

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“Producción de ácido cítrico utilizando *Aspergillus Niger* ATTC 9642
usando lactosuero y fosfato dipotásico en fermentación sumergida”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORES:

- Bach. Bermúdez Ruiz Bryan Rayt
- Bach. Zavaleta Reyes Ivan Gonzalo

ASESOR:

Dr. Ángel Castro Alvarado

ORCID: 0000-0002-5984-0587

Nuevo Chimbote – Perú

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



“PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO UTILIZANDO *Aspergillus niger*
ATCC 9642 USANDO LACTOSUERO Y FOSFATO DIPOTÁSICO EN
FERMENTACIÓN SUMERGIDA.”

Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciado en Biotecnología

Revisado y aprobado por el Asesor:

Dr. Castro Alvarado Ángel Pablo

DNI: 06451148

ID ORCID: 0000-0002-5984-0587

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



Revisado y aprobado por el Jurado Evaluador:

M. Sc. Alva Muñoz Eterio Amaranto
PRESIDENTE
DNI: 32406295
ID ORCID: 0000-0002-4113-7981

M. Sc. Diestra Balta Jesús Gabriel
SECRETARIO
DNI: 70553964
ID ORCID: 0000-0003-2462-2229

Dr. Castro Alvarado Ángel Pablo
INTEGRANTE
DNI: 06451148
ID ORCID: 0000-0002-5984-0587

ACTA DE CALIFICACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN DE LA TESIS

En el Distrito de Nuevo Chimbote, en la Universidad Nacional de Santa, en la reunión en la sala de sesiones del DABMB de dando cumplimiento a la Resolución N° 038-2023-UNS-CFC, siendo las 11 horas del día 07 de febrero del 2023

Se reunió el Jurado Evaluador presidido por el M.Sc Eterio ALVA MUÑOZ teniendo como miembros a M.Sc Jesús DIESTRA BALTA (secretario) y Dr Angel CASTRO ALVARADO (integrante), para la sustentación de tesis a fin de optar el título de LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA, realizado por los tesistas BERMÚDEZ RUIZ Bryan Rayt y ZA VALETA REYES Iván Gonzalo quienes sustentaron la tesis intitulada:

"Producción de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* ATTC 9642 usando lactosuero y fosfato DIPOTÁSICO EN FERMENTACIÓN SUMERGIDA"

Terminada la sustentación los tesistas respondieron a las preguntas formuladas por los miembros del jurado.

El Jurado después de deliberar sobre aspectos relacionados con el trabajo, contenido y sustentación del mismo y con las sugerencias pertinentes, declara la sustentación como BUENO asignándole un calificativo de Diecisiete puntos. Según artículo 111° del Reglamento General de Grados y Títulos vigente (Resolución N° 580-2022-CU-R-UNS)

Siendo las 11:59 horas del mismo día se dio por terminado el acto de sustentación firmando los miembros del Jurado en señal de conformidad



Nombre: M.Sc Eterio ALVA MUÑOZ
Presidente



Nombre: M.Sc. Jesús DIESTRA BALTA
Secretario



Nombre: Dr Ángel CASTRO ALVARADO
Integrante

Distribución: Integrantes JE (03), tesistas () y archivo FC (02).

AGRADECIMIENTO

Agradecer en primer lugar a Dios porque sin Él, nada sería posible. Gracias a la Universidad Nacional del Santa, alma máter de nuestra formación académica profesional, en especial a la Escuela Profesional de Biotecnología, por brindarnos los conocimientos, experiencias y oportunidades.

También gracias a nuestros padres y hermanos porque, gracias a ellos, a su consideración, cariño y amor, tenemos la voluntad y la fuerza extra para continuar y dar por concluido la presentación de nuestro informe de investigación para la obtención de nuestro título profesional.

A nuestro asesor Ms. Sc. Ángel Castro Alvarado por todo el apoyo, correcciones, conocimiento y sugerencias para el desarrollo y culminación del presente trabajo de investigación.

A todo el equipo técnico de laboratorio de la Escuela Profesional, a los profesores que nos brindaron las estrategias y métodos que hicieron parte de este trabajo de investigación.

A nuestros amigos y compañeros de estudio, que compartieron conocimientos, experiencias, así como su amistad y apoyo.

A mi familia, amigos y todas aquellas personas por su apoyo constante, y que de alguna forma contribuyeron a nuestra formación profesional y a la culminación de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A Dios por la oportunidad, la vida y el entendimiento, por su protección y guía durante todo este tiempo, quien nos ha guardado con bien desde siempre.

A nuestros padres por su apoyo incondicional y las palabras de aliento e inspiración durante nuestra formación profesional, quienes a pesar de las dificultades siempre nos brindaron su ayuda, incentivándonos para lograr concluir hoy una de nuestras metas.

A nuestros hermanos, por su apoyo y cariño y a nuestros profesores por el apoyo constante durante el pregrado.

ÍNDICE

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN	xiii
ABSTRAC.....	xiv
I.INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Objetivos de Investigación:.....	18
1.1.1. Objetivo General.....	18
1.1.2. Objetivos Específicos.....	18
1.2. HIPÓTESIS.....	19
II. MARCO TEÓRICO	20
2.1. DESCRIPCIÓN DEL LACTOSUERO	20
2.1.1. Generalidades	20
2.1.2. Composición química del Lactosuero.....	23
2.2. ÁCIDO CÍTRICO	24
2.2.1. Definición	24
2.3. MICROORGANISMO	28
2.3.1. Generalidades	28
2.3.2. Propiedades	29
2.3.3. Bioquímica de la Producción de Ácido Cítrico.....	30
2.3.4. Contaminación de la industria láctea.....	35
III. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. MÉTODO DE ESTUDIO	38
3.2. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO	38
3.3. MATERIAL DE ESTUDIO.....	38
3.3.1. Biológico.....	38
3.4. MÉTODOS	39
3.4.1. Descripción de la materia prima.....	39
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
3.5.1. Medio de Producción.....	39
3.5.2. Tratamiento y Conservación del Lactosuero	40
3.5.3. Conteo de Esporas para el Inóculo	41
3.5.4. Caracterización Físicoquímica en el IITA de la UNS	41
3.5.5. Condiciones para el Medio de Fermentación sumergida.....	42
3.5.6. Cuantificación de Lactosa.....	42

3.6.	Cuantificación de Biomasa por Peso Húmedo	43 ^{yii}
3.7.	Cuantificación de Ácidos orgánicos expresados como Ácido Cítrico	43
3.8.	Método HPLC	44
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	46
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
VII.	ANEXOS	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Lactosuero, Subproducto de la industria quesera (Foegeding & Luck., 2002).	22
Figura 2.	Ácido cítrico para aditivos alimentarios (Concha Garcia.,2014)	25
Figura 3.	Estructura química del ácido cítrico (Thangavelu y col., 2011).....	25
Figura 4.	Morfología de <i>Aspergillus niger</i>	28
Figura 5.	Vía metabólica de la producción de ácido cítrico a partir de carbohidratos por <i>Aspergillus niger</i> (Papagianni, 2007)	31
Figura 6.	I. Cepa fúngica de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 en agar papa dextrosa (PDA); II. Vista microscópica del conidióforo de <i>A. niger</i> a 100 X, con tinción Safranina.....	38
Figura 7.	I. Muestra de lactosuero en frasco de vidrio luego de haber sido esterilizado; II. Lactosuero conservado a 4°C en envase de vidrio estéril.....	39
Figura 8.	I. Siembra de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642 en agar papa dextrosa (PDA); II. Vista de colonias de <i>A. niger</i> después de 4 días a 30 °C	40
Figura 9.	Proceso de tratamiento y conservación de lactosuero, A. Medición de pH- indicator strips-Merck, B. % de lactosa determinado por el método de Fehling, C. Medición de conductividad y OD usando el multiparámetro Thermo Scientific, D. Pasteurización del Lactosuero	41
Figura 10.	Datos cinéticos de la fermentación al 90% de lactosuero y 380 ppm de K ₂ HPO ₄ para la producción de ácido cítrico utilizando <i>A. niger</i> ATCC 9642.	46
Figura 11.	Datos cinéticos de la fermentación al 90% de lactosuero y 360 ppm de K ₂ HPO ₄ para la producción de ácido cítrico utilizando <i>A. niger</i> ATCC 9642.	47
Figura 12.	Datos cinéticos de la fermentación al 70% de lactosuero y 380 ppm de K ₂ HPO ₄ para la producción de ácido cítrico utilizando <i>A. niger</i> ATCC 9642.	48
Figura 13.	Datos cinéticos de la fermentación al 70% de lactosuero y 360 ppm de K ₂ HPO ₄ para la producción de ácido cítrico utilizando <i>A. niger</i> ATCC 9642.	49

Figura 14. Datos de la Variación del pH a diferentes Tratamientos de la Fermentación.	52
Figura 15. Datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 1 de la Fermentación.....	54
Figura 16. Datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 2 de la Fermentación.....	55
Figura 17. Datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 3 de la Fermentación.....	56
Figura 18. Datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 4 de la Fermentación.....	57
Figura 19. Conteo de esporas en Cámara Neubauer, A. Preparación de Tween 80 al 0.8% en 5mL de agua destilada, vertidas en placa con colonias de <i>Aspergillus niger</i> , B. Solución colocada en la cámara Neubauer, C. Microscopio calibrado del IITA, D. Conteo de esporas a 40X.....	69
Figura 20. A. inoculación de los caldos de fermentación con $2,6 \times 10^6$ esporas/mL de <i>Aspergillus niger</i> , B. Se colocó en el Shaker a 150 rpm con 30°C., C. Preparación del medio de fermentación antes de agregar al biorreactor, D. Medición y control de la fermentación.....	71
Figura 21. Caracterización fisicoquímica del Lactosuero, A. Multiparámetro Thermo Scientific del IITA de la UNS, B. La data arrojó 8.67mg/L de OD., C. El análisis arrojó 7.7 ms/cm de conductividad., D. Medición del pH de la muestra.....	21
Figura 22. A. Muestras de 1 mL del caldo de fermentación de cada tratamiento colocados tubos, B. Tubos de ensayo llevados a la centrifuga a 5 000 RPM, por un tiempo de 5 minutos.....	73
Figura 23. A. Muestreo del caldo fermentativo en un ambiente estéril, B. Ajuste de Temperatura, pH y otros parámetros en el programa usado para operar el Biorreactor.	74
Figura 24. Equipo de HPLC.....	75
Figura 25. Curva de calibración	76
Figura 26. Data del tratamiento 1 de la réplica 2.....	77

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1.	Composición General del Lactosuero	21
Tabla 2.	Composición química porcentual del Lactosuero.....	22
Tabla 3.	Caracterización físico química del lactosuero.....	24
Tabla 4.	Concentraciones de lactosuero y K ₂ HPO ₄ en cada tratamiento	42
Tabla 5.	Diseño de Medio de Cultivo.....	79
Tabla 6.	Resultados de los parámetros cinéticos Q _p , Q _x , Y _{p/s} y μ, de los cuatro tratamientos, para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	61
Tabla 7.	Resultados de los parámetros cinéticos Q _p , Q _x , Y _{p/s} y μ, de los cuatro tratamientos, para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	62
Tabla 8.	Resultados de los parámetros cinéticos Q _p , Q _x , Y _{p/s} y μ, de los cuatro tratamientos, para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	62
Tabla 9.	Resultados del diseño experimental al 90% de lactosuero y 380 ppm de K ₂ HPO ₄ para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	81
Tabla 10.	Resultados del diseño experimental al 90% de lactosuero y 360 ppm de K ₂ HPO ₄ para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	82
Tabla 11.	Resultados del diseño experimental al 70% de lactosuero y 380 ppm de K ₂ HPO ₄ para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	83
Tabla 12.	Resultados del diseño experimental al 70% de lactosuero y 360 ppm de K ₂ HPO ₄ para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	84
Tabla 13.	Parámetros cinéticos μ, Y _{x/s} , Y _{p/s} y Q _p de los cuatro tratamientos, para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	85

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Conteo de esporas del hongo (<i>Aspergillus niger</i>).....	69
Anexo 2. Escalamiento en el Instituto de Investigación Tecnológica Agroindustrial de laUNS.....	70
Anexo 3. Caracterización Físicoquímica del Lactosuero utilizando el Multiparámetro Thermo Scientific del IITA de la UNS	72
Anexo 4. Determinación De Biomasa Por Peso Húmedo	73
Anexo 5. Toma de muestras y data en el proceso fermentativo usando el Biorreactor del IITA	74
Anexo 6. Curva Patrón del Ácido Cítrico por HPLC.....	75
Anexo 7. Data de la producción del Ácido Cítrico analizado en el laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Escuela de Ingeniería Ambiental de la UNT usando el equipo de HPLC.....	77
Anexo 8. Diseño de Medio de Cultivo.....	78
Anexo 9. Diseño Experimental.....	80
Anexo 10. Resultados Y Discusión	81
Anexo 11. Tablas del diseño experimental	81
Anexo 12. Análisis de Varianza y Valores de Significancia usando el paquete Estadístico Minitab 17.	86
Anexo 13. Determinación del μ_{max} de <i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642.....	87

RESUMEN

El lactosuero se ha constituido en el principal residuo de la industria láctea en nuestra localidad a pesar de los constantes esfuerzos por aprovecharlo. Nuestro presente trabajo tiene por objetivo estudiar y evaluar los efectos de lactosuero y fosfato dipotásico (K_2HPO_4) a diferentes concentraciones, sobre la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida utilizando el hongo del género *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Los medios de fermentación fueron sometidos a condiciones de $35^\circ C$ y 150 rpm por 96 h. Se evaluó la concentración de biomasa celular, el consumo de lactosa, la producción de ácido cítrico (Cp) y se estimaron los parámetros cinéticos y estequiométricos. Se aplicó un diseño experimental aleatorio con un arreglo factorial 2^K , los datos se procesaron a través del paquete estadístico Minitab 17. En el análisis estadístico se muestra que la concentración de lactosuero y K_2HPO_4 no se ajustan a un modelo de primer orden debido a que en el análisis de Pareto no superan el efecto estandarizado.

Las concentraciones de lactosuero y K_2HPO_4 a 90%-380 ppm respectivamente, fueron las mejores. Los valores de acidez se mantuvieron en un rango de 3.8-4.9 con inoculación de *Aspergillus niger* de $2,6 \times 10^6$ esporas/mL en todos los medios de fermentación. El medio de fermentación con 90% lactosuero y 380 ppm K_2HPO_4 alcanzó un pH de 4.2 en el menor tiempo (96h). Demostrando que las altas concentraciones de lactosuero y K_2HPO_4 favorecieron la acidificación mostrando la mayor producción (1.072 gCp/L), $Y'p/s=0.03649$ g/g, $Qp=0.011$ gCp/L*h; mientras las menores concentraciones de lactosuero y K_2HPO_4 mostraron menor crecimiento microbiano, menor gasto de lactosa, menor producción de ácido cítrico.

Palabras clave: lactosuero, ácido cítrico, parámetros cinéticos.

ABSTRACT

Whey has become the main dairy-industry waste product despite the continuous efforts aimed at finding a way to use it. Our present work aims to study and evaluate the effects of whey and dipotassium phosphate (K_2HPO_4) at different concentrations, on the production of citric acid by submerged fermentation using the fungus of the genus *Aspergillus niger* ATCC 9642.

The fermentation media were subjected to conditions of 35 ° C and 150 rpm for 96 h. The cell biomass concentration, the lactose consumption, the citric acid production (C_p) were evaluated and the kinetic and stoichiometric parameters were estimated. A randomized experimental design with a 2^k factorial arrangement was applied; the data was processed through the Minitab 17 statistical package. In the statistical analysis it is shown that the concentration of whey and K_2HPO_4 do not fit a first order model due to that in the Pareto analysis do not exceed the standardized effect.

The concentrations of whey and K_2HPO_4 at 90% -380ppm respectively, were the best. Acidity values were maintained in a range of 3.8-4.9 with *A. niger* inoculation of 2.6×10^6 spores / mL in all fermentation media. The fermentation medium of the second replica with 90% whey and 380 ppm K_2HPO_4 reached 4.2 pH in the shortest time (96h). Demonstrating that the high concentrations of whey and K_2HPO_4 favored acidification showing the highest production ($1.0727565 \text{ gCp} / \text{L}$), $Y'p / s = 0.03649 \text{ g} / \text{g}$, $Qp = 0.01065 \text{ gCp} / \text{L} * \text{h}$; while the lower concentrations of whey and K_2HPO_4 showed lower microbial growth, lower lactose expense, lower production of citric acid.

Key words: whey, citric acid, kinetic parameters.

I. INTRODUCCIÓN

El lactosuero es un líquido caracterizado por ser claro, de color amarillo verdoso, como resultado de la coagulación de la leche durante el proceso de elaboración del queso, y contiene un promedio de 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína, 0.6% de cenizas y 0.3% de grasas, entre otros componentes (Baena et al., 1994; Marwaha y Kennedy, 1988).

Teniendo en consideración que, a partir de la coagulación enzimática de 100 L de leche, se obtienen de 9 a 30 Kg de cuajada, dependiendo de la especie del rebaño lechero, se tiene que el suero final constituirá entre 70 y 90% del volumen total de la leche empleada inicialmente en la producción de queso, y en él se retendrá alrededor del 55% de los nutrientes originales de la leche, aproximadamente 6.3 g/Kg del suero (Gómez, 2012).

Actualmente el lactosuero es utilizado para la elaboración de alimentos balanceados para animales de granja y su aprovechamiento es mínimo, el restante es desechado por las industrias convirtiéndose en el contaminante principal de las industrias lácticas debido que al mezclarse el lactosuero con los afluentes de los ríos genera sustancias orgánicas altamente dañinas para la población y el medio ambiente.

Según estudios ambientales el lactosuero es un subproducto que se ha constituido en el principal desecho de la industria láctea. A pesar de los constantes esfuerzos por aprovechar las propiedades nutricionales del suero, la mayoría de los volúmenes producidos de este residuo son vertidos directa y negligentemente en los cursos de agua naturales provocando un impacto ambiental dañino debido a su elevado contenido de materia orgánica negativa, que alcanza una DBO5 de 30.000-50.000 mg/L (Baena et al., 1994; Marwaha y Kennedy, 1988). La alta demanda biológica de oxígeno de estos residuos, estimada entre 30 y 50 mil partes por millón (ppm), lo está convirtiendo en grandes focos de contaminación a nivel global (Mendoza & Hernández, 2017).

La legislación actual prohíbe rigurosamente el vertimiento directo del suero a los cuerpos de agua sin un tratamiento previo, el cual consiste principalmente en la remoción de la lactosa y las proteínas concentradas. Sin embargo, son exactamente estos componentes los que tienen más valor nutricional al momento de aprovechar el lactosuero como medio de cultivo para fermentaciones industriales de metabolitos primarios de gran

demanda (García et al., 1993; Moulin y Galzy, 1984).

Debido a sus propiedades nutricionales y funcionales de alto valor, el lactosuero se ha constituido en una de las principales materias primas convenientes para obtener diferentes productos a nivel tecnológico. La utilización de este residuo en los últimos años va acompañada de la realización de investigaciones y experimentos en la industria láctea, siendo considerado en la actualidad uno de los campos más importantes y con mayor potencial de investigación y en la industria de alimentos (Guerrero et al., 2011).

Una de las principales industrias que estimula la producción del ácido cítrico es la alimenticia y de bebidas procesadas, dada su continua utilización como aditivo, su uso se ha hecho extensivo en la industria farmacéutica y de jabones generando mayor expansión en la demanda mundial. El consumo crece a una razón mayor de 5-8% al año, tendencia que parece mantenerse constante (Malveda et al., 2009).

El género fúngico más importante en la producción industrial de ácido cítrico es el *Aspergillus* con las especies como: *niger*, *awamori*, *clavatus*, *fenicis*, *fumaricus*, *wentii* (Waksman, 1946; Betancourt, 2003 y Kamzolova et al., 2011). Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir ácido cítrico, sin embargo; *Aspergillus niger*, es el principal microorganismo utilizado en la producción industrial bajo ciertas condiciones nutricionales, de agitación y aireación (Rywinska et al., 2010).

Entre los macro-elementos, el fósforo (P) y el potasio (K) son fundamentales en el proceso de fermentación. El P, no sólo es necesario para la fosforilación a nivel de sustrato, para la producción de ATP/ADP, sino que también es indispensable en la síntesis de ADN / ARN de nuevas células o células en crecimiento. El K por su parte es co-factor de varias enzimas glicolíticas y activador de enzimas del ciclo de Krebs, determinantes en el proceso de acumulación del ácido cítrico. El K igualmente, tiene una importante función como osmoregulador (Bomba Na⁺ / K⁺) (Gómez Lucía, Muñoz Jaime, 2014).

