 24 horas de fermentación. Sustituyendo se obtuvo lo siguiente:

$t = 24$  horas

$$\mu = \frac{1.3724 - 1.5886}{24 - 0} = -0.0090 \left( \frac{g}{Lh} \right) = \frac{dLn x}{dt}$$

TABLA N° 9. RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMETRICA DE BIOMASA POR PESO SECO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DEL ACIDO GLUCONICO

| TIEMPO (HORAS) | VELOCIDAD VOLUMETRICA (g/Lh) |
|----------------|------------------------------|
| 0              | 0.0000                       |
| 24             | -0.0090                      |
| 48             | 0.0042                       |
| 72             | ***                          |
| 96             | 0.0018                       |
| 120            | -0.0002                      |
| 144            | ***                          |
| 168            | -0.0017                      |
| 192            | -0.0031                      |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

Este proceso se repitió en cada muestra del medio de cultivo de fermentación; determinando los valores individuales que se presentan en la Tabla N° 9. Una vez calculado los valores de cada muestra, se graficó para determinar el máximo y el mínimo crecimiento con relación al tiempo de fermentación, como se muestra en la figura N° 12. La curva representada con línea roja indica el resultado obtenido experimentalmente y la curva Corregida representada con línea azul se obtuvo automáticamente con el programa Equation Grapher 3.0. En la curva experimental trazada en la figura N° 12, se observa un descenso de la velocidad volumétrica de la biomasa en las primeras 24 horas de iniciada el proceso de fermentación hasta valores negativos menores de: -0.009; luego de pasadas las 24 horas hasta las 48 horas se denota un aumento acelerado de

la velocidad volumétrica de la biomasa hasta un valor positivo de 0.004; pasadas las 48 horas hasta las 192 horas en la que finalizó el proceso fermentativo, se produjo un cambio de la velocidad volumétrica de biomasa con una tendencia a la disminución, pero de forma gradual. Al comparar la curva experimental con la curva ideal, se ha observado que de acuerdo a la curva

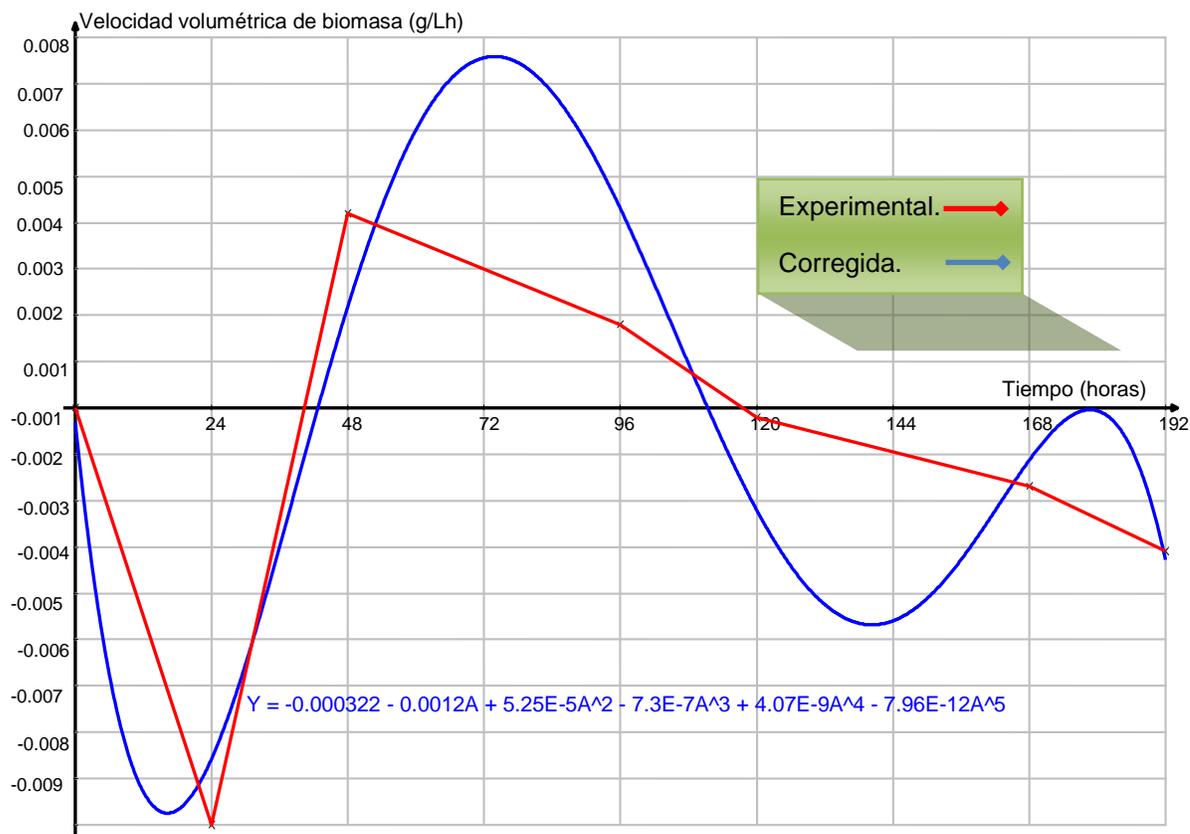


Figura N° 12. Curva de velocidad volumétrica de biomasa (g/Lh) vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico

ideal trazada, el descenso de velocidad volumétrica debería de iniciarse aproximadamente en las primeras 12 horas de la fermentación con valores próximos a -0.009; esperando una máxima velocidad volumétrica a las 72 horas con valores mayores a 0.007. De acuerdo a esta curva el descenso normal se presenta a partir de las 72 hasta las 144 horas con valores cercanos

a  $-0.005$ , debiendo darse un leve aumento de la velocidad a partir de las 144 hasta las 168 horas con valores muy próximos al cero. Después de las 168 horas lo normal es un descenso de velocidad volumétrica con un valor negativo de  $-0.003$ . Se puede observar experimentalmente que la velocidad máxima volumétrica se alcanzó a las 48 horas con un valor  $0.0042$ ; mientras que la curva normal indica que la máxima velocidad volumétrica se alcanza a las 72 horas con un valor próximo a  $0.006$ . El descenso de la velocidad volumétrica experimental de biomasa en las primeras 24 horas se debe a algunas razones: la primera es porque el mantenimiento de la cepa fue muy prolongado de manera que en este tiempo los nutrientes del medio utilizado para mantener la cepa (Agar Sabouraud) se empezaron a agotar produciendo de alguna manera lesiones a las células del hongo; de manera que cuando fue inoculado al medio de cultivo de fermentación se comprueba el descenso de la velocidad; las células sobrevivientes en la fase de adaptación al medio de cultivo productor (dulce de atado), primero desdoblan a la sacarosa en moléculas más pequeñas como son: glucosa y fructosa, para luego consumir la glucosa como sustrato principal para su crecimiento y es así como pasadas las 24 horas hasta las 48 horas presenta un incremento acelerado de la velocidad volumétrica de biomasa, pasadas las 48 horas se denota un descenso de la velocidad volumétrica; este podría deberse a dos razones: una por agotamiento de la glucosa y la otra porque durante este tiempo empieza nuevamente las enzimas del hongo a desdoblar a las moléculas de la sacarosa en glucosa y fructosa para obtener la energía necesaria para su crecimiento. Por lo tanto al comparar ambas curvas, la experimental sigue una trayectoria muy similar al de la curva idealizada con la diferencia de que en la curva normalizada de las 120 a 192 presenta un comportamiento diauxico o sea con un descenso y leves aumentos de la velocidad volumétrica de biomasa, siendo este comportamiento normal para un medio de cultivo complejo conformado por la sacarosa que es un disacárido formado por la glucosa y fructuosa de esta manera los datos

obtenidos en la curva experimental se aceptan los datos obtenidos experimentalmente de la velocidad volumétrica de biomasa para el ensayo N° 2.

### Velocidad específica de biomasa por el método de peso seco.

La velocidad específica de generación de células se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$\mu^1 = \frac{1}{x} \left( \frac{dLnx}{dt} \right)$$

Donde:

$\mu^1$ : velocidad específica

x: gramos de biomasa / litros de muestra analizada

dx/dt: velocidad volumétrica de biomasa

Ejemplo para t = 24 horas

$$\mu^1 = \frac{1}{3.945} (-0.0090) = -0.0022 \left( \frac{g}{Lh} \right)$$

El procedimiento para calcular la velocidad específica de biomasa a través de la fórmula anterior se realizó para cada tiempo de fermentación los cuales se muestran en la tabla N° 10.

TABLA N° 10. RESULTADOS DE VELOCIDAD EPECIFICA DE BIOMASA POR PESO SECO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO

| TIEMPO (HORAS) | VELOCIDAD ESPECIFICA DE GENERACION DE CELULAS MICROBIANAS (g/Lh) |
|----------------|--|
| 0              | 0.0000   |
| 24             | -0.0022  |
| 48             | 0.0006   |
| 72             | ***  |
| 96             | 0.0003   |
| 120            | -4.23E-05  |
| 144            | ***  |

TABLA N° 10. CONTINUACION

|     |         |
|-----|---------|
| 168 | -0.0004 |
| 192 | -0.0011 |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

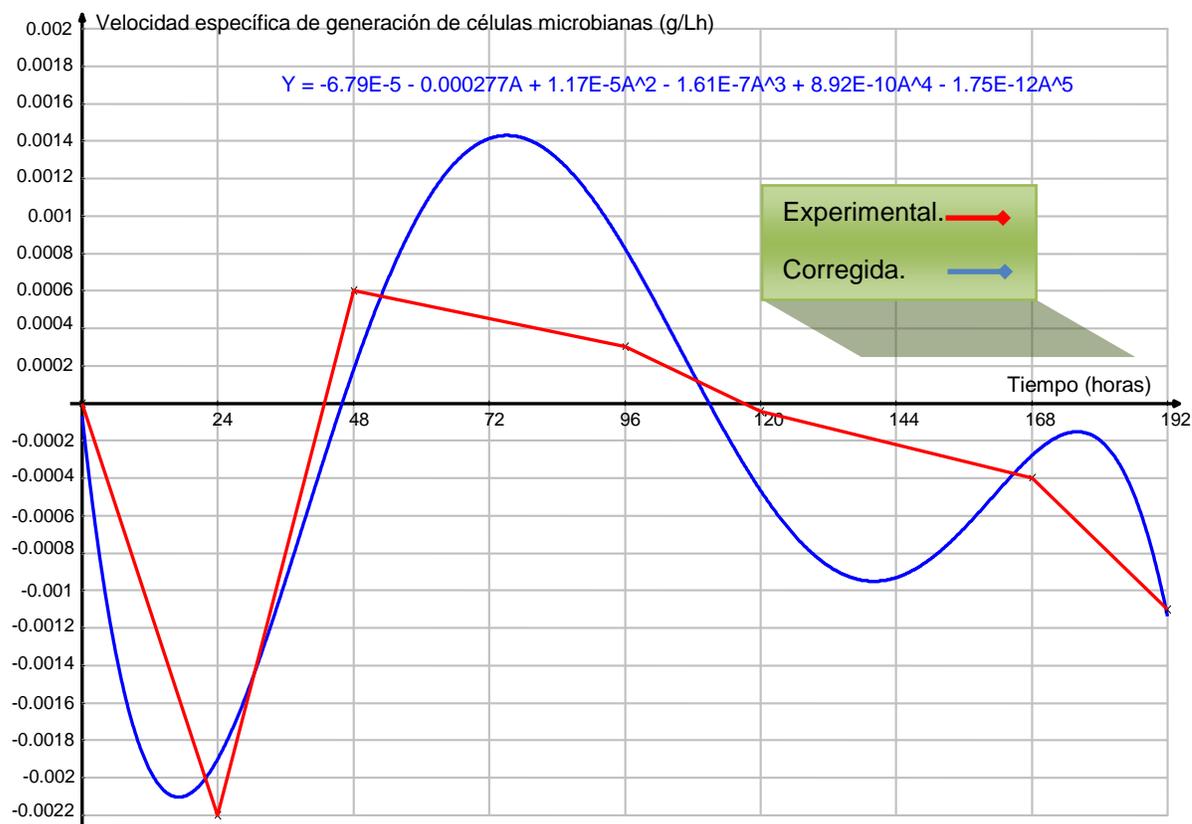


Figura N° 13. Curva de velocidad específica de biomasa (g/Lh) vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico

La curva experimental representada por la línea de color rojo en el gráfico de la figura N° 13, es el resultado obtenido mediante la aplicación de la fórmula de velocidad específica de biomasa. La curva corregida representada por la línea azul es obtenida automáticamente mediante el programa Equation Grapher 3.0. Se puede apreciar de manera gráfica el comportamiento cinético para la generación de células microbianas en un tiempo específico para el hongo *Aspergillus niger* en un medio de cultivo complejo de dulce de atado. En esta

figura se observa que en la curva experimental, de las 0 a las 24 horas presenta un descenso de la velocidad específica de biomasa indicando el valor negativo de  $-0.0022$ , después de las 24 horas hasta las 48 horas se da un aumento acelerado de la velocidad específica de biomasa, obteniéndose un valor de velocidad específica de biomasa de  $0.0006$ ; A partir de las 48 horas hasta las 192 horas en la que se finalizó el proceso fermentativo se pudo observar un descenso gradual de la velocidad específica de biomasa a un valor intermedio entre  $-0.0012$  y  $0.001$ . Este valor es mucho mayor con respecto al presentado en las primeras 24 horas. Es de notar que de acuerdo a la curva normalizada (línea azul), el descenso de la velocidad específica de biomasa debería de observarse en las primeras 12 horas de la fermentación con un valor intermedio entre  $-0.0022$  y  $-0.002$  de velocidad específica de biomasa y la máxima debería de obtenerse a las 72 horas, con un valor de  $0.0014$ . Tanto en la curva experimental como en la normalizada se aprecia un comportamiento diauxico de la velocidad específica después de las 72 horas. Los descensos apreciados en las primeras 24 horas en las dos curvas es debido, en primer lugar, a que la cepa utilizada se le dió un tiempo muy prolongado de mantenimiento, provocando lesiones internas en las células del hongo por agotamiento de los nutrientes necesarios y por la liberación de metabolitos tóxicos por este hongo; en segundo lugar, porque muchas células de la cepa se debilitaron mientras estaban en el medio mantenimiento y al entrar contacto con el medio de cultivo de fermentación (dulce de atado), algunas ya se encontraban muertas y las sobrevivientes iniciaron el proceso de adaptación y reconocimiento de manera que primero comenzó por desdoblar las moléculas de sacarosa a moléculas más pequeñas como es la glucosa y fructosa, para luego consumirlas es así como se aprecia de forma gráfica el aumento de la velocidad específica de biomasa después de las 24 horas. Luego se presentan nuevamente descensos por el agotamiento de glucosa, por lo que las enzimas de la cepa comienzan

nuevamente el procedimiento antes descrito como es a desdoblar la sacarosa a glucosa y fructosa.

### **Estandarización de la glucosa por el método fenol-sulfúrico para la cuantificación de azúcares totales**

Para medir experimentalmente la glucosa del dulce de atado, fue necesario estandarizar la glucosa, midiendo dos variables: Absorbancia a 490 nm y concentración en miligramos por mililitros de glucosa. La estandarización se hizo en 7 tubos con diferentes concentraciones de glucosa, agua estéril, fenol al 80% y ácido sulfúrico concentrado. En la Tabla N° 11 se presentan los resultados obtenidos de la curva estandarizada de glucosa mediante el método Fenol-Sulfúrico.

**TABLA N° 11. RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACION DE LA GLUCOSA**

| TUBO | Sol. Std de glucosa (µg/mL) | H <sub>2</sub> O estéril (mL) | Fenol 80% (mL) | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> con c. (mL) | Absorbancia (490nm) | Concentración mg/mL |
|------|-----------------------------|-------------------------------|----------------|--|---------------------|---------------------|
| 1    | 0.0                         | 2.0                           | 0.1            | 5.0  | 0.000               | 0.0000              |
| 2    | 0.1                         | 1.9                           | 0.1            | 5.0  | 0.007               | 0.0003              |
| 3    | 0.2                         | 1.8                           | 0.1            | 5.0  | 0.125               | 0.0037              |
| 4    | 0.4                         | 1.6                           | 0.1            | 5.0  | 0.289               | 0.0087              |
| 5    | 0.6                         | 1.4                           | 0.1            | 5.0  | 0.320               | 0.0096              |
| 6    | 0.8                         | 1.2                           | 0.1            | 5.0  | 0.433               | 0.0130              |
| 7    | 1.0                         | 1.0                           | 0.1            | 5.0  | 1.297               | 0.0389              |

Los datos obtenidos en las variables de Absorbancia y Concentración fueron graficados para obtener la curva estandarizada, la cual fue corregida mediante la aplicación de la regresión lineal con la siguiente ecuación:  $Y = -0.000628 + 33.4X$  obtenida mediante el programa Equation Grapher 3.0. En la figura N° 14 se representan los datos obtenidos mediante el método Fenol-Sulfúrico, trazado en línea roja y los datos corregidos con la ecuación representada al final de la línea roja con un segmento de línea azul.

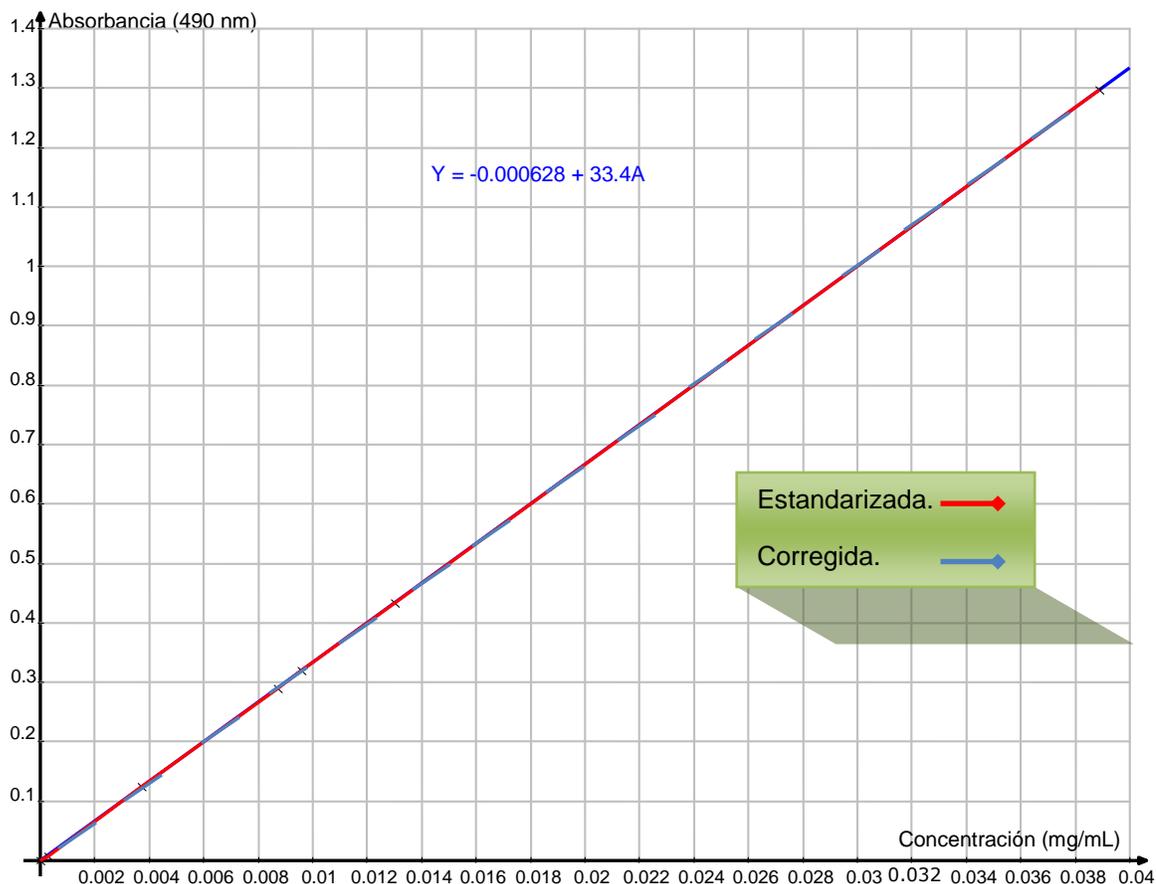


Figura N° 14. Curva estándar de glucosa: Absorbancia vs Concentración (mg/mL)

Al comparar la línea estandarizada (roja) con la línea corregida (segmento azul) se observa que ambas líneas siguen la misma tendencia. Por tanto los datos estandarizados cumplen, dándose por aceptada la curva estándar de glucosa.

### **Cuantificación de azúcares totales en muestras fermentadas por el método fenol-sulfúrico**

Para cuantificar los azúcares totales de las muestras fermentadas se siguió el siguiente procedimiento: se invirtió los valores de la ecuación  $y = -0.000628 + 33.4X$ ; obteniendo la ecuación  $Y = 33.4X - 0.000628$ . Despejando la variable "X" de la ecuación anterior se obtiene una segunda ecuación:

$$X = \frac{Y + 0.000628}{33.4}$$

Ejemplo para A = 0.281, si Y = A

$$X = \frac{0.281 + 0.000628}{33.4} = 0.0084 \left( \frac{mg}{mL} \right)$$

Luego aplicando la fórmula:  $FD = \frac{\text{El producto de número de diluciones hechas}}{\text{El producto de número de alicuotas tomadas}}$  se obtiene el Factor de Disolución (FD)

En el ejemplo anterior el FD = 50

Multiplicando el FD por concentración del azúcar da como resultado:

$$0.0084 \text{ mg/mL} (50) = 0.4200 \text{ mg/mL}$$

En la Tabla N° 12 se muestran los resultados de concentración de azúcar obtenidos aplicando el procedimiento anterior. Que posteriormente se graficaron y están representados en la figura N° 15.