La principal estrategia de optimización de procesos es el desarrollo de microorganismos como maquinarias biológicas, con mayores productividades y más eficientes a través de programas de mejoramiento de cepas, utilizando herramientas de ingeniería genética (Gómez, 2004), estrategia que ha demostrado ser exitosa aún en la era

tecnológica (Parekhet al., 2000). Como resultado de los procesos de mejoramiento de cepas frecuentemente se generan duplicaciones de los genes que codifican para la síntesis de enzimas claves y determinantes en la bioacumulación del ácido cítrico y por tanto, el requerimiento de nutrientes y co-factores como potasio y el fósforo puede ser alterado como estrategia de aumentar un mayor rendimiento (Gomez, 2004).

En esta exhaustiva búsqueda, las compañías biotecnológicas se preocupan continuamente, por una parte, de obtener materias primas e insumos de bajo costo y elevada calidad, y por otra, de optimizar los procesos. Una de las principales estrategias de optimización de procesos productivos es el desarrollo de microorganismos más productivos y eficientes a través de extensivos programas de mutación inducida y selección (Parekh et al., 2000). Sin embargo, las cepas resultantes se implementan con los niveles tradicionales de P y K. Dado que en los procesos de mejoramiento genético ya sea de mutación y selección son frecuentes las duplicaciones de genes codificantes por enzimas determinantes en el proceso, el requerimiento de elementos nutricionales y/o co-factores también puede verse incrementado.

Estudios preliminares a nivel de laboratorio han demostrado que una reducción en el P acompañada de un incremento en el K, mejora significativamente la productividad (g/L x h) y eficiencia (%) del proceso, resultados que muestran la importancia de estudiar con rigurosidad el efecto de niveles de estos dos elementos específicos y comprender su importancia en la participación en el proceso productivo (Gómez Lucía, et al 2012).

Luego de las investigaciones realizadas, se estableció que la concentración de fósforo en el medio está regulada por la presencia de los metales iónicos tales como: hierro, cobre, zinc y manganeso. Condiciones donde los metales mencionados no pueden ser totalmente controlados, como, por ejemplo, en sustratos como melazas, es recomendable trabajar con bajos niveles de fosfatos. En estas condiciones nutricionales, un incremento en los fosfatos genera la formación de azúcares ácidos no fermentables en los medios de cultivos, otras reacciones colaterales y un incremento mayor de biomasa (Papagianni y col. 2007).

Por lo ya mencionado, se hace evidente la necesidad de realizar esfuerzos para el desarrollo de nuevas herramientas eficientes e innovadoras para la bio-valorización de

residuos de la industria láctea, los cuales representan materias primas de bajo costo y alta disponibilidad en nuestra provincia. En este sentido, la fermentación sumergida catalizada por microorganismos se presenta como una de las mejores estrategias, capaz de promover caminos eficientes y alternativos a los residuos generados, reduciendo posibles contaminaciones ambientales, así como agregar valor a estos residuos a través de la producción de metabolitos de interés industrial como son los aditivos en este caso ácido cítrico. Como fuente de medio de cultivo, el suero de leche tiene el potencial de suministrar las fuentes de carbono y de energía necesaria para el desarrollo de diferentes microorganismos y la producción de sustancias de alto valor. El presente trabajo tuvo por objeto estudiar y determinar las concentraciones de lactosuero en calidad de sustrato y fosfato dipotásico para bioproducción de ácido cítrico utilizando la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 9642 en fermentación sumergida, con la estrategia de aprovechar y a la vez reducir el impacto ambiental que causan los vertimientos de estos subproductos contaminantes en los cursos de agua naturales. Por lo tanto, es importante considerar el siguiente problema de investigación: ¿Cuál es el efecto de la concentración de lactosuero y fosfato dipotásico en la producción de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* ATCC 9642 en fermentación sumergida?

1.1. Objetivos de Investigación:

1.1.1. Objetivo General:

- Determinar el efecto de la concentración de lactosuero y fosfato dipotásico en la producción de ácido cítrico utilizando la cepa de *Aspergillus niger* ATCC 9642 en fermentación sumergida.

1.1.2. Objetivos Específicos:

- Evaluar el efecto de lactosuero (70% y 90%) y fosfato dipotásico (360ppm y 380ppm), para producir ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* ATCC 9642 en fermentación sumergida.
- Determinar la relación que existe entre los niveles de fosfato dipotásico y la concentración de lactosuero con un nivel de confiabilidad del 95% utilizando el paquete estadístico Minitab 17.

- Determinar los parámetros estequiométricos: $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, Q_p , μ de la fermentación de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* ATCC 9642 en fermentación sumergida.

1.2. HIPÓTESIS

Variando las concentraciones de Lactosuero (70% y 90%) y las concentraciones de fosfato dipotásico (360 ppm y 380 ppm), es posible una mayor producción de ácido cítrico a una concentración de 90 % de lactosuero y 380 ppm de fosfato dipotásico en fermentación sumergida utilizando la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. DESCRIPCIÓN DEL LACTOSUERO

2.1.1. Generalidades

El lactosuero es un subproducto obtenido tras la disociación de la caseína precipitada durante la elaboración del queso, considerado un producto de desecho, utilizado para la elaboración de productos aproximadamente baratos como el suero en polvo. Durante la compactación suave de la leche por medio del ácido láctico, se retira un agua concentrada de proteínas que tienen un alto valor biológico, con minerales, aminoácidos y vitaminas. Tiene un color amarillo-verdoso cuya composición física-química dependerá del método de fabricación empleado, el tipo de leche (bovina, caprina, ovina, etc.), época del año, el tipo de alimentación que recibe el ganado y etapa de lactación que recibe el ganado (Alvarado y Guerra, 2010). Considerando que, a partir de la coagulación enzimática de 100 L de leche, se pueden obtener de 9 a 30 Kg de cuajada, dependiendo de la especie y raza del rebaño lechero, se tiene que el suero resultante constituirá entre 70 y 90% del volumen total de la leche empleada inicialmente en la elaboración de los quesos, y en él se retiene alrededor del 55% de los nutrientes de origen de la leche, aproximadamente 6.3 g/Kg de suero (Gómez, 2012).

El lactosuero es utilizado para la preparación de alimentos para animales de finca y su explotación es casi cero, lo demás es retirado por las industrias transformándose en el contaminante cardinal de las compañías lácticas ya que al fusionarse el lactosuero con los afluentes de los ríos genera sustancias orgánicas tóxicas para la población y el medio ambiente. La alta demanda biológica de oxígeno de estos desechos, estimada entre 30 y 50 mil partes por millón (ppm), lo configura en ingentes focos de contaminación (Mendoza & Hernández, 2017).

Debido a sus características nutricionales y funcionales, el lactosuero se ha transformado en una materia prima conveniente para conseguir diferentes tipos de productos a nivel tecnológico. La utilización del suero en los últimos años viene acompañada de la ejecución de investigaciones en la industria láctea, siendo considerado hoy en día uno de los campos más importantes de investigación y desarrollo de esta industria de alimentos (Guerrero et al., 2011).

La producción internacional anual de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa. El triunfo de los productos lácteos y la fabricación de nuevos productos ha aumentado la elaboración del lactosuero, la cual se aumenta año con año, situación de la que nuestro país no es la excepción.

Existen varios tipos de lactosuero: el primero, denominado dulce, está basado en la coagulación por la renina a pH 6,5; el segundo, llamado ácido, efecto del proceso de fermentación y/o adición de ácidos orgánicos o ácidos minerales para coagular la caseína como en la producción de quesos frescos (Panesar et al., 2007). Según los datos bibliográficos de la composición proximal de los lactosueros dulce y ácido, se observa que el primero presenta, ligeramente, mayores contenidos de lactosa y proteína (Tabla 1).

Tabla 1. Composición General del Lactosuero

Constituyente	Lactosuero Dulce (g/L)	Lactosuero Acido (g/L)
Sólidos	63,0- 70,0	63,0- 70,0
Lactosa	46,0- 52,0	44,0- 46,0
Proteína	6,0- 10,0	6,0- 8,0
Calcio	0,4- 0,6	1,2- 1,6
Fosfatos	1,0- 3,0	2,0- 4,5
Lactato	2	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Fuente: Panesar et al. (2007)

La coagulación ácida se lleva a cabo de dos maneras: una natural y la otra impulsada. La primera (acidez natural) consiste en dejar la leche en reposo para que las bacterias ácido-lácticas presentes en la leche degraden la lactosa para formar ácido láctico; la segunda, en la adición de un ácido orgánico. Con ambos tratamientos se logra reducir el pH de la leche, provocando la alteración de las micelas de caseína y modificando su

dispersabilidad. Cuando el pH de la leche llega a 5.2, las micelas se han desestabilizado produciéndose con esto la aglomeración y respectivamente el denominado gel láctico (Lucey, 2010).



Figura 1. Lactosuero, Subproducto de la industria quesera (Foegeding & Luck.,2002).

Según otros científicos, del ámbito nacional (Perú) muestran composiciones proximales algo variables de acuerdo al proceso de obtención de un tipo de queso específico (por ejemplo, queso pario, queso fresco, etc.), y con referencia al autor (Asas et al, 2021) muestra una composición proximal (o composición química) porcentual de lactosuero muy cercano al realizado por nuestra presente investigación de Tesis.

Tabla 2. Composición química porcentual del Lactosuero

Composición (%)		
Tipo de Nutrientes	Suero de Queso Dulce	Suero de Queso Acido
Agua	93.6	93.5
Grasas	0.05-0.37	0.04-0.27
Proteína	0.68-1	0.6-0.8
Lactosa	4.6-5.2	4.4-4.6
Minerales	0.5	0.8
Ácido láctico	0.05	0.4

Fuente: Sena (2015)

La tabla 1 y la tabla 2 de la composición química del lactosuero refleja la variabilidad de los nutrientes en dicha sustancia, esto es dependiente de las características de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y de la tecnología empleada. Teniendo en cuenta estas diferencias se puede establecer la siguiente clasificación de los lactosueros: Suero dulce (se produce a partir de acción enzimática, contiene más lactosa) y Suero ácido (se obtiene por acción ácida, con mayor concentración de proteínas) (Poveda, 2013). Dicho Lactosuero se utiliza para la elaboración de diversos compuestos como: B-Lactoglobulina, Lactoferrina, Lactoperoxidasa, proteína unicelular y la producción de ácido cítrico el cual es utilizado como acidulante y en la formulación de fármacos lo que lo hace un aditivo muy importante en las industrias alimentarias y farmacéuticas. Sin embargo, no hay muchas iniciativas a nivel nacional para poder aprovechar tan nutritiva sustancia, esto debido al escaso conocimiento en las biotransformaciones industriales y también en la tecnología de membrana para poder elaborar dichos productos de valor agregado para la cubrir las necesidades de la población a nivel nacional y mundial.

2.1.2. Composición química del Lactosuero

El lactosuero personaliza una rica y variado conjunto de proteínas segregadas que poseen extenso intervalo de características químicas, físicas y funcionales (Foegeding & Luck, 2002). Concretamente, suponen alrededor del 20% de las proteínas de la leche de bovino (Baro et al., 2001), siendo su principal componente la β -lactoglobulina (β -LG) con cerca de 10% y α -lactoalbúmina con 4% de todo el prótido lácteo (Hinrichs et al., 2004), además, contiene otras proteínas como lactoferrina, lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, y glicomacropéptidos (Baro et al., 2001). La β -LG es segregada en el calostro de bovinos con gran resistencia a la digestión gástrica, lo que origina intolerancia y/o alergenidad en seres humanos, a pesar de esto ahora en día se están llevando a cabo investigaciones encaminadas a la caracterización de los diferentes tipos de alimentos con prótidos de suero de leche por medio de resonancia magnética nuclear de baja resolución (RMN) (Hinrichs et al., 2004), igualmente se está trabajando en los tratamientos industriales como esterilización, calentamiento o presión hidrostática alta y la hidrólisis que mejoran la digestibilidad de la β -LG presente en el lactosuero (Pescumma et al., 2008).

Tabla 3. Caracterización físico química del lactosuero.

CARACTERIZACION FISICO QUIMICA DEL LACTOSUERO	
Lactosa	40 - 50 %
Materia Seca	55 75 %
pH	< 4,5
Grados Dormic	> 50°
Cloruros	2 - 2,2 g/Kg

Fuente: Hinrichs et al., (2004)

2.2. ÁCIDO CÍTRICO

2.2.1. Definición

El ácido cítrico es un ácido orgánico que rebosa en la naturaleza y muy extendido en el reino vegetal y animal, hallándose en considerable cantidad en los frutos. Como ácido libre o como sal, se encuentra en las semillas y los jugos de gran diversidad de flores y plantas. Es un ingrediente del vino (0,4 g/L), la leche (1 a 4g/L), los productos lácteos y los tejidos y líquidos animales (Concha Garcia,2014pg.39).

El ácido cítrico se comercializa como ácido cítrico monohidrato o como ácido cítrico anhidro. Se utiliza en las empresas farmacéuticas (10% de la utilización total). Su alto sabor y la facilidad con la que es asimilado favorecen su utilización como ingrediente ácido para mantener el pH o para obtener un pH conveniente y hacer resaltar el sabor de una extensa variedad de productos en esas industrias. Recientemente se ha convertido en materia prima valioso para usos industriales de naturaleza general como pulimiento y limpieza del hierro y acero, proceso y acondicionamiento de líquidos industriales, y en la fabricación de resinas, lacas, pinturas, tintas y en el estampado de telas (Concha Garcia, 2014), ver Fig 2.



Figura 2. Ácido cítrico para aditivos alimentarios (Concha Garcia.,2014).

El ácido cítrico es el ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotri-carboxílico, con formulación molecular $\text{HOOCCH}_2\text{C}(\text{OH})(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$, con un peso molecular de 192.12. Tiene dos formas estables: el ácido cítrico monohidrato con un 91,42% de ácido cítrico anhidro y 8,5% de agua, y el ácido cítrico anhidro, es un ácido orgánico que puede ser considerado natural, sin embargo también puede ser sintetizado vía laboratorio, es un ácido orgánico que se encuentra en casi todos los tejidos animales y vegetales, se presenta en forma de ácido de frutas en el limón, mandarina, lima, toronja, naranja, piña, ciruela, guisantes, melocotón, así como en los huesos, músculos y sangre de animales. Es considerado un ácido carboxílico versátil y ampliamente utilizado en el campo de la alimentación, de los productos farmacéuticos y cosméticos, entre otros, (Thangavelu y col. 2011). Físicamente es un polvo cristalino blanco que puede presentarse de manera anhidra o como monohidrato, considerado un triácido carboxílico, su estructura química se presenta en la Figura 3.

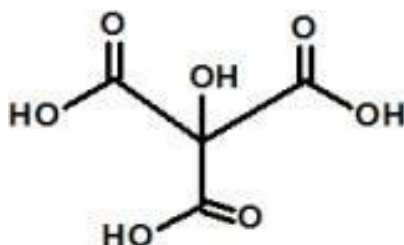


Figura 3. Estructura química del ácido cítrico (Thangavelu y col., 2011).

Hoy en día la elaboración de ácido cítrico por fermentación a escala mercantil ha conformado un gran adelanto dentro del terreno de la microbiología industrial; al mismo periodo que independiza a las naciones desarrolladas en el suministro de este producto ya ha modificado significativamente el comercio internacional de ácido cítrico y citrato cálcico. El ácido cítrico fue aislado por Scheele en el año 1784 del zumo de limón, en forma de sólido cristalizado; después se produjo a partir de glicerol y de otros compuestos químicos, para últimamente desde 1923 obtenerse por fermentación, utilizando microorganismos que crecían sobre la superficie de los cultivos, Werhmer (1893) fue el pionero en describir al ácido cítrico como un producto de la fermentación por mohos. Desde estos, que él describió como *Citromyces pfefferianus* y *Citromyces glabres* (clasificados por Thom como penicilios), elaboraban el ácido en base de soluciones nutritivas de sacarosa que contenían carbonato cálcico. Más tarde, Wehmer dio a conocer la formación de ácido cítrico por *Penicillium luteum* y *Mucor piriformis*, no obstante se creía que los *Aspergillus* negros solo producían ácido oxálico. Su hallazgo condujo a amplias investigaciones de los factores que influyen sobre la producción micológica del ácido cítrico, las diversas cepas de mohos capaces de producirlo y el engranaje por el cual se forma una sustancia de cadena ramificada de compuestos azucarados de tipo lineal (Martin & Steel, 1954).

Se estableció que la concentración de fósforo está regulada por la asistencia de los metalesiónicos como hierro, cobre, zinc y manganeso. En condiciones donde los metales no pueden ser totalmente controlados, como, por ejemplo, en sustratos como melazas, es aconsejable trabajar con bajos niveles de fosfatos. En estas condiciones, un aumento en los fosfatos puede desencadenar la producción de azúcares ácidos no fermentables, otras reacciones colaterales e incremento de biomasa (Papagianni et al., 1999).

La producción de ácido cítrico ha crecido notablemente en el presente siglo. En 1950, alcanzaba 50.000 toneladas/año, posteriormente y con el desarrollo de la fermentación sumergida, que constituye un proceso mucho más económico que la fermentación en superficie, se registró una importante expansión, actualmente, la capacidad instalada mundial es de aproximadamente 2180000 toneladas/año (Malveda et al, 2009).

La industria alimenticia y de bebidas procesadas estimula el mercado del ácido cítrico dada su continua utilización como aditivo, su uso se ha hecho extensivo en la

industria farmacéutica y de jabones generando expansión de la demanda mundial. El consumo crece a razón de 5-8% al año, tendencia que parece mantenerse estable (Malveda et al, 2009).

Se calcula que a partir de 10 litros de leche de vaca se puede elaborar de 1 a 2 kg de queso y un rango de 8 a 9 kg de suero. Al simbolizar alrededor del 90% del volumen de la leche, abarca la mayor parte de las sustancias hidrosolubles de ésta, el 95% de lactosa (azúcar de la leche), el 25% de los prótidos y el 8% de la materia grasa de la leche. Su composición varía de acuerdo al origen de la leche y la variedad de queso fabricado, pero en general el contenido proximal es de 93.1% de agua, 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas (minerales), 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles, y las concentraciones de los macronutrientes Cobre (Cu), Hierro (Fe), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Fosforo (P), Potasio (K) serán: Cu (1,048 ppm), Fe (149,592 ppm), Zn (2,015 ppm), Mn (1,048 ppm), Mg (0,271 ppm), Ca (0,4 - 0,6 g/L) , (Papagianni, 2007).

En las operaciones de fermentación sumergida, la aireación es extremadamente crucial, esto es debido a que la elaboración de ácido cítrico es impulsada por el aumento del oxígeno. Si el suministro de aire es parado por unos breves minutos, la elaboración de ácido cítrico se paraliza irreversiblemente, así se reinicie la aireación. Entonces teniendo en cuenta que el metabolismo de *Aspergillus niger* es oxidativo y que el ácido cítrico es un metabolito primario, podemos afirmar que el efecto de parar la aireación depende en parte de la fase en la cual haya ocurrido la interrupción y el tiempo que este haya durado. Así durante la fase de producción una interrupción en el flujo de oxígeno cerca de 2 minutos decrecerá el rendimiento del ácido cítrico apreciablemente pero simultáneamente no se inhibe la producción de biomasa, pero como es lógico se desestimula ligeramente.

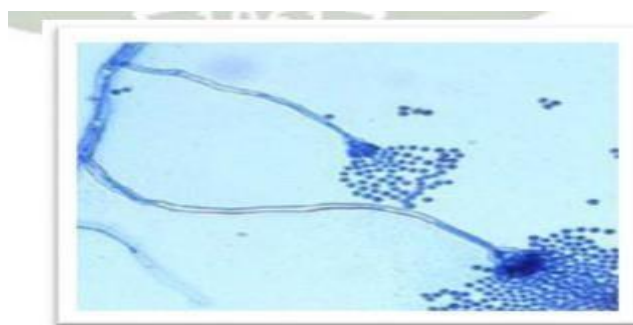
El hongo *Aspergillus niger* requiere de elementos metálicos como: Fe, Cu, Mn para su crecimiento, pero hay algunos elementos que requieren una cantidad mínima en el proceso fermentativo como la adición de Mn a concentraciones bajas como 3 µg/L, han mostrado reducir drásticamente la producción de ácido cítrico, también se ha reportado que la adición de 10 mg de Mn por litro reduce la producción de ácido cítrico aproximadamente al 50%. Se establecieron que los niveles óptimos de Zn y Fe son 0.3 y 1.3 ppm respectivamente. A altos niveles de zinc el cultivo de hongos se mantiene en fase

de crecimiento y no se genera el ácido cítrico, pero a bajos niveles, el crecimiento se ve limitado y *Aspergillus niger* pasa a la fase de producción de ácido cítrico (Papagianni, 2007).

2.3. MICROORGANISMO

En 1729 el *Aspergillus* fue clasificado por primera vez en 1729 por el biólogo italiano Pier Antonio Micheli. El cual lo bautizó con el nombre de “*Aspergillus*” por semejarse a la herramienta usada para desparramar agua bendita. La descripción realizada por Micheli de este género de hongo en su obra “*Nova Plantarum Genera*” tiene relevancia histórica, al ser identificado como una zona inicial de la ciencia de la micología (Concha Garcia, 2014).

Figura 4. Morfología de *Aspergillus niger*



Fuente <http://www.microbiologia.com.ar/bacteriologia/fisiologia.php?Mostrar=quimicos>

2.3.1. Generalidades

La estructura microscópica del *Aspergillus niger* es única. Tiene hifas tabiculares y conidioforas cuya cabeza está localizada en el extremo de una hifa, compuesta por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella directamente insertadas sobre la vesícula. De la fiálides se desprenden las esporas (conidios) (Concha Garcia, 2014).

Geográficamente tiene una amplia distribución mundial, su ocurrencia ha sido documentada desde la región ártica hasta el trópico. Se encuentra distribuido en suelos con pH entre 4 a 8 y su abundancia relativa aumenta luego de las actividades de labranza y fertilización del suelo, tolera altas concentraciones de herbicidas (35 mg/g de Dalapon).

Habita en una variedad de sustratos incluyendo: granos, forraje, frutos, vegetales, semillas y en la rizósfera de una gran variedad de plantas como banano, trigo, arroz, algodón, café, papa, caña de azúcar, cebada avena, maíz y guisantes entre otros (Concha Garcia, 2014).

2.3.2. Propiedades

El género fúngico más importante en la producción industrial de ácido cítrico es el *Aspergillus* con las siguientes especies *niger*, *awamori*, *clavatus*, *fenicis*, *fumaricus*, *wentii* (Waksman, 1946; Betancourt, 2003 y Kamzolova et al., 2011). Muchos organismos pueden producir ácido cítrico, sin embargo, *A. niger*, es el principal microorganismo utilizado en la producción industrial bajo ciertas condiciones de agitación y aireación (Rywinska et al., 2010).

Dentro de los macro-elementos, el fósforo (P) y el potasio (K) son fundamentales en el proceso de fermentación. El P, no sólo se requiere para la fosforilación a nivel de sustrato, para la producción de ATP/ADP, sino también en la síntesis de ADN / ARN de nuevas células o células en crecimiento. El K por su parte es co-factor de varias enzimas glicolíticas y activador de enzimas del ciclo de Krebs, determinantes en el proceso de acumulación del ácido cítrico. El K igualmente, juega papel importante como osmoregulador (Bomba Na⁺ / K⁺) (Gómez Lucía, Muñoz Jaime.2014).

Una de las estrategias de optimización de procesos es el desarrollo de microorganismos con mayores productividades y más eficientes a través de programas de mejoramiento de cepas (Gómez, 2004), estrategia que ha demostrado ser exitosa aun en la era tecnológica (Parekh et al., 2000). Como resultado de los programas de mejoramiento de cepas frecuentemente se generan duplicaciones de los genes que codifican para la síntesis de enzimas determinantes en la acumulación del ácido cítrico y por tanto, el requerimiento de nutrientes y co-factores como potasio y el fósforo puede ser alterado.

En esta búsqueda, las compañías se preocupan continuamente, por una parte, de obtener materias primas e insumos de bajo costo y elevada calidad, y por otra, de optimizar los procesos. Una de las estrategias de optimización de procesos es el desarrollo de microorganismos más productivos y eficientes a través de extensivos programas de mutación y selección. Sin embargo, las cepas resultantes se implementan con los niveles

tradicionales de P y K o aquellos utilizados con sus parentales. Dado que en los procesos de mutación y selección son frecuentes las duplicaciones de genes codificantes por enzimas determinantes en el proceso, el requerimiento de nutrientes y/o co-factores también puede verse incrementado.

Estudios preliminares a nivel de laboratorio muestran que una reducción en el P acompañada de un incremento en el K, genera aumento en la productividad (g/L x h) y eficiencia (%) del proceso, resultados que señalan la importancia de estudiar con detalle el efecto de niveles de estos dos elementos y comprender su participación en el proceso (Gómez Lucía, et al 2012).

Posteriormente se estableció que la concentración de fósforo está regulada por la presencia de los metales iónicos como hierro, cobre, zinc y manganeso. En condiciones donde los metales no pueden ser totalmente controlados, como, por ejemplo, en sustratos como melazas, es aconsejable trabajar con bajos niveles de fosfatos. En estas condiciones, un incremento en los fosfatos puede generar la formación de azúcares ácidos no fermentables, otras reacciones colaterales e incremento de biomasa (Papagianni y col. 2007).

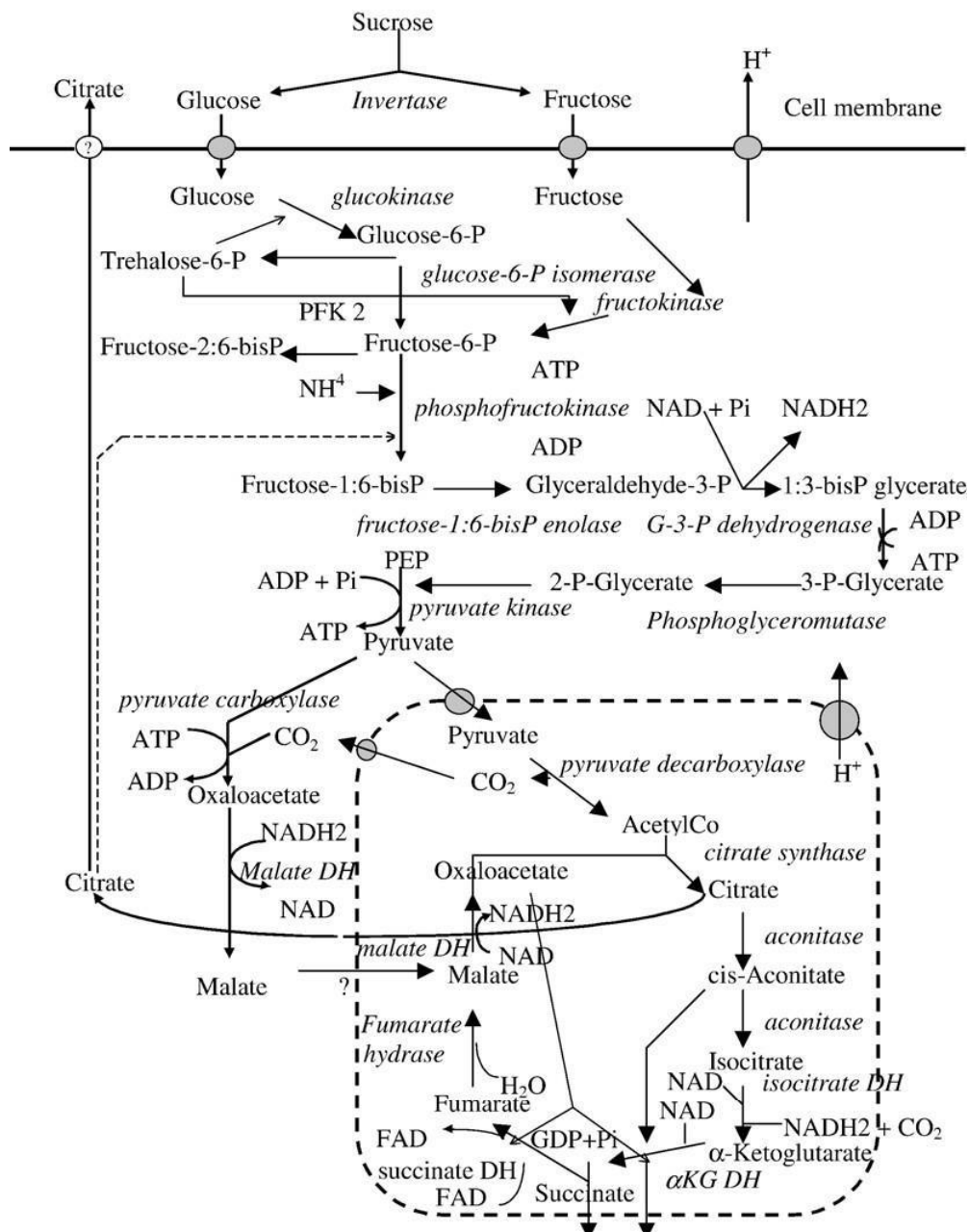
2.3.3. Bioquímica de la Producción de Ácido Cítrico

Para revisar la bioquímica de la formación de ácido cítrico se puede decir que el exceso de producción de ácido cítrico requiere una combinación única de las condiciones nutricionales inusuales (exceso de fuente de carbono, iones de hidrógeno y el oxígeno disuelto, y altas concentraciones de ciertos metales traza y de fosfato), que influyen sinérgicamente el rendimiento de fermentación (Papagianni y col. 2007).

El ácido cítrico es un intermediario en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) o ciclo de Krebs. Las funciones de este ciclo son generar energía en forma de ATP en conjunción con la fosforilación oxidativa durante el metabolismo aeróbico de carbohidratos y crear precursores de otros ciclos biosintéticos como aminoácidos. En condiciones ambientales que promueven el desarrollo celular el ciclo funciona en estado estacionario, los intermediarios que lo constituyen se mantienen a niveles bajos sin acumulación de alguno en particular. Tal acumulación resultaría en un ineficiente uso de los nutrientes. El mantenimiento de dicho estado estacionario se efectúa mediante una regulación precisa de

enzimas presentes en rutas metabólicas que alimentan el ciclo o que parten de él. Las enzimas pueden ser controladas a nivel de síntesis de proteínas (represión o inducción) o de actividad enzimática (inhibición o activación) (López y col. 2012).

Figura 5. Vía metabólica de la producción de ácido cítrico a partir de carbohidratos por *Aspergillus niger* (Papagianni, 2007).



De acuerdo con Habison et.al y Rohr y Kubicek (1983), una deficiencia de manganeso, o limitación de fosfato y nitrógeno, inhibe el anabolismo de *A. niger*, y la

degradación resultante de las proteínas conduce a una mayor concentración de iones amonio. Este aumento es capaz de contrarrestar la inhibición ejercida por el ácido cítrico sobre la fosfofructocinasa, siendo un efector final positivo. Las altas concentraciones de NH_4^+ y glucosa también reprimen la síntesis de α -cetoglutarato deshidrogenasa, inhibiendo el catabolismo del ácido cítrico a través del ciclo de Krebs, lo que lleva a su acumulación.

Por lo tanto, una de las razones para la acumulación de ácido cítrico es el resultado de un flujo de ingresos a alta velocidad y una reducción en la velocidad del flujo de salida.

Actualmente la producción de ácido cítrico por fermentación a escala comercial ha constituido un gran progreso dentro del campo de la microbiología industrial; al mismo tiempo que independiza a los países desarrollados en el abastecimiento de este producto y ha modificado notablemente el comercio mundial de ácido cítrico y citrato cálcico. El ácido cítrico fue aislado por Scheele en el año 1784 del zumo de limón, en forma de sólido cristalizado; luego se sintetizó a partir de glicerol y de otros compuestos químicos, para finalmente desde 1923 obtenerse por fermentación, utilizando microorganismos que crecían sobre la superficie de los cultivos. Werhmer (1893) fue el primero en describir al ácido cítrico como un producto de la fermentación por mohos. Dos de estos, que él designó como *Citromyces pfefferianus* y *Citromyces glabres* (clasificados por Thom como penicilios), producían el ácido a partir de soluciones nutritivas de sacarosa que contenían carbonato cálcico. Más tarde, Wehmer dio a conocer la formación de ácido cítrico por *Penicillium luteum* y *Mucor piriformis*, aunque creía que los *Aspergillus* negros solo producían ácido oxálico. Su descubrimiento condujo a extensos estudios de los factores que influyen sobre la producción micológica del ácido cítrico, las diversas cepas de mohos capaces de producirlo y el mecanismo por el cual se forma una sustancia de cadena ramificada de compuestos azucarados de tipo lineal (Concha Garcia, 2014).

Se estableció que la concentración de fósforo está regulada por la presencia de los metalesiónicos como hierro, cobre, zinc y manganeso. En condiciones donde los metales no pueden ser totalmente controlados, como, por ejemplo, en sustratos como melazas, es aconsejable trabajar con bajos niveles de fosfatos. En estas condiciones, un incremento en los fosfatos puede generar la formación de azúcares ácidos no fermentables (Martin & Steel, 1954), otras reacciones colaterales e incremento de biomasa (Papagianni et al., 1999).

La producción de ácido cítrico ha crecido notablemente en el presente siglo; actualmente, la capacidad instalada mundial es de 750 000 TM/año, con una producción real de 550 000 TM año. El ácido cítrico se fabrica en más de 20 países y la Unión Europea, Estados Unidos y China reúnen el 88% del total mundial. Recientemente, se observó un aumento en la capacidad productiva de Europa Oriental y del Lejano Oriente, particularmente en China, la cual produce proporcionalmente menor volumen de ácido cítrico de alta calidad, es decir, purificado y refinado. Sin embargo, la capacidad de elaboración del producto crudo representa el 24% del total mundial. La Unión Europea incrementó su elaboración ubicándose primera en el ranking mundial debido, fundamentalmente, a su uso como materia prima para la fabricación de detergentes biodegradables. Se estima que la demanda de Estados Unidos, en el último quinquenio, creció según una tasa cercana al 7% anual. Este crecimiento se relaciona con la expansión de la industria de alimentos y bebidas. Las primeras firmas productoras a nivel mundial son Bayer y ADM, cada una con el 17% del mercado aproximadamente. Le siguen Junbunzlauer, Cargill y Critique Belge que produce más de 300 toneladas de ácido cítrico diariamente (Concha García 2014).

Así mismo, países como China (50 000 TM), Indonesia (25 000 TM), Rusia (22000 TM), India (10 000 TM), Eslovaquia (4 500 TM) y Tailandia (4 000 TM) cuentan con plantas pequeñas que permiten elaborar un total significativo integral de MILES de toneladas de ácido cítrico. La expansión de la demanda mundial de ácido cítrico se debe, fundamentalmente, a su utilización como aditivo en la industria de alimentos y bebidas. Por ejemplo, en Estados Unidos este sector demanda el 72% del total. A principios de la década del 90', el producto se destinaba a distintas industrias. El consumo de ácido cítrico en el mundo crece a razón de 5-8% anual y la tendencia parece mantenerse estable (Concha García, 2014).

La producción de ácido cítrico ha crecido notablemente en el presente siglo. En 1950, alcanzaba 50.000 toneladas/año, posteriormente y con el desarrollo de la fermentación sumergida, que constituye un proceso mucho más económico que la fermentación en superficie, se registró una importante expansión, actualmente, la capacidad instalada mundial es de aproximadamente 2180000 toneladas/año (Malveda et al, 2009).

La industria alimenticia y de bebidas procesadas estimula el mercado del ácido cítrico dada su continua utilización como aditivo, su uso se ha hecho extensivo en la industria farmacéutica y de jabones generando expansión de la demanda mundial. El consumo crece a razón de 5-8% al año, tendencia que parece mantenerse estable (Malveda et al, 2009).

Se estima que a partir de 10 litros de leche de vaca se puede producir de 1 a 2 kg de queso y un promedio de 8 a 9 kg de suero. Al representar cerca del 90% del volumen de la leche, contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta, el 95% de lactosa (azúcar de la leche), el 25% de las proteínas y el 8% de la materia grasa de la leche. Su composición varía dependiendo del origen de la leche y el tipo de queso elaborado, pero en general el contenido aproximado es de 93.1% de agua, 4.9% de lactosa, 0.9% de proteína cruda, 0.6% de cenizas (minerales), 0.3% de grasa, 0.2% de ácido láctico y vitaminas hidrosolubles, y las concentraciones de los macronutrientes Cobre (Cu), hierro (Fe), Zinc (Zn), Manganeseo (Mn), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), fósforo (P), Potasio (K) serán: Cu (1,048 ppm), Fe (149,592 ppm), Zn (2,015 ppm), Mn (1,048 ppm), Mg (0,271 ppm), Ca (0,4 - 0,6 g/L) (García et al 1993).

En los procesos de fermentación sumergida, la aireación es extremadamente crítica, esto es debido a que la producción de ácido cítrico es estimulada por el incremento del aire. Si el suministro de aire es parado por unos pocos minutos, la producción de ácido cítrico se detiene irreversiblemente, así se reanuda la aireación. Entonces teniendo en cuenta que el metabolismo de *Aspergillus niger* es oxidativo y que el ácido cítrico es un metabolito primario, podemos afirmar que el efecto de parar la aireación depende en parte de la fase en la cual haya ocurrido la interrupción y el tiempo que este haya durado. Así durante la fase de producción una interrupción en el flujo de oxígeno cerca de 2 minutos decrece el rendimiento del ácido cítrico apreciablemente pero simultáneamente no se inhibe la producción de biomasa, pero como es lógico se desestimula ligeramente.

El hongo *Aspergillus niger* requiere de Fe, Cu, Mn y Zn para su crecimiento, pero hay algunos elementos que requieren una cantidad mínima en el proceso fermentativo como la adición de Mn a concentraciones bajas como 3 µg/L, han mostrado reducir drásticamente la producción de ácido cítrico, también se ha reportado que la adición de 10 mg de Mn por litro reduce la producción de ácido cítrico aproximadamente al 50%. Se

estableció que los niveles óptimos de Zn y Fe son 0.3 y 1.3 ppm respectivamente. A altos niveles de zinc el cultivo de hongos se mantiene en fase de crecimiento y no se genera el ácido cítrico, pero a bajos niveles, el crecimiento se ve limitado y *Aspergillus niger* pasa a la fase de producción de ácido cítrico (Papagianni,2007).

Los Procesos Sumergidos, aunque llevan más tiempo un aproximado de 8 días tiene varias ventajas: menor inversión en la construcción, 25% menos inversión total y costes más bajos de mano de obra. Por otro lado, entre las principales desventajas se encuentran los costes más altos de energía y la tecnología de control más sofisticada que requiere personal más entrenado.

2.3.4. Contaminación de la industria láctea

La industria láctea representa un importante sector dentro de la industria alimentaria y su contribución material en términos de contaminación de las aguas receptoras es significativa, lo que hace necesario y obligatorio el tratamiento previo de sus desechos líquidos antes del vertimiento. El caudal producido por la industria láctea depende del consumo de agua en la planta procesadora y este depende de la naturaleza de los productos fabricados y varía de una fábrica a otra.

Las aguas residuales de estas industrias están constituidas esencialmente por residuos de leche, productos diluidos y productos de limpieza como detergentes, ácidos y álcalis fuertes. Los principales constituyentes orgánicos en los residuos de la leche son sus sólidos naturales: grasa de la leche emulsionada, lactosa y proteínas (caseína y lactoalbúmina), sales y oligoelementos. A menudo también contiene sacarosa (Concha García,2014).

Las sustancias orgánicas de los efluentes de industrias lácteas provienen de los productos desechados y en menor grado de los productos de limpieza y desagües sanitarios.

Según los Valores Máximos Admisibles (vma) de las descargas de aguas residuales no domésticas emitidos por sedapal en el anexo nº1 metodología para determinar el pago adicional por exceso de concentración de los parámetros fijados en el anexo nº 1 del d.s. nº 021-2009-vivienda 1. Establecimiento de rangos en concordancia con el principio de

incentivar la reducción de las descargas de los parámetros del anexo N° 1 del d.s. n° 021-2009-vivienda, En donde su metodología establece cinco (05) rangos de concentración de los parámetros (dbo, dqo, sst, Aceites y Grasas) en relación a los incrementos de concentraciones establecidas como valores máximos admisibles de las descargas de aguas residuales en el sistema de recolección del servicio de alcantarillado sanitario y la transición de estos valores en relación a la dilución de la ciudad y los efectos generados y proyectados en la operación y mantenimiento de la red colectora y plantas de tratamiento de desagüe, con la finalidad de incentivar en los usuarios no domésticos la adecuación de sus sistemas con un pre tratamiento antes de verter sus desagües a la red colectora. La cual al no cumplir la definición de rangos de parámetros estipulada por esta entidad se hará acreedor de un pago adicional en base a los rangos establecidos.