TABLA N° 12. RESULTADOS DE AZUCARES TOTALES EN MUESTRAS POR EL METODO FENOL-SULFURICO MEDIANTE LA APLICACION DE LA FORMULA OBTENIDA POR REGRESION LINEAL

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | LECTURA DE LA ABSORBANCIA ( $\lambda=490\text{nm}$ ) | REGRESION LINEAL<br>$y=33.4x-0.000628$<br>$X=(\text{mg/mL})$ | FACTOR DE DILUCION | CONCENTRACION (mg/mL) |
|---------------|----------------|--|--|--------------------|-----------------------|
| 1             | 0              | 0.281  | 0.0084   | 50                 | 0.4200                |
| 2             | 24             | 0.268  | 0.0080   |                    | 0.4000                |
| 3             | 48             | 0.373  | 0.0111   |                    | 0.5550                |
| 4             | 72             | ***  | ***  |                    | ***                   |
| 5             | 96             | 0.416  | 0.0124   |                    | 0.6200                |
| 6             | 120            | 0.617  | 0.0184   |                    | 0.9200                |
| 7             | 144            | ***  | ***  |                    | ***                   |
| 8             | 168            | 0.441  | 0.0132   |                    | 0.6600                |
| 9             | 192            | 0.533  | 0.0159   |                    | 0.7950                |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajeron muestras del medio de cultivo de fermentación

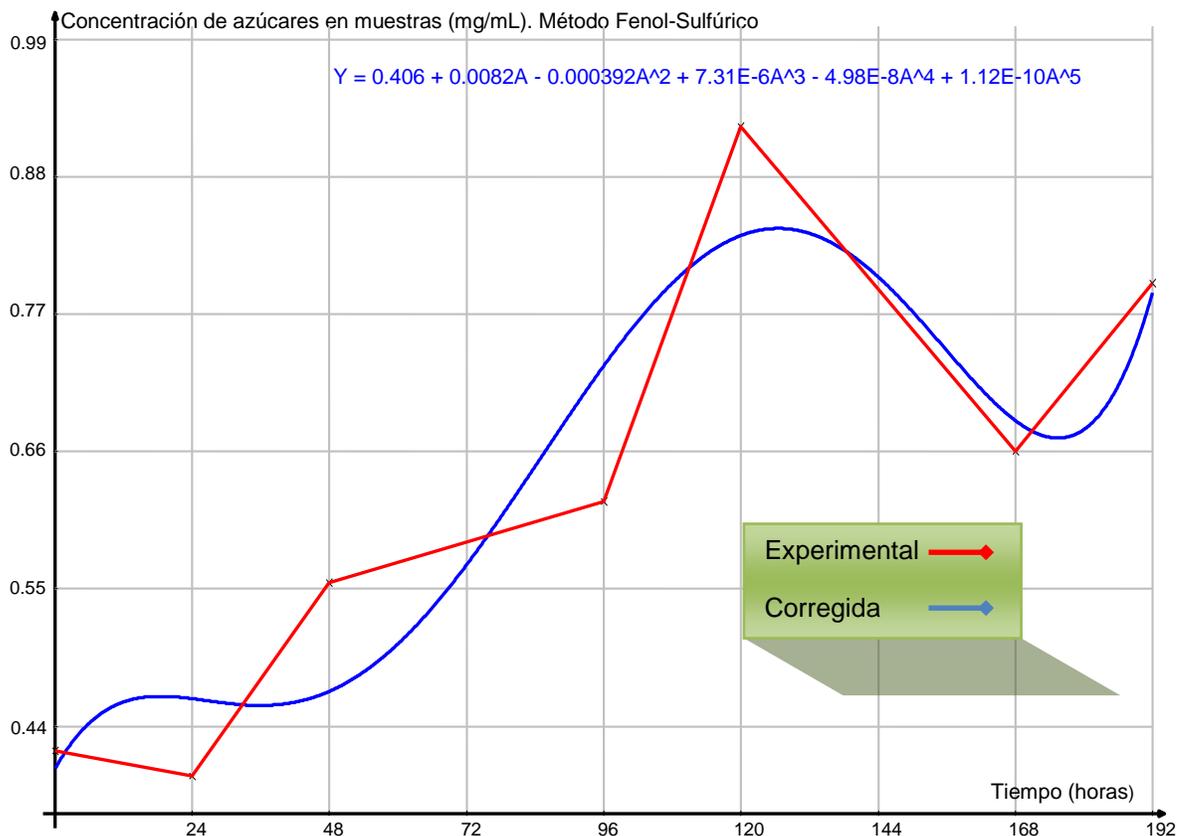


Figura N° 15. Curva de concentración de azúcares en Muestras (mg/mL) vs Tiempo (horas), Método Fenol-Sulfúrico

En la figura N° 15 se aprecia de forma grafica el consumo de los azúcares por la cepa del hongo *Aspergillus niger* en un medio de cultivo complejo de dulce de atado. La curva experimental representada por la línea roja indica el resultado obtenido mediante la aplicación de la fórmula resultante de la regresión lineal  $Y = 33.4X - 0.000628$ ; la curva corregida representada por la línea azul se obtuvo mediante la aplicación de regresión polinomial con el programa Equation Grapher 3.0. Se observa en la curva experimental un leve descenso de los azúcares en las primeras 24 horas de iniciado el proceso fermentativo, revelando el valor de 0.40 mg/mL. De las 24 horas hasta las 120 horas se nota un ascenso de los azúcares de 0.40 mg/mL a 0.92 mg/mL. Seguidamente se aprecia un descenso a las 120 horas y a las 168 horas,

alcanzando valores de concentración de 0.92mg/mL y 0.66 mg/mL respectivamente. Observándose un leve ascenso de los azúcares a partir de las 168 horas hasta las 192 horas de finalización del proceso fermentativo, con valores de 0.66mg/L y 0.795mg/mL. Con respecto a la curva corregida (línea azul) se puede apreciar que lleva una tendencia bastante similar a la curva experimental (línea roja). Al comparar las dos curvas, se nota una variación de ascenso de los azúcares en la curva corregida en las primeras 12 horas de iniciada la fermentación, luego desciende de las 12 horas hasta las 36 horas. A partir de las 36 horas se observa una similitud en la tendencia de las dos curvas, expresadas en ascensos y descensos de los azúcares. Estos datos indican que los resultados obtenidos experimental y estadísticamente son congruentes. Por tanto da lugar a sostener que en las primeras 24 horas de fermentación hubo consumo de azúcares (glucosa) como resultado de la hidrólisis ácida sufrida por la acidificación del medio con la adición de ácido clorhídrico al 1N; disminuyendo dicho consumo a partir de las 24 horas hasta las 120 horas. La disminución del consumo de azúcares por la cepa puede estar asociado con el desdoblamiento de la sacarosa a glucosa y fructosa, aumentando los niveles de azúcar en el medio de fermentación; pero también puede asociarse al consumo de azúcares y al desdoblamiento de la sacarosa, lo que incidió para no observarse la tendencia a la disminución de la concentración de azúcar en el medio. Es de hacer notar que a partir de las 120 horas se da un descenso brusco de los azúcares lo que indica que la cepa aumento su consumo para adquirir la energía necesaria y metabolizar la glucosa a ácido glucónico.

El resultado obtenido experimentalmente de azúcares totales en las muestras fermentadas a través de la fórmula de regresión lineal, se corrigió con la ecuación de regresión polinomial por medio del programa Equation Grapher 3.0 y resultó la siguiente ecuación:

$$y = 0.406 + 0.0082X - 0.000392X^2 - 7.31E_6X^3 - 4.98E_8X^4 + 1.12E_10X^5$$

Ejemplo: para un t =0; en donde t = X

$$y = 0.406 + 0.0082(0) - 0.000392(0)^2 - 7.31E_6(0)^3 - 4.98E_8(0)^4 + 1.12E_10(0)^5$$

$$y = 0.406 \left( \frac{mg}{mL} \right)$$

Los datos obtenidos con la ecuación polinomial fueron utilizados para calcular la velocidad volumétrica del consumo de sustrato en la producción de ácido glucónico. En la Tabla N° 13 se muestra los resultados de azúcares obtenidos con la ecuación de regresión polinomial.

TABLA N° 13. RESULTADOS DE AZUCARES TOTALES APLICANDO REGRESION POLINOMIAL A LAS MUESTRAS

| N° DE MUESTRAS | TIEMPO (HORAS) | CONCENTRACION (mg/mL) |
|----------------|----------------|-----------------------|
| 1              | 0              | 0.4060                |
| 2              | 24             | 0.4624                |
| 3              | 48             | 0.4690                |
| 4              | 72             | ***                   |
| 5              | 96             | 0.7314                |
| 6              | 120            | 0.8372                |
| 7              | 144            | ***                   |
| 8              | 168            | 0.6994                |
| 9              | 192            | 0.8160                |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

### Velocidad volumétrica de consumo de sustrato.

Para determinar la velocidad volumétrica de consumo de sustrato, se aplicó la fórmula siguiente:

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

En donde:

Q<sub>s</sub>: Velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/Lh)

S<sub>2</sub>: Concentración de sustrato (g/L) en el tiempo final

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

$t_2$ : Tiempo final

$t_1$ : Tiempo inicial

A continuación se presenta un ejemplo para determinar la velocidad volumétrica en un periodo de 24 horas aplicando la fórmula anterior:

$$Q_s = \frac{0.4624 - 0.4060}{24 - 0} = 0.0023 \left( \frac{g}{Lh} \right) = - \frac{ds}{dt}$$

En la tabla N° 14 se muestran los resultados de velocidad volumétrica de consumo de sustrato en el proceso de fermentación y producción de ácido glucónico, obteniendo los siguientes valores: a las 0 horas la velocidad volumétrica fue equivalente a 0.0 unidades, a las 24 el valor fue de 0.0023 unidades, a las 48 horas resultaron 0.0013 unidades; a las 96 horas las unidades obtenidas fueron de 0.0033; a las 120 horas resultó el valor de 0.0035 unidades; el valor obtenido a las 168 horas se fue de 0.0017. Finalmente a las 192 horas el valor resultante fue de 0.0021. Es de hacer notar que a las 72 y 144 horas no se hizo la medición de azúcar por lo tanto se obtuvo ningún valor. Los valores de la velocidad volumétrica se presentan graficadas en la figura N° 16.

TABLA N° 14. RESULTADOS DE VELOCIDAD VOLUMETRICA DE CONSUMO DE SUSTRATO DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO

| TIEMPO (HORAS) | CONCENTRACION (mg/mL) | VELOCIDAD VOLUMETRICA (g/Lh) |
|----------------|-----------------------|------------------------------|
| 0              | 0.4060                | 0.0000                       |
| 24             | 0.4624                | 0.0023                       |
| 48             | 0.4690                | 0.0013                       |
| 72             | ***                   | ***                          |
| 96             | 0.7314                | 0.0033                       |
| 120            | 0.8372                | 0.0035                       |
| 144            | ***                   | ***                          |
| 168            | 0.6994                | 0.0017                       |
| 192            | 0.8160                | 0.0021                       |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

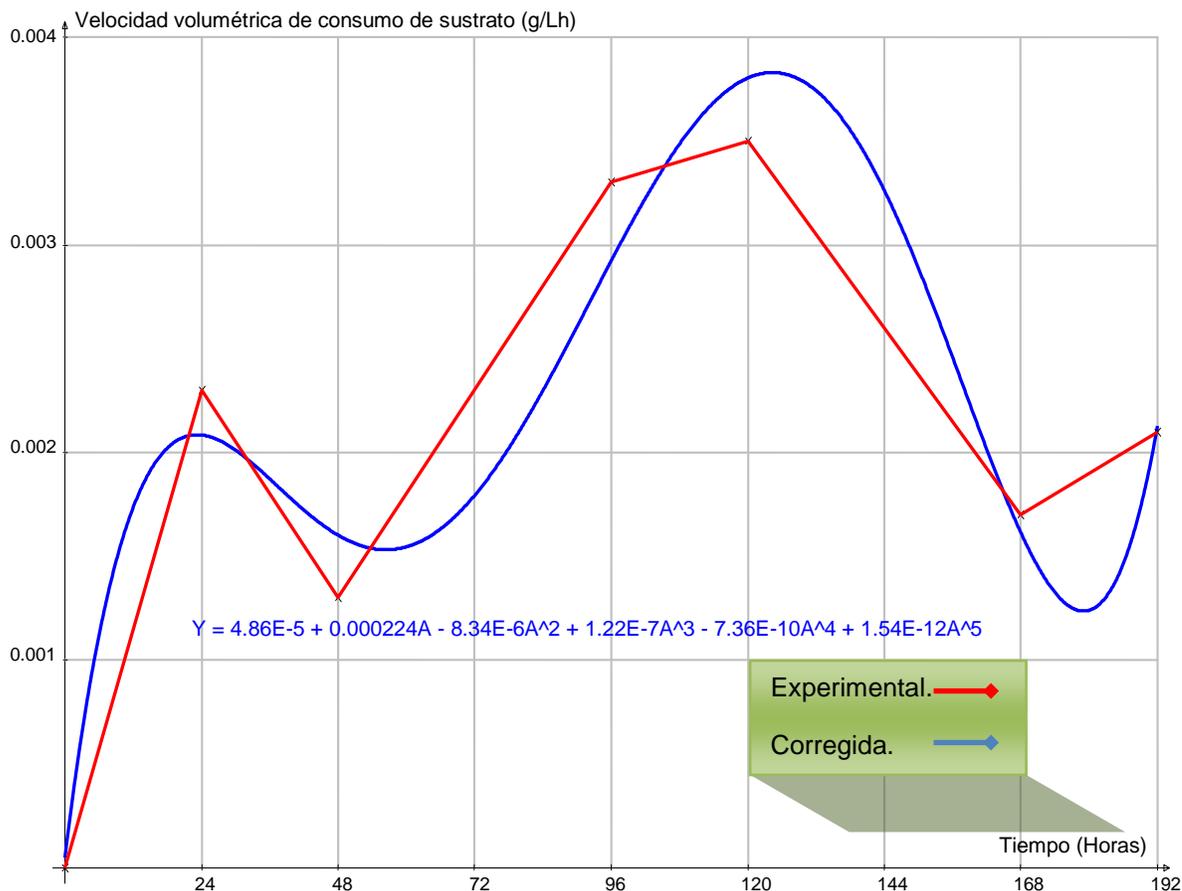


Figura N° 16. Curva de velocidad volumétrica de consumo de sustrato (g/Lh) vs Tiempo (horas)

En la figura N° 16 se observa que la curva experimental, representada por la línea roja, muestra una tendencia de ascenso de velocidad volumétrica de consumo de sustrato ( $Q_s$ ) en las primeras 24 horas de iniciado el proceso de fermentación con un valor de 0.0023 g/Lh; indicando que la cepa del hongo no consume azúcar. En este período las enzimas del hongo inician el procedimiento de desdoblar la sacarosa a moléculas más simples como son: la glucosa y fructosa, dando como resultado un aumento en la concentración de los azúcares en el medio de fermentación. Después de las 24 horas hasta las 48 horas se aprecia un descenso de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato con un valor de 0.0013g/Lh. En esta fase el hongo está consumiendo

azúcares (glucosa) y obteniendo a partir de ella, la energía necesaria para su respectivo crecimiento. A partir de las 48 horas hasta las 120 horas se aprecia nuevamente un ascenso acelerado de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato resultando los valores que van de 0.0013 a 0.0035g/Lh. Esto indica que la cepa del hongo repite el procedimiento de desdoblamiento de la sacarosa a moléculas más simples (glucosa y fructosa), aumentando de forma acelerada la concentración de azúcares en el medio con respecto al inicio de la fermentación. Se puede apreciar en la curva experimental que a partir de las 120 horas hasta las 168 horas, presenta nuevamente un descenso de 0.0035 a 0.0017 g/Lh. Este descenso indica que se dió un consumo del azúcar (glucosa) mayor con respecto al período comprendido entre las 24 a 48 horas. El consumo de azúcares en este caso no fue para el crecimiento de la cepa si no para la formación del metabolito en estudio (ácido glucónico). De las 168 a las 192 horas la línea experimental indica un ascenso de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato; indicando que se repite el procedimiento de desdoblamiento de la sacarosa a glucosa y fructosa por parte de las enzimas del hongo, mostrando nuevamente un aumento de la concentración de los azúcares en el medio de fermentación. El aumento de la concentración de los azúcares no se puede ver si es mayor o menor con respecto al que se dió al inicio del proceso de fermentación, debido que a las 192 horas se finalizó el proceso de fermentación. En la curva corregida se puede observar que sigue una trayectoria similar al de la curva experimental, indicando que el resultado obtenido de velocidad volumétrica de consumo de sustrato esta dentro de los parámetros normales bajo las condiciones controladas. Además en todo el proceso de fermentación se pudo observar un comportamiento diauxico caracterizado por ascensos y descensos de la velocidad volumétrica de consumo de sustrato en la cepa del hongo ***Aspergillus niger***.

### Velocidad específica de consumo de sustrato.

La velocidad específica de consumo de sustrato se determino con la siguiente fórmula:

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

En donde:

$q_s$ : Velocidad específica de consumo de sustrato

$ds/dt$ : Velocidad volumétrica de consumo de sustrato

$X$ : gramos de biomasa/Litros de muestra analizada

Así por ejemplo para obtener la velocidad específica de consumo de sustrato en 24 horas se siguió el siguiente procedimiento:

$$q_s = \left(-\frac{1}{3.945}\right) (0.0023) = -5.83E_{-04}$$

El resultado obtenido fue de  $-5.83E_{-04}$ . En la tabla N° 15 se muestran los resultados obtenidos de velocidad específica de consumo de sustrato durante la producción de Ácido Glucónico. En dicha tabla se puede observar las variaciones de los valores en relación con el tiempo.

TABLA N° 15. RESULTADOS DE VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CONSUMO DE SUSTRATO

| TIEMPO (HORAS) | CONCENTRACION (mg/mL) | VELOCIDAD ESPECIFICA (g/Lh) |
|----------------|-----------------------|-----------------------------|
| 0              | 0.4060                | 0.0000                      |
| 24             | 0.4624                | -5.83E-04                   |
| 48             | 0.4690                | -2.15E-04                   |
| 72             | ***                   | ***                         |
| 96             | 0.7314                | -5.62E-04                   |
| 120            | 0.8372                | -7.40E-04                   |
| 144            | ***                   | ***                         |
| 168            | 0.6994                | -4.67E-04                   |
| 192            | 0.8160                | -7.81E-04                   |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

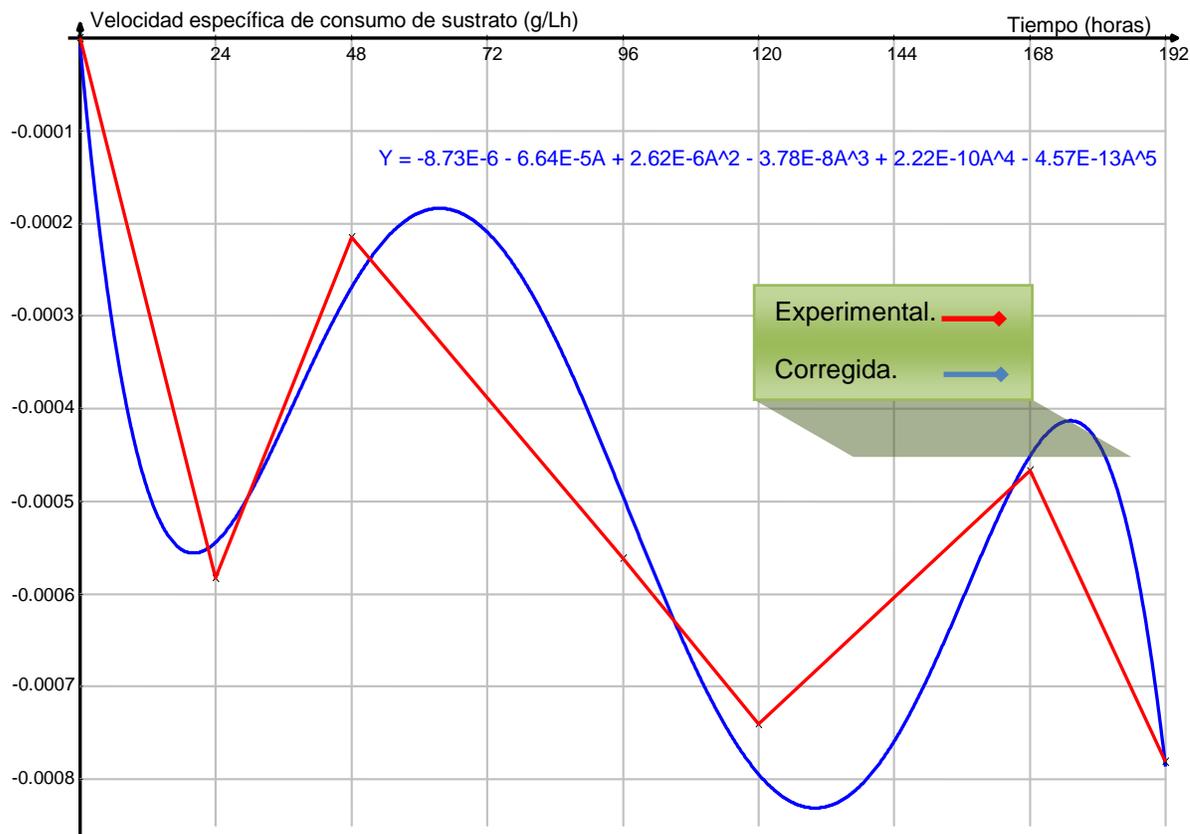


Figura N° 17. Curva de velocidad específica de consumo de sustrato (g/Lh) vs Tiempo (horas) para la producción de Ácido Glucónico

La Figura N° 17. Describe la relación existente entre los miligramos de azúcar consumido y los miligramos de biomasa formada por litro de medio de fermentación dado en un tiempo específico. En esta figura se representan dos curvas, la experimental representada por la línea roja, obtenida mediante la aplicación de la fórmula de velocidad específica de consumo de sustrato durante la producción de Ácido Glucónico y la curva corregida, representada por la línea azul obtenida de la aplicación de regresión polinomial. En la curva experimental se observa que a partir de las primeras 24 horas de iniciado el proceso de fermentación hubo un descenso de la velocidad específica de consumo de sustrato hasta un valor de  $-5.83E-04$  g/Lh; indicando que los miligramos de azúcar consumido son menores a los miligramos de biomasa formada. En este lapso de tiempo la cepa del hongo *Aspergillus niger* no

consumió azúcar por ser un disacárido; las enzimas del hongo tuvieron que desdoblar las moléculas de sacarosa a moléculas de glucosa y fructosa para obtener la energía necesaria para su subsistencia y crecimiento. De las 24 horas hasta las 48 horas se aprecia un ascenso gradual de la velocidad específica de consumo de sustrato a un valor negativo de  $-2.15E-04$  g/Lh, lo cual indica que a las 48 horas se realizó el máximo consumo de azúcar (glucosa) en relación a la máxima biomasa formada. Además en la curva experimental se puede apreciar un segundo ascenso de la velocidad específica a las 168 horas resultando el valor de  $-4.67E-04$ , aunque este fue menor con respecto al presentado a las 48 horas, es un indicador de que en este período hubo también, un máximo consumo de glucosa del hongo que no tiene relación con el crecimiento de la biomasa, pues se puede observar en la figura N° 1, un descenso. En el ascenso que se observa a las 168 horas. Además se puede afirmar que este segundo máximo de consumo de sustrato fue para la formación del ácido glucónico y no para el crecimiento del hongo. Al realizar una comparación entre la curva experimental (línea roja) y la curva corregida (línea azul), se puede observar que en la curva corregida el máximo consumo de sustrato debería haberse dado aproximadamente a las 60 horas con un valor de velocidad específica de consumo de sustrato arriba de  $-0.0002$ ; pero menor de  $-0.0001$  y el segundo máximo de consumo de sustrato debería haberse dado aproximadamente a las 74 horas con un valor de velocidad específica de consumo de sustrato próximo a  $-0.0004$ .