El pago adicional a ser aplicado a los usuarios No domésticos que producen agua residual No doméstica con concentraciones de DBO, DQO, SST y Aceites y Grasas por encima de los Valores Máximos Admisibles del Anexo n° 1 del D.S. n° 021-2009-vivienda, en adelante VMA, será aplicado sobre la estructura tarifaria previamente definida entre SEDAPAL y la SUNASS. Por tanto, únicamente los usuarios que opten por arrojar en la red colectora pública agua residual No doméstica con concentraciones de DBO5, DQO, SST y Aceites y Grasas por encima de los VMA deberán realizar el pago adicional.

La producción mundial anual de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa. El éxito de los productos lácteos y la obtención de nuevos productos ha aumentado la producción de lactosuero, la cual se incrementa año con año, situación de la que nuestro país no es la excepción. El suero producido en Perú es de aproximadamente de 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína verdadera. A pesar de esta riqueza nutricional, potencialmente utilizable, el 47% de lactosuero es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación. La descarga continuada de suero en estos ecosistemas altera sus propiedades fisicoquímicas. En el caso de los suelos, disminuye el rendimiento de las cosechas, pero además se observa el fenómeno de lixiviación. Este fenómeno se presenta porque el lactosuero contiene nitrógeno soluble en agua, el cual es arrastrado a través de diversas capas llegando hasta los mantos freáticos y convirtiéndose en un peligro para la salud de los animales y humanos. Una industria quesera media que produzca diariamente 40,000 litros de suero sin depurar genera una

contaminación diaria similar a una población de 1,250,000 habitantes. Por ello es importante que las industrias lácteas utilicen el lactosuero con el fin de no contaminar el ambiente.

El suero como subproducto proviene de la coagulación de la leche durante la fabricación de quesos. Es un líquido compuesto principalmente de agua, materia grasa, lactosa, proteínas, vitaminas y minerales. Constituye además el problema más difícil de resolver con respecto al tratamiento de las aguas residuales de la industria láctea y se estima que entre el 60 y 70% de la carga orgánica total de los efluentes industriales corresponde a suero (Concha García, 2014).

La leche entera presenta una DBO de 110 000 mg/L y la leche descremada un valor de 80.000 mg/L, donde aproximadamente 45 kilos de leche entera producen 4,5 kilos de DBO. En cuanto al pH, el valor de éste en los residuos in natura varía entre 4,2 y 9,2, sin embargo, según monitoreos realizados en residuos lácteos se han observados valores entre 2,0 y 12,9 con un valor promedio de 7,5. Estas aguas residuales tienen la tendencia a volverse ácidas muy rápidamente por la fermentación de la lactosa que se transforma en ácido láctico, principalmente en ausencia de oxígeno disuelto y el pH bajo resultante puede causar la precipitación de la caseína. Los vertidos de las plantas de producción de queso son especialmente ácidos por la presencia del suero. La concentración de sólidos en suspensión varía en función de las operaciones industriales y los valores oscilan entre 400 y 2.000 mg/L.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MÉTODO DE ESTUDIO

La presente investigación es de tipo aplicativo.

3.2. LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio del Instituto de Investigación Tecnológico Agroindustrial (IITA) en el Área de Bioprocesos Agroindustriales y el Laboratorio de Investigación de la Escuela Académico Profesional de Biotecnología en la Universidad Nacional del Santa, en conjunto con el laboratorio de Tecnologías Limpias y/o emergentes de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de Trujillo.

3.3. MATERIAL DE ESTUDIO

3.3.1. Biológico

Se utilizó la cepa, el hongo: *Aspergillus niger* ATCC 9642, como microorganismo productor de ácido cítrico, dicha cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642 y proviene de National Center for Agricultural Utilization Research del Departamento de Agricultura de Estados Unidos.

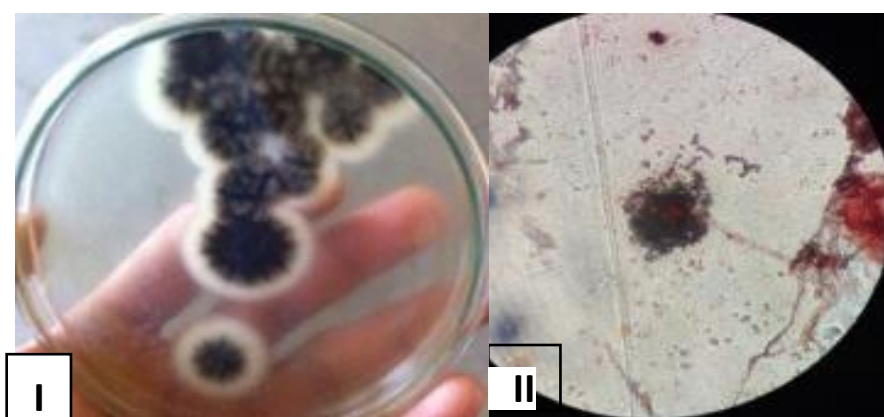


Figura 6.. I. Cepa fúngica de *Aspergillus niger* ATCC 9642 en agar papa dextrosa(PDA); II. Vista microscópica del conidióforo de *A. niger* a 100 X, con tinción Safranina.

Lactosuero dulce: Donado por el fundo San Luis, Santa, Ancash-Perú. En la figura 7 se muestra la representación visual del lactosuero conservado a una temperatura de 4°C en un envase de vidrio.

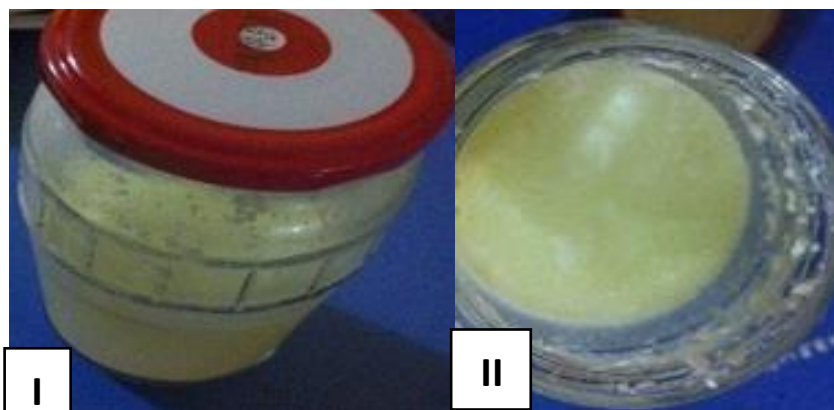


Figura 7. I. Muestra de lactosuero en frasco de vidrio luego de haber sido esterilizado; II. Lactosuero conservado a 4°C en envase de vidrio estéril.

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Descripción de la materia prima

La muestra de lactosuero fue recolectada de los residuos lácteos del proceso de elaborar el queso en el fundo San Luis, Santa, Ancash-Perú; teniendo en cuenta la ausencia de hongos u otro factor que pueda alterar el proceso en la fermentación.

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para demostrar el rendimiento de la producción de Ácido Cítrico, se llevó a cabo un diseño 2^K, a través de los procesos de Fermentación Sumergida usando la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642. (Ver Anexo 2)

3.5.1. Medio de Producción

La cepa se sembró en dos medios de cultivo sólido recomendados para este género de hongos (Smith y Onions, 1983; Domsch et al., 1980) y se incubaron a una temperatura de 30 °C durante 7 días. Los medios empleados fueron: Agar Czapeky PDA

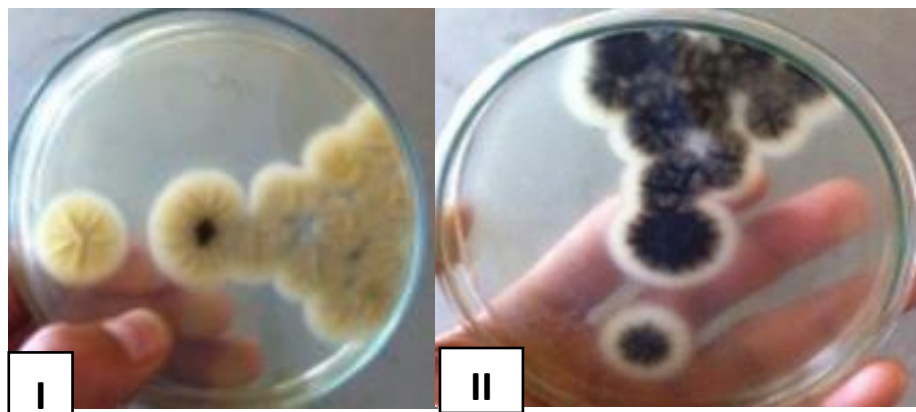


Figura 8. I. Siembra de *Aspergillus niger* ATCC 9642 en agar papa dextrosa (PDA); II. Vista de colonias de *A. niger* después de 4 días a 30 °C.

La cepa de *Aspergillus niger* ATCC 9642 fueron conservadas en tubos con agar Sabouraud inclinado cubiertas con aceite mineral estéril bajo refrigeración a 4°C, las cuales serán sub cultivadas cada 2 meses (Smith y Onions, 1983).

3.5.2. Tratamiento y Conservación del Lactosuero

Se utilizó lactosuero dulce que fue suministrado por el fundo San Luis que tiene su pequeña fábrica local de productos lácteos en Buenos Aires – Nuevo Chimbote, a una concentración de 6.25% de Lactosa y determinado por el método de Fehling (Concha García, 2014), la cual fue conservada a una temperatura de 4°C en un envase de vidrio en la refrigeradora del laboratorio del IITA de la UNS, la cantidad fue de 1 L de las cuales 320 mL se utilizó por cada réplica, haciendo un total de 1 corrida con tres réplicas, 40 mL fueron para determinar pH-incator strips-Merck, % lactosa determinado por el método de Fehling (Concha Garcías, 2014), conductividad y OD con el (multiparámetro thermo scientific), Acidez titulable (Guía de Bromatología, 2007-UBA). Según los requerimientos del diseño experimental al lactosuero antes de someterse al proceso de fermentación se realizó un pretratamiento el que consistió en pasteurizar del lactosuero a 65 °C por 15 min a un pH de 6.2.

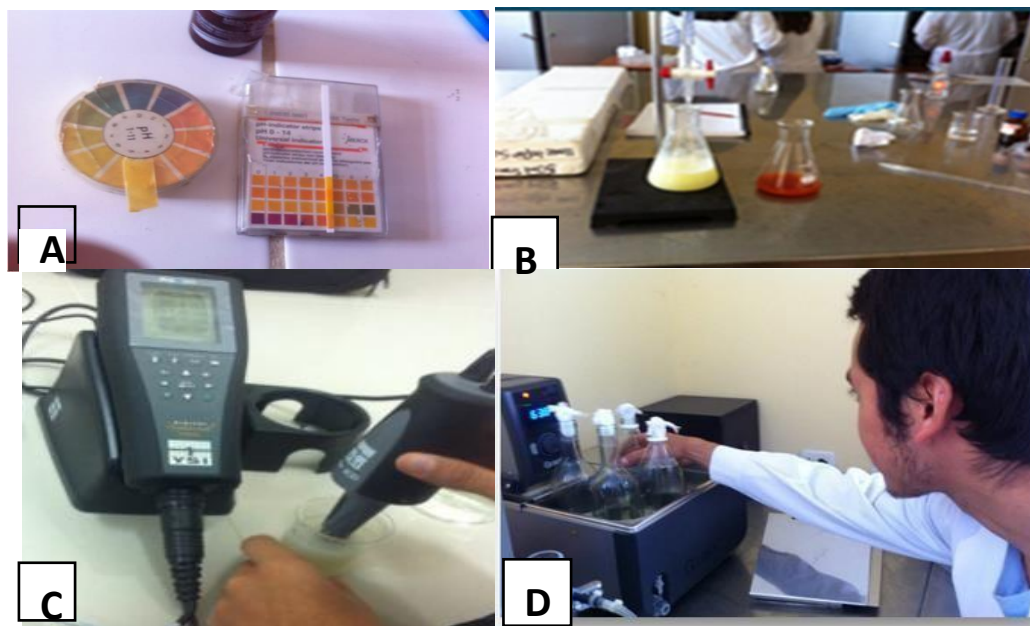


Figura 9. Proceso de tratamiento y conservación de lactosuero, A. Medición de pH-incator strips-Merck, B. % de lactosa determinado por el método de Fehling, C. Medición de conductividad y OD usando el (multiparámetro Thermo Scientific), D. Pasteurización del Lactosuero

3.5.3. Conteo de Esporas para el Inóculo

Se preparó Tween 80 al 0.8% en un volumen de 5 mL agua destilada (Concha García, 2014), Luego se vertió esta solución en la placa que contenía el *A. niger* ATCC 9642, para finalmente ser vertido el inóculo en cada matraz (4 matraces Erlenmeyer). De la solución (inóculo) se sacó una alícuota de 100 microlitros los cuales fueron colocados en cámara Neubauer en el microscopio, se hizo el conteo respectivo obteniéndose $2,6 \times 10^6$ esporas/mL.

3.5.4. Caracterización Físicoquímica en el IITA de la UNS

La caracterización física-química de la muestra de lactosuero fue realizada en los laboratorios de control de calidad del IITA de la UNS utilizando el multiparámetro Thermo Scientific. Se obtuvieron 8.67 mg/L de oxígeno disuelto (OD), 4.3 de pH, y 7.7 ms/cm de conductividad.

3.5.5. Condiciones para el Medio de Fermentación sumergida

Los cuatro tratamientos para las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces agitados de 250 mL que contenían 100 mL de medio de cultivo con lactosuero como fuente de carbono al cual se le suplemento sulfato de amonio 2 g/L como fuente de nitrógeno y fosfato dipotásico en ppm como fuente de K y P. pH inicial fue tuvo un valor de 6.2. Los tratamientos fueron inoculados con una suspensión de esporas equivalente al 5% del volumen total. Posteriormente, se incubaron en agitación continua a 150 rpm en un Biorreactor ubicado en el laboratorio de biotecnología agrícola a una temperatura de 30°C. Los tratamientos se corrieron durante 4 días.

Tabla 4.

Concentraciones de lactosuero y K₂HPO₄ en cada tratamiento

TRATAMINETOS	Lactosuero (%)	K ₂ HPO ₄ (ppm)
1	90	380
2	90	360
3	70	380
4	70	360

Fuente: Propio autor.

3.5.6. Cuantificación de Lactosa

Fundamento: Poder reductor del azúcar sobre la sal cúprica del reactivo.

Procedimiento:

a. Cálculo del Título de Fehling

Colocar en una bureta la solución de glucosa al 5 x 1000

Colocar en un erlenmeyer de 250 mL, 10 mL de Fehling A y 10 mL de Fehling B exactamente medidos, añadir 25 mL de agua destilada y someter a fuego directo hasta ebullición constante.

Dejar caer gota a gota desde la bureta la solución de glucosa hasta viraje del color azul al amarillo, para terminar en pardo. Anotar el gasto obtenido (UCSM).

Título de Fehling = Gasto de azúcar reductor x 51000=

Título de Fehling = 50 x 51000=0.25

b. Determinación de Lactosa

Colocar el lactosuero en una bureta y dejar caer gota a gota sobre un matraz que contiene 10 mL de Fehling A y 10 mL de Fehling B más los 25 mL de agua destilada y continuar en forma similar al cálculo de título de Fehling, hasta obtener el color pardo o rojo ladrillo (UCSM). $\text{g\% de lactosa} = \frac{\text{Título de Fehling}}{\text{Gasto de Lactosuero}} \times 100$ $\text{g\% de lactosa} = \frac{0.254 \text{ mL} \times 100}{4} = 6.25$

3.6. Cuantificación de Biomasa por Peso Húmedo

Para determinación de peso húmedo se tomaron muestras de 1 mL del caldo de fermentación de cada tratamiento y se colocaron sus respectivos tubos (4) de ensayos previamente pesados. Luego los tubos son llevados a la centrifuga 5 000 RPM, por un tiempo de 5 minutos. Luego pasamos a pesar cada tubo de ensayo en la balanza analítica del laboratorio de investigación, anotamos los pesos y por diferenciales obtenemos la biomasa en g/L (Martínez Saldaña, Yurico Elizabeth, 2012).

3.7. Cuantificación de Ácidos orgánicos expresados como Ácido Cítrico

El sobrenadante obtenido de las muestras de caldo de fermentación del método anterior se sometió a análisis para su determinación en contenidos de lactosa, fuente de carbono proporcionado por el lactosuero (S, g./l.) por el método de Fehling, y la cuantificación de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico (AC, g./l.) de acuerdo al

método de titulación potenciométrica descrito en la AOAC (2005) que consistió en colocar 2 mL de sobrenadante completamente limpio de sólidos en un beaker de 50 mL. y se le añadió 9 mL. de agua destilada desionizada en agitador magnético a temperatura ambiente al cual se le colocó unatira de pH, determinando su valor y se añadió gota a gota solución de NaOH 0,01N ($fc=0,9981$) hasta obtener rangos alcalinos y, utilizando su curva potenciométrica se determinó el volumen de neutralización con el que se calculó la concentración de ácido en la muestra de acuerdo a la siguiente ecuación: C_p (g. Ac.Cítrico/l.) = $6,4043 \cdot 10^4 fc \cdot N \cdot V$

Donde:

C_p: concentración de ácidos orgánicos expresado como ácido cítrico; g./l.

N: normalidad de la solución titulante de NaOH; eq-g./l.

V: volumen de la solución titulante utilizada; l.

fc: factor de corrección de la solución titulante

Todos los ensayos se ejecutaron por triplicado para validez y significación estadística.

Para la concentración de ácido cítrico en el tratamiento 1 se obtuvo un $C_p=0.703134$ g/L, y para el tratamiento 2 se obtuvo un $C_p=0.575292$ g/L, para el tratamiento 3 se obtuvo un $C_p=1.086662$ g/L y para el tratamiento 4 se obtuvo un $C_p=1.022741$ g/L.

3.8. Método HPLC

Las muestras de la fermentación de la segunda réplica se sacaron muestras a las 12, 24, 48, 72, 96 horas, pero solo se llevaron a analizar los puntos de las 96 horas de la réplica 1 y 2, de los cuatro tratamientos. Los equipos y se describen a continuación:

Equipo: Sistema cuaternario UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid

SeparationColumn: SHODEX SUGAR SH1011

Detector: UV (210 nm)

Condiciones de ensayos:

-Temperatura de columna: 50°C

-Eluyente: H₂SO₄ 0.01 N

-Flujo: 1.0 mL/min

-Volumen de muestra: 10 uL

Para las curvas estándar, se utilizaron: ácido cítrico monohidrato (JTBaker) y L,D-ácido láctico (Sigma)

El rango de concentración de la curva de calibración para ácido cítrico está entre 10 y 1000 ppm (partes por millón). 1 ppm = 1 mg/L

Sobre las muestras:

Donde dice Injection Name está el rótulo de la muestra.

Los picos de ácido cítrico salen a 6.7 minutos en las condiciones del ensayo.

Se diluyeron con agua ultrapura. Se filtraron las muestras con filtros nylon, y se añadieron en microviales.

Los valores de cada muestra (en ppm) de los compuestos ácido cítrico u otros ácidos se muestran en las Tablas debajo de los cromatogramas en la columna "Amount", se puede ver el valor (en ppm) para cada compuesto. Si dice n.a. quiere decir que no hay una concentración detectable del compuesto en la muestra.

El compuesto glicerol que aparece en los cromatogramas es un estándar interno, no está presente en sus muestras, así que no lo consideren como parte de su muestra. Ese procedimiento se realizó para la curva patrón del ácido cítrico (Ver Anexo 2).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los valores obtenidos a partir de la investigación nos muestran una producción de Ácido Cítrico inicial significativa a las 72 horas (Fig.10).

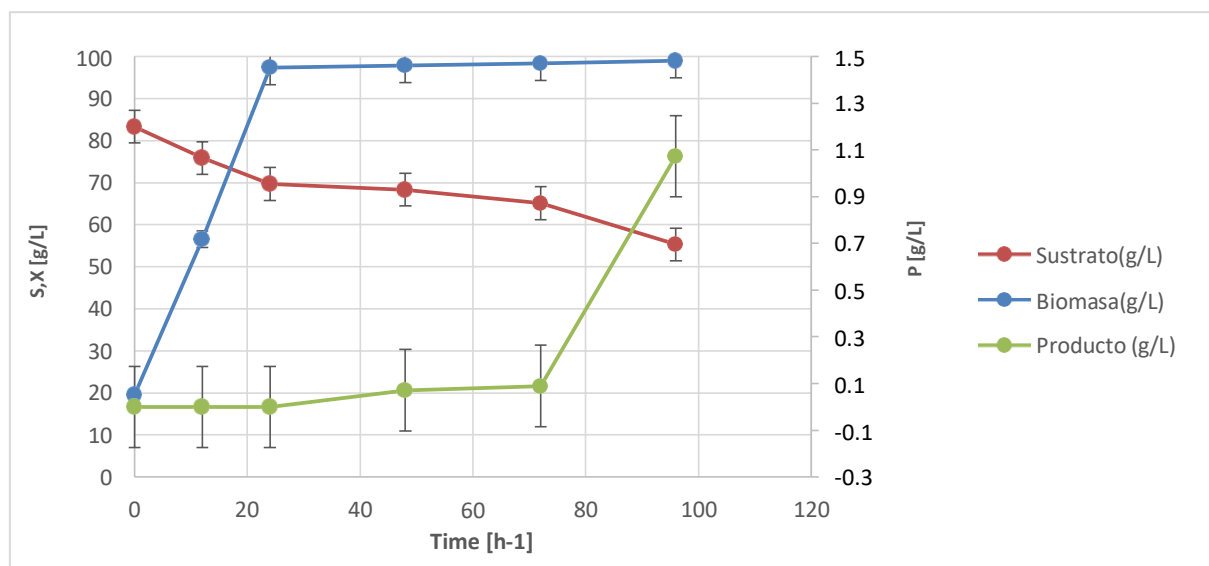


Figura 10. Datos cinéticos de la fermentación al 90% de lactosuero y 380 ppm de K_2HPO_4 para la producción de ácido cítrico utilizando *A. niger* ATCC 9642.

Con un aumento en la síntesis a las 96 horas en la Idiofase, favorecido por la temperatura de $30^{\circ}C$ y una agitación de 150 RPM para no dañar morfológicamente a la cepa; aunque el consumo de lactosa no pudo ser aprovechado al 100 % debido a que la cepa tiene mayor afinidad por la glucosa, tal y como lo reporta Sánchez Toro y col. (2004) y solo fue utilizado un 34% aproximado. Mientras que Concha Waleska et al, (2014) registran un porcentaje mayor de utilización de lactosa como sustrato, un aprox. de 59,56 % a $20^{\circ}C$ y de 45,78% a $30^{\circ}C$, lo que demostró que es posible aumentar esta conversión moviendo otros factores o, permitiendo un mayor período de fermentación lo cual se evidenció para el *A. niger* evaluado en este medio debido a que finalizados los 8 días de monitoreo la cepa fungal no presenta estado estacionario que no podría ser descrito por las ecuaciones de crecimiento analizadas en el sistema batch conformado.

La figura 11 muestra un mayor consumo de sustrato respecto al crecimiento de biomasa y producción de Ácido Cítrico a partir de las 48 horas.

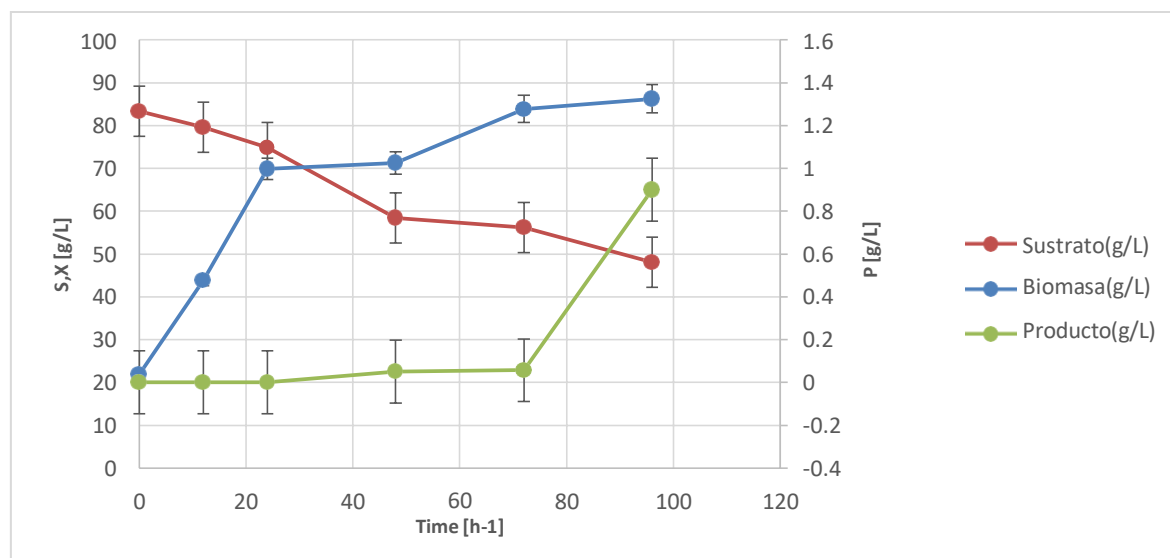


Figura 11. Datos cinéticos de la fermentación al 90% de lactosuero y 360 ppm de K₂HPO₄ para la producción de ácido cítrico utilizando *A. niger* ATCC 9642.

Esto demuestra que la fase adaptativa (fase lag) del microorganismo es lenta debido a que la lactosa no es una fuente de carbono muy aprovechable. La biotransformación del nutriente carbonado (lactosa, principalmente) proveniente del medio de cultivo ensayado, se determinó por su consumo o desaparición por medio del mecanismo biocatalítico ejercido por la ruta metabólica activa de la cepa fungal de *A. niger* que efectúa conversión enzimática de la lactosa (disacárido) en sus unidades más pequeñas (glucosa y galactosa) que resultan ser mayormente más digeribles y asimilables por el microorganismo tal y como lo reporta Sánchez Toro et al, (2004), quienes describen el mecanismo biocatalítico activo multienzimático generado por el metabolismo fungal del *Aspergillus niger* ensayado para romper y craquear moléculas poliméricas y/o de alto peso molecular en unidades más pequeñas asimilables que permiten ejecutar mayor cinética de producción de metabolitos primarios y secundarios en medio sumergido.

Como se muestra en el gráfico 12, la capacidad de la cepa microbiana evidencia un grado de rendimiento menor comparado con el gráfico 1, en parte debido a que el tratamiento 3 tiene un 70 % de lactosa y no varió en la concentración de Fosfato

dipotásico.

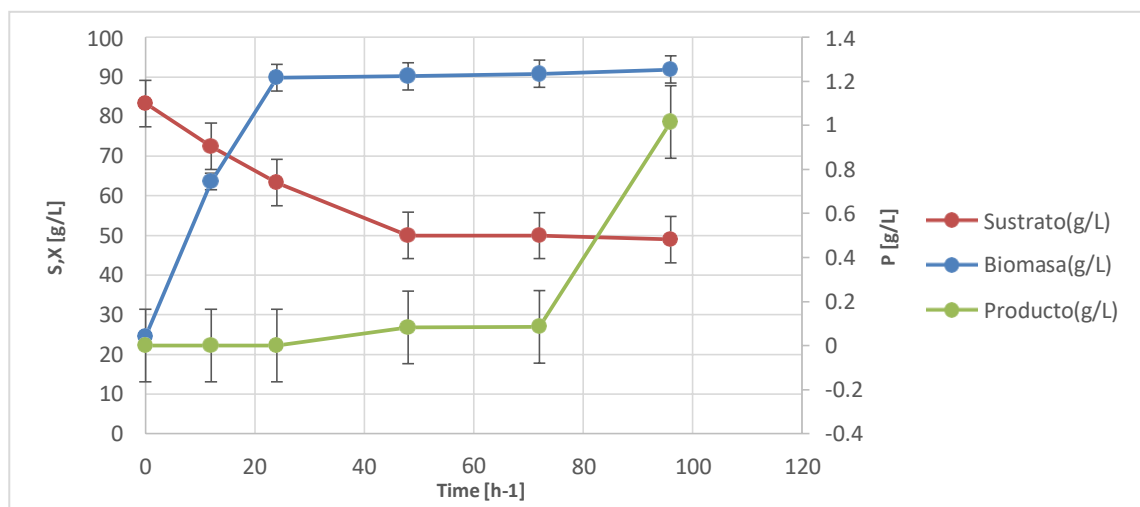


Figura 12. Datos cinéticos de la fermentación al 70% de lactosuero y 380 ppm de K_2HPO_4 para la producción de ácido cítrico utilizando *A. niger* ATCC 9642.

Como medio de cultivo, el suero de leche puede suministrar las fuentes de carbono y de energía, necesarias para el desarrollo de diferentes microorganismos y la producción de metabolitos de alto valor. El número de microorganismos que tienen la capacidad de asimilar la lactosa es limitado, pero al hidrolizar este disacárido y obtener glucosa y galactosa mediante un proceso enzimático empleando p-galactosidasa (lactasa), se amplían significativamente las perspectivas de aprovechamiento del suero en procesos de fermentación (García et al., 1993). Adicionalmente, se ha iniciado el estudio del suero de leche como medio alternativo para el cultivo de microorganismos recombinantes (Souza et al., 2001; Domínguez et al., 2001).

La producción de biomasa a las 96 horas de fermentación es de 4.8 g/L con 70 % de lactosuero y 380 ppm de K_2HPO_4 , el cual este perfil de tratamiento nos da la segunda mayor proporción de biomasa después del tratamiento 1 (90% de Lactosuero y 380 ppm de K_2HPO_4), debido a que se encuentra un nivel de porcentaje más diluido; además nos

da un rendimiento de producción de Ácido cítrico después también del tratamiento 1, y en nuestro concepto ello indica que a menor dilución del azúcar reductor tendremos una mayor producción de nuestra variable de respuesta.

Otro autor como Concha, (2014) hace referencia al efecto de la temperatura de 30 °C como el óptimo para la bioproducción de este ácido orgánico, el cual también se tomó como la temperatura de operación en el diseño experimental, adicionalmente el autor referido llevo a cabo un pre tratamiento (Lactosuero desproteínizado) y logro obtener hasta 0.047 g de ácido cítrico por gramo consumido de lactosa, pero consumido en mayor tiempo (8 días), con un nivel de confiabilidad estadística de 95% con ayuda del SPSS v21.

En la fig.13 se observan los resultados obtenidos durante 4 días de fermentación empleando el medio líquido seleccionado en un biorreactor agitado de 3 L con aireación de 150 rpm

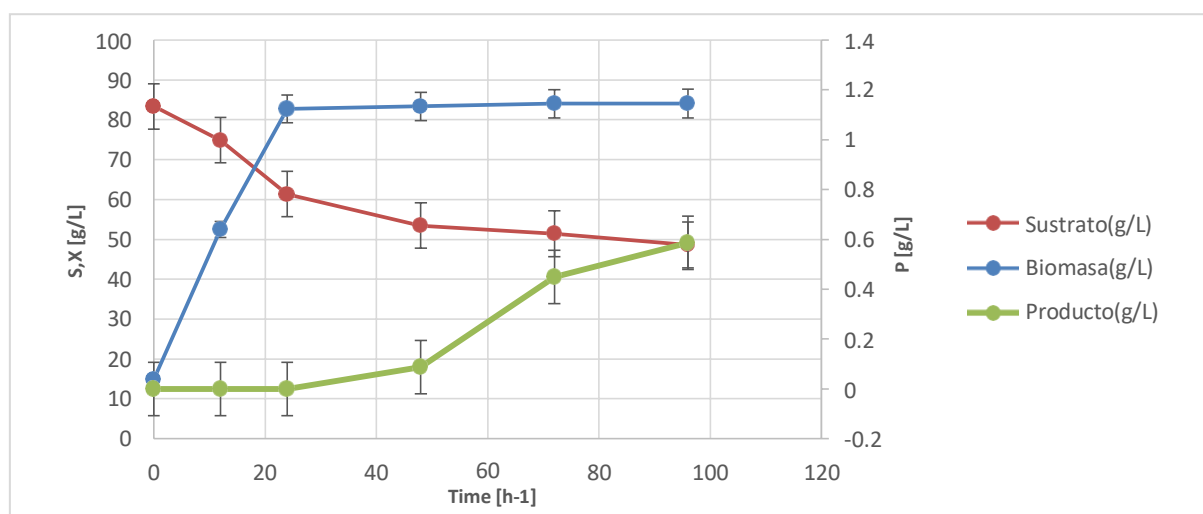


Figura 13. Datos cinéticos de la fermentación al 70% de lactosuero y 360 ppm de K₂HPO₄ para la producción de ácido cítrico utilizando *A. niger* ATCC 9642.

Las cinéticas de sustrato, biomasa y producto. A lo largo de la fermentación se pudieron apreciar los agregados miceliales del hongo. (pellets), debido a que en este tratamiento se realizaron con las menores concentraciones de sustrato y fuente de fósforo y nitrógeno. De los datos cinéticos obtenidos se observó el crecimiento celular finalizando la trofofase, a partir del cual el cultivo entró en fase exponencial. La concentración de sustrato

disminuyó significativamente en la fase exponencial hasta las 96 h (4to día); sin embargo, al final de la fermentación no se alcanzaron a consumir todos los azúcares reductores disponibles en el medio, lo que indica que es necesario aumentar la conversión del sustrato.

Los rendimientos tanto de biomasa como producto resultan ser muy bajos para lo esperado debido a diversos factores entre ellos la aireación, y una combinación única tanto de nutrientes como de condiciones poco usuales (ciertos metales traza, oxígeno disuelto y concentración de fosfato) para que la bioquímica de la producción de este ácido orgánico se vea favorecida en gran medida y así tener mayor rendimiento de producto sobre sustrato que asimismo afecta la productividad volumétrica, que es un parámetro muy importante cuando se realiza fermentaciones a gran escala, y así poder decidir sobre el posible uso del Lactosuero como fuente de carbono en reemplazo de la melaza muy utilizado a escala industrial para producir ácido cítrico; otro punto que va en detrimento de la producción de la variable de respuesta es la caracterización del potencial bioquímico de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642 lo cual determino que es baja producción después del ejecutado los tratamientos con un nivel de confiabilidad del 95% usando el paquete estadístico Minitab 17.

La tabla 4 es el resultado de un diseño factorial 2^K y así poder evidenciar una combinación de los 2 niveles de factores (Concentración de lactosuero y del Fosfato dipotásico) que influyen en la variable de respuesta que es la concentración de ácido cítrico formado durante la Fermentación aeróbica de 96 horas. Y el mejor tratamiento se escaló a un biorreactor de 3 litros del IITA (Instituto de Investigación Tecnológico Agroindustrial, de la Universidad Nacional del Santa) de tanque agitado con el mejor tratamiento 1 para poder tener un conocimiento mayor sobre la operación y puesta en marcha del equipo (ver Figura 11 inciso D).

Además, la constante cinética de crecimiento microbiano luego de su cálculo dio un valor aproximado de 0.03 h^{-1} (ver Anexo 13), para el cual muestra un desarrollo fungal pero no es tan formador de ácido cítrico el cual es la variable de respuesta y también formando otros ácidos orgánicos como ácido fórmico y ácido acético mostrado en el método HPLC; a pesar de ello la cepa puede formar ácido cítrico eso conlleva a que el lactosuero pueda ser prometedor para la producción de productos de interés industrial y así evitar su vertimiento a la red doméstica o en su defecto a cuerpos de agua como lagos y ríos que desembocan al

mar causando la eutrofización de los mismos debido a su contenido químico.

Otro punto peculiar es la mayor producción de biomasa que de producto de interés, debido a que hay un incremento de la actividad de enzimas como la aconitasa, isocitrato deshidrogenasa y succínico deshidrogenasa las cuales resultan favorecidas por el contenido nutritivo de elementos que presenta el lactosuero, por ejemplo la deficiencia de manganeso y fósforo disminuye en gran medida el anabolismo fungal debido al aumento de la concentración intracelular de NH_4^+ (Habison et al., 1983; Rohr & Kubicek, 1981); dicha concentración inhibe la enzima Fosfofructokinasa (PFK) lo cual acarrea una aglomeración de ácido cítrico como producto final de la serie de condiciones bioquímicas para poder llevar a cabo dicho proceso, y para que se den estas condiciones muy finas se tendría que pre-tratar el lactosuero (hacer un permeado para poder disminuir elementos como el magnesio, zinc, hierro, nitrógeno).

No obstante las condiciones de los elementos traza, no son los únicos y se tendría que hacer distintos grupos de ensayos como el diseño de Box-Behnken y así poder tener más variables independientes para la optimización de dichos parámetros químicos como una alternativa más viable y así poder reutilizar el lactosuero como fuente principal de carbono y energía y elementos traza para la bioproducción de ácido cítrico; aunque tradicionalmente se ha utilizado la melaza pero se filtra y luego se hace pasar por un intercambiador catiónico para tener los niveles óptimos de elementos traza, por ejemplo el manganeso en el medio de melaza ronda en una concentración aproximada de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ y así con los demás micronutrientes para que puede haber un mejor rendimiento en la producción de ácido cítrico.

La condición de aireación también juega un papel importante porque las vías utilizadas por la cepa son el ciclo de Krebs y la glucólisis con la presencia de moléculas de alta energía como el ATP y NADH, dicho oxígeno suministrado en forma de aire filtrado no se debe descontinuar porque ello conlleva a la disminución de la producción del ácido cítrico; asimismo los parámetros de operación como el pH, agitación son significativos para poder lograr el mejor rendimiento posible tanto con lactosuero como melaza como lo documentan diversos autores pero el más preponderante es (Papagianni, 2007).

A continuación, se muestra la figura 14, donde se evidencia la variación de pH de los 4 tratamientos de la réplica 2.

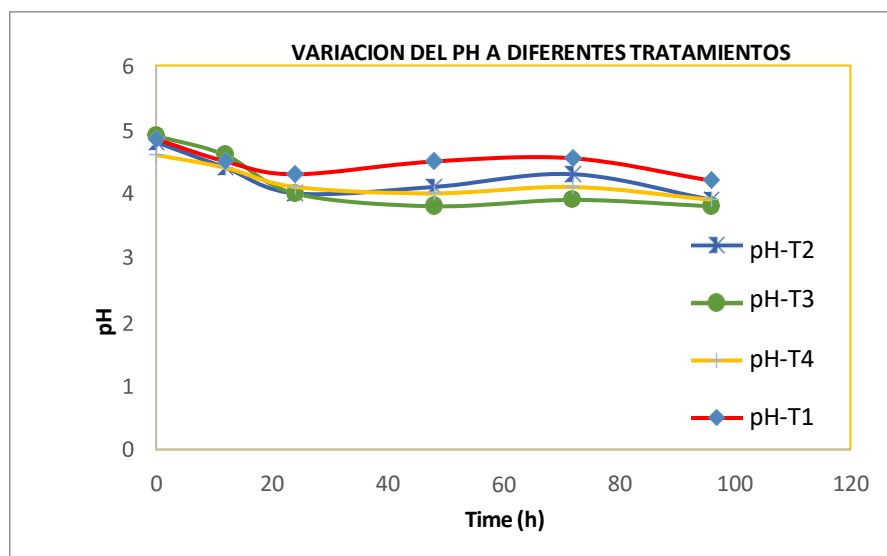


Figura 14. Datos de la Variación del pH a diferentes Tratamientos de la Fermentación.

A partir de las 12 horas de fermentación hay una disminución del pH en los diferentes ensayos debido a que la cepa fúngica metaboliza el lactosuero que contiene azúcares reductores el cual genera un descenso del medio, pero no debido solamente a la formación de ácido cítrico como variable de estudio sino también de otros ácidos orgánicos; a partir de las 24 horas hasta aproximadamente las 72 horas de proceso inicia una etapa de poca variación en el pH para todos los experimentos llevados a cabo, debido a que la fase exponencial de crecimiento no hubo un consumo tan significativo de sustrato que hubo al comienzo porque el medio de fermentación no era el más apropiado para la cepa y también la temperatura. La influencia de la concentración de iones de hidrógeno (pH) es también un aspecto influyente en la bioquímica de producción de ácido cítrico debido a que sus niveles deben ser entre 4.5-6 y también una temperatura en un intervalo de 28- 30°C tanto para fermentación sumergida como para fermentación en superficie y que dichas condiciones deben estar en ese promedio para poder producir el ácido cítrico.