### **ENSAYO N°.3**

Se trabajó con una concentración inicial del dulce de atado de 80 g/Litro, antes de ser esterilizado el medio de cultivo; el pH fue regulado a 1.95 con una solución de ácido clorhídrico 1N y la medición de los grados °Brix fue de: 7.0, inmediatamente se le aplicó oxigenación al medio. Antes de añadir el hongo al medio de fermentación se tomó una muestra control y se procedió a medir los

grados °Brix y el pH. El hongo fue preparado con una suspensión de las esporas en una base de tween 80 al 0.1% previamente esterilizada en el autoclave; inmediatamente fue inoculado al medio de cultivo (dulce de atado). La hora cero de la fermentación inicia desde el momento que es inoculada las esporas del hongo al medio de cultivo, en este momento se tomaron dos muestras e inmediatamente se les determinó pH y fueron refrigeradas para realizarle los demás parámetros analíticos. El oxígeno fue suministrado al medio durante los ocho días del proceso de fermentación; es decir desde las 0 horas hasta las 168 horas. Durante este proceso se tomaron muestras a cada 24 horas a excepción de las 120 horas que no fue posible por no tener acceso al laboratorio por ser domingo, obteniendo un total de siete muestras incluyendo las muestras iniciales de las 0 horas. Es de mencionar que el ensayo 3 se logró determinar con la Técnica de Recuento en Placa, el número de colonias de los hongos con que inició el proceso de fermentación el cual fue de  $26 \times 10^{-3}$  UFC/mL y las siguientes determinaciones analíticas para la evaluación de la cinética de fermentación: grados °Brix, pH, cuantificación de azúcares totales, además se realizaron ensayos de la curva estándar de ácido glucónico a través del método espectrofotométrico Uv/Vis mediante un barrido de 180 a 600 nm de longitud de onda ( $\lambda$ ), pero no se logró la cuantificación del ácido glucónico a través del método espectrofotométrico, debido a las interferencias que fueron observadas en el espectro del estándar del ácido causadas por el fenol utilizado para esta prueba, las interferencias fueron observadas en la región ultravioleta de 190 a 300 nm. La región en la que es absorbido el ácido glucónico es en la de 276 nm. Además se realizaron ensayos de identificación del ácido glucónico mediante la técnica de cromatografía en capa fina utilizando placas cromatográficas recubiertas de sílica gel de 20x20; las placas de 20x20 (cm) se recortaron y las nuevas dimensiones fueron de 9x3 (cm) y se llevó a la par el estándar del ácido glucónico a una concentración de 20 mg/mL; las aplicaciones de muestra y estándar fueron realizadas por medio de capilares y

se realizaron 10 aplicaciones sobre las placas tanto del estándar como muestra. La fase móvil utilizada en esta técnica fue: n-propanol: etil acetato: agua; en proporciones de: 5:2:3, el agente revelador utilizado para esta prueba fue el azul de bromofenol al 0.01% en alcohol de preparación reciente. En la tabla 16 se muestra un cuadro resumen de los parámetros analíticos determinados durante la evaluación de la cinética de fermentación para la obtención del ácido glucónico:

**TABLA N° 16. PARAMETROS DE CINETICA DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Aspergillus niger* DEL ENSAYO E3**

| PROMEDIO DE MUESTRAS DUPLICADAS SEGÚN HORAS DE FERMENTACIÓN | CINETICA DE CRECIMIENTO PARAMETROS CINETICOS |       |             |          |                              |  |
|---|--|-------|-------------|----------|------------------------------|--|
|   | pH   | °Brix | Biomasa g/L | % acidez | Azucares Concentración mg/mL | Ácido Glucónico por cromatografía de capa fina |
| 0 horas   | 1.95   | 7.0   | 1.0         | 0.4642   | 0.2000                       | No identificado                                |
| 24 horas  | 1.93   | 7.4   | 2.0         | 0.3689   | 0.7000                       | No identificado                                |
| 48 horas  | 1.59   | 8.0   | 2.0         | 0.4612   | 0.4950                       | No identificado                                |
| 72 horas  | 1.94   | 7.5   | 4.0         | 0.4612   | 0.0850                       | No identificado                                |
| 96 horas  | 1.93   | 8.2   | 3.0         | 0.4458   | 0.2350                       | No identificado                                |
| 120 horas   | ***  | ***   | ***         | ***      | ***                          | ***  |
| 144 horas   | 1.43   | 9.0   | 5.0         | 0.4458   | 0.5900                       | No identificado                                |
| 168 horas   | 1.85   | 10.0  | 6.0         | 0.2767   | 0.8900                       | No Identificado                                |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

## RESUMEN COMPARATIVO DE LOS TRES ENSAYOS

Al inicio del capítulo se mencionó que en el presente estudio experimental se realizaron tres ensayos con la finalidad de aumentar la confiabilidad y validez de la investigación y dar relevancia científica a los resultados. En todo el proceso de experimentación surgieron imprevistos que alteraron los resultados esperados en cada uno, los cuales ya fueron mencionados al describir cada ensayo. Sin embargo, al integrar los tres ensayos se hace posible dar un sustento científico a esta investigación. En primer lugar como fue el caso del ensayo N° 1 que no fue posible evaluar la curva estándar del ácido glucónico, cuantificación del ácido, ni la identificación por el método cromatográfico; además no se logró realizar la prueba alterna para la identificación del ácido glucónico. Sin embargo, al integrar los tres ensayos se observa coincidencia en cada etapa que le da sustento científico a esta investigación.

A continuación se presenta un análisis comparativo de los parámetros analíticos que fueron útiles para realizar una evaluación de la cinética de fermentación para la obtención del ácido glucónico en los tres ensayos; estos parámetros son: pH, grados °Brix, azúcares totales, biomasa y acidez total.

**TABLA N° 17. RESULTADO DE pH PARA LOS TRES ENSAYOS**

| TIEMPO (H) | pH (E1) | pH (E2) | pH (E3) |
|------------|---------|---------|---------|
| 0          | 2.67    | 3.02    | 1.95    |
| 24         | 2.63    | 3.05    | 1.93    |
| 48         | 2.60    | 3.11    | 1.59    |
| 72         | 2.58    | ***     | 1.94    |
| 96         | 2.51    | 2.98    | 1.93    |
| 120        | ***     | 2.87    | ***     |
| 144        | 2.55    | ***     | 1.43    |
| 168        | 2.55    | 2.57    | 1.85    |
| 192        |         | 2.54    |         |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

En la tabla N° 17 se observa la variabilidad del pH con respecto al tiempo de fermentación para el ensayo 1, 2 y 3. De la tabla N° 16 se obtuvo la figura N° 18

con la finalidad de ver la diferencia o similitudes entre las líneas de pH para los tres ensayos experimentales.

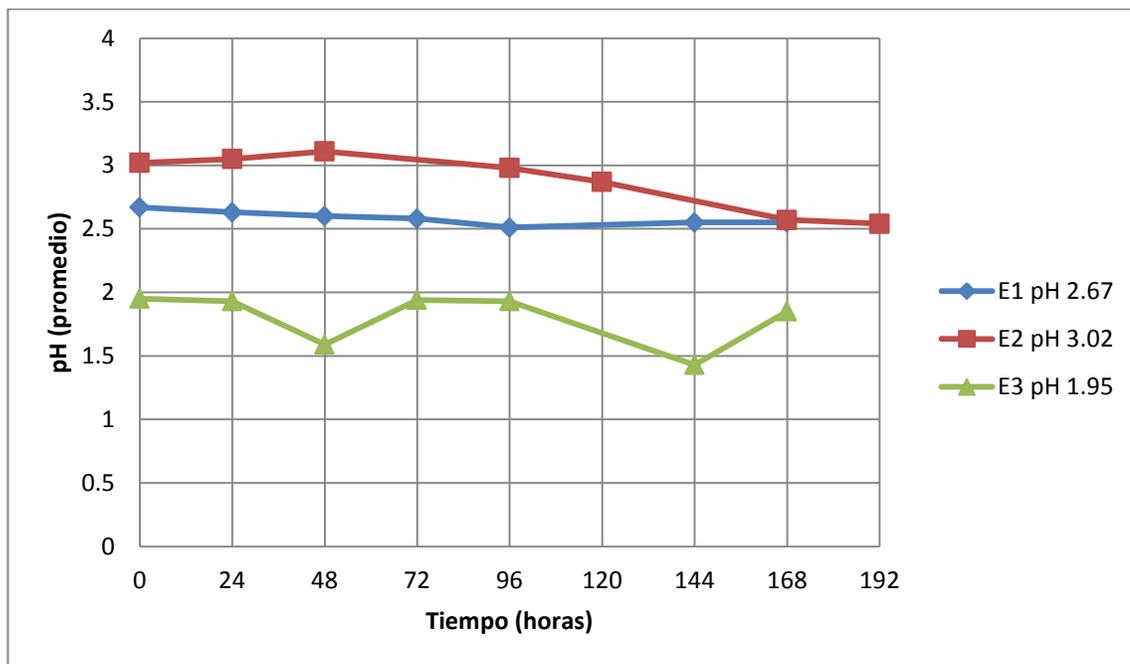


Figura 18. Curva de pH vs Tiempo (horas) de los ensayos de producción de Ácido Glucónico (E1, E2, E3)

En la figura N° 18 se aprecia una similitud con respecto a la tendencia de disminución del pH para los ensayos 1 y 2. Con una mayor coincidencia de pH a las 168 horas para ambos ensayos, con la diferencia de que en el ensayo N° 2 presentó un ascenso de pH de las 0 a 48 horas. La línea de pH del ensayo N° 3 presenta una marcada diferencia con respecto a las líneas de los ensayos 1 y 2, notándose en el ensayo N° 3 descensos y ascensos de pH; mostrando un primer descenso de pH a partir de las 0 horas hasta las 48 horas y un segundo descenso después de las 72 horas hasta las 144 horas, observando leves ascensos de pH después de las 48 horas hasta las 72 horas y un segundo descenso después de las 144 horas hasta las 168 horas. Los tres ensayos muestran un pH dentro de lo requerido para el crecimiento del hongo y para la formación del metabolito en estudio solo los ensayos 1 y 2.

Otro parámetro tomado en cuenta para realizar este estudio fue la acidez total; pero antes de observar el comportamiento de este parámetro cinético se muestran en la tabla N° 18 los volúmenes gastados de valorante NaOH 0.1N en las muestras fermentadas.

TABLA N° 18. RESULTADOS DE VOLUMENES GASTADOS DE NaOH 0.1N EN LOS ENSAYOS E1, E2 Y E3 PARA LA DETERMINACION DE LA ACIDEZ TOTAL

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | VOLUMEN (mL) E1 | VOLUMEN (mL) E2 | VOLUMEN (mL) E3 |
|---------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1             | 0              | 0.3528          | 0.9016          | 1.1760          |
| 2             | 24             | 0.3528          | 0.6272          | 0.9408          |
| 3             | 48             | 0.4704          | 0.6664          | 1.1760          |
| 4             | 72             | 0.4704          | ***             | 1.1760          |
| 5             | 96             | 0.5096          | 0.8232          | 1.1368          |
| 6             | 120            | ***             | 0.8624          | ***             |
| 7             | 144            | 0.4704          | ***             | 1.1368          |
| 8             | 168            | 0.5488          | 1.1760          | 0.7056          |
| 9             | 192            |                 | 1.2544          |                 |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

A partir de los volúmenes de la tabla N° 17 se obtuvo la acidez total a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acidez Total} = \frac{\text{mL de NaOH gastado} * \text{NNaOH} * \text{Meq ác. glucónico} * 100}{\text{mL de muestra}}$$

De la fórmula anterior se obtuvieron los datos de acidez total para los tres ensayos. Los resultados obtenidos de acidez total se muestran en la tabla N° 19, estos varían de acuerdo al tiempo de fermentación.

TABLA N° 19. RESULTADOS DE ACIDEZ TOTAL DE LOS ENSAYOS E1, E2 Y E3 PARA LA PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | % DE ACIDEZ DE E1 | % DE ACIDEZ DE E2 | % DE ACIDEZ DE E3 |
|---------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 1             | 0              | 0.1383            | 0.3536            | 0.4642            |
| 2             | 24             | 0.1383            | 0.2459            | 0.3689            |
| 3             | 48             | 0.1844            | 0.2613            | 0.4612            |
| 4             | 72             | 0.1844            | ***               | 0.4612            |
| 5             | 96             | 0.1998            | 0.3228            | 0.4458            |
| 6             | 120            | ***               | 0.3382            | ***               |
| 7             | 144            | 0.1844            | ***               | 0.4458            |

TABLA N° 19. CONTINUACION

|   |     |        |        |        |
|---|-----|--------|--------|--------|
| 8 | 168 | 0.2152 | 0.4642 | 0.2767 |
| 9 | 192 |        | 0.4919 |        |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

De la tabla N° 19 resulta la figura N° 19, en esta figura se observa el comportamiento de la acidez total con respecto al tiempo de fermentación para los ensayos 1, 2 y 3 mostrando cada línea de acidez su propia tendencia.

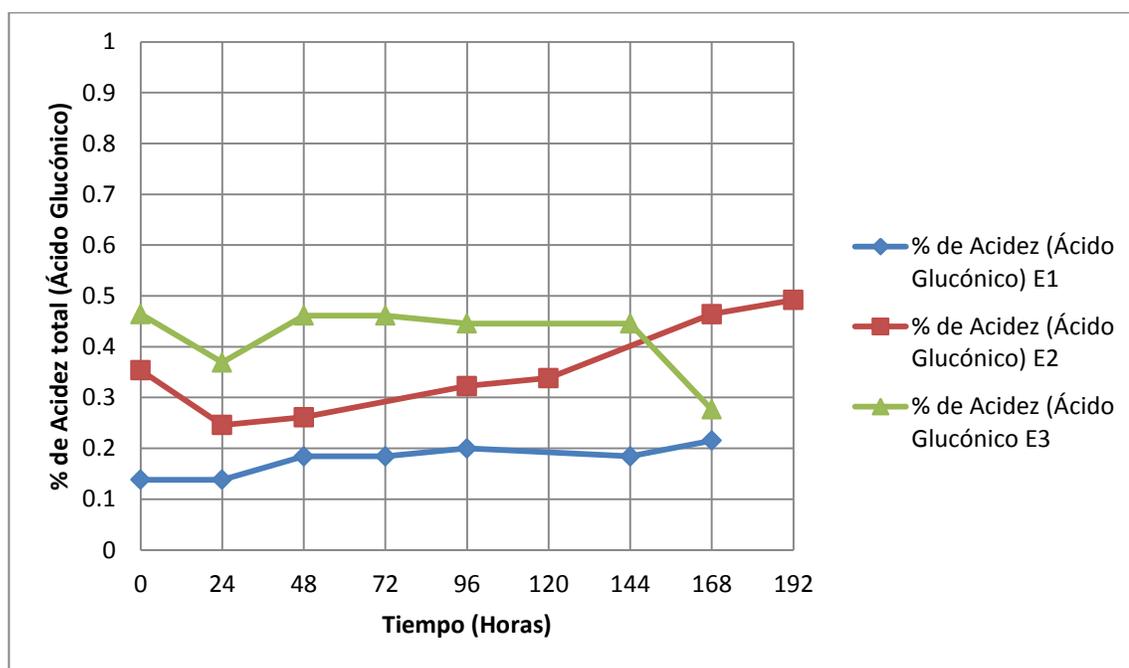


Figura 19. Curva de Acidez total (Ácido Glucónico) vs Tiempo (Horas) de los ensayos E1, E2 y E3

En la figura N° 19 las líneas de los ensayos 1 y 2 muestran un aumento del porcentaje de acidez a partir de las 24 horas; con respecto al primero el aumento se mantuvo hasta las 168 horas y para el segundo el aumento es hasta las 192 horas; con la diferencia que el ensayo N° 2 presenta un descenso del porcentaje de acidez a partir de las 0 horas hasta las 24 horas, mientras que el ensayo N° 1 muestra una acidez constante en los períodos de las 0 a 24 horas y de las 48 a 72 horas, manifestando un leve descenso de las 96 hasta las 144 horas. Al realizar una comparación del ensayo N° 3 con el ensayo N° 2

se observa una coincidencia en las primeras 24 horas de fermentación, notando una disminución de la acidez en ambos ensayos, pasadas las 24 horas el ensayo N° 3 presenta un comportamiento totalmente diferente con respecto a lo observado en los ensayos 1 y 2, mostrando un leve aumento de las 24 horas hasta las 48 horas, llegando a la acidez inicial, pasadas las 48 horas hasta las 144 horas no muestra cambios significativos, seguidamente en vez de aumentar el porcentaje de acidez esta se ve disminuida después de las 144 horas hasta las 168 horas; por lo que se deduce que para el ensayo N° 3 no hubo acumulo de ácidos orgánicos, ni tan poco del ácido glucónico; en cambio para los ensayos 1 y 2 si existe el acumulo de ácidos orgánicos (ácido glucónico), pero se observa un mayor acumulo del ácido en el ensayo N° 2.

Los grados °Brix es otro parámetro analítico tomado en cuenta en este estudio, estos resultados son mostrados en la tabla N° 20.

TABLA N° 20. RESULTADOS DE GRADOS °BRIX EN LOS ENSAYOS E1, E2 Y E3

| TIEMPO (HORAS) | GRADOS °BRIX (E1) | GRADOS °BRIX (E2) | GRADOS °BRIX (E3) |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0              | 3.0               | 7.6               | 7.0               |
| 24             | 3.0               | 7.6               | 7.4               |
| 48             | 2.5               | 8.0               | 8.0               |
| 72             | 3.0               | ***               | 7.5               |
| 96             | 3.0               | 8.7               | 8.2               |
| 120            | ***               | 9.3               | ***               |
| 144            | 3.5               | ***               | 9.0               |
| 168            | 3.5               | 9.4               | 10.0              |
| 192            |                   | 10.3              |                   |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

De los resultados de grados °Brix tabulados en la tabla 20 se obtuvo la figura N° 20

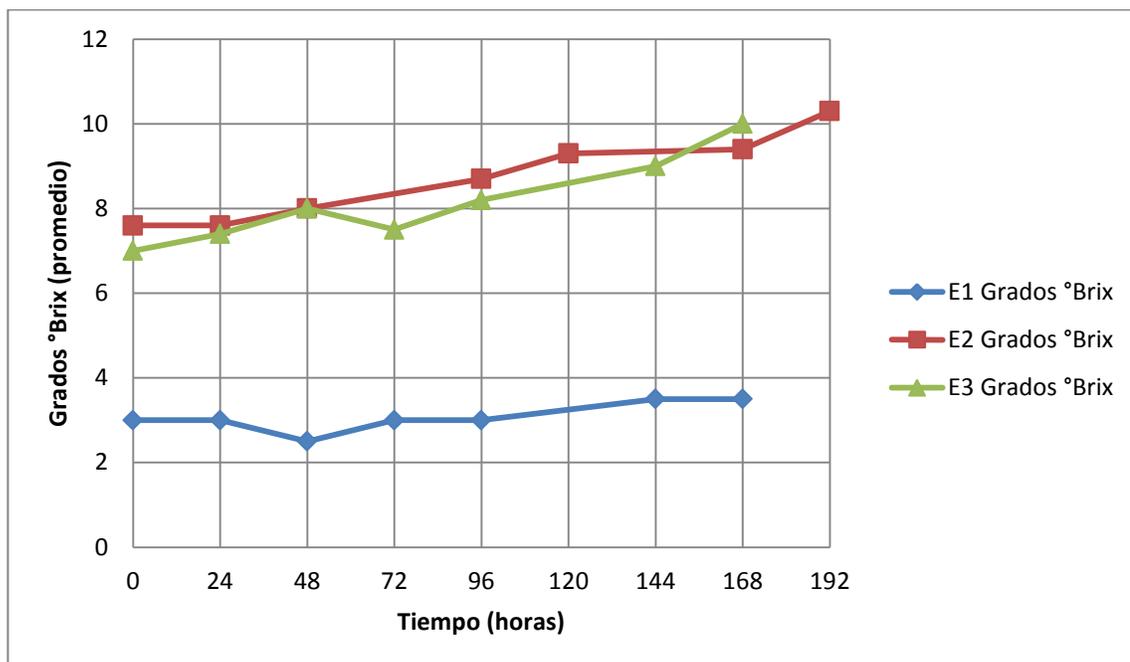


Figura N° 20. Curva de resultados de grados °Brix vs Tiempo (horas) de los ensayos de producción de Ácido Glucónico (E1, E2 y E3)

La figura N° 20 muestra gráficamente el comportamiento de los resultados obtenidos de forma experimental de los grados °Brix consumidos por el microorganismo en estudio para su crecimiento y metabolismo del ácido glucónico en los ensayos 1, 2 y 3. Al comparar las líneas de los ensayos 2 y 3 se observa que en ambos los grados °Brix tienden a aumentar con la diferencia de que la línea del ensayo N° 3 muestra una disminución de los grados °Brix entre las 48 y 72 horas del proceso fermentativo; en cambio el ensayo N° 2 presenta constancia de los grados °Brix en las primeras 24 horas y una segunda constancia a partir de las 120 horas hasta las 168 horas. En relación a la línea del ensayo N° 1, se observa que presenta un comportamiento muy diferente con respecto a las líneas de los ensayos 2 y 3; aunque existe dos puntos de coincidencia con el ensayo N° 2 en lo que respecta a la constancia de los grados °Brix: el primero es observado en las primeras 24 horas de fermentación y el segundo se observó después de las 144 horas hasta las 168

horas; mostrando una disminución de los grados °Brix a partir de las 24 horas hasta las 48 horas.