Con respecto al tiempo de fermentación (96 horas) a una temperatura de 30°C los diferentes tratamientos nos muestran una cinética no muy favorable debido a que esta cepa bajo estudio a pesar de las condiciones oportunas y/o favorables tiene la capacidad de producir ácidos orgánicos, pero no tienen una ruta metabólica específica para la

producción de ácido cítrico.

La influencia en el pH es fundamental para el éxito de la fermentación sumergida, por ello inicialmente se necesita un pH bajo aproximadamente de 4-5, si fuera más bajo su nivel causaría inhibición del crecimiento fungal y así poder tener una mejor germinación de los propágulos de la cepa requiriendo un consumo de amonio, este proceso causa una liberación de protones lo que conlleva a una disminución del pH que será de utilidad para la fase de producción de ácido cítrico; no obstante si el pH está en 4.5 a más en la fase de producción el rendimiento se ve afectado dramáticamente en un 80 % aproximadamente, y para que sea efectiva la técnica de producción del ácido cítrico se requiere que el pH disminuya a 2 aproximadamente transcurrida las 2-3 horas del proceso de fermentación, ya que algunas enzimas del ciclo de Krebs son sensibles a dicho parámetro (Papagianni, 2007).

Además el pH de 2-2.02 influye en la morfología de la cepa, ya que puede adaptarse formando pequeños pellets, y forma de filamentos que a su vez ejercen de manera positiva en la bioproducción del ácido de interés, y que a un pH menor al rango mencionado ($\text{pH} < 2$) produce formas morfológicas anormales (bulbo, hifas) y la producción de ácido se redujo dramáticamente, a un pH alrededor de 3 en la fase de producción del metabolito de interés, se produjo la presencia evidente de otro ácido (el ácido oxálico), a pesar de ello cuando se trata de un pH óptimo hay un rango amplio cuando se trabaja con melaza como fuente de carbono y energía y concerniente al Lactosuero se podría utilizar dichos rangos, ya que entre las diferentes fuentes de carbono no habría ese pequeño inconveniente. (Dawson, 1986).

El rango de pH (1.5-3.5) se experimentó también en quimiostato, dando como resultado una velocidad de crecimiento específico de 0.075 h^{-1} , y en general a la productividad de ácido cítrico y de biomasa fueron independientes dentro del intervalo de pH, lo cual sugiere que se necesita más casos de estudio para poder elucidar con una mayor precisión el efecto del pH sobre el rendimiento y la productividad del ácido cítrico.

En la figura 15, se muestran los datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 1 de la Fermentación.

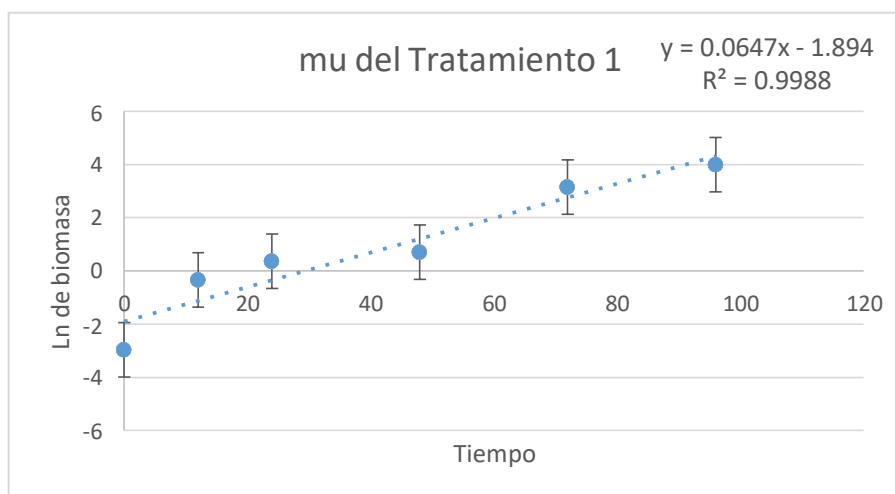


Figura 15. Datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 1 de la Fermentación.

El tratamiento 1, mostró una velocidad específica de crecimiento de la cepa *Aspergillus niger* de 0.0647 h^{-1} con un coeficiente de correlación lineal de 0.9111 que es la mayor de todos los tratamientos del experimento realizado. En este tratamiento se usaron las concentraciones más altas de lactosuero, de la fuente de fósforo y nitrógeno y una agitación de 150 RPM para no dañar morfológicamente a la cepa, cabe recalcar que partiendo con esta agitación en el primer tratamiento se decidió replicar las mismas revoluciones para los posteriores tratamientos del experimento de investigación con el objetivo de mantener lo más estable posible al microorganismo.

En la figura 16, se muestran los datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 2 de la Fermentación.

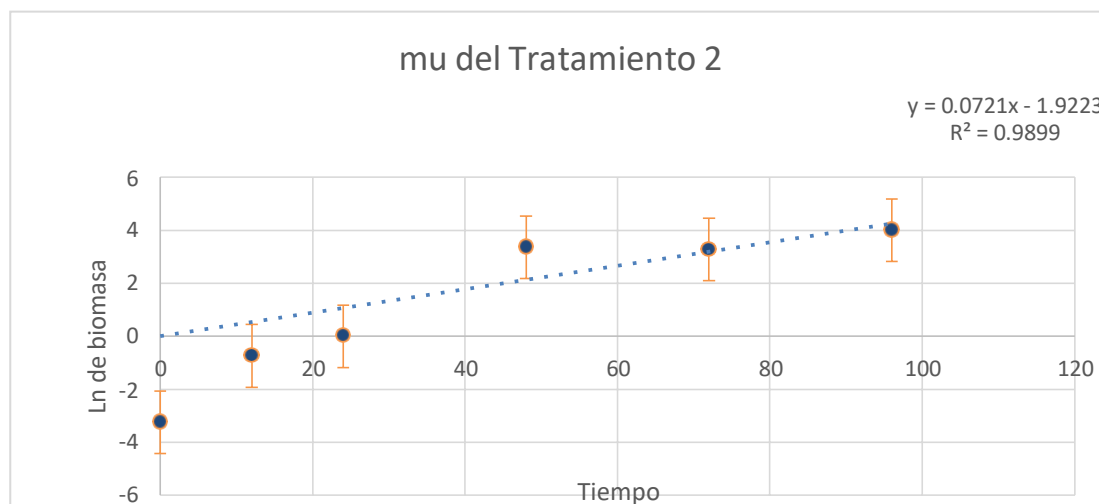


Figura 16. Datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 2 de la Fermentación.

El tratamiento 2 nos muestra una velocidad de crecimiento microbiano específico equivalente a 0.0721 h^{-1} , el cual indica que tuvo mayor aumento de biomasa comparado con el tratamiento 1, evidenciando que un menor pH inicial induce a que el consumo de la fuente de carbono gatilleara el crecimiento de biomasa en lugar de mejorar el rendimiento de la síntesis de producto.

En la figura 17, se muestran los datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 3 de la Fermentación.

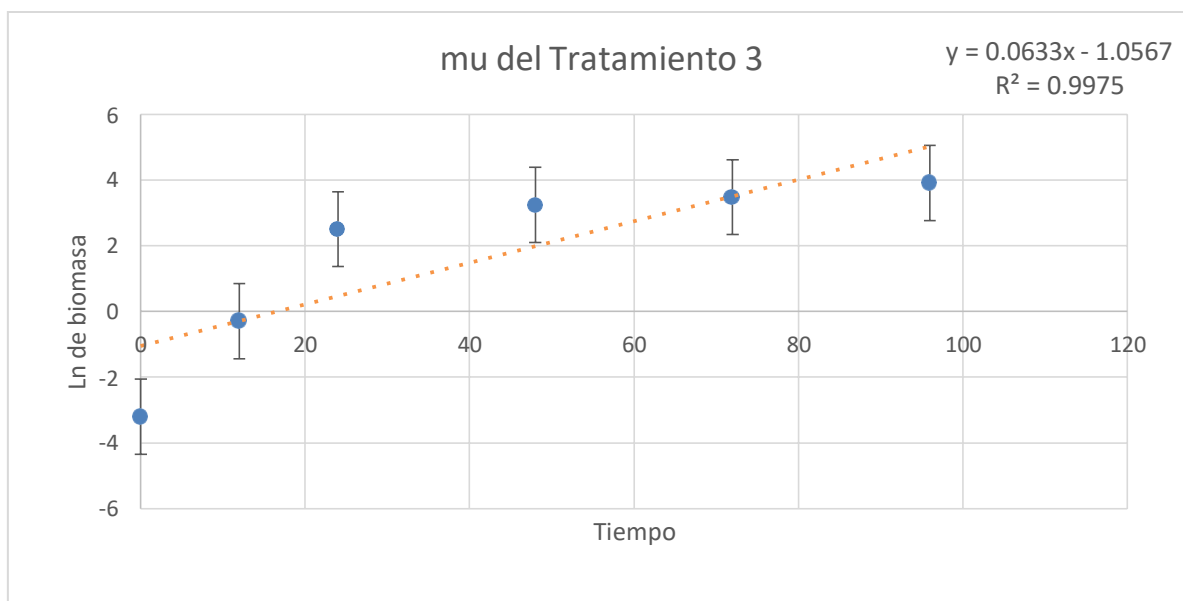


Figura 17. Datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 3 de la Fermentación.

El tratamiento 3 indica que su tasa de crecimiento del microorganismo *Aspergillus niger* fue de 0.0633 h^{-1} , con un coeficiente de correlación de Pearson semejante a 0.7031, en este caso el aumento de biomasa fue ligeramente menor al tratamiento 1 y 2 esto debido a que el % de la fuente de carbono (lactosuero) fue menor al de los 2 primeros tratamientos, pero no varió en la concentración del fosfato dipotásico, demostrando que el lactosuero podría tener el potencial de suministrar los nutrientes necesarios como fuente de carbono y energía para un regular crecimiento de biomasa.

El tratamiento 3 indica que su tasa de crecimiento del microorganismo *Aspergillus niger* fue de 0.0633 h^{-1} , con un coeficiente de correlación de Pearson semejante a 0.7031, en este caso el aumento de biomasa fue ligeramente menor al tratamiento 1 y 2 esto debido a que el % de la fuente de carbono (lactosuero) fue menor al de los 2 primeros tratamientos, pero no varió en la concentración del fosfato dipotásico, demostrando que el lactosuero podría tener el potencial de suministrar los nutrientes necesarios como fuente de carbono y energía para un regular crecimiento de biomasa.

En la figura 18, se muestran los datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 4 de la Fermentación.

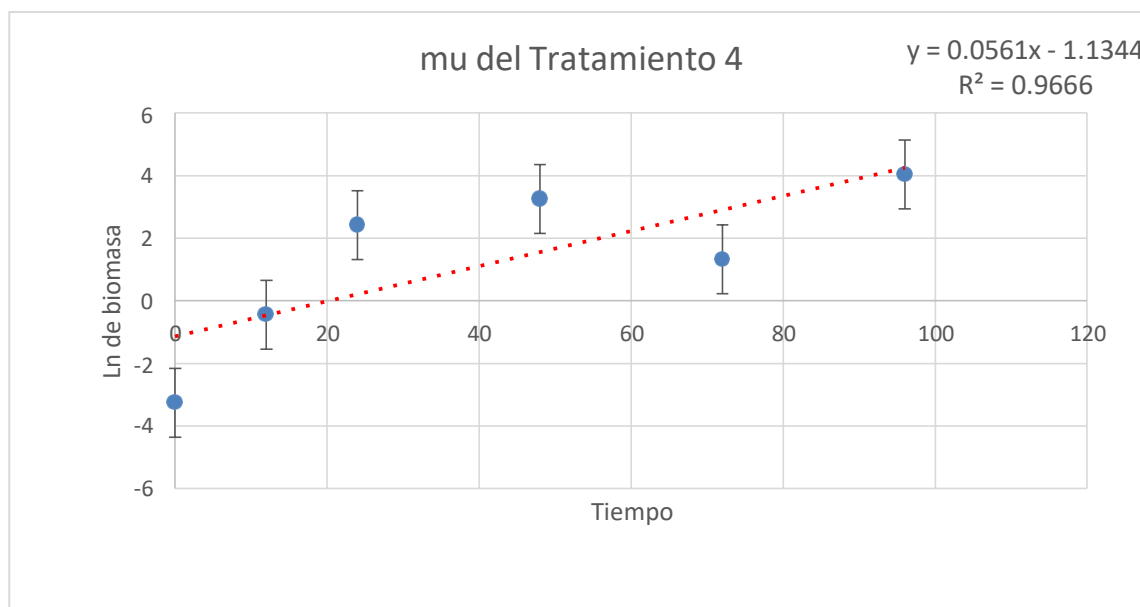


Figura 18. Datos de la velocidad específica de crecimiento (μ) del tratamiento 4 de la Fermentación.

En el tratamiento 4 el resultado de la velocidad específica de crecimiento (μ) fue equivalente a 0.0561 h^{-1} , con un coeficiente de correlación de Pearson menor debido a que la aireación y el control del pH fue bajo en las horas de la fermentación del experimento, también se puede evidenciar que fue el tratamiento con menor concentración de lactosuero y fuente de fósforo y nitrógeno en el medio de cultivo. Por ello es que según la cinética obtenida se observa el crecimiento celular finalizado en la trofofase.

La tasa del crecimiento microbiano (μ) en el medio fermentativo está en función del nutriente limitante, pero en este caso uno de los parámetros de mayor influencia fue el pH, debido a que un pH por debajo de 3.8, mostró un aumento en la biomasa, pero un aumento bastante poco significativo de ácido cítrico en las horas intermedias del proceso de la fermentación. También se ha evidenciado que dentro de los elementos menores el de mayor influencia en la morfología de *Aspergillus niger*, es la concentración del manganeso (Mn). Se estudió la morfología y la composición de la pared celular de *A. niger* en condiciones de suficiente y deficiente manganeso (Mn) en diferentes medios fermentativos

productores de ácido cítrico. Lo que demostró que una menor cantidad de iones de manganeso (menos de 10^{-7} M) del medio nutritivo resultó en un anormal desarrollo morfológico que se caracterizó por un aumento de la hinchazón de las esporas y hifas. Y los iones de manganeso influyeron en la ramificación y síntesis de quitina. Cambios morfológicos, que incluyeron la ausencia de células hinchadas y reducción de diámetros de los filamentos, acompañada de una reducción del 20% en el rendimiento de ácido cítrico, después de adición de 30 mg/l Mn a un medio libre de Mn (Papagianni et al., 1995).

La producción de ácido cítrico está relacionado entre otras variables directamente con la fuente de carbono que proviene del Lactosuero, debido a que la lactosa es un disacárido de desdoblar debido a que la cepa tiene mayor afinidad enzimática sobre otro tipo de disacárido el cual es la sacarosa que proviene de otras fuentes naturales como la caña de azúcar, remolacha, pulpas de fruta; estas fuentes deben estar en concentración inicial aproximada de 14-22% de azúcar el cual incrementa la biosíntesis de ácido cítrico (Shu and Johnson, 1948; Honecker et al., 1989); y otros autores realizaron experimentos con maltosa, sacarosa, manosa, fructosa, sorbosa, celobiosa, xilosa, arabinosa fueron evaluadas obteniendo una producción promedio de 10% p/v donde su investigación sobre la influencia de la concentración y tipo de fuente de carbono nos dice un adecuado nivel de carbono permite la inhibición de la enzima α -cetoglutarato deshidrogenasa generada por el sustrato.

La viabilidad de las diversas fuentes de carbono, de acuerdo a la capacidad metabólica de *Aspergillus niger* fueron evaluadas indicando que todas fueron medianamente asimilables con excepción del ácido acético. También la galactosa es una fuente de carbono pobre para el incremento de la biomasa y además de bajo aprovechamiento de ácido cítrico; a pesar de la buena afinidad por glucosa, sorbitol, manosa, maltosa, fructosa solo se generó un mayor rendimiento de ácido cítrico mayor que en las fuentes de glucosa y fructosa debido a su naturaleza biológica fungal. También la capacidad de la cepa al parecer no se ve afectada por las diferentes concentraciones de las diversas fuentes de carbono; aunque un incremento de 1-14% en alguna de las fuentes de carbono mencionadas gatilla un lapso de tiempo de retraso en el crecimiento de la biomasa de 12 a 18 horas disminuyendo la tasa de crecimiento de un 20% aproximadamente, y lo más probable que el efecto de estos carbohidratos sean utilizados para la una mayor producción de biomasa y no tanto producto. También se ha evaluado si el micelio de la cepa de *Aspergillus niger* pre-

cultivado en menores concentraciones de disacáridos no sintetizarían una cantidad significativa de citrato, sino que la excretarían cuando sean sembradas en los medios definidos con un alta concentración de azúcar como en nuestros tratamientos experimentales; sin embargo se observaron altos rendimientos en concentraciones menores de azúcar similares a las que obtuvieron en nuestro experimento que se llevaron a cabo en cultivo sumergido, demostrando que la capacidad de producción del metabolito de interés va a variar según cada cepa y según las concentraciones iniciales de las diversas fuentes de carbono y su disponibilidad para ser metabolizados Xu et al. (1989).

Como es evidente la formación de ácido cítrico requiere de la síntesis de proteínas específicas. Como se ha documentado en los experimentos que el tipo de fuente de carbono y su concentración en el medio ejerce un efecto evidente en la bioacumulación de ácido cítrico mediante la inducción de las condiciones metabólicas para la cepa y los requerimientos nutricionales en el medio, que una vez establecidas parece mantenerse estable en el tiempo.

En cuanto a lo que resulta de morfología fúngica relacionada con la producción de ácido cítrico estudiados en los diferentes medios de fermentación y según la investigación de (Papagianni, 2007) hay una controversia sobre la forma pelletizada o filamentosa del *Aspergillus niger* porque es todavía poco conocido su relación con la producción del ácido cítrico porque a pesar de ello va a variar según el tipo de cepa y otras variables de operación como son la velocidad de agitación, concentración de la fuente de carbono, pH, elementos traza o micronutrientes, temperatura, fuente de nitrógeno y limitación de fosfato y tipo de fermentación; todos estas características mencionadas ejercen una influencia sobre la formación de pellets y que serán de utilidad en el proceso de depurificación de ácido cítrico. Según otro caso de estudio demostró una relación entre la morfología y la productividad esto visible en el proceso de fermentación usando diferentes biorreactores, mientras que la agitación está asociada con el desarrollo de filamentos cortos y ramificados que tienen la capacidad de producir ácido cítrico. Sin embargo, si hay una fuerte agitación no controlada se produce un esfuerzo cortante de cizalla lo genera un estrés que puede causar la rotura de algunos filamentos de la estructura fúngica, lo cual conlleva a una fase estacionaria prematura y de muerte disminuyendo la capacidad de biosíntesis de ácido cítrico a pesar de que la agitación de continua y no debe ser parada en ningún momento.

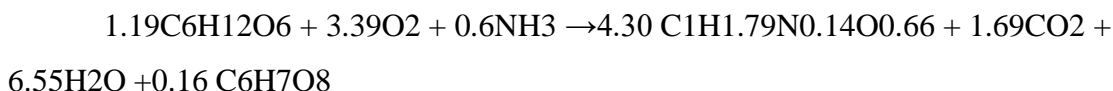
En algunos casos particulares de agitación se observaron fragmentación y su posterior regeneración y/o rebrote de los micelios que son beneficios para la producción, porque la fragmentación se da en los micelios más susceptibles que son las partes más antiguas y fuertemente vacuoladas de los filamentos metabólicamente activos; siendo así que los nuevos filamentos generados tienen mayor capacidad de bioproducción. Ello también en función al pH del medio de cultivo, el cual tiene un efecto directo en la biosíntesis por *Aspergillus niger*, ello debido a que ciertas enzimas del ciclo de Krebs son sensibles al pH del medio. El pH durante el proceso es crucial para un buen rendimiento debido a que lo favorece en el aspecto de la germinación de las esporas (pH mayor a 5), luego a medida que transcurre la fermentación se debe disminuir el pH ya sea por la propia fermentación o agregando cierta cantidad de HCL para favorecer la producción de ácido cítrico y también se produce un menor riesgo de contaminación, también inhibe la formación de otros ácidos orgánicos (como por ejemplo ácido gluónico y ácido oxálico). También se ha evidenciado de captar amoníaco del medio lo que desencadena una liberación de protones (Xu, 1989).