Así como los parámetros analíticos mencionados anteriormente, es necesario hacer mención de la biomasa obtenida en los tres ensayos con la finalidad de observar la tendencia de cada una de acuerdo al ensayo. Los resultados de biomasa obtenidos para cada ensayo se muestran en la tabla N° 21, estos varían de acuerdo al tiempo de fermentación para cada ensayo.

**TABLA N° 21. RESULTADOS DE BIOMASA EN LOS ENSAYOS E1, E2 Y E3**

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | BIOMASA EN E1 (g/L) | BIOMASA EN E2 (g/L) | BIOMASA EN E3 (g/L) |
|---------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 1             | 0              | 2.146               | 4.897               | 1.0                 |
| 2             | 24             | 1.345               | 3.945               | 2.0                 |
| 3             | 48             | 1.240               | 6.019               | 2.0                 |
| 4             | 72             | 1.037               | ***                 | 4.0                 |
| 5             | 96             | 1.524               | 5.864               | 3.0                 |
| 6             | 120            | ***                 | 4.728               | ***                 |
| 7             | 144            | 2.526               | ***                 | 5.0                 |
| 8             | 168            | 1.957               | 3.633               | 6.0                 |
| 9             | 192            |                     | 2.687               |                     |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

De los resultados de biomasa obtenidos en la tabla N° 21 se obtuvieron las tres curvas de cinética de crecimiento para cada ensayo por separado mediante la aplicación de la fórmula siguiente:  $\ln(X)$ , donde "X" representa a la biomasa (g/L). Los datos obtenidos de la fórmula anterior son reflejados en la tabla N° 22.

**TABLA N° 22. RESULTADOS DE BIOMASA APLICANDO A LOS DATOS EXPERIMENTALES LOGARITMO NATURAL EN LOS ENSAYOS E1, E2 Y E3**

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | Ln (x) EN E1 (g/L) | Ln (x) EN E2 (g/L) | Ln (x) EN E3 (g/L) |
|---------------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1             | 0              | 0.7636             | 1.5886             | 0.0000             |
| 2             | 24             | 0.2963             | 1.3724             | 0.6931             |
| 3             | 48             | 0.2151             | 1.7949             | 0.6931             |
| 4             | 72             | 0.0363             | ***                | 1.3862             |
| 5             | 96             | 0.4213             | 1.7688             | 1.0986             |
| 6             | 120            | ***                | 1.5535             | ***                |
| 7             | 144            | 0.9266             | ***                | 1.6094             |

TABLA N° 22. CONTINUACION

|   |     |        |        |        |
|---|-----|--------|--------|--------|
| 8 | 168 | 0.6714 | 1.2900 | 1.7917 |
| 9 | 192 |        | 0.9884 |        |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo fermentación

Los resultados obtenidos de biomasa mediante la aplicación de la fórmula:  $\ln(X)$  son reflejados en la tabla N° 22; son utilizados para trazar las tres líneas que describen el comportamiento por separado para los ensayos 1, 2 y 3 en la figura N° 21.

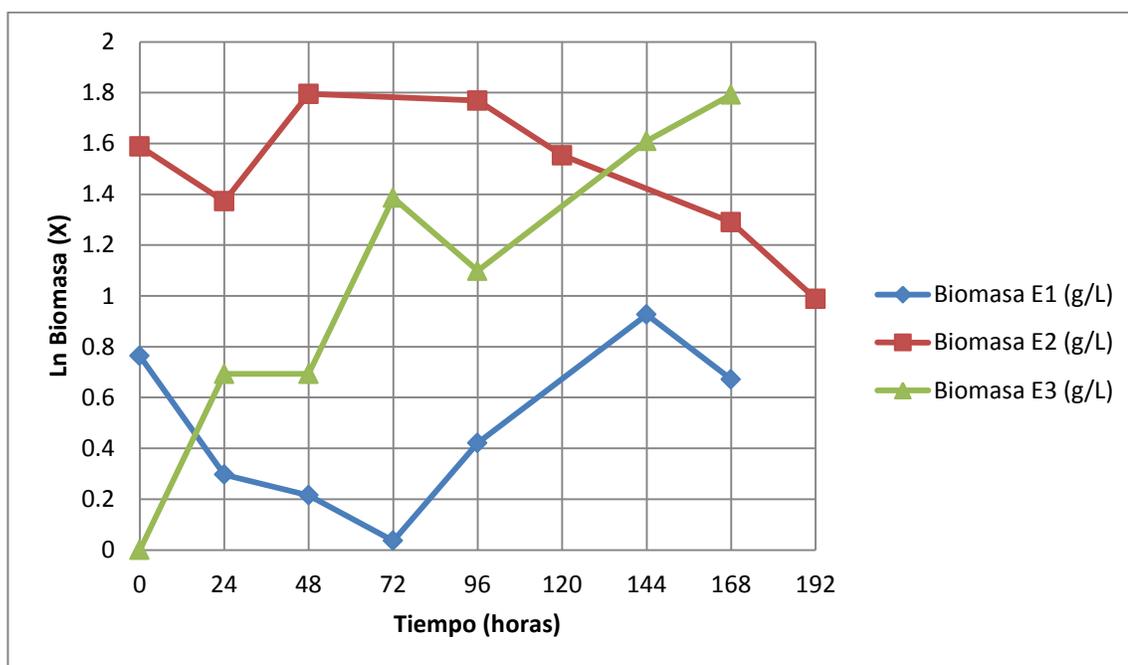


Figura N° 21. Curva de biomasa por peso seco  $\ln(x)$  vs Tiempo (horas) de los ensayos E1, E2 y E3 para la producción de Ácido Glucónico

En la Figura N° 21 se observan las tres líneas de los ensayos 1, 2 y 3; donde cada una representa una cinética de crecimiento microbiano o generación de células con un comportamiento totalmente diferente entre cada ensayo. Debido que para realizar cada ensayo fueron variadas algunas condiciones del medio, como las que a continuación se mencionaran: el ensayo N° 1 se trabajó a una concentración inicial de 30 g/L de dulce de atado (como medio de cultivo) y un

pH inicial de 2.67, se le proporciono oxigeno y agitación al medio; pero no fueron simultaneas estas últimas condiciones (agitación y oxigenación) si no que fue necesario intercalar cada 24 horas, la cepa del hongo antes de ser inoculada al medio de fermentación se le dió un mantenimiento de 15 días. El ensayo N° 2 se trabajo a una concentración inicial 80 g/L de dulce de atado, pH inicial de 3.02 y se le suministró oxígeno al medio durante todo el proceso de fermentación, la cepa del hongo previo a la inoculación al medio de fermentación se le dió un mantenimiento de 1 mes; en lo que respecta a las condiciones de trabajo para el ensayo N° 3, estas fueron: 80 g/L de dulce de atado, pH inicial de 1.95 y suministro de oxígeno durante todo el proceso fermentativo y un tiempo de mantenimiento de la cepa en estudio de un mes; los tres ensayos fueron trabajados a temperatura ambiente (27°C). En lo que respecta a la cinética de crecimiento microbiano presentado por el primer ensayo (E1), se observa una fase de muerte celular temprana en las primeras 72 horas, mostrando solo dos fases en su ciclo como es: la fase logarítmica (crecimiento) y la fase de muerte; mientras que la cinética del segundo ensayo (E2) refleja casi todas fases de su ciclo de crecimiento: logarítmica, estacionaria y muerte, no así la fase de adaptación. Al observar la cinética del ensayo N° 3, se nota que presenta un comportamiento muy diferente a la cinética de los ensayos 1 y 2, mostrando solamente una fase de su ciclo como es la logarítmica en todo el proceso fermentativo.

Para ampliar el criterio de la investigación como se hace mención al inicio del capítulo fue necesario tomar en cuenta el último parámetro analítico: azúcares totales, para la obtención de los resultados de azúcares fue necesario apoyarse de la curva estandarizada de los azúcares. Los resultados se muestran en la tabla N° 23.

TABLA N° 23. RESULTADOS DE LOS ENSAYOS 1, 2 y 3 DE LA APLICACION DE REGRESION LINEAL AL ANALISIS DE MUESTRAS POR EL METODO FENOL-SULFURICO PARA LA CUANTIFICACION DE AZUCAREZ TOTALES

| N° DE MUESTRA | TIEMPO (HORAS) | CONCENTRACION DE E1 (mg/mL) | CONCENTRACION DE E2 (mg/mL) | CONCENTRACION DE E3 (mg/mL) |
|---------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1             | 0              | 0.3536                      | 0.4200                      | 0.2000                      |
| 2             | 24             | 0.6994                      | 0.4000                      | 0.7000                      |
| 3             | 48             | 0.9152                      | 0.5550                      | 0.4950                      |
| 4             | 72             | 0.9594                      | ***                         | 0.0850                      |
| 5             | 96             | 0.6240                      | 0.6200                      | 0.2350                      |
| 6             | 120            | ***                         | 0.9200                      | ***                         |
| 7             | 144            | 0.6968                      | ***                         | 0.5900                      |
| 8             | 168            | 0.9906                      | 0.6600                      | 0.8900                      |
| 9             | 192            |                             | 0.7950                      |                             |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo fermentación

Los resultados obtenidos de azúcares totales a partir de la tabla N° 23 se procede a graficar y se muestran en la figura N° 22.

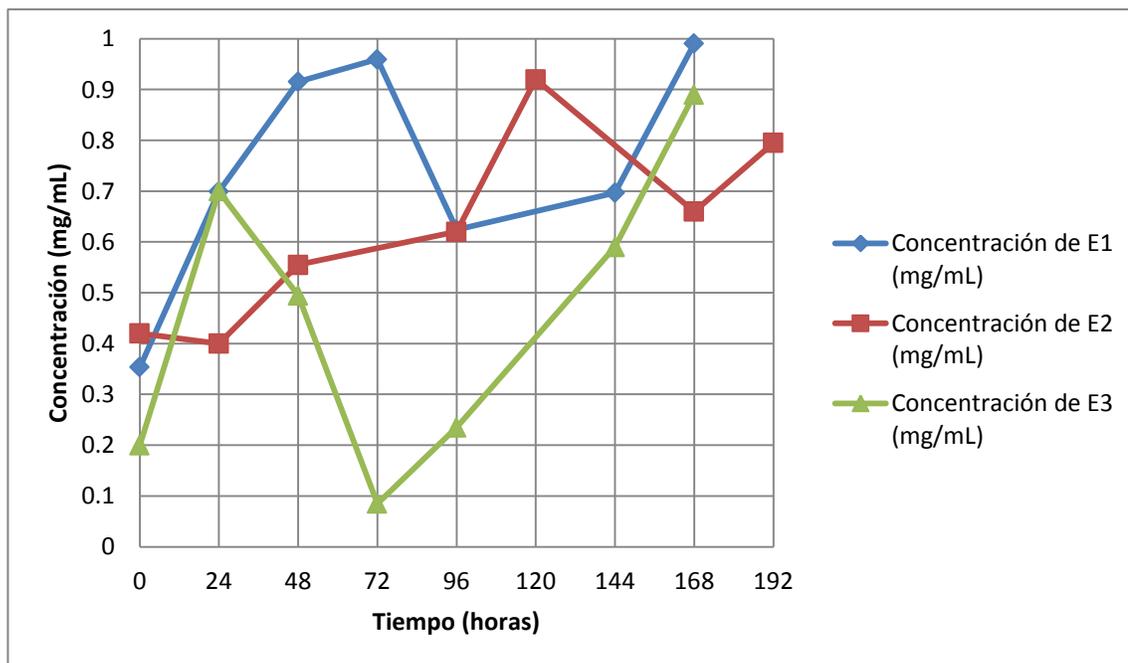


Figura N° 22. Curva de concentración de azúcares en muestras vs Tiempo (horas), para los ensayos E1, E2 y E3

La Figura N° 22 representa gráficamente las diferentes líneas de azúcares consumidos durante la producción de Ácido Glucónico para los ensayos 1, 2 y 3

obtenida mediante el método fenol-sulfúrico, cada una mostró un comportamiento totalmente diferente, debido a que la cepa de hongo fue sometido a un medio de cultivo complejo como se menciona al inicio de la investigación como es el dulce de atado, que en su composición está conformado por el disacárido sacarosa; por lo tanto la cepa antes de consumir el azúcar tiene que realizar un proceso de desdoblamiento del azúcar a glucosa y fructosa para obtener de ella la energía necesaria para su crecimiento y metabolización del ácido glucónico. Se observa además que ambas líneas muestran un comportamiento heterogéneo con ascensos y descensos de los azúcares; llamándose a este tipo de comportamiento: DIAUXICO. El ensayo N° 1 presenta un marcado descenso de los azúcares de las 72 horas hasta las 144 horas, mientras que el ensayo N° 2 lo presento de las 120 horas hasta las 168 horas y el ensayo N° 3 el descenso de los azúcares se ve reflejado a partir de las 24 horas hasta las 72 horas.

### **ANALISIS DE LOS PROCESO FERMENTATIVOS E1, E2 Y E3.**

Luego de haber observado de manera gráfica el comportamiento de la cinética de fermentación en un estudio comparativo de las siguientes variables tomadas en cuenta como son: biomasa, pH, acidez total, grados °Brix y azúcares consumibles para cada ensayo experimental realizado. De los tres ensayos se elige el ensayo E2 para su reproducibilidad, ya que éste presenta un mejor comportamiento cinético, además el pH se mantiene entre 3 y 2, el cual es el idóneo para el crecimiento celular con una concentración inicial de 7.0 grados °Brix, así como para producir el metabolito deseado como es el Ácido Glucónico con un buen suministro de oxígeno al medio y sin una agitación intermedia. Además, basados en el parámetro de la acidez total se logra observar que este mantiene un aumento constante hasta finalizar el proceso de fermentación, indicando que hay una buena formación de ácidos orgánicos, comprobándose que el dulce de atado contiene los nutrientes adecuados; así como los azúcares

esenciales como fuente de energía y sustrato principal para obtener el Ácido Glucónico.

Es de mencionar que a pesar de que no se logró identificar la formación del Ácido Glucónico mediante la cromatografía de capa fina, ni la cuantificación del ácido por espectrofotometría uv/visible durante el desarrollo de los tres ensayos fermentativos. Con respecto a lo primero se cambió la fase móvil incluida en el estudio (butanol: ácido fórmico al 85 %: agua) y el reactivo de Tillman como agente revelador por azul de bromo fenol al 0.04% y n-propanol: etil acetato: agua (5: 2: 3); debido que el reactivo Tillman como agente revelador falló en el primer ensayo y no fue posible la revelación de las manchas. Además la fase móvil (butanol: ácido fórmico: agua) a pesar de que se varió las proporciones de cada componente con la finalidad de aumentar o disminuir la polaridad de la mezcla para mejorar la corrida del estándar de ácido glucónico.

Al momento de ensayar el agente revelador azul de bromofenol al 0.04% sobre las placas cromatografica inyectadas con el estándar de ácido glucónico previamente corridas mediante la mezcla de: butanol: ácido fórmico: agua fue observado un barrido de la mancha por toda la parte intermedia de la placa cromatografica lo que indica que no es una buena mezcla de solventes para separar e identificar el Ácido Glucónico; en cambio la segunda mezcla de solvente (n-propanol: etil acetato: agua) resultó ser efectiva para identificar el Ácido Glucónico al trabajarse con el estándar del ácido. Al ser ensayada la nueva mezcla (n-propanol: etil acetato: agua) en las muestras fermentadas no fue perceptible a la vista el revelado de las manchas al ser rociadas con el agente revelador azul de bromofenol al 0.04% debido a dos razones: la primera es porque el ácido en estudio presenta características de inestabilidad en estado sólido y la segunda es debida a que las cantidades de ácido producido fueron mínimas de tal forma que no fue posible su identificación mediante esta técnica. Además se realizaron varios ensayos con la curva estándar del ácido

mediante un barrido de 190 a 600 nm, pero se observaron varias interferencias a partir de los 190 a 300 nm de longitud de onda; la primera interferencia se debió al emplear agua desmineralizada; se corrigió trabajando con agua bidestilada, se repite nuevamente el ensayo con el estándar, mostrando nuevamente las mismas interferencias que con los ensayos anteriores, con la diferencia que en este caso fueron producidas por el fenol; por ser de calidad reactivo; opacando la absorción del estándar en la región ultravioleta, pero a pesar de las interferencias presentadas por el fenol se comprobó que se absorbe en los 276 nm.

**CAPITULO 6**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. Se comprobó que el dulce de atado, como medio de cultivo es una alternativa viable y una buena fuente para obtener el Ácido Glucónico mediante un estudio de cinética.
2. Se determinó de acuerdo al estudio de la cinética de crecimiento microbiano la presencia de ácido glucónico, pero no fue posible su cuantificación; debido a las interferencias presentadas por el fenol calidad reactivo en la región Uv / Vis de los 190 a 300nm.
3. De acuerdo al estudio realizado al ensayo 2, se deduce que la fase en la que se produce la mayor cantidad de Ácido Glucónico en la cinética de crecimiento microbiano del hongo *Aspergillus niger* es entre la fase de latencia y muerte; el cual comprende los períodos de tiempo de 120 a 192 horas; determinado mediante el parámetro de la acidez total.
4. La cinética de crecimiento del hongo *Aspergillus niger* presentó un comportamiento Diaúxico. Debido que el dulce de atado, como medio de cultivo productor del ácido presenta dentro de su composición la sacarosa; disacárido que el hongo tiene que desdoblar para obtener la glucosa, sustrato principal para adquirir la fuente de energía y el Ácido Glucónico.
5. No fueron visibles las manchas de Ácido Glucónico sobre las placas cromatográficas al rociar el agente revelador de azul de bromofenol al 0.02%, debido que el Ácido Glucónico obtenido fue mínima y es un ácido inestable.
6. Se logró determinar que la fase móvil butanol: ácido fórmico: agua en proporciones (12: 1: 1) no es una buena elección para la identificación del estándar de Ácido Glucónico a través de la técnica de cromatografía en capa fina; porque presento un barrido de la mancha a lo largo y ancho de la

placa cromatográfica al ser rociado con el agente revelador de azul de bromofenol al 0.02%, debido a la alta polaridad de la mezcla de solventes. Se comprobó que el reactivo de tillman no es buen agente revelador para el Ácido Glucónico.

7. La cantidad de Ácido Glucónico obtenido se ve favorecida por la concentración del medio de cultivo proporcionado a la cepa de ensayo, pH, la agitación y oxigenación continua.
8. El pH de los ensayos E1, E2 y E3 presentó variación de 3.0 a 1.0 con el objeto de buscar el pH óptimo para el crecimiento de la cepa del hongo ***Aspergillus niger*** y la formación del Ácido Glucónico; por lo que el rango de pH para producir el Ácido Glucónico puede oscilar de 4 a 2.

**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio comparativo de cinética del hongo *Aspergillus niger* para producir el Ácido Glucónico, utilizando separadamente como medios de cultivo el suero de leche, agua de cocimiento de maíz, melaza y dulce de atado; controlando las mismas condiciones de mantenimiento para elegir el medio de cultivo o medios de cultivos óptimos para la producción de Ácido Glucónico. Además investigar que otros desechos agroindustriales pueden ser útiles para la producción de este ácido.
2. Investigar la cinética de crecimiento de las siguientes cepas de hongos *Aspergillus niger* NRRL3, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Gonatotryps*, *Endomycopsis* y *Pullularia* o bacterias *Acetobacter suboxidans*, *Vibrio* y *Pseudomonas* para identificar las que producen mejor el Ácido Glucónico.
3. Controlar que el microorganismo *Aspergillus niger* no pase de la fase exponencial en un estudio cinético con el objeto de aumentar la producción de Ácido Glucónico, manteniendo las condiciones óptimas de crecimiento y desarrollo de la cepa; suministrar suficiente oxígeno al medio de cultivo productor del ácido.
4. Diseñar un método para identificar y cuantificar el Ácido Glucónico, por cromatografía de alta resolución HPLC.
5. Utilizar fenol grado HPLC y agua bidestilada para preparar los reactivos, muestras y estándar para la cuantificación del Ácido Glucónico por el método espectrofotometría UV/Vis aplicando un barrido de los 200 a 400nm de longitud de onda; realizar un ensayo previo con la curva estándar del Ácido Glucónico.

6. Realizar un tratamiento previo de purificación a las muestras del fermento con la finalidad de minimizar e incluso eliminar las posibles interferencias en la cuantificación e identificación del Ácido Glucónico.
7. Controlar las condiciones de temperatura, concentración de sustrato, pH y suministro de oxígeno durante el proceso de fermentación para mejorar el rendimiento de la producción de Ácido Glucónico.
8. Llevar un control de colonias del microorganismo en estudio con el que inicia la fermentación a través del método espectrofotométrico Uv/ Vis con alta sensibilidad o por el método de recuento en placa.

## BIBLIOGRAFIA

1. AOAC, (Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Usa). 1984. 14a Edición. Washington, D. C. Editor Sidney Williams 420p (apartado 22.058).
2. Castillo Rodriguez, WE y otros. 2007. Propuesta de evaluación de la cinética de fermentación para la obtención de vitamina B12 utilizando la cepa del género Propionibacteriumfreudrich. Trabajo de graduación. Qca y Farm. El Salvador, Universidad de el Salvador. 69, 71-74p.
3. Dominguez S, Xorge. A. 1975. Cromatografía en papel y capa delgada. 1ra. edición. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico Washington, D. C. 1, 6, 7, 8, 9 y 41p.
4. Facultad de Química y Farmacia. 2007 “Manual de Laboratorio de Microbiología Aplicada IV”. Universidad de El Salvador. C. A.169p
5. Facultad de Química y Farmacia. 2005 “Manual de Laboratorio de Microbiología III”. Universidad de El Salvador. C. A.
6. García Chacón, MJ y otros. 1994. Ensayos preliminares para la inmovilización de la enzima glucosa oxidasa por el método atrapamiento en gel. Trabajo de graduación. Qca y Farm. El Salvador, Universidad de El Salvador.
7. Instituto de Investigaciones Tecnológicas. Editado en 1964. Elaboración de panela. Bogotá, D. E., Colombia, S. A. 13-15p
8. ICAITI (Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, GUA). [1986]. Vol. 2. (BEBIDAS ALCOHOLICAS DESTILADAS, Determinación de la acidez total, ICAITI 33010h5p.2).
9. Kirk, RE y otros. 1966. Enciclopedia de Tecnología Química. Editorial Hispano-Americano México Trad. ingles. OG Garrea tomo XIV. 549p

10. Kirk, RE y otros. 1966. Enciclopedia de tecnología química. Editorial Hispano-Americano México. Trad. ingles. OG Garrea tomo VII. 876, 877 y 879p
11. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1997. REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA. Primera edición (contiene integra la tercera edición de la Farmacopea Europea). Madrid, España. METODOS ANALITICOS. 31-32p.
12. Quijano Quan, AM. y otros. 2006. Propuesta de cinética de fermentación para la producción de ácido glutámico. Trabajo de graduación. Qca y Farm. El Salvador, Universidad de El Salvador. 39-41, 62- 63p
13. Scrag, A. 1996. Biotecnología para ingenieros “Sistemas biológicos en procesos tecnológicos”. 1ra. Edición. Editorial Limusa México. Trad. L. Huerta. 19, 191-199, 201-203p
14. The United States Pharmacopeia, Convection the Pharmacopeia of the United States Twenty-fifth revision; and the National Formulary, Twenty eth Edition. 2053, 2327, 2346, 2351 y 2353p
15. Velasco C. 1989. Microbiología Industrial. 1ra. Edición: Manual de Laboratorio de Microbiología Industrial. Editorial Acribia, S. A. 103-106, 153p
16. Wulf, C. y otros. Biotecnología. “Manual de Microbiología Industrial”. 1ra. Edición. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. Trad. P. L. Padin. 162-163p
17. Argembio. La biotecnología (en línea). Argentina. Consultado 21 de junio. 2009. Disponible en:  
<http://www.porquebiotecnologia.com.ar/doc/biotecnologia/biotec.asp>
18. Blanco M de. 1996. La panela, un producto agroindustrial de alto valor nutritivo (en línea). Consultado 10 junio. 2009. Disponible en:  
<http://base.d-p-h.info/fr/fiches/premierdph/fiche-premierdph-2786.html>

19. Calderón Laboratorios Ltda. 1998. Acerca de los quelatos (en línea). Bogotá. Colombia, LABNEWS. Consultado 8 febrero. 2009. Disponible en: <http://www.drcalderonlabs.com/Labnews/Labnews6.html>
20. CONICET. 2007. Hallan un hongo para mejorar los cultivos (en línea). Argentina. Consultado 15 mayo. 2010. Disponible en: <http://www.conicet.gov.ar/NOTICIAS/portal/noticia.php?n=911&t=4>
21. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. UNITED STATES. 1997. *Aspergillus niger* evaluación final de riesgos (en línea). Estados Unidos. Consultado 24 julio. 2009. Disponible en: [http://www.epa.gov/biotech\\_rule/pubs/fra/fra006.html](http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra006.html)
22. Flores. E y otros. Determinación del ácido glucónico por fermentación de la glucosa con *Aspergillus niger* (en línea). Valencia, España. Universidad de Carabobo, Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería. Consultado 16 julio. 2009. Disponible en: <http://medusa.unimet.edu.ve/academic/iiicongreso/areavii.htm>
23. González. DA y otros. Jugo de caña y follajes arbóreos en la alimentación no convencional del cerdo (en línea). Estado de Aragua. Venezuela, Universidad Central de Venezuela. Consultado 10 junio. 2009. Disponible en: [http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/rccpn/revista11\\_\(3\)2004/daniel.htm](http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/rccpn/revista11_(3)2004/daniel.htm)
24. Lida. A y otros. 2009. Identificación y caracterización de genes blanco de la Gin/GinR del sistema de detección-quórum por intermedio de *gluconacetobacter* (en línea). Tokio, Japón. Universidad de Tokio. Consultado 15 mayo. 2010. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19520724>
25. Jacobs. CM y otros. 2009. El efecto Grobiotic-P combinado con pared celular de levadura y ácido glucónico sobre el crecimiento, la digestibilidad de nutrientes, y población microbiana fecal en pollos

- jóvenes (en línea). Universidad de Illinois. Consultado 15 mayo. 2010.  
Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834087>
26. Megazime. 2005. Ácido glucónico/D-glucono- δ-lactona. Procedimiento de ensayo (en línea). Irlanda, © Megazime International Ireland Limited 2005. Consultado 15 agosto. 2009. Disponible en:  
<http://www.vinotec.com/pdf/FOLLETOGLUCONICO.pdf>
27. Marchante Castellanos. P. y otros. 2004. Análisis químico farmacéutico métodos clásicos cuantitativos (en línea). Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos Universidad de la Habana. Consultado 9 julio. 2009. Disponible en: [http://revistas.mes.edu.cu/eduniv/02-Libros-por-ISBN/959-16-0300/0290\\_Analisis-Quimico-Farmaceutico-Metodos-Clasicos-Cuantitativos.pdf/view](http://revistas.mes.edu.cu/eduniv/02-Libros-por-ISBN/959-16-0300/0290_Analisis-Quimico-Farmaceutico-Metodos-Clasicos-Cuantitativos.pdf/view)
28. Mosquera. S y otros. 2007. Variables que afectan la calidad de canela procesada en el Departamento del Cauca (en línea). Cauca, Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Consultado 10 junio. 2009. Disponible en:  
<http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol5/2Vol5.pdf>
29. Nayudo. M. 2007. Científicos australianos logran semillas de trigo biotecnológicas con protección frente a plagas de hongos (en línea). Australia, Antama. Consultado 8 febrero. 2009. Disponible en:  
[http://www.organicconsumers.org/ACO/articulos/article\\_5268.cfm](http://www.organicconsumers.org/ACO/articulos/article_5268.cfm)
30. Peinado Amores. R. 2003. Utilización de diversas especies de levaduras para la disminución de los contenidos en ácido glucónico de vinos y mostos. Efecto sobre los compuestos del aroma (en línea). Córdoba, Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias. Consultado 17 abril. 2009. Disponible en:  
[http://www.cibernetia.com/tesis\\_es/CIENCIAS\\_TECNOLOGICAS/TECNOLOGIA\\_DE\\_LOS\\_ALIMENTOS/BIOQUIMICA\\_Y\\_MICROBIOLOGIA\\_DE\\_LOS\\_PROCESOS\\_FERMENTATIVOS/1](http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_TECNOLOGICAS/TECNOLOGIA_DE_LOS_ALIMENTOS/BIOQUIMICA_Y_MICROBIOLOGIA_DE_LOS_PROCESOS_FERMENTATIVOS/1)

31. Polberg. M. 2002. Identificación y análisis funcional de genes implicados en el catabolismo del ácido glucónico en *Corynebacterium glutamycum* ATCC13032. España, Universidad de León, Facultad de Biología. Departamento de Ecología, Genética Y Microbiología. Consultado 29 octubre. 2009. Disponible en:  
[http://www.cibernetia.com/tesis\\_es/CIENCIAS\\_TECNOLOGICAS/TECNOLOGIA\\_DE\\_LOS\\_ALIMENTOS/BIOQUIMICA\\_Y\\_MICROBIOLOGIA\\_DE\\_LOS\\_PROCESOS\\_FERMENTATIVOS/1](http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_TECNOLOGICAS/TECNOLOGIA_DE_LOS_ALIMENTOS/BIOQUIMICA_Y_MICROBIOLOGIA_DE_LOS_PROCESOS_FERMENTATIVOS/1)
32. Restrepo C. 2007. Historia de la panela colombiana, su elaboración y propiedades (en línea). Colombia. Consultado 16 junio. 2009. Disponible en: <http://www.historiacocina.com/paises/articulos/colombia/panela.htm>
33. Segura Martin, J. Fundamentos básicos de los métodos fisicoquímicos para el análisis de antioxidantes (en línea). Consultado 16 julio. 2009. Disponible en: <http://www.marcossegura.info/antioxidan.htm#PR>
34. Tan. X y otros. 2009. Nanotubo carbón-soporte nanopátículas de oro como catalizadores eficientes para la oxidación selectiva de celulosa a ácido glucónico en medio acuoso (en línea). Xiamen, China. Universidad de Xiamen. Consultado 15 mayo. 2010. Disponible en:  
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/r?dbs+hsdb:@term+@rn+526-95-4>
35. Torres Buendía. M. 2002. Método para fabricar gluconolactato de calcio, composiciones, procesos y usos del mismo (en línea). WIPO (Intellectual Property Organization). Consultado 23 noviembre. 2009. Disponible en:  
<http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2002098434&IA=MX2002000058&DISPLAY=DESC>
36. Turkia. H y otros. 2010. Electroforesis capilar para monitorear la producción de ácido carboxílico por *Gluconobacterxydans* (en línea). Consultado 15 mayo. 2010. Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20074741>

37. UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES. 2005. Producción de ácido glucónico y sus derivados (en línea). UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES, Departamento de Ciencia y Tecnología. Consultado 9 julio. 2009. Disponible en:  
<http://bioprocesos.unq.edu.ar/Biopro%20II/Produccion%20de%20acido%20gluconico.pdf>
38. <http://html.rincondelvago.com/espectroscopia-uv.html>
39. <http://www.aditivosalimentarios.com/index.php/codigo/574/acido-gluconico>
40. [http://www.espdv.com.mx/productos.php?tipo=1&id\\_producto=8](http://www.espdv.com.mx/productos.php?tipo=1&id_producto=8)
41. <http://www.quiminet.com/pr4/ACIDO%20BGLUCONICO%2050-%20BTECNICO.htm#m-provedores>
42. <http://www.monografias.com/trabajos17/acido-citrico/acido-citrico.shtml>

## **ANEXOS**

**ANEXO N°. 1**  
**GLOSARIO**

## GLOSARIO

**Cámara o cuba de desarrollo** <sup>(3)</sup>: Recipiente con una tapa que cierra herméticamente, donde se forma el cromatograma.

**Capa** <sup>(3)</sup>: fase estacionaria (inmóvil) untada o embadurnada homogéneamente sobre un soporte.

**Cromatograma** <sup>(3)</sup>: Papel o placa donde las sustancias se despliegan después de su separación.

**Disolvente** <sup>(3)</sup>: Sustancia o mezcla de sustancias fluidas que constituyen la fase móvil (portadora) en una cromatografía.

**Factor de retardación (Rf)** <sup>(33)</sup>: Es la relación entre la distancia viajada por el analito y la distancia viajada por el disolvente.

**Frente de disolvente** <sup>(3)</sup>: Línea frontal de la fase móvil, visible durante el desarrollo.

**Origen** <sup>(3)</sup>: Zona donde se aplica la muestra como círculo o línea en la disolución de la mezcla que se va a separar.

**Revelador** <sup>(3)</sup> (sinónimo: agente cromógeno): Agente físico o químico que hace visible las sustancias separadas por cromatografía en papel o capa delgada.

**Resolución** <sup>(3)</sup>: El grado de separación entre dos sustancias contiguas sobre el cromatograma. Eficiencia de la separación cromatográfica.

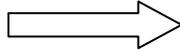
**Soporte** <sup>(3)</sup>: La placa de vidrio, papel, plástico o metal sobre la que se deposita la fase estacionaria, sea adsorbente sólido, gel de reparto o resina de intercambio iónico.

**ANEXO Nº. 2**  
**ESQUEMAS DE METODOLOGIA ANALITICA**

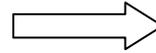
#### 4.2.7.1 Determinación de biomasa por el método de peso seco (2).



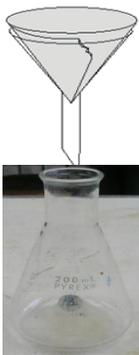
1. Secar el papel filtro a 75°C por 2 horas



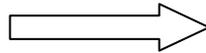
2. Enfriar en desecador por 30 min.



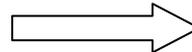
3. Pesar el papel filtro en balanza analítica.



4. Filtra 50 mL del medio de cultivo de fermentación y recibir el filtrado en un erlenmeyer estéril de 125 mL



5. Guardar en refrigeración para posteriores determinaciones.

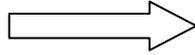


6. Lavar el papel filtro que contiene la biomasa con tres porciones de 5.0 mL de agua estéril y recibir los lavados en otro erlenmeyer de 125 mL.

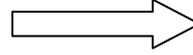




7. Colocar el papel filtro sobre una placa de petri.



8.  
Repetir  
los  
pasos 1  
y 2



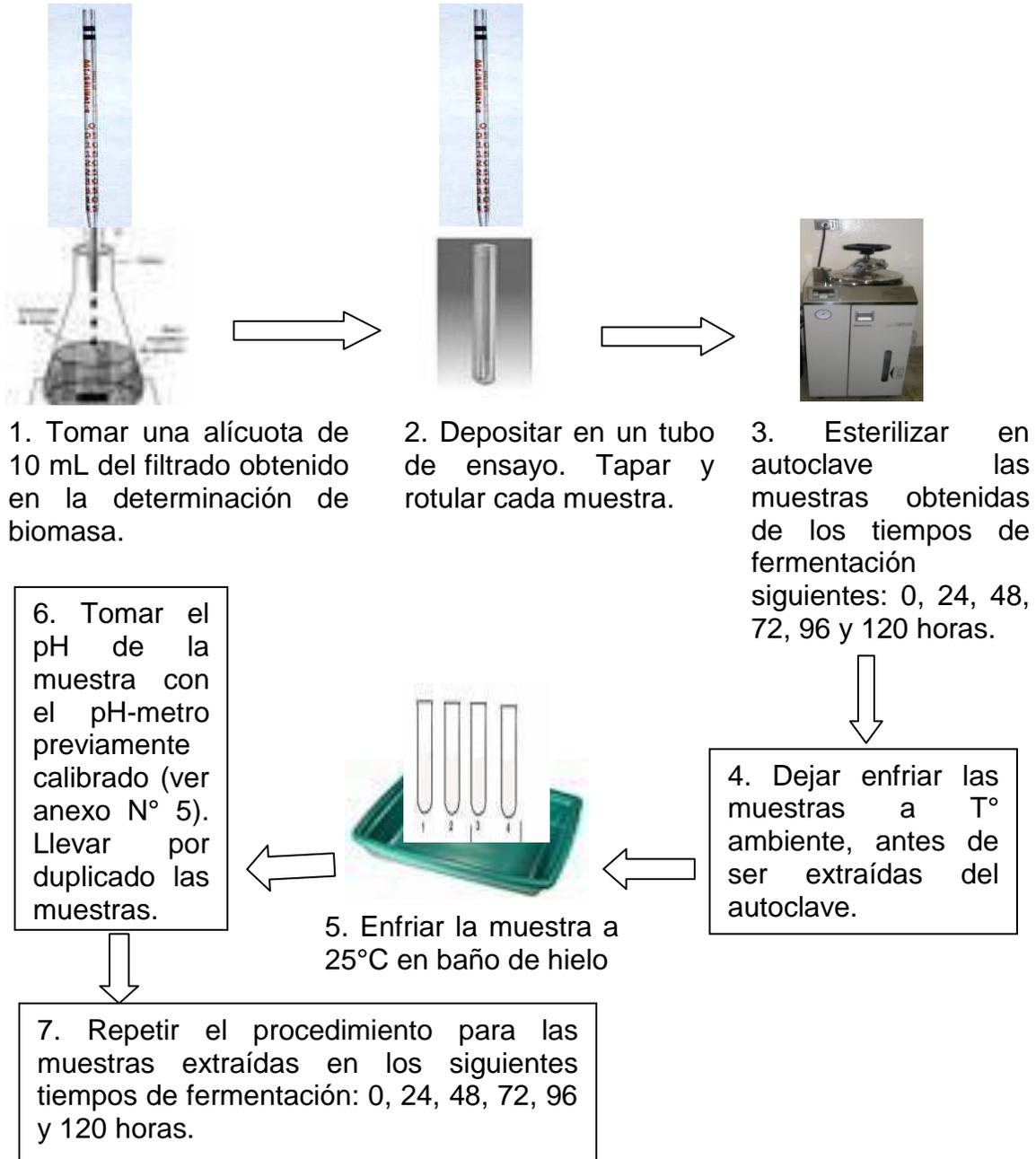
9. Pesar el papel filtro, conteniendo la biomasa en balanza analítica. Por diferencia de peso determinar la biomasa.



10. Proceder de igual forma para las muestras recolectadas en los siguientes tiempos de fermentación: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas; llevar por duplicado las muestras.

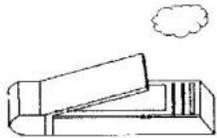
NOTA: Realizar esta determinación en condiciones estériles

#### 4.2.7.2 Determinación de pH <sup>(14)</sup>

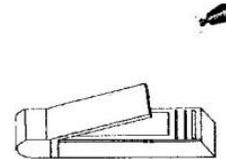
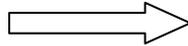


NOTA: Antes de tomar el pH de las muestras, lavar los electrodos del pH-metro con tres porciones de agua libre de CO<sub>2</sub> y después con tres porciones de la solución de la muestra

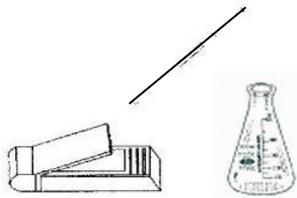
#### 4.2.7.3 Determinación de grados °Brix (2).



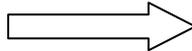
1. Limpiar el portamuestra del Brixómetro, usando algodón impregnado con alcohol.



2. Calibrar el Brixómetro, usando una gota de agua estéril



3. Depositar sobre el portamuestra del Brixómetro una gota del filtrado obtenido durante la determinación de biomasa.



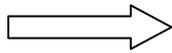
4. Realizar la lectura de grados °Brix, orientando el Brixómetro hacia la luz para observar mejor la escala.

NOTA: Repetir esta misma operación para las muestras obtenidas en los siguientes tiempos del proceso de fermentación: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, llevar por duplicado las muestras

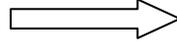
#### 4.2.7.4 Elaboración de la curva estándar de glucosa (2).



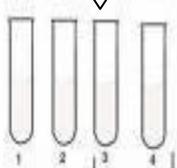
1. Pesar 0.02 g de glucosa anhidra en balanza analítica.



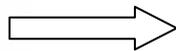
2. Transferir a un frasco volumétrico de 100 mL.



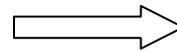
3. Agregar 30 mL de agua destilada, agitar hasta disolver, aforar a volumen y homogenizar.



4. Preparar a partir de solución estándar de glucosa las soluciones que se detallan en la tabla N° 1.

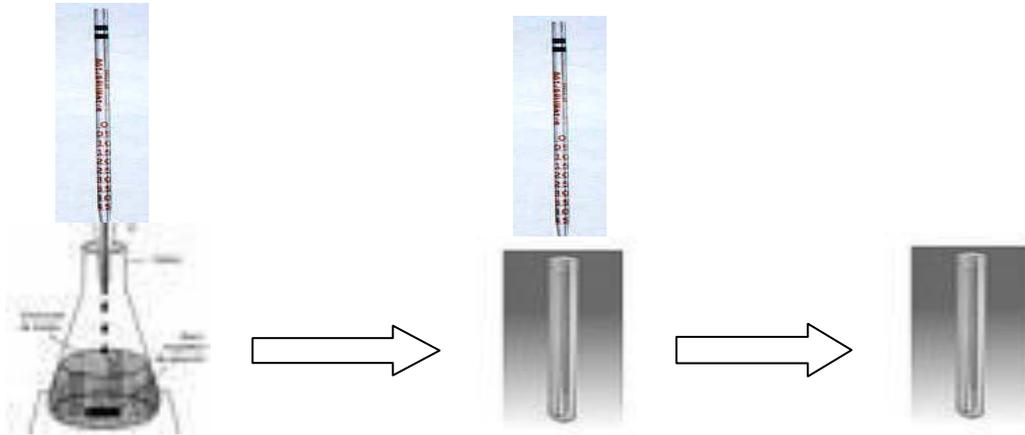


5. Llevar a temperatura ambiente y leer en el espectrómetro uv-visible a una longitud de onda de 490 nm.



6. utilizar como blanco el tubo N°1 de la tabla N°1.

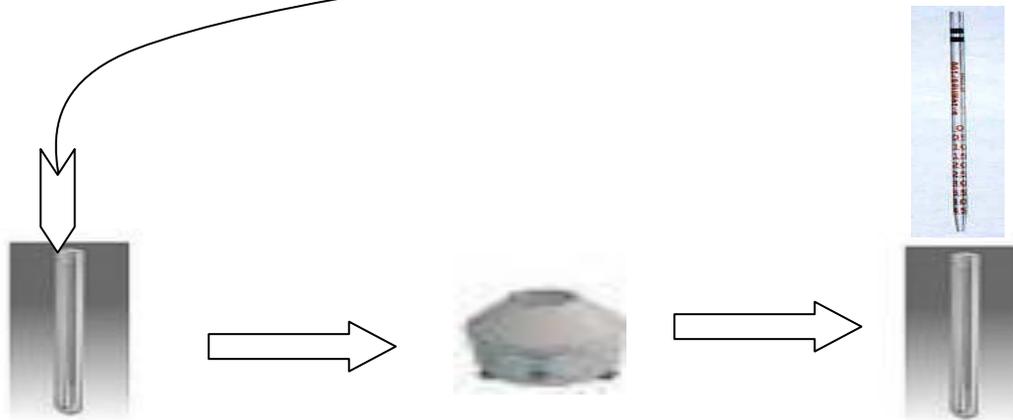
#### 4.2.7.5 Determinación de azúcares totales (Método fenol-sulfúrico) (2).



1. Tomar una alícuota de 10 mL del filtrado obtenido durante la determinación de biomasa.

2. Depositar en un tubo de ensayo.

3. Agregar 1.0 mL de sulfato de zinc al 10% + 1.0 mL de Hidróxido de sodio 0.5N TS.



4. Reposar por 15 min. a temperatura ambiente.

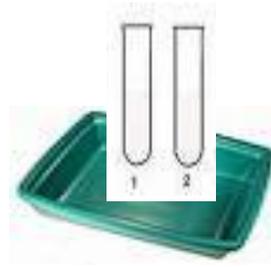
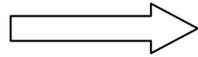
5. Centrifugar por 15 min. a 1000 rpm.