Hay muchos grupos de microorganismos productores de ácido cítrico como por ejemplo: *Bacillus licheniformes*, *Corynebacterium sp*, *Penicillium janthinelum*, entre otros y que todos ellos necesitan de aireación para poder tener una tensión de oxígeno disuelto (OD) adecuado a través de un complejo proceso de transferencia de masa y pase a la células de los diferentes microorganismos incluyendo *Aspergillus niger* el cual mencionada cepa tiene y usa 2 tasas respiratorias diferentes; una es vía sensible al cianuro y la otra vía es dependiente de ácido salicilhidroxámico (SHAM) el cual se da al final de la trofofase, pero dicho proceso no está bien definido por los investigadores; a pesar de ello la fabricación de citrato requiere de condiciones muy óptimas y subóptimas en algunos casos; por ello es que los rendimientos y productividades y también su velocidad de crecimiento específico de la cepa bajo estudio resultó ser relativo porque varía según la especie del microorganismo, tipo de fuente de carbono, pH, aireación, tiempo de fermentación, elementos traza, afectando todos estos parámetros sobre la cinética de producción con altos rendimientos de ácido cítrico (Papagianni, 2007).

La cepa fúngica tiene poca afinidad por el lactosuero debido a que no tiene niveles adecuados de la enzima b-galactosidasa es para poder transformar la lactosa como fuente de carbono y energía, es por eso a que nivel industrial se usa bagazo de caña de azúcar del

cual se puede obtener glucosa, y así poder tener un rendimiento teórico aproximado de 6 gr/L. A continuación, se presenta la ecuación estequiométrica de la producción de ácido cítrico.

La composición elemental de la biomasa se determinó por la combustión y con un analizador de gases y ICP-MS:



Fuente: Elaboración Propia

Según el balance de materia teórico por cada molécula de Lactosa (342.3g/mol aproximado) componente principal del lactosuero no daría 24.6 g/mol de biomasa se direccionaría más a la formación de biomasa como de producto y poco al producto, lo que daría un bajo rendimiento de sustrato a producto.

Fuente: Elaboración Propia

RÉPLICA 1

Tabla 6. Resultados de los parámetros cinéticos Q_p , Q_x , Y_p/s y μ , de los cuatro tratamientos, para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

TRATAMIENTOS	Q_p (g/L.h)	Q_x (g/L.h)	Y_p/s	μ
90% Lact. 380ppmK ₂ HPO ₄	0.0089	0.0366	0.033	0.0647
90% Lact. 360ppmK ₂ HPO ₄	0.00836	0.0833	0.0285	0.0721
70% Lact. 380ppmK ₂ HPO ₄	0.008605	0.0212	0.038	0.0633
70% Lact. 360ppmK ₂ HPO ₄	0.005794	0.0423	0.0245	0.0561

Fuente: Propio autor.

RÉPLICA 2

Tabla 7. Resultados de los parámetros cinéticos Q_p , Q_x , $Y_{p/s}$ y μ , de los cuatro tratamientos, para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

TRATAMIENTOS	Q_p (g/L.h)	Q_x (g/L.h)	$Y_{p/s}$	μ
90% Lact. 380ppmK ₂ HPO ₄	0.01065	0.05576	0.03649	0.0652
90% Lact. 360ppmK ₂ HPO ₄	0.00617	0.05629	0.01682	0.0711
70% Lact. 380ppmK ₂ HPO ₄	0.01121	0.05115	0.03134	0.0622
70% Lact. 360ppmK ₂ HPO ₄	0.00094	0.05869	0.00259	0.0544

Fuente: Propio autor.

RÉPLICA 3

Tabla 8. Resultados de los parámetros cinéticos Q_p , Q_x , $Y_{p/s}$ y μ , de los cuatro tratamientos, para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

TRATAMIENTOS	Q_p (g/L.h)	Q_x (g/L.h)	$Y_{p/s}$	μ
90% Lact. 380ppmK ₂ HPO ₄	0.0089	0.06597	0.033	0.0644
90% Lact. 360ppmK ₂ HPO ₄	0.00836	0.05619	0.0285	0.0736
70% Lact. 380ppmK ₂ HPO ₄	0.008605	0.05157	0.038	0.0648
70% Lact. 360ppmK ₂ HPO ₄	0.005794	0.0688	0.0245	0.0533

Fuente: Propio autor.

Los mejores resultados de rendimiento y productividad en la fermentación para la biosíntesis se obtuvieron en el tratamiento 1 (90% lactosuero y 380 ppm de K_2HPO_4). Con base a los valores de significancia ($p < 0.05$) se concluye que el efecto del K_2HPO_4 no es significativo debido a que es superior a 0.05, y que una fuente de P, K se encuentra de forma natural de forma subóptimas. Según el análisis estadístico con la ayuda del Software Minitab 17 en el diagrama de Pareto el factor más influyente es el fosfato dipotásico los factores no se ajustan a un modelo de primer orden, por ello los factores no superan el efecto estandarizado, y según la gráfica de interacción para los factores muestra que el efecto combinado no influye de manera significativa en la bioproducción de ácido cítrico.

(Según Sánchez y Muñoz 2012), encontraron que para maximizar el potencial a escala industrial de la cepa *Aspergillus niger* es necesario realizar estudios sistemáticos de los requerimientos nutricionales particulares de cada nueva cepa. Y según este mismo autor el valor p para fósforo es de 0.46. Y para nuestro Análisis de Varianza con Minitab 17 obtuvimos un p de 0.383.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La evaluación de la producción de Ácido Cítrico, usando como medio base el residuo de la industria quesera (Lactosuero), el tratamiento 1 (90% de Lactosuero y 380 ppm de K_2PHO_4) fue la mayor producción de todos los tratamientos con un rendimiento de 1.07 gr de Ácido Cítrico/L de Lactosuero.
2. Se logró determinar que la relación entre los niveles de Fosfato dipotásico y el Lactosuero con un nivel de confianza del 95 %, utilizando el paquete estadístico Minitab 17.
3. Los resultados estequiométricos ($Y_x/s, Y_p/s, Q_p$) obtenidos de la Fermentación Sumergida utilizando la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642 no fueron los esperados debido a que se necesita un equilibrio nutricional adecuado ajustado a un pH controlado.
4. El lactosuero debe ser pre-tratado para poder tener una mejor fuente de azúcares reductores, y así poder ser utilizado de mejor forma por la cepa *Aspergillus Niger* ATCC 96.42
5. Se recomienda hacer diluciones no menores a las elaboradas al presente trabajo de investigación, debido a que hay falta de nutrientes si se llega a preparar concentraciones menores del 70 %.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gómez schouben, a (2012) *Efecto de la variación de los niveles de P &K en la producción de ácido cítrico utilizando una cepa de Aspergillus niger (Tesis de Maestría)*. Universidad Nacional de Colombia Facultad Ciencias Agropecuarias. <http://www.bdigital.unal.edu.co/10577/1/7515002.2012.pdf>.
- Concha, García. W. (2014) *Producción Biológica De Ácido Cítrico A Partir De Lactosuero De Residuo Quesero Entero Y Desproteínizado Utilizando Una Cepa Fungal De Aspergillus Niger sp. En Cultivo Sumergido*. Repositorio de tesis UCSM.
- García, M;Gómez, L. Barzana, E. 1987. *Studies on the simultaneous production of single-cell protein and endopolygalacturonase from Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnol.Lett.*9(6):411-416.
- Lucey, J.A. (2010). *Formation and physical properties of yogurt*. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 23, N.º 9, 1127-1136.
- Lucey, J.A. (2002). *ADSA Foundation Scholar Award. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels*. *J. Dairy Sci.* 85, 281-294.
- Pescumma, M., Herbet, E., Mozzi, F. & font, G. (2008). *Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content*. *Food Microbiology.* 25 (3): 442-451.
- Baro, L., Jiménez, J., Martínez, A. & Bouza, J. (2001). *Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales*. *Ars. Pharmaceutica.* 42 (4): 135-145.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D. & Bunko, K. (2007). *Bioutilisation of whey for lactic acid production*. *Food Chemistry.* 105: 1-14.
- Foegeding, E. & Luck,P. (2002). *Whey protein products.1957-1960*. In: Caballero, B., L. Trugo, P. Finglas (eds.). *Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition*. New

York: Academic Press.

Hinrichs, R., Götz, J., Noll, M., Wolfschoon, A., Eibel, H. & Weisser, H. (2004). *Characterization of different treated whey protein concentrate by means of low resolution nuclear magnetic resonance*. International Dairy Journal. 14 (9): 817-827.

Marcelo Abel, S (1997). *Producción de ácido cítrico y desarrollo morfológico en miembros del género Aspergillus (Tesis de Postgrado)*. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2951_Soria.pdf.

Sánchez Toro, O., Ortiz Buriticá, M., Betancourt Garcés, A (2004). *Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con Aspergillus spp.* revista_biotecnologia. <http://www.bdigital.unal.edu.co/13177/2/542-3862-1-PB.pdf>.

Sánchez, T (2004). *Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con Aspergillus spp.* Revista Colombiana de Biotecnología, 52. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/542/1043>.

Baena, Sandra; Campos, Claudia; Rojas, Germán. (1994). *Aguas residuales de la industria láctea: Naturaleza y composición de las aguas residuales*. Revista Ambiente y Desarrollo Pontificia Universidad Javeriana. Año 2, No 2 y3, Mayo – Septiembre. pp.83

Boehringer Mannheim/r-biopharm. (2001). *Citric Acid. UV method for the determination of citric acid in foodstuffs and other materials*. Cat. No. 0 139 076.

Brown, C.M; Campbell, I; Priest, F.G. (2009). *Introducción a la biotecnología*. 3era. Ed., Editorial Acribia, S.A. España.

Moulin, G. Galzy, P. 184. *Whey a potential substrate for biotechnology*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews. 1:347-373.

García GM, Revah MS, Gómez RL. "Productos lácteos" en García Garibay M, Quintero Ramírez R, López-Munguía Canales A (edit.), *Biología Alimentaria*, Limusa Noriega Editores, México (1993) 153-223.

<https://elementos.buap.mx/directus/storage/uploads/00000002141.pdf>

Saffran M., Denstedt F., (1948), *A rapid method for the determination of citric acid*, Department of biochemistry, Montreal Canada.

Sikander A.; Haq I.; Qadeer M.A.; Iqbal J., (2002), *Production of Citric Acid by Aspergillus niger using cane molasses in a stirrer fermentor*. *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 5.

Xu D.B., Kubicek C.P. and Rhr M. (1989), *A comparison of factors influencing citric acid production by A. niger grown in submerged culture and on filter paper*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 30, 444-449.

Mattey, M. (1992), *The production of organic acids*, *Crit. Rev. Biotechnol.* vol. 12, 87-132.

Lesniak W. (1999), *Citric acid biotechnology: fermentation substrates* En: Kristiansen B., Mattey M. and Linden J. (editoriales), London, Taylor Francis Ltd., pp. 149– 159.

Lehninger, A. (1987), *Principios de Bioquímica*, Omega 2ªEd. pp. 447- 465.

Leopold H. (1959), *Ober das Verhalten Von invertase and glukoseoxydase wahrend der citronens~iureg~rung*, *Die Nahurang*, vol. 3, 987.

Hossain M., Brooks J.D. and Maddox I.S. (1984), *The effect of sugar source on citric acid production by A. niger*, *AppL MicrobioL Biotechnol.*, vol. 19, 393-397.

Habison, A., Kubicek, C. P., & Rohr, M. (1983). Partial purification and regulatory properties of phosphofructokinase from *Aspergillus niger*. *Biochemical Journal*, **209**, 669– 676.

- Grewal H., Kalra K. (1995), *Fungal production of citric acid*, *Journal of Biotechnology Advances*, vol. 13, 209-234.
- El-Enshasy H., Kleine J., Rinas U. (2006), *Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pellets growth forms of recombinant Aspergillus niger*, *Process Biochem*, 42: 2103-2112.
- Berovic M., Legisa M. (2007), *Citric acid production*, *Biothechnol Annu. Rev.*, 13:303- 43.
- Papagianni, M. 2007. Review: Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol. Adv.* 25:244-263.
- SENA. (2015). *Manejo integral del Lacto-Suero. Plan integral de manejo de lactosuero, algunas aplicaciones*. Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA).
- Shu P, Johnson MJ. Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind Eng Chem* 1948a;40:1202–5.
- Röhr, M., & Kubicek, C. P. (1981). Regulatory aspects of citric acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, **16**, 34– 37.
- Xu BD, Madrit C, Röhr M, Kubicek CP. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1989;30:553–8.
- Kristiansen, B. and Sinclair, C.G. Production of citric acid in continuous culture.
- Biotechnology and Bioengineering.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Conteo de esporas del hongo (*Aspergillus niger*)

1. Conteo en la Cámara Neubauer

Para realizar la determinación del número de esporas se preparó Tween 80 al 0.8% en un volumen de 5mL de agua destilada, luego se vertió esta solución en la placa que contenía el *Aspergillus niger*, seguido de ello se tomó 200 microlitros los cuales fueron colocados en la cámara Neubauer en el microscopio a 40 X, donde se hizo el conteo respectivo obteniéndose $2,6 \times 10^6$ esporas/mL.

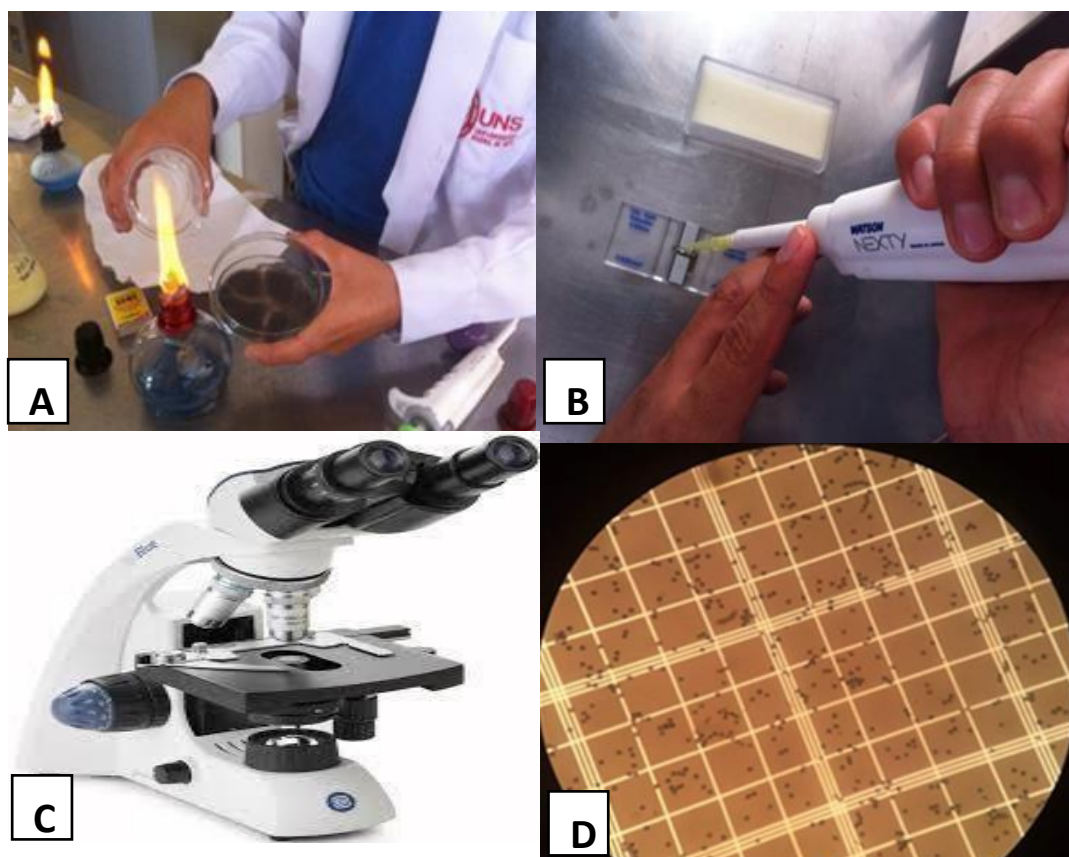


Figura 19. Conteo de esporas en Cámara Neubauer, A. Preparación de Tween 80 al 0.8% en 5mL de agua destilada, vertidas en placa con colonias de *Aspergillus niger*, B. Solución colocada en la cámara Neubauer, C. Microscopio calibrado del IITA, D. Conteo de esporas a 40X

Anexo 2. Escalamiento en el Instituto de Investigación Tecnológica Agroindustrial de la UNS

Los cálculos mostrados a continuación fueron para un volumen de 300mL con las concentraciones de lactosuero y K₂HPO₄ (90%-380ppm, 90%360 ppm, 70%-380 ppm y 70%360 ppm) para cada envase respectivamente, seguido de ello se pasteurizó a 65°C por 15 minutos. Para lo cual su variable de respuesta es la concentración de Ácido Cítrico (gr/Lt).

- 1) **TRATAMIENTO 1** ← 90% & 380 ppm

270 mL Lact + 25 mL H₂O + 5 mL Inoc + 1.14 g K₂HPO₄ + 2 g (NH₄)₂SO₄

- 2) **TRATAMIENTO 2** ← 90% & 360 ppm

270 mL Lact + 25 mL H₂O + 5 mL Inoc + 1.089 g K₂HPO₄ + 2 g (NH₄)₂SO₄

- 3) **TRATAMIENTO 3** ← 70% & 380 ppm

210 mL Lact + 85 mL H₂O + 5 mL Inoc + 0.39 g K₂HPO₄ + 2 g (NH₄)₂SO₄

- 4) **TRATAMIENTO 4** ← 70% & 360 ppm

210 mL Lact + 85 mL H₂O + 5 mL Inoc + 0.36 g K₂HPO₄ + 2 g (NH₄)₂SO₄

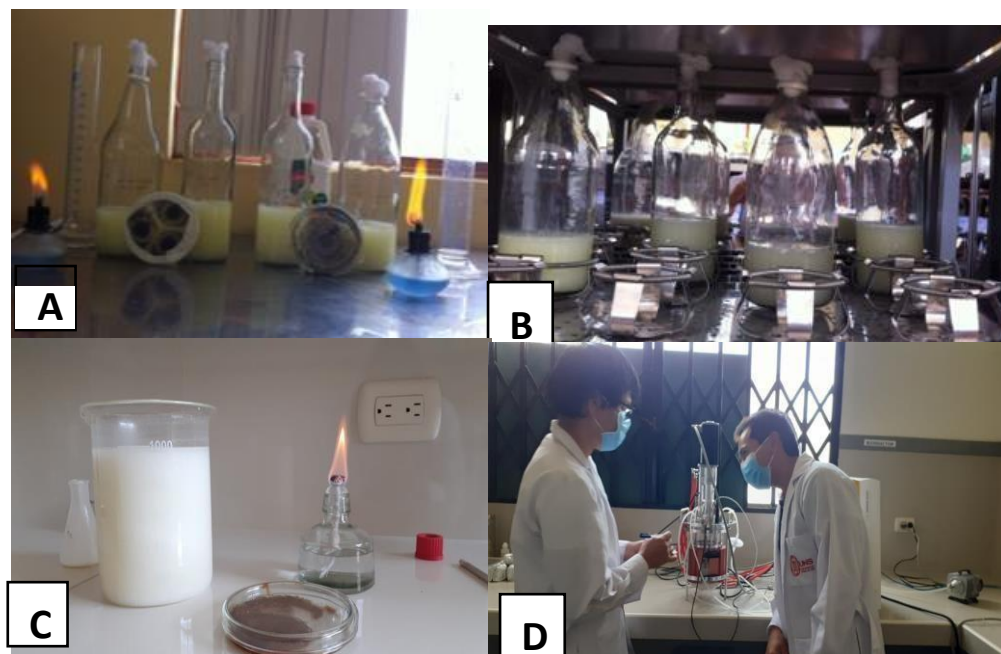


Figura 20. A. inoculación de los caldos de fermentación con $2,6 \times 10^6$ esporas/mL de *Aspergillus niger*, B. Se colocó en el Shaker a 150 rpm con 30°C ., C. Preparación del medio de fermentación antes de agregar al biorreactor, D. Medición y control de la fermentación.

Anexo 3. Caracterización Físicoquímica del Lactosuero utilizando el Multiparámetro Thermo Scientific del IITA de la UNS

La caracterización físico-química de la muestra de lactosuero fue realizada en los laboratorios de control de calidad del IITA de la UNS utilizando el multiparámetro Thermo Scientific. Se obtuvieron 8.67mg/L de OD, 4.3 pH, 7.7 ms/cm de conductividad.



Figura 21. Caracterización físicoquímica del Lactosuero, A. Multiparámetro Thermo Scientific del IITA de la UNS, B. La data arrojó 8.67mg/L de OD., C. El análisis arrojó 7.7 ms/cm de conductividad., D. Medición del pH de la muestra.