6. Tomar 2.5 mL del sobrenadante obtenido en paso anterior.





7. Depositar en otro tubo de ensayo + 2.5 mL de agua destilada + 0.1 mL de fenol al 80%. Agitar después de cada adición.



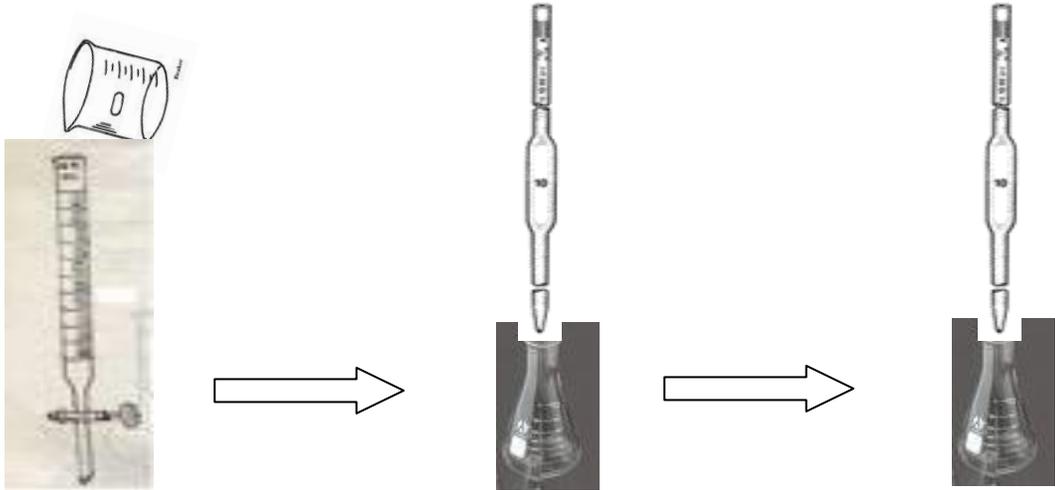
8. Colocar los tubos de ensayo en baño de hielo. Agregar 5.0 mL de  $H_2SO_4$  conc. Agitar y dejar reposar por 15 min.



9. Determinar la absorbancia en espectrofotómetro uv/visible, previamente calibrado a 490 nm. Los valores obtenidos interpolarlos en una curva tipo de glucosa de 0 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ; elaborada en tabla N°1.

NOTA: Repetir el procedimiento para las muestras extraídas en los siguientes tiempos: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

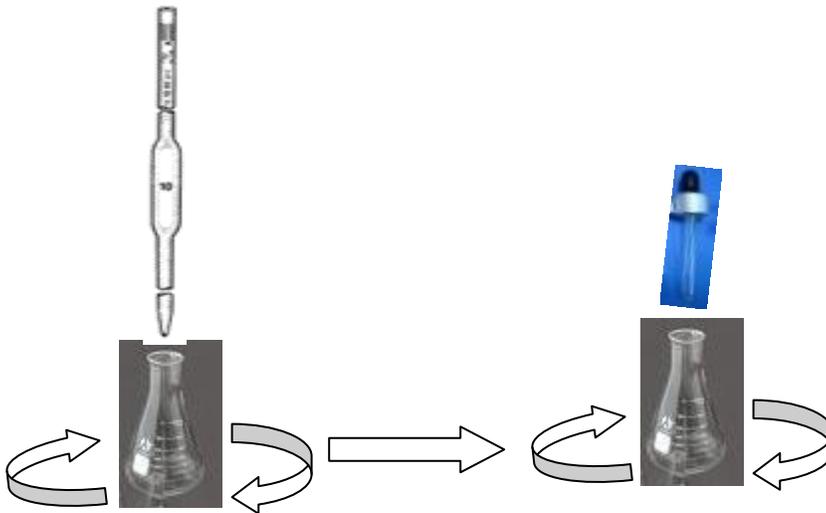
#### 4.2.7.6 Determinación de la acidez total <sup>(1,8)</sup>.



1. Llenar una bureta de 25 mL con la solución valorante de NaOH 0.1N VS.

2. Medir con pipeta volumétrica 5.0 mL del filtrado obtenido en la determinación de biomasa.

3. Depositar en un erlenmeyer de 125 mL.



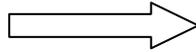
4. Diluir con 10 mL de agua desmineralizada. Agitar.

5. Agregar 1 o 2 gotas de fenolftaleína, agitar después de cada adición.

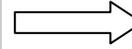




6. Titular con la solución valorante de NaOH 0.1N VS, agitar después de cada adición.



7. Titular hasta la aparición de una coloración rosado tenue (punto final).



8. Anotar la cantidad de valorante gastado.



9. Llevar por duplicado cada muestra.

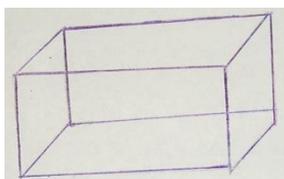
Formula para calcular % de acidez:

$$\% \text{ de acidez total} = \frac{mL \text{ NaOH gastado} * N\text{NaOH} * \text{Meq de } \acute{a}c. \text{ gluc\`o}n\text{ico} * 100}{mL \text{ de muestra}}$$

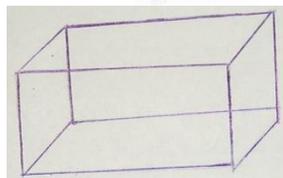
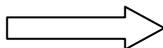
NOTA: Realizar esta determinación analítica para las muestras: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas

#### 4.2.7.7 IDENTIFICACION DEL ACIDO GLUCONICO.

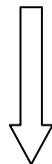
##### 4.2.7.7.1 Identificación del Ácido Glucónico por cromatografía en capa fina (TLC) (3,4 y 11).



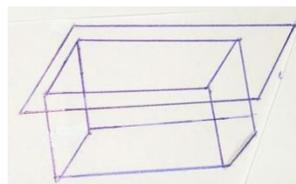
1. Cubrir las paredes de la cubeta cromatográfica con papel filtro



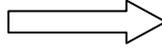
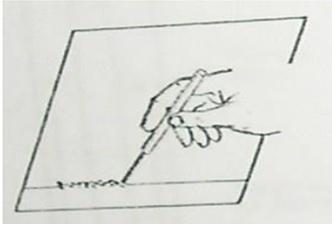
2. Verter en la cubeta una cantidad de fase móvil adecuada al tamaño de la cubeta para alcanzar una altura del líquido de 5mm a 10 mm.



3. Dejar saturar el papel filtro con la fase móvil.

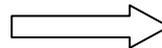
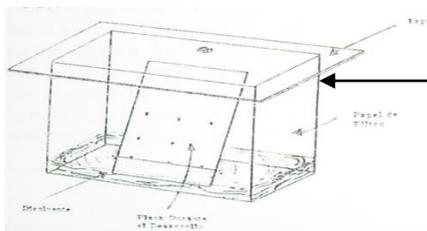


4. Tapar la cubeta y dejar reposar a T° ambiente durante 1 hora.



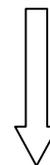
5. Depositar 20  $\mu\text{L}$  de muestra sobre una placa cromatográfica del filtrado obtenido en determinación de biomasa y 20  $\mu\text{L}$  del Std de Ácido Glucónico. Intercalar muestra y estándar a una distancia de 10 mm para cada aplicación.

6. Dejar evaporar el disolvente de las soluciones, tanto de muestra como de estándar



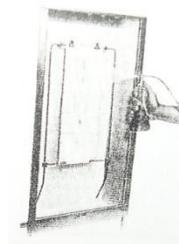
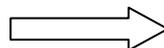
8. Dejar desarrollar el cromatograma a  $T^\circ$  ambiente por 1 hora.

7. Colocar la placa dentro de la cubeta cromatográfica en una posición lo más vertical y por encima del nivel de la fase móvil, tapar la cubeta.

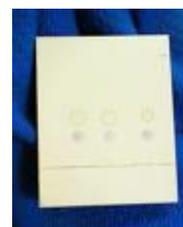
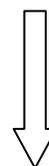


NOTA<sub>1</sub>: Fase móvil (preparación, ver Anexo N°. 7): butanol : ácido fórmico al 85% : agua (12 : 1 : 1)

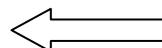
9. Sacar la placa cromatográfica e inmediatamente marcar el frente del solvente. Dejar secar la placa cromatográfica a T° ambiente.



10. Rociar la placa con el agente revelador "reactivo de tillman" (preparación ver anexo N°. 7).



12. Calcular los Rf correspondientes



11. Dejar secar las manchas de la placa cromatográfica a T° ambiente.

Formula:

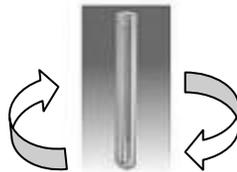
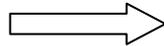
$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el soluto (mm)}}{\text{Distancia recorrida por el solvente (mm)}}$$

NOTA<sub>2</sub>: Aplicar en la placa cromatográfica el estándar de ácido glucónico (preparación, ver Anexo N° 4) y muestra "mx". Llevar por duplicado las placas cromatográficas para los tiempos: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas

#### 4.2.7.7.2 Prueba alterna de identificación del Ácido Glucónico <sup>(6)</sup>.

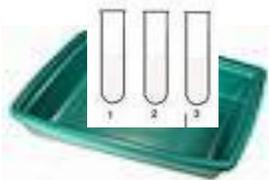


1. Tomar una alícuota de 0.5 mL del filtrado obtenido durante la determinación de biomasa.

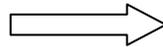


2. Depositar en un tubo de ensayo. Agregar 2.0 mL de agua destilada + 0.1 mL de fenol al 80%, agitar después de cada adición

3. Llevar Std de glucosa y ácido glucónico, tratar de igual forma que la muestra



4. Sumergir los tubos en baño de agua fría y agregar lentamente a c/u 5.0 mL de ácido sulfúrico conc.



5. La formación de un anillo en la interface de color salmón tanto en el Std. de ácido glucónico como en la muestra. Prueba confirmativa para ácido glucónico en la muestra.



Realizar esta determinación para las muestras extraídas durante los tiempos de: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas; llevar por duplicado las muestras.

#### 4.2.7.8 Elaboración de la curva estándar de Ácido Glucónico

Concentración inicial del ácido glucónico 50%: 50 g de ac. glucónico en 100 mL

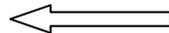
1 mL Ácido Glucónico (0.5 g)  $\longrightarrow$  100 mL (5000  $\mu\text{g/mL}$ )



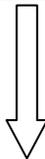
1 mL (5000  $\mu\text{g}$ )  $\longrightarrow$  25 mL (200  $\mu\text{g/mL}$ )



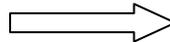
2. Leer la absorbancia de cada tubo en el espectrofotómetro Uv.-visible a una longitud de onda de 276 nm.



1. preparar a partir de aquí las soluciones indicadas en la tabla N° 2



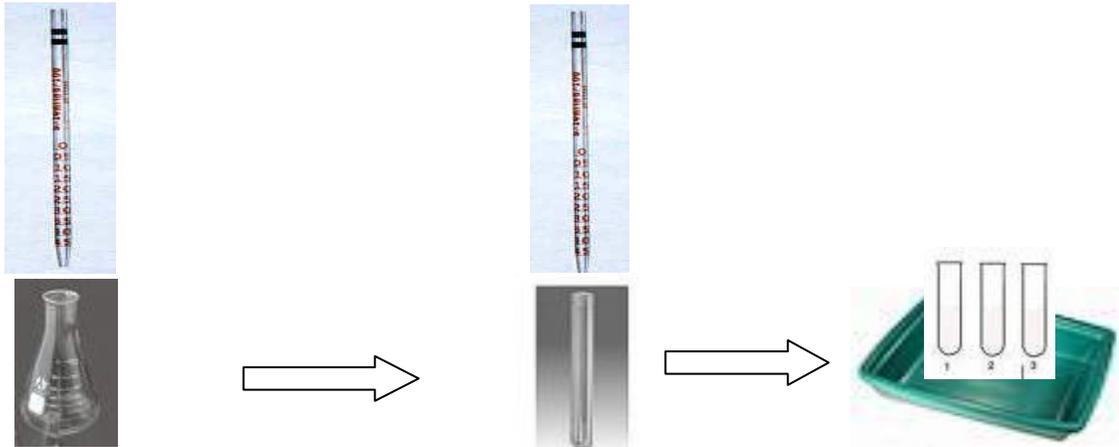
3. Utilizar como blanco la solución del tubo N° 1, indicada en la tabla N° 2.



4. Anotar las absorbancias.

#### 4.2.7.9 Determinación de Ácido Glucónico en las muestras

Seguir ejemplo del tubo N° 6 (tabla N° 2) para la preparación de las muestras.

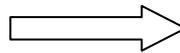


1. Tomar una alícuota de 2.5 mL del filtrado obtenido en la determinación de biomasa.

2. Depositar en un tubo de ensayo y agregar 2.5 mL de agua destilada + 0.1 mL de fenol al 80%. Agitar después de cada adición.

5. Sumergir los tubos en baño de agua fría y agregar lentamente a c/u 5.0 mL de ácido sulfúrico conc.

6. Dejar reposar los tubos de ensayo por 30 minutos en el baño de agua fría.

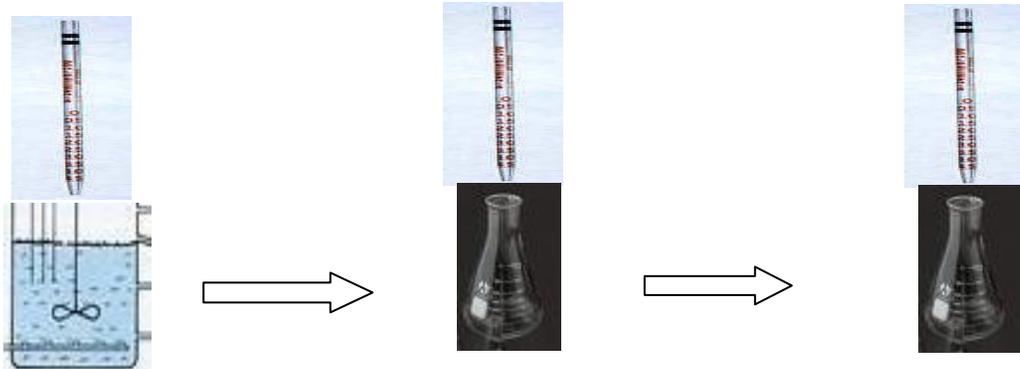


7. Leer la absorbancia de cada tubo en el espectrofotómetro Uv/visible a una longitud de onda de 276 nm.

NOTA: Repetir el procedimiento para las muestras recolectadas a las: 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas, llevar cada muestra por duplicado

**ANEXO N° 3**  
**DETERMINACION DEL NUMERO INICIAL DE COLONIAS DE**  
***Aspergillus niger* EN EL BIORREACTOR MEDIANTE EL METODO DE**  
**RECuento EN PLACA**

**Determinación del número inicial de colonias de *Aspergillus niger* en el biorreactor mediante el método recuento en placa <sup>(5)</sup>.**



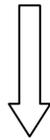
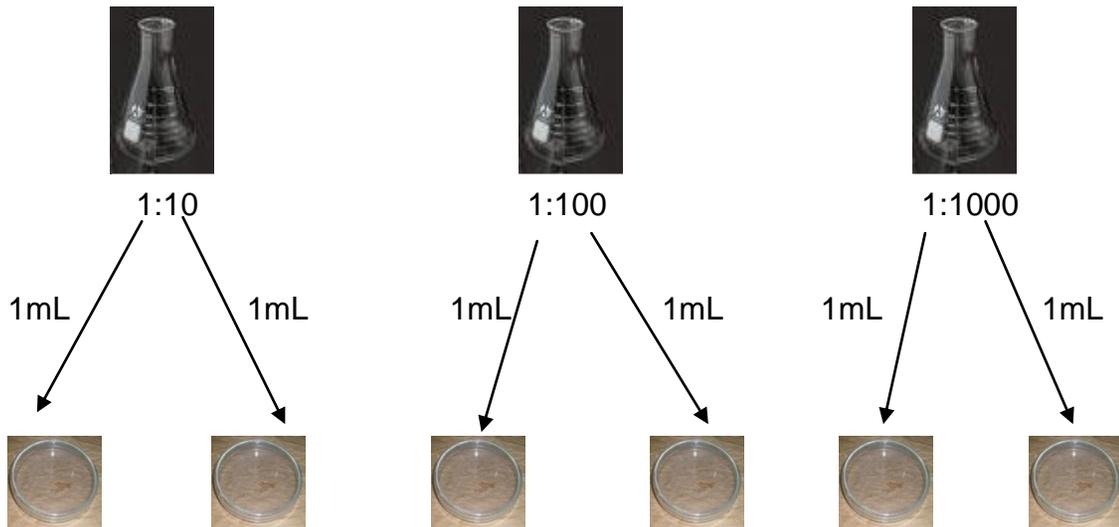
1. Tomar 10 mL del biorreactor que contiene el medio de cultivo mas el inculo del hongo.

2. Depositar en el frasco que contiene 90 mL del búfer fosfato pH 7.2 (ver preparación Anexo N° 9), rotular como dilución 1:10

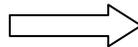
3. Tomar 10 mL de la dilución 1:10, depositar en un frasco que contiene 90mL de búfer fosfato pH 7.2, rotular como dilución 1:100



4. Pipetear 10 mL de la dilución 1:100, depositar a otro frasco que contiene 90 mL de búfer fosfato pH 7.2. Rotular como dilución 1:1000



5. Agregar 20 mL de Agar Sabouraud a cada placa de petri; previamente acidificada con ácido tartárico (preparación ver anexo N° 9), a una °T de 45°C, mezclar y tapar. Rotular



6. Dejar solidificar, sellar con tirro cada placa de petri e incubar las placas a 28°C por 5 días.

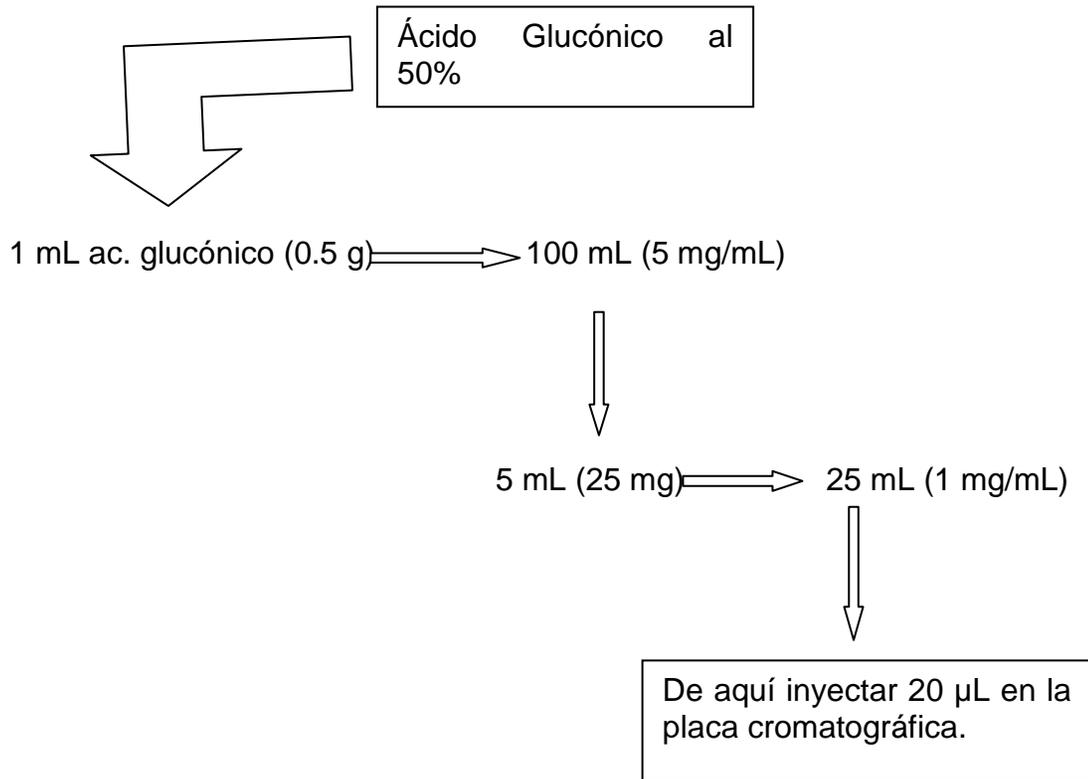


7. Contar las colonias del *Aspergillus niger* en un cuenta colonias.

NOTA: Realizar esta determinación en condiciones estériles

**ANEXO N°. 4**  
**PREPARACION DE ESTANDAR DE ACIDO GLUCONICO PARA**  
**CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA (T. L. C.)**

## SOLUCION ESTANDAR DE ACIDO GLUCONICO (1mg/mL) <sup>(4)</sup>.



**ANEXO N° 5**  
**PROCEDIMIENTO PARA CALIBRAR EL pH-METRO**

## **PROCEDIMIENTO PARA CALIBRAR EL pH- METRO** <sup>(14)</sup>

Para estandarizar el pH-metro, se seleccionan dos soluciones búfer cuya diferencia de pH no debe ser mayor de 4 unidades. Llenar la celda del potenciómetro con una de las soluciones búfer, normalizar la temperatura a la que el material de prueba se va a medir; establecer la “temperatura” y controlar la temperatura de la solución, ajustar el control de la calibración a los valores idénticos de pH observado en lo tabulado. Enjuagar los electrodos de la célula con varias porciones de la segunda solución búfer para estandarizar, luego llenar la celda con ella a la misma temperatura que el material a medir. El pH de la segunda solución búfer es de  $\pm 0,07$  unidades de pH de los valores tabulado. Si se observa una mayor desviación, examinar los electrodos y si son defectuosos reemplazarlos. Ajuste la “pendiente” o “temperatura” de control para que el valor de pH observado sea idéntico al tabulado.

Repita la estandarización hasta que las dos soluciones búfer de normalización brinden valores de pH de 0.02 unidades de pH de lo tabulado sin ajuste del control.

**ANEXO N° 6**  
**REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO, MATERIAL Y EQUIPO.**

## **REACTIVOS**

Fenolftaleína TS

Ácido clorhídrico 1N

Ácido sulfúrico conc.

Hidróxido de sodio 0.1N VS

Hidróxido de sodio 0.5N TS

Hidróxido de sodio al 3%

Agua estéril

Agua desmineralizada

Agua libre de CO<sub>2</sub>

Fenol al 80%

Sulfato de zinc al 10%

Butanol GR

Ácido fórmico al 85%

Reactivo de Tillman al 0.1% en alcohol

Alcohol isopropílico

Tween80 al 0.1%

Aceite mineral

## **ESTANDARES**

## **PUREZA**

Glucosa anhidra ( $C_6H_{12}O_6$ ) PM 180,2

Ácido Glucónico ( $C_6H_{12}O_7$ ) PM 196,16      50%

Biftalato de potasio ( $KHC_8H_4O_4$ ) PM 204,2

## **MEDIOS DE CULTIVO**

Agar sabouraud (Medio de mantenimiento del *Aspergillus niger*) (preparación ver anexo N°. 9).

Dulce de atado de caña de azúcar (Medio productor para el Ácido Glucónico) (preparación ver anexo N°. 9).

Búfer fosfato pH 7.2 (preparación ver anexo N°. 9).

## **MATERIAL**

Placas de petri

Erlenmeyer de 125 mL

Asa

Jeringa graduada de 1mL

Pipetas mohr (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL)

Embudo de vidrio

Pizeta

Agitador de vidrio

Beaker (10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL y 1000 mL)

Balón Volumétrico (10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL y 500 mL)

Tubos de ensayo

Bureta de 25 mL

Pipeta volumétrica (1 mL, 5 mL y 10 mL)

Probeta de vidrio (10 mL, 25 mL y 100 mL)

Soporte metálico

Pinza para bureta

Frasco spray

Pipeteador

Crisol

Papel filtro

Papel de aluminio

Gradilla para tubos

Hisopos estériles

Gasa estéril

Fósforos

Mechero bunsen

Tirro

Cubeta de aluminio

Tripode

Mascara extractora de gases

## **EQUIPO**

Balanza granataria

Baño de María

Balanza semi-analítica

Microscopio

Balanza analítica

Cámara extractora de gases

Cocina

Autoclave

Estufa

Desecador

Refrigeradora

Centrifugadora

Fermentador de 1.5L

Cubeta cromatográfica

Placas para cromatografía de capa delgada

Espectrofotómetro ultravioleta visible

**ANEXO N° 7**  
**PREPARACION DE REACTIVOS**

### **HIDROXIDO DE SODIO (NaOH) 0.5N TS** <sup>(14)</sup>

Pesar 1.0 g de NaOH sobre un beaker limpio y seco de 50 mL (realizar en balanza granataria), añadir 10 mL de agua libre de CO<sub>2</sub> e inmediatamente agitar hasta disolver. Transferir esta solución a un matraz volumétrico de 50 mL, realizar lavados al beaker con porciones de 2 mL de agua libre de CO<sub>2</sub>, transferir al matraz volumétrico; llevar a volumen con el resto de agua libre de CO<sub>2</sub>, homogenizar. Envasar en frasco plástico, rotular y almacenar.

### **SULFATO DE ZINC AL 10% (ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O)** <sup>(14)</sup>

Pesar 5.0 g de ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O en beaker limpio y seco de 50 mL. Utilizar balanza granataria, añadir 10 mL de agua desmineralizada, inmediatamente agitar hasta disolver completamente. Pasar esta solución a un balón volumétrico de 50 mL, realizar lavados al beaker con porciones de 2 mL de agua desmineralizada y transferirlos al matraz volumétrico, llevar a volumen; homogenizar. Envasar en frasco ámbar de vidrio, rotular y almacenar.

### **TWEEN 80 AL 0.1%** <sup>(15)</sup>

Pesar en balanza semi-analitica 0.05 g de tween 80 en beaker limpio y seco de 100 mL (previamente calibrado a 50 mL), agregar poco a poco los 50 mL de agua desmineralizada, agitar hasta homogenización completa, calentar si no se homogeniza la mezcla. Tapar con papel aluminio, esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 Lbs de presión.

### **REACTIVO DE TILLMAN AL 0.1% EN ALCOHOL (preparación reciente)**

Pesar en papel 0.1 g de sal de sodio 2,6-diclorofenol indofenol (utilizar balanza analítica), calibrar un beaker de 150 mL a 100 mL, colocar acá los 0.1 g de la sal, disolver con 10 mL de alcohol (butanol), llevar a volumen con el resto de alcohol, agitar para completa homogenización de la solución. Transferir esta solución a un frasco plástico spray, rotular.

NOTA: Utilizar cámara extractora de gases durante su preparación y uso del reactivo de Tillman

### **PREPARACION DE LA FASE MOVIL <sup>(4)</sup> (Cromatografía de capa delgada).**

Butanol: ácido fórmico al 85%: agua (12:1:1)

Adicionar a un beaker de 250 mL, 50 mL de ácido fórmico al 85%, más 50 mL de agua desmineralizada, agitar hasta homogenizar; incorporar esta solución a un segundo beaker de 500 mL que contenga los 200 mL de butanol homogenizar la mezcla. Pasar esta mezcla homogénea poco a poco y con agitación constante a los 400 mL restantes de butanol que se encuentra un tercer beaker de 1000 mL, agitar hasta completa homogenización. Envasar en un frasco ámbar de 1 litro de capacidad, tapar y rotular

NOTA: Preparar este reactivo en cámara extractora de gases, así como su uso

### **HIDROXIDO DE SODIO (NaOH) AL 3% <sup>(14)</sup>**

Pesar 3.0 g de NaOH en un beaker limpio y seco de 50 mL sobre una balanza granataria, disolver con 10 mL de agua desmineralizada. Pasar esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL, realizar lavados al beaker con porciones de 2 mL de agua desmineralizada y transferirlos al frasco volumétrico. Llevar a volumen con agua desmineralizada, homogenizar, envasar en frasco plástico y rotular.

### **FENOLFTALEINA TS** <sup>(14)</sup>

Pesar en beaker limpio y seco de 50 mL (previamente calibrado a 25 mL) 0.25 g de fenolftaleína (realizar esta operación en balanza semi-analítica), agregar 10 mL de butanol, agitar inmediatamente para disolver, llevar a volumen, homogenizar la solución. Envasar en frasco ámbar de vidrio, rotular.

### **FENOL AL 80%** <sup>(14)</sup>

Pesar en beaker limpio y seco de 100 mL, la cantidad de 40.0 g de fenol (realizar esta operación en balanza granataria). Realizar lavados al beaker con porciones de 10 mL de agua desmineralizada y transferir los lavados a un frasco volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con agua desmineralizada, homogenizar. Envasar en frasco ámbar de vidrio, rotular.

### **HIDROXIDO DE SODIO 0.1N VS** <sup>(14)</sup>

Pesar en un beaker limpio y seco de 50 mL, la cantidad de 2.0 g de NaOH (realizar esta operación en balanza granataria), añadir 25 mL de agua libre de CO<sub>2</sub>, agitar hasta disolver, transferir esta solución a un frasco volumétrico de 500 mL. Realizar lavados al beaker con porciones de 2 mL de agua libre de CO<sub>2</sub> y transferir los lavados al frasco volumétrico. Llevar a volumen con el resto de agua libre de CO<sub>2</sub>, tapar, homogenizar. Pasar esta solución a un frasco plástico con capacidad para 500 mL, rotular y almacenar.

### **SOLUCION DEL ESTANDAR PRIMARIO DE BIFTALATO DE POTASIO 0.1N (KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>). M.204.2** <sup>(14, 11)</sup>

Secar en estufa 4.0 g de KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> a 120°C por 2 horas, enfriar en un desecador a temperatura ambiente. Pesar en un beaker limpio y seco de 25 mL, la cantidad de 2.042 g de KHC<sub>8</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub> sobre una balanza analítica, disolver con 20 mL de agua libre de CO<sub>2</sub>; transferir esta solución a un frasco volumétrico de 100 mL. Realizar lavados con porciones de 5 mL de agua libre de CO<sub>2</sub> y

transferir los lavados al frasco volumétrico, llevar a volumen con agua libre de CO<sub>2</sub>; homogenizar.

### **AGUA LIBRE DE CO<sub>2</sub>** <sup>(14)</sup>

Colocar en un beaker de 1 litro, 1000 mL de agua desmineralizada; llevar a ebullición. Tapar el beaker y mantener en ebullición por 5 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente sin quitar la tapa para evitar que absorba el CO<sub>2</sub> del ambiente.

### **ACIDO FORMICO AL 85%**

Medir en una probeta limpia y seca 84.2 mL de ácido fórmico (99% de pureza), transferir a un balón volumétrico de 100 mL. Aforar a volumen con agua desmineralizada, homogenizar.

### **ACIDO CLORHIDRICO (HCl) 1N** <sup>(14)</sup>

$$\rho_{\text{HCl conc.}} = 1.19 \text{ g/mL}$$

$$\% \text{ de pureza del \u00c1cido clorh\u00eddrico} = 37\% \text{ p/v}$$

Medir en una bureta limpia y seca de 100 mL la cantidad 77.7 mL de HCl concentrado, transferir a un balón de 250 mL. Agregar agua desmineralizada poco a poco con agitación constante; Llevar a volumen, tapar el frasco. Homogenizar y rotular.

NOTA: Preparar esta solución en una cámara extractora de gases

**ANEXO N° 8**  
**ESTANDARIZACION DE LA SOLUCION DE NaOH 0.1N**

**ESTANDARIZACION DE LA SOLUCION DE NaOH 0.1N VS SOLUCION DE BIFTALATO DE POTASIO 0.1N** (preparación ver ANEXO N°.7) (14, 11)

1. Llenar la bureta de 25 mL con la solución de NaOH 0.1N , previamente ambientada con la solución de NaOH 0.1N
2. Pipetear con pipeta volumétrica, 10 mL de biftalato de potasio 0.1N
3. Colocar esta alícuota en un erlenmeyer de 125 mL
4. Adicionar 1 o 2 gotas de fenolftaleína, agitar después de la adición.
5. Proceder a titular con la solución de NaOH 0.1N, con agitación constante
6. Dejar de titular la solución de biftalato de potasio 0.1N hasta que se produzca un viraje del indicador de incoloro ha rosado tenue.
7. Anotar el volumen de titulante gastado (NaOH 0.1N)
8. Repetir la valoración con dos muestras más.

FORMULA:

$$N_{NaOH} = \frac{\text{gramos de biftalato de potasio en alícuota de 10mL}}{V \text{ (mL) gastado de NaOH} * \text{Meq de biftalato de potasio}}$$

$$\overline{N}_{real} = \frac{N_1 + N_2 + N_3}{3}$$

$$\overline{N}_{real} = \frac{N_1 + N_2 + N_3}{3}$$

$$F.C = \frac{\overline{N}_{real}}{\overline{N}_{teorico}}$$

**ANEXO N°. 9**  
**PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO**

**AGAR SABOURAUD; medio de mantenimiento de la cepa de *A. niger* (preparación según indicación de lo rotulado en el frasco).**

Pesar 16.3 g de agar sabouraud, utilizar balanza granataria. Transferir a un erlenmeyer de 250 mL, añadir 250 mL de agua desmineralizada, calentar en un baño de agua hirviendo; acidificar a pH 3.0 con ácido tartárico. Tratar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

**MEDIO DE CULTIVO DE PRODUCCION DEL ACIDO GLUCONICO; dulce de atado de caña de azúcar (preparación de acuerdo a criterio propio y al acumulo de conocimientos adquiridos).**

Pesar en balanza granataria sobre un beaker de 1000 mL, la cantidad de 30.0g de dulce de panela; previamente triturado. Añadir 1 litro de agua desmineralizada, disolver a temperatura de ebullición, dejar enfriar a temperatura ambiente. Filtrar sobre una gasa y recibir en un erlenmeyer de 1 litro, tratar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

**BUFFER FOSFATO pH 7.2**

Utilizar agua libre de CO<sub>2</sub> para su preparación.

**Solución "A" NaHPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O**

Pesar en un beaker limpio y seco de 100 mL la cantidad de 5.97 g de NaHPO<sub>4</sub>, utilizar balanza semi-analítica. Añadir 50 mL de agua; agitar hasta disolver. Transferir a un frasco volumétrico de 250 mL, realizar tres lavados al beaker con porciones de 10 mL de agua cada una, transferir los lavados al balón volumétrico. Llevar a volumen con el resto de agua. Homogenizar.

### **Solución “B” $\text{KH}_2\text{PO}_4$**

Pesar en un beaker limpio y seco de 50 mL la cantidad de 2.27 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , utilizar balanza semi-analítica. Añadir 25 mL de agua; agitar hasta disolver. Transferir a un frasco volumétrico de 250 mL, realizar tres lavados al beaker con porciones de 10 mL de agua cada uno, transferir los lavados al balón volumétrico. Llevar a volumen con el resto de agua. Homogenizar.

Medir en una probeta 71.5 mL de la solución “A”, transferir a un erlenmeyer de 125 mL. Seguidamente medir 28.5 mL de la solución “B” y transferir al erlenmeyer de 125 mL. Agitar hasta homogenizar la solución (solución búfer fosfato pH 7.2); preparar tres erlenmeyer. De aquí medir en probeta 90 mL de la solución búfer fosfato pH 7.2 y transferir a otro erlenmeyer de 125 mL, repetir el procedimiento con dos erlenmeyer más, tapar con papel aluminio y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

**ANEXO Nº. 10**  
**METODOS ANALITICOS**  
**FARMACOPEA ESPAÑOLA** <sup>(37)</sup>

1 h 30 min. Poner en contacto el papel con la fase móvil y retirarlo cuando la fase móvil ha recorrido la distancia prescrita o cuando ha transcurrido el tiempo señalado en la monografía. Secar al aire. Durante el tiempo de desarrollo, mantener el papel protegido de la luz intensa.

#### CROMATOGRAFIA DESCENDENTE

*Equipo.* Está constituido por una cámara cromatográfica de vidrio de borde esmerilado y cuyas dimensiones están en relación con las del papel a emplear. Está provista de una tapa de vidrio que asegura un cierre hermético y posee un orificio central de 1,5 cm de diámetro, aproximadamente; dicho orificio está obturado por una placa de vidrio esmerilado o por un tapón. En la parte superior de la cámara y en el interior de ésta se halla, sobre unos soportes, la cubeta de la fase móvil provista de un dispositivo que permite fijar la parte superior del papel cromatográfico. Dos varillas de vidrio situadas en los 2 lados de la cubeta, paralela y ligeramente por encima de sus bordes superiores, actúan como soporte del papel cromatográfico e impiden que su extremo libre toque ningún punto de la cámara cromatográfica. El papel cromatográfico es un papel de filtro adecuado, cortado en tiras de longitud suficiente y de anchura comprendida entre 2,5 cm y la longitud de la cubeta, de manera que la migración de la fase móvil se efectúe en el sentido de las fibras del papel.

*Procedimiento.* Verter en el fondo de la cámara cromatográfica una capa de 2,5 cm aproximadamente de la fase móvil señalada en la monografía, tapar, dejar reposar a 20-25 °C durante 24 h y mantener a la misma temperatura todo el tiempo que duren las operaciones cromatográficas. Con un lápiz trazar una línea fina paralela a uno de los lados del papel. La distancia entre esta línea y uno de los extremos del papel es tal que, cuando dicho extremo este fijo en la cubeta y el resto del papel caiga libremente, la línea se halle a algunos centímetros por debajo de la varilla guía y paralela a ésta. Con una micropipeta depositar sobre la línea el volumen de disolución indicado en la monografía. Si la mancha alcanza un diámetro superior a 10 mm, depositar la disolución en distintas fracciones, dejando evaporar el disolvente en cada ocasión. Si se emplea la misma tira de papel para más de un cromatograma, se deben depositar las distintas disoluciones a lo largo de la línea a una distancia mínima de 3 cm las unas de las otras. Seguidamente introducir el papel en la cámara, tapar y dejar reposar durante 1 h 30 min. Verter la fase móvil en cantidad suficiente a través del orificio de la tapa y cerrar ésta. Retirar el papel cuando la fase móvil ha recorrido la distancia prescrita o cuando ha transcurrido el tiempo señalado en la monografía. Secar al aire. Durante el tiempo de desarrollo mantener el papel protegido de la luz intensa.

#### 2.2.27. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

La cromatografía en capa fina es una técnica de separación en la que la fase estacionaria está constituida por un material adecuado, dispuesto en una capa fina y uniforme, fijada sobre un soporte (placas u hojas) de vidrio, metal o plástico. La separación se realiza por migración (desarrollo), a través de la capa fina, de los solutos en un disolvente o mezcla adecuada de disolventes.

Salvo indicación contraria, deben utilizarse el equipo, las placas y el procedimiento siguientes.

#### EQUIPO

El equipo consta de :

- *placas u hojas*, prefabricadas o preparadas como se indica posteriormente, cuyas dimensiones (generalmente 100 mm x 100 mm o 200 mm x 200 mm) permiten el depósito de las disoluciones para la cromatografía y el recorrido de migración prescritos. El espesor de la capa activa es generalmente de 0,1 mm a 0,3 mm.
- *cubeta cromatográfica*, de fondo plano o con dos huecos y de material transparente e inerte. Sus dimensiones están adaptadas a las de las placas u hojas que se vayan a utilizar y está provista de una tapa que asegura un cierre hermético.
- *micropipetas, microjeringas, capilares calibrados* o cualquier otro dispositivo que permita un depósito correcto de las disoluciones.

#### PLACAS

La cromatografía se realiza con placas prefabricadas o con placas preparadas según el procedimiento que se explica posteriormente. En ambos casos, las placas cumplen satisfactoriamente el ensayo del poder de detección y, si está prescrito, el ensayo del poder de resolución. Estos ensayos se realizan al mismo tiempo que la cromatografía de la disolución problema, utilizando las disoluciones de referencia prescritas. En el momento de su empleo, las placas pueden activarse, si fuera necesario, por calentamiento a 100-105 °C durante 1 h.

#### Preparación de las placas

Preparar una suspensión homogénea de la fase estacionaria y, mediante un dispositivo adecuado, depositarla sobre las placas, que habrán de estar escrupulosamente limpias, en una capa de un espesor de 0,1 mm a 0,3 mm. Dejar secar al aire y después calentar las placas en la estufa a 100-105 °C durante 1 h. En el momento de su empleo, se retira una banda estrecha de la fase estacionaria de los 2 lados de la placa que quedarán verticales durante el desarrollo.

#### PROCEDIMIENTO

Cubrir las paredes de la cubeta cromatográfica con un papel de filtro. Verter en la cubeta una cantidad de fase móvil adecuada al tamaño de la cubeta y suficiente para obtener una altura de líquido de 5 mm a 10 mm, después de la saturación del papel de filtro. Tapar la cubeta y dejar reposar a 20-25 °C durante 1 h.

Depositarse, a una distancia de 15-20 mm aproximadamente del borde inferior y a 10 mm como mínimo de los bordes laterales de la placa, el volumen prescrito de cada una de las disoluciones. Realizar este depósito en fracciones lo suficientemente pequeñas para obtener manchas circulares (2 mm a 6 mm de diámetro) o, si así está prescrito, bandas (10 mm a 20 mm por 2 mm a 6 mm). Los depósitos en una misma placa se sitúan a una distancia mínima entre ellos de 10 mm y sobre una línea paralela al borde inferior de la placa.

Cuando se haya evaporado el disolvente de las disoluciones depositadas, colocar la placa dentro de la cubeta cromatográfica, en una posición lo más vertical posible. Los

## Aparatos

depósitos deben quedar siempre por encima del nivel de la fase móvil. Tapar la cubeta cromatográfica y mantener a 20-25 °C. Cuando la fase móvil haya recorrido la distancia indicada en la monografía, retirar la placa, secarla y proceder al revelado de los cromatogramas de la forma que se prescriba.

En el caso de que se trate de una cromatografía bidimensional, secar las placas después del primer desarrollo y a continuación realizar un segundo desarrollo, en una dirección perpendicular a la del primero.

### PODER DE RESOLUCION

Las exigencias en cuanto al poder de resolución se prescriben en las monografías específicas.

### PODER DE DETECCION

El poder de detección se considera satisfactorio cuando la mancha o la banda del cromatograma que se obtenga a partir de la disolución de referencia menos concentrada sea claramente visible.

### 2.2.28. CROMATOGRAFIA DE GASES

La cromatografía de gases es una técnica de separación en la que la fase móvil es un gas (gas portador) y la fase estacionaria, contenida en una columna, está formada por un sólido o por un líquido impregnado sobre un soporte sólido inerte, o por una película líquida que recubre uniformemente las paredes de la columna.

La cromatografía de gases se basa en fenómenos de adsorción y/o de reparto.

**Equipo.** Está constituido por una entrada de gas, una cámara de inyección, una columna cromatográfica, un detector y un registrador. La columna generalmente es de vidrio o de acero inoxidable y contiene a la fase estacionaria. El gas portador circula por la columna con un flujo controlado y pasa seguidamente a través del detector.

La determinación se realiza a temperatura constante o utilizando un programa de temperaturas.

El sistema de detección empleado debe permitir la determinación de las cantidades de sustancia presentes en el efuyente. Generalmente este sistema se basa en la ionización de llama, en la conductividad térmica o bien en fenómenos termoiónicos o de captura de electrones.

**Procedimiento.** Acondicionar la columna, la cámara de inyección y el detector a las temperaturas indicadas en la monografía. Preparar la disolución de la sustancia a examinar y las disoluciones de referencia prescritas. Con las disoluciones de referencia proceder a la adecuada calibración del aparato y determinar las cantidades a inyectar para obtener una respuesta satisfactoria. Comprobar la repetitividad de la respuesta realizando inyecciones repetidas y, si fuera necesario, calcular el número de platos teóricos.

Inyectar las disoluciones y registrar los cromatogramas que resulten. Verificar la repetitividad de las respuestas realizando inyecciones sucesivas. Determinar el área de los picos correspondientes a las sustancias a determinar, o bien su altura, si el factor de simetría calculado como se indica a

continuación está comprendido entre 0,80 y 1,20. Cuando se emplee un programa de temperaturas, calcular el área de los picos. Cuando se utilice patrón interno debe comprobarse previamente que ningún pico de la sustancia que se examina queda enmascarado por el del patrón interno.

A partir de los valores obtenidos, calcular el contenido del o de los componentes a determinar. En algunos casos, calcular el porcentaje de uno o de varios de los componentes de la sustancia que se examina determinando el área del o de los picos correspondientes en relación con el área total de todos los picos, con excepción de los que correspondan a los disolventes o a los reactivos empleados (procedimiento denominado "de normalización"). En este caso es deseable el empleo de un amplificador de amplia escala y de un integrador automático.

El **factor de simetría** de un pico puede calcularse a partir de la expresión :

$$\frac{b_{0,05}}{2A}$$

$b_{0,05}$  = anchura del pico en el veintavo de su altura,

$A$  = distancia entre la perpendicular trazada desde el máximo del pico y el borde de entrada en el veintavo de su altura.

La **resolución** ( $R_s$ ) puede calcularse mediante la fórmula siguiente :

$$R_s = \frac{1,18 (t_{Rb} - t_{Ra})}{b_{0,5a} + b_{0,5b}}$$

$t_{Rb} > t_{Ra}$

$t_{Rb}$  y  $t_{Ra}$  designan respectivamente las distancias, en milímetros, sobre la línea de base entre el punto de inyección y las perpendiculares trazadas desde los de máximos de los picos contiguos.

$b_{0,5a}$  y  $b_{0,5b}$  designan las anchuras de los picos en la mitad de su altura, en milímetros.

Los resultados de la determinación sólo son aceptables si la resolución entre los picos del cromatograma es superior a 1,0, salvo indicación contraria.

El **número de platos teóricos** ( $n$ ) puede calcularse a partir de los datos obtenidos en condiciones isotérmicas, mediante la siguiente fórmula:

$$n = 5,54 \left( \frac{t_R}{b_{0,5}} \right)^2$$

$t_R$  = distancia medida sobre la línea de base, en milímetros, entre el punto de inyección y una perpendicular trazada desde el máximo del pico estudiado.

$b_{0,5}$  = anchura del pico, expresada en milímetros, a la mitad de su altura.

El **coeficiente de distribución másica**  $D_m$  (o factor de capacidad) se define como sigue :

$$D_m = \frac{\text{Cantidad de sustancia disuelta en la fase estacionaria}}{\text{Cantidad de sustancia disuelta en la fase móvil}} = K \times \frac{V_s}{V_m}$$

$K$  = coeficiente de distribución en el equilibrio,

$V_s$  = volumen de fase estacionaria,

$V_m$  = volumen de fase móvil.

**ANEXO N°.11**  
**CERTIFICADO DE ANALISIS DEL ACIDO GLUCONICO**



# Certificate of Analysis

---

<http://certificates.merck.de>

Date of print: 09.08.2010

---

8.22057.0100 Gluconic acid (50% solution in water) for synthesis  
Batch S4626357

---

#### Batch Values

---

|                         |       |   |
|-------------------------|-------|---|
| Assay (acidimetric)     | 49.3  | % |
| Density (d 20 °C/ 4 °C) | 1.230 |   |

*Date of examination (DD.MM.YYYY):* 06.07.2009  
*Minimum shelf life (DD.MM.YYYY):* 31.07.2011

Dr. Wolfgang Bolkart

---

responsible laboratory manager quality control

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

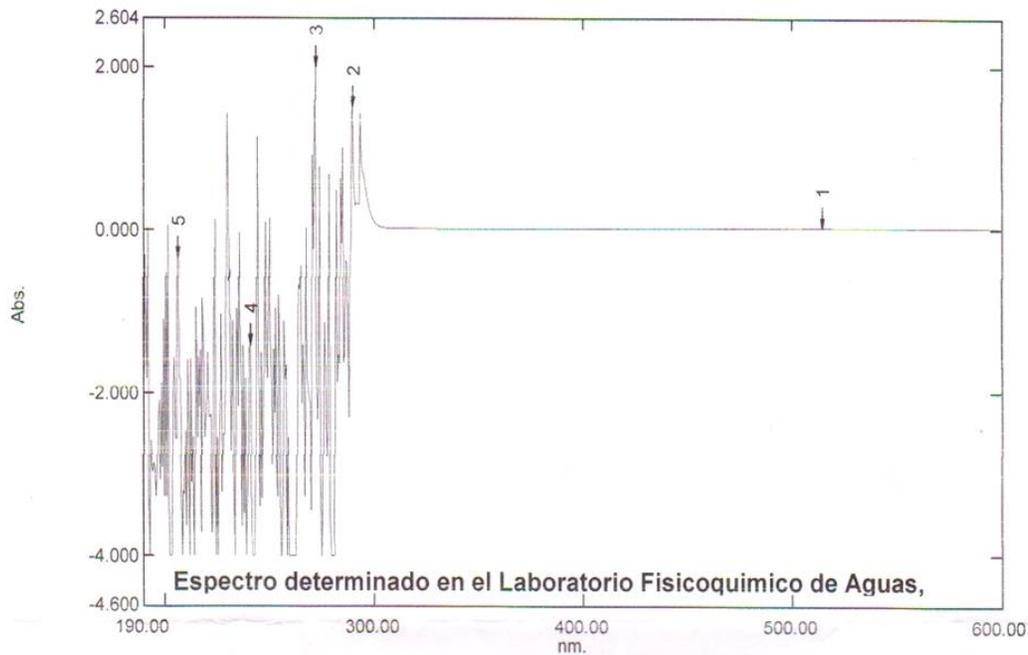
**ANEXO N°.12**  
**ESPECTRO DEL ESTANDAR DE ACIDO GLUCONICO**

# Espectro de Estandar

07/10/2011  
03:13:30 p.m.

Data Set: Espectro de Estandar de acido Gluconico\_151200 - RawData

## Espectro de Acido Gluconico 3



Measurement Properties  
Wavelength Range (nm.): 190.00 to 600.00  
Scan Speed: Fast  
Sampling Interval: 0.5  
Auto Sampling Interval: Enabled  
Scan Mode: Auto

Instrument Properties  
Instrument Type: UV-1800 Series  
Measuring Mode: Absorbance  
Slit Width: 1.0 nm  
Light Source Change Wavelength: 364.0 nm  
S/R Exchange: Normal

Attachment Properties  
Attachment: None

Sample Preparation Properties  
Weight:  
Volume:  
Dilution:  
Path Length:  
Additional Information:

| No. | P/V | Wavelength | Abs.   | Description |
|-----|-----|------------|--------|-------------|
| 1   | ⊕   | 514.50     | 0.024  |             |
| 2   | ⊕   | 290.00     | 1.527  |             |
| 3   | ⊕   | 272.00     | 2.004  |             |
| 4   | ⊕   | 241.00     | -1.406 |             |
| 5   | ⊕   | 206.00     | -0.341 |             |

**ANEXO N°.13**  
**FOTOGRAFIAS DEL TRABAJO DE INVESTIGACION**

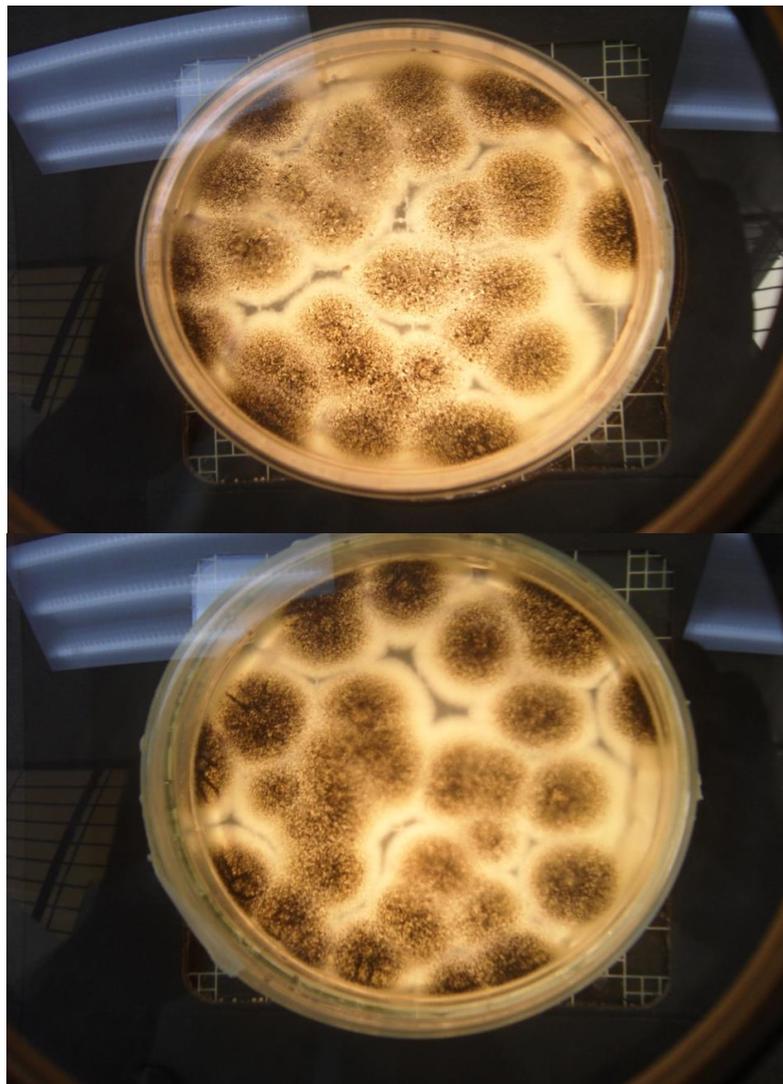


Figura N° 23. Frotis de *Aspergillus niger* en Agar Sabouraud, Laboratorio de Microbiología, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador



Figura N° 24. Fermentador utilizado en laboratorio de microbiología con 80g/1L de dulce de atado como medio de cultivo y esporas del hongo ***Aspergillus niger***



Figura N° 25. Toma de muestras en el ensayo E1



Figura N° 26. Proceso de obtención de la biomasa (filtración por gravedad)



Figura N° 27. Medición de grados °Brix en muestras del fermento



Figura N° 28. Cuantificación de azúcares totales por el método fenol-sulfúrico en muestras del fermento

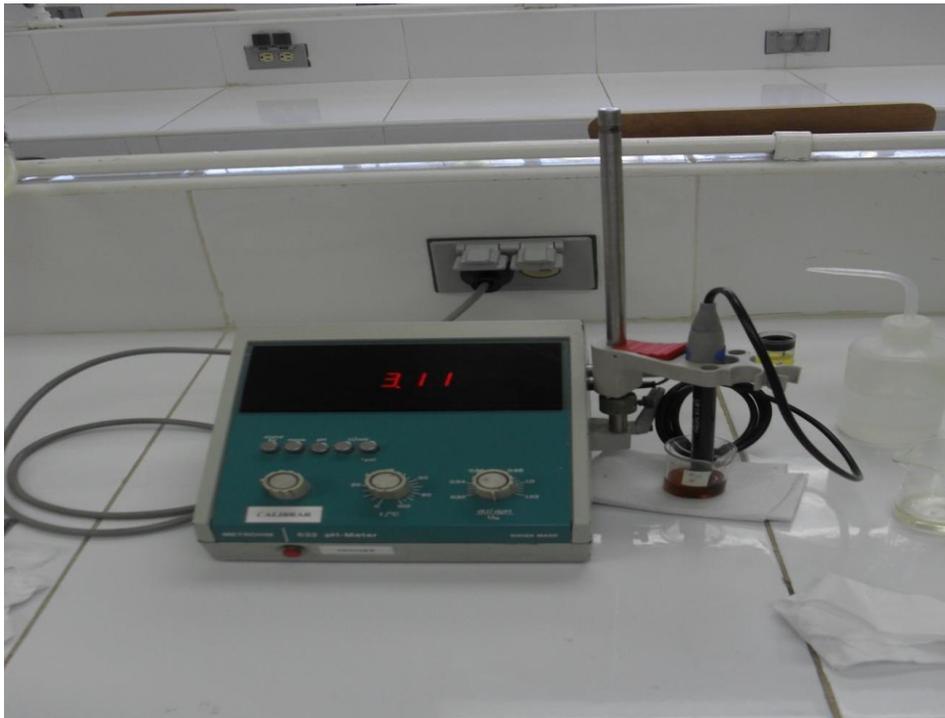
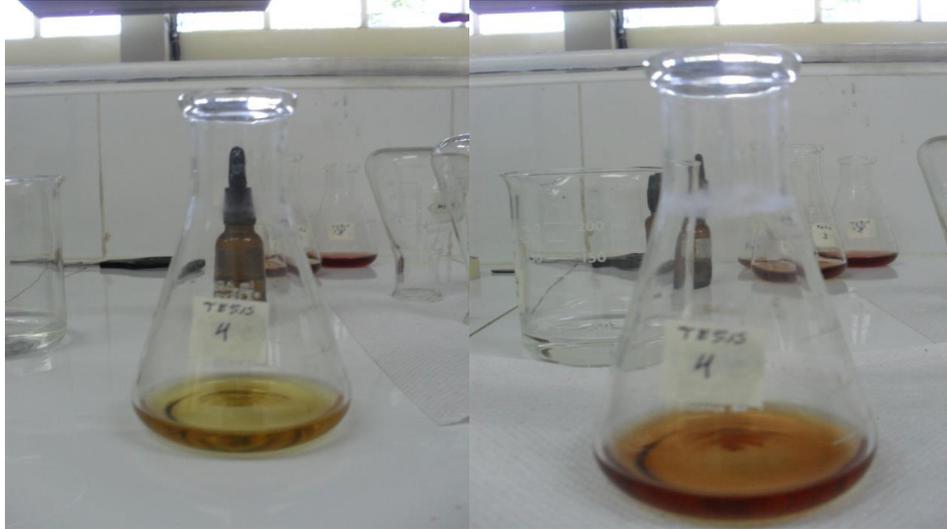


Figura N° 29. Procedimiento para la determinación del pH en muestras fermentadas



Antes de la valoración

Después de la valoración

Figura N° 30. Procedimiento para la determinación de la acidez total en muestras fermentadas de las 24 horas mediante la valoración ácido-base con NaOH 0.1N

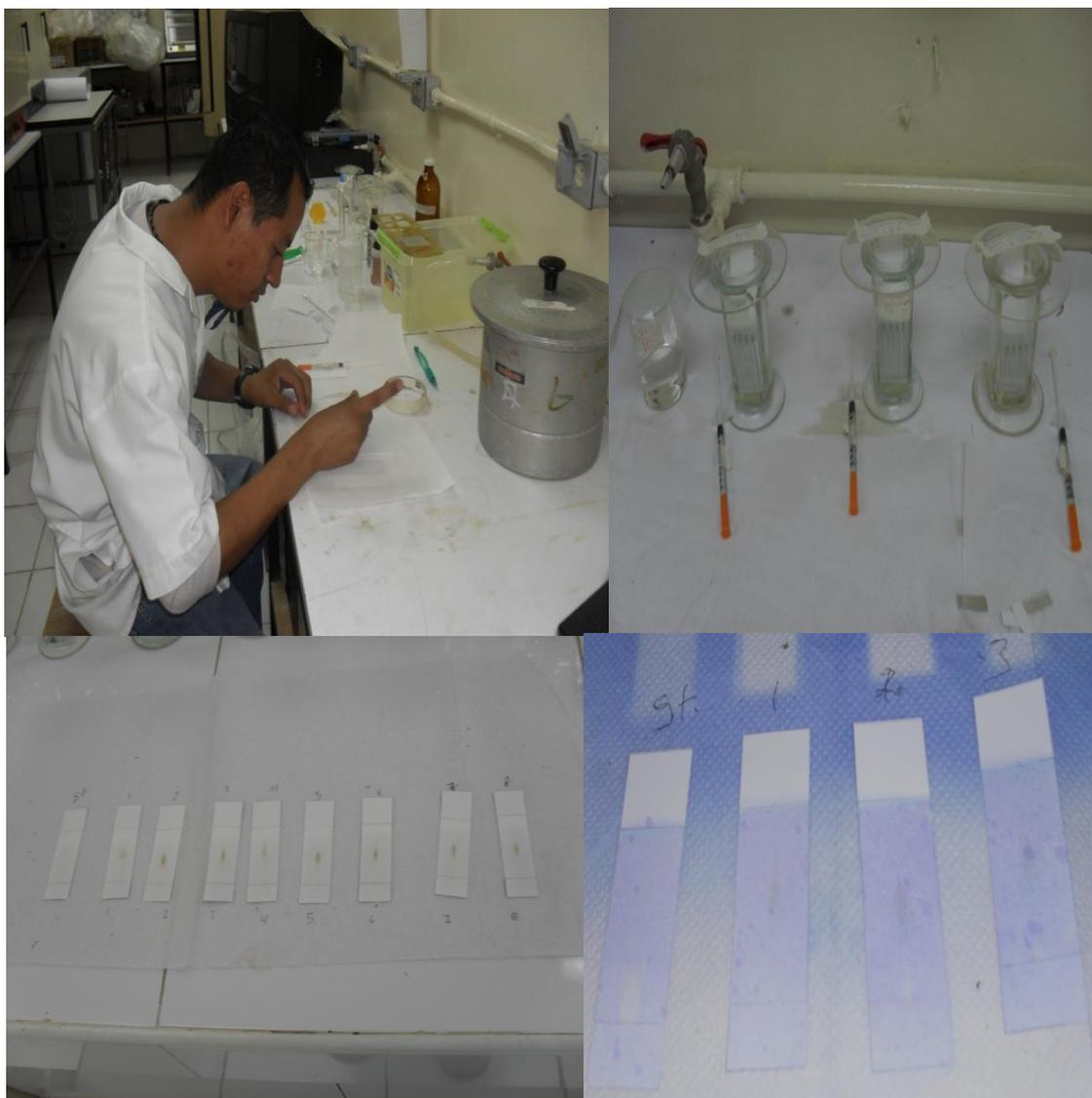


Figura N° 31. Etapas del procedimiento para la identificación del Ácido Glucónico en muestras fermentadas por cromatografía de capa fina (agente revelador: azul de bromofenol, Fase móvil: acetato de etilo: n-propanol: agua)

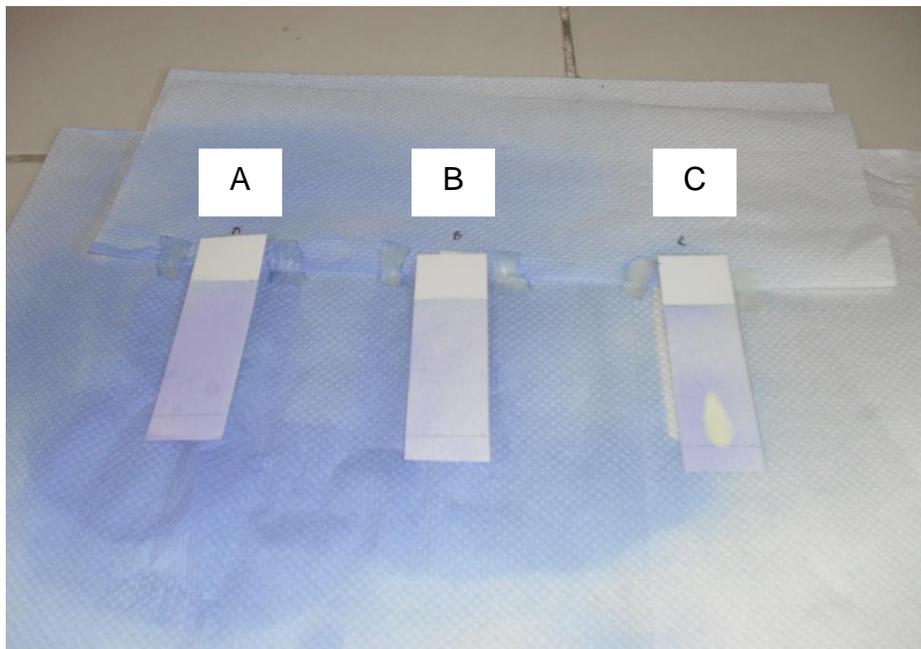


Figura N° 32. Corrida del estándar de Ácido Glucónico a una concentración de 20 mg/mL por cromatografía en capa fina. Fase móvil: n-propanol: etil acetato: agua (5: 2: 3)

TABLA N° 24. RESULTADOS DE BIOMASA, ACIDEZ TOTAL Y AZUCARES DEL E2 DURANTE LA PRODUCCION DE ACIDO GLUCONICO

| TIEMPO (HORAS) | BIOMASA (LnX) | % ACIDEZ TOTAL | AZUCARES (mg/mL) |
|----------------|---------------|----------------|------------------|
| 0              | 1.5886        | 0.3536         | 0.4200           |
| 24             | 1.3724        | 0.2459         | 0.4000           |
| 48             | 1.7949        | 0.2613         | 0.5550           |
| 72             | ***           | ***            | ***              |
| 96             | 1.7688        | 0.3228         | 0.6200           |
| 120            | 1.5535        | 0.3382         | 0.9200           |
| 144            | ***           | ***            | ***              |
| 168            | 1.2900        | 0.4612         | 0.6600           |
| 196            | 0.9884        | 0.4919         | 0.7950           |

(\*\*\*) Hora en la que no se extrajo muestra del medio de cultivo de fermentación

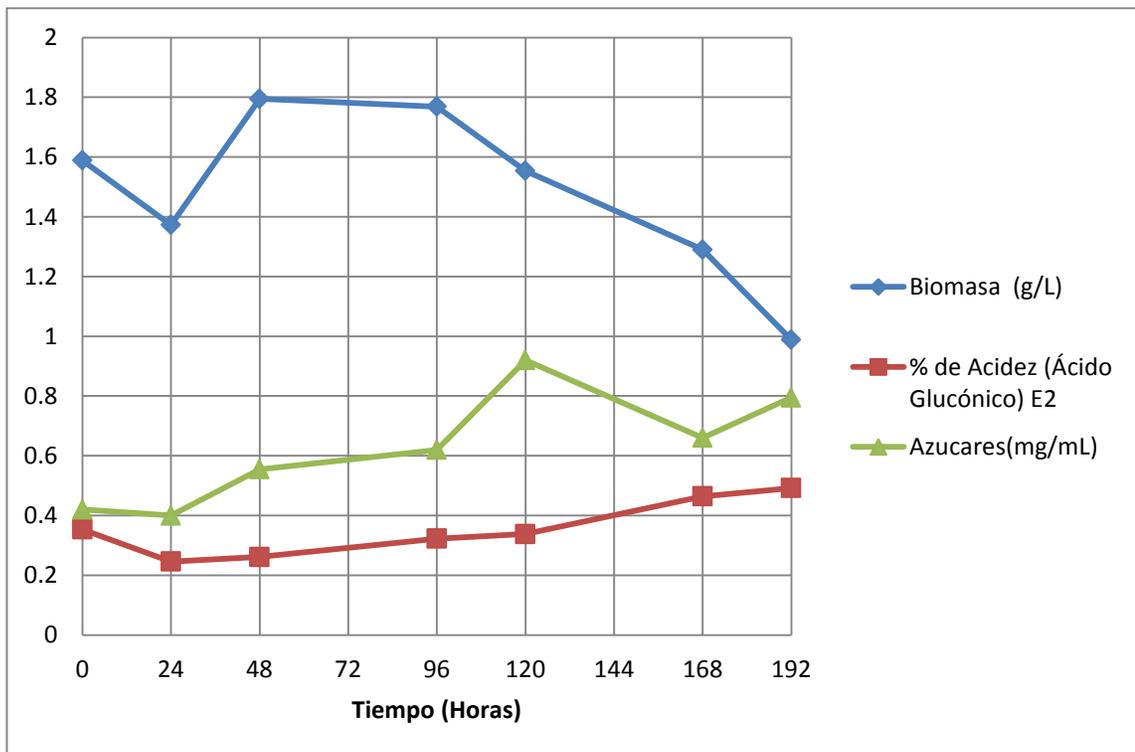


Figura N° 23. Curva de biomasa por peso seco, acidez total y azúcares vs. Tiempo (horas) del ensayo E2 durante la producción de Ácido Glucónico