Anexo 4. Determinación De Biomasa Por Peso Húmedo

Para determinación de peso húmedo se tomaron muestras de 1 mL del caldo de fermentación de cada tratamiento y se colocaron sus respectivos tubos (4) de ensayos previamente pesados. Luego los tubos son llevados a la centrifuga 5 000 RPM, por un tiempo de 5 minutos. Luego pasamos a pesar cada tubo de ensayo en la balanza analítica del laboratorio de investigación, anotamos los pesos y por diferencias obtenemos la biomasa en g/L (Martínez Saldaña, Yurico Elizabeth, 2012).



Figura 22. A. Muestras de 1 mL del caldo de fermentación de cada tratamiento colocados tubos, B. Tubos de ensayo llevados a la centrifuga a 5 000 RPM, por un tiempo de 5 minutos.

Anexo 5. Toma de muestras y data en el proceso fermentativo usando el Biorreactor del IITA.

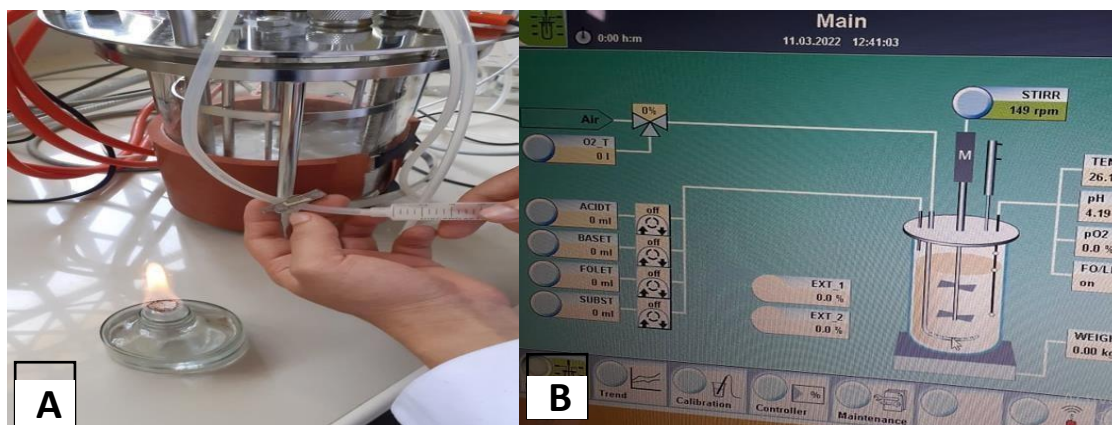


Figura 23. A. Muestreo del caldo fermentativo en un ambiente estéril, B. Ajuste de Temperatura, pH y otros parámetros en el programa usado para operar el Biorreactor.

Anexo 6. Curva Patrón del Ácido Cítrico por HPLC

Equipo: Sistema cuaternario UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation

Columna: SHODEX SUGAR SH1011

Detector: UV (210 nm)

Condiciones de ensayos:

-Temperatura de columna: 50°C

-Eluyente: H₂SO₄ 0.01 N

-Flujo: 1.0 mL/min

-Volumen de muestra: 10 uL



Figura 24. Equipo de HPLC

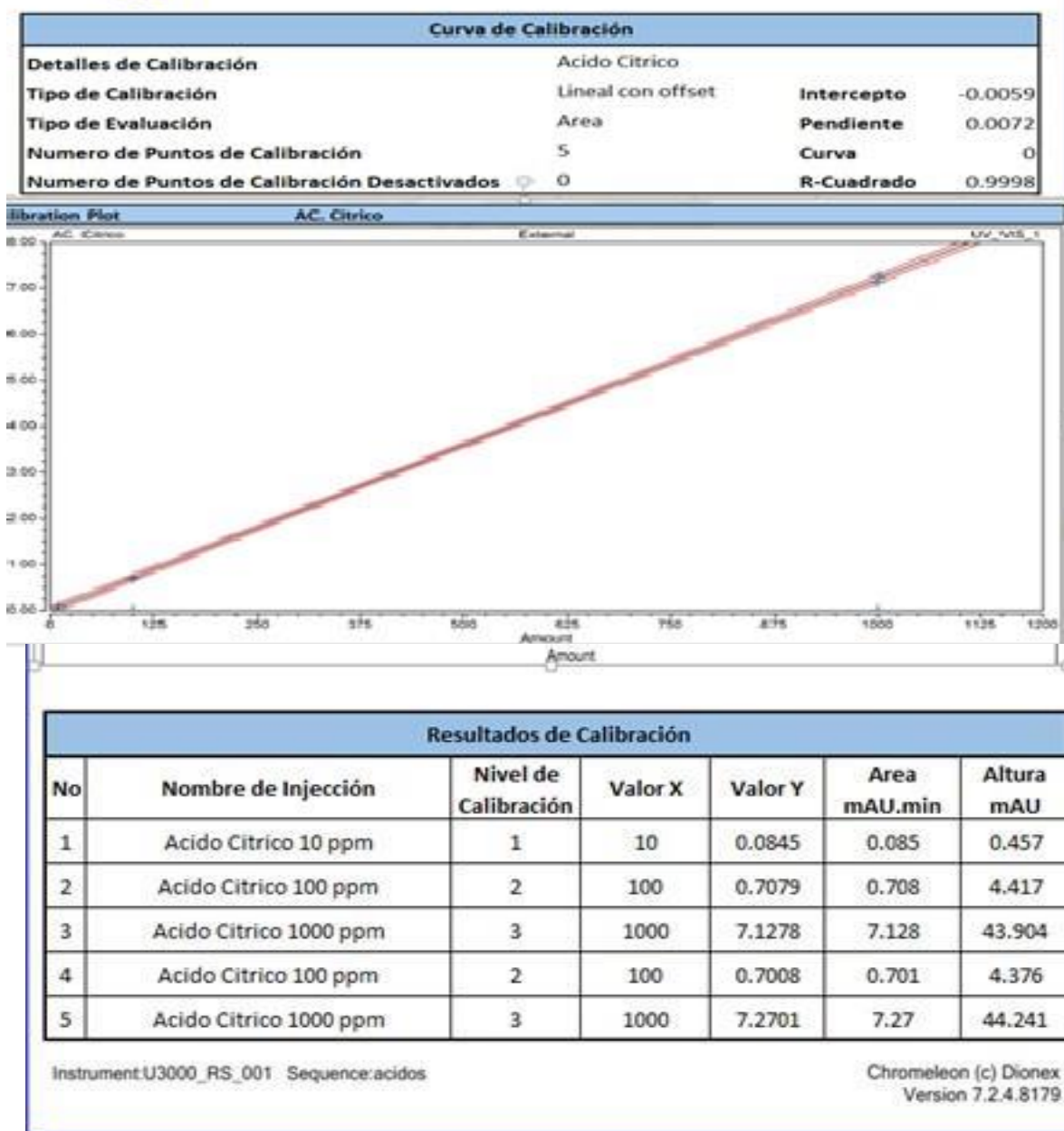


Figura 25. Curva de calibración

Anexo 7. Data de la producción del Ácido Cítrico analizado en el laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Escuela de Ingeniería Ambiental de la UNT usando el equipo de HPLC.

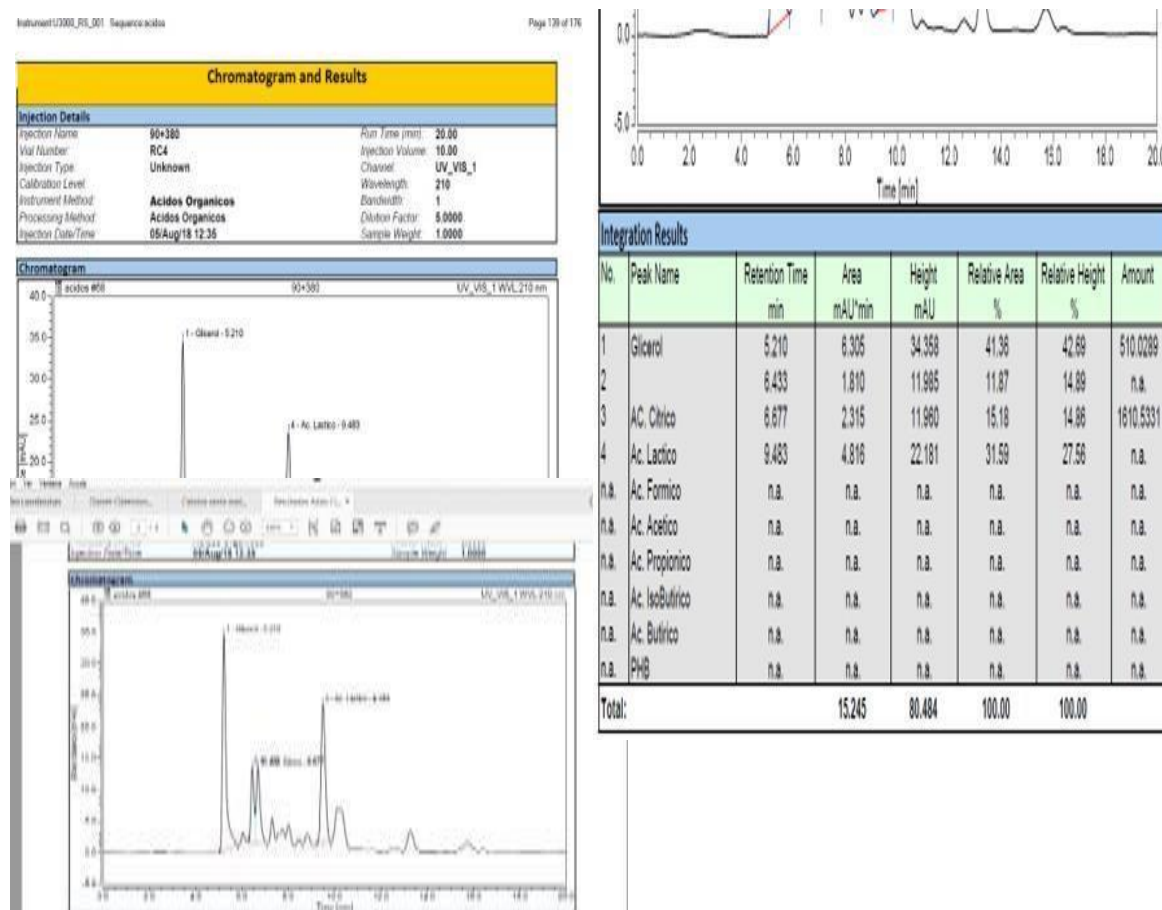


Figura 26. Data del tratamiento 1 de la réplica 2.

Anexo 8. Diseño de Medio de Cultivo

	Elemento	(Formula)	(Nombre)	%Célula	%Nutriente	W/s	So	S'o
144	C	342.3	Lactosa	52	42.06836109	0.809006944	3.70825	5.9332
14	N	14	nitrogeno(NH4)2SO4	8	100	12.5	0.24	0.384
31	P	31	Fosforo (Fosfato Dipotásico)	2	100	50	0.06	0.096
39	K	39	Potasio(Fosfato Dipotásico)	4	100	25	0.12	0.192
24	Mg	24	Magnesio(contenido en Lactosuero)	0.5	100	200	0.015	0.024
55	Fe	55	Hierro(cont. En Lactosuero)	0.5	100	200	0.015	0.024
63	Cu	63	Cobre(cont.En Lactosuero)	0.01	100	10000	0.0003	0.00048
54	Mn	54	Manganeso(cont. En Lactosuero)	0.007	100	14285.71429	0.00021	0.000336

Fuente: Propio autor.

El diseño de medio de cultivo se realizó para obtener una biomasa de 3 g/L, el exceso fue de 60% 1.6, y volumen de 100 mL (0.1 L), posteriormente en cada tratamiento se hicieron las modificaciones de las variables independientes las cuales fueron lactosuero y K₂HPO₄ al 90%-380 ppm, 90%-360 ppm, 70%-380 ppm, 70%-360 ppm respectivamente.

Este Diseño de Medio de Cultivo tuvo como referencia la Composición del Lactosuero (Según Lectures Handbook Products 2001).

Tabla 5. Diseño de Medio de Cultivo

Lactosa	6.50%
Calcio	0.3g/L
Magnesio	0.1g/L
Fósforo	0.007g/L
Potasio	0.00015g/L
Cobre	0.01-10ppm
Zinc	1ppm
Hierro	1.3ppm
Manganeso	0.1ppm

Fuente: Propio autor.

Anexo 9. Diseño Experimental

Con el objetivo de llevar a cabo la etapa de adaptación, los hongos fueron transferidos del medio de crecimiento donde presentaron desarrollo óptimo (en placas con Agar Czapek y PDA), a los medios de cultivo líquido.

Los medios de fermentación para la primera réplica tuvieron la siguiente composición por cada combinación:

Matraz 1: 90% de lactosuero, 380 ppm (0.38 g) de K_2HPO_4 , 1.0 g/L de $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$.

Matraz 2: 90% de lactosuero, 360 ppm (0.36 g) de K_2HPO_4 , 1.0 g/L de $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$.

Matraz 3: 70% de lactosuero, 380 ppm (0.13 g) de K_2HPO_4 , 1.0 g/L de $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$.

Matraz 4: 70% de lactosuero, 360 ppm (0.13 g) de K_2HPO_4 , 1.0 g/L de $(NH_4)_2SO_4 \cdot 7H_2O$.

Los medios de fermentación se realizaron en Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de los medios mencionados ajustados a un pH de 5.5. Todos los medios preparados y el material de vidrio fueron esterilizados por pasteurización a 65 °C, durante 15 minutos. Los medios fueron inoculados con una suspensión de $2,6 \times 10^6$ esporas/mL. El cultivo se llevó a cabo a 35 °C en un termostato de recirculación digital con agitación a 150 rpm durante 5 días.

Para evaluar la biosíntesis de ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger* ATCC 9642 en medios de producción basados en lactosuero, se planteó un diseño experimental de dos factores (lactosuero y K_2HPO_4) cada factor con 2 niveles (tratamientos) y con tres réplicas por nivel sin punto centrales. Los tratamientos realizados fueron: lactosuero entero a distintas concentraciones. Los cultivos se realizaron en Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de medio de 100 mL. A los medios así preparados no se les agregó ningún componente adicional (simulación de un reactor por lote).

Anexo 10. Resultados Y Discusión

Anexo 11. Tablas del diseño experimental

Tabla 9. Resultados del diseño experimental al 90% de lactosuero y 380 ppm de K₂HPO₄ para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Time(h-1)	peso(g/L)	peso(g/L)	X(g/L)	S(g/L)	PH	[]AC(g/L)	Desviación Estándar
0	4,9407	4,9921	0,0514	83,33	4,85	0	0.5973
12	4,9415	5,0013	0,7176	75,88	4,5	0	Media
24	4,9478	5,0083	1,452	69,7	4,3	0	1.106
48	4,9676	5,0101	2,04	68,31	4,5	0,071335 6	-
72	4,9775	5,0102	2,3544	65,11	4,55	0,089236 5	-
96	5,0104	5,0667	5,4048	55,33	4,2	1,072756 5	-

Fuente: Propio autor.

Tabla 10. Resultados del diseño experimental al 90% de lactosuero y 360 ppm de K₂HPO₄ para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Time(h-1)	peso(g/L)	peso(g/L)	X(g/L)	S(g/L)	PH	[]AC(g/L)	Desviación Estándar
0	5,0268	5,0655	0,0387	82	4,8	0	0.5018
12	5,0455	5,0852	0,4764	79,64	4,4	0	Media
24	5,0652	5,1068	0,9984	74,9	4	0	0.857
48	5,0106	5,0703	2,8656	58,39	4,1	0,0512635	-
72	5,0163	5,0531	2,6496	56,23	4,3	0,0572736	-
96	5,0002	5,0569	5,4432	48,12	3,9	0,5923655	-

Fuente: Propio autor.

Tabla 11. Resultados del diseño experimental al 70% de lactosuero y 380 ppm de K₂HPO₄ para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Time(h-1)	peso(g/L)	peso(g/L)	X(g/L)	S(g/L)	PH	[]AC(g/L)	Desviación Estándar
0	4,9678	5,0083	0,0405	80	4,9	0	0.487
12	4,967	5,0291	0,7452	72,5	4,6	0	Media
24	5,0456	5,0963	1,2168	63,33	4	0	0.952
48	4,9477	5,0009	2,5536	50	3,8	0,0823516	-
72	4,9569	5,0017	3,2256	49,96	3,9	0,08512356	-
96	4,9636	5,0155	4,9824	48,98	3,8	1,0165893	-

Fuente: Propio autor.

Tabla 12. Resultados del diseño experimental al 70% de lactosuero y 360 ppm de K₂HPO₄ para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

Time(h-1)	peso(g/L)	peso(g/L)	X(g/L)	S(g/L)	PH	[]AC(g/L)	Desviación Estándar
0	4,9252	4,9638	0,0386	79	4,6	0	0.453
12	4,9042	4,9575	0,6396	74,89	4,4	0	Media
24	5,0205	5,0673	1,1232	61,37	4,1	0	0.8708
48	4,9156	4,9697	2,5968	53,48	4	0,0875698	-
72	4,9045	4,9565	3,744	51,45	4,1	0,0892356	-
96	4,9625	5,0216	5,6736	48,61	3,9	0,0898756	-

Fuente: Propio autor.

Tabla 13. Parámetros cinéticos μ , $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$ y Q_p de los cuatro tratamientos, para evaluar la producción de ácido cítrico obtenidos a partir de la cepa *Aspergillus niger* ATCC 9642.

TRATAMIENTOS	μ	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$	$Q_p(\text{g/L.h})$
Tratamiento 1	0.0647	1.9305	0.0365	0.0089
Tratamiento 2	0.0721	1.5448	0.0168	0.008360
Tratamiento 3	0.0633	1.4493	0.0313	0.0086050
Tratamiento 4	0.0561	1.6329	0.0025	0.0057940

Anexo 12. Análisis de Varianza y Valores de Significancia usando el paquete Estadístico Minitab 17.

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajustado	MC Ajustado	Valor F	
Modelo	3	128.25	42.75	0.13	
Lineal	2	104.17	52.08	0.15	
Concentración de Lactosuero	1	80.08	80.08	0.24	
Concentración de Fosfato Dipotásico	1	24.08	24.08	0.07	
Interacciones de 2 Términos	1	24.08	24.08	0.07	
Concentración de lactosuero*C de fosfato dipotásico	1	24.08	24.08	0.07	
Error	8	2720.67	340.08		
Total	11	2848.92			

Fuente: Propio autor.

Anexo 13. Determinación del u_{max} de *Aspergillus niger* ATCC 9642

S	1/S	1/u	u
83.33	0.01200048	15.4559505	0.0647
82	0.01219512	13.8696255	0.0721
80	0.0125	15.7977883	0.0633
79	0.01265823	17.8253119	0.0561
	1/U_{max}	33.043	
	U_{max}	0.0302636	

Fuente: Propio autor.

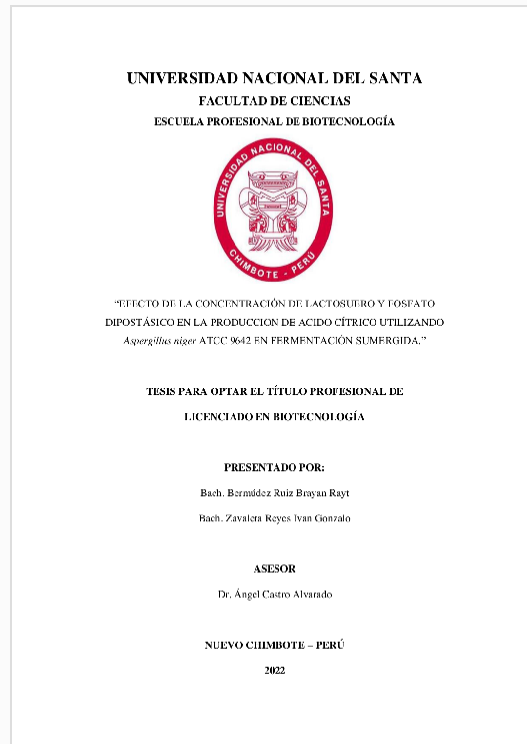


Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Pbe Asesoría Y Capacitación
Título del ejercicio: REPORTES
Título de la entrega: REPORTE INFORME TESIS
Nombre del archivo: INFORME_DE_TESIS_UNO_2022.pdf
Tamaño del archivo: 1.66M
Total páginas: 86
Total de palabras: 19,435
Total de caracteres: 104,318
Fecha de entrega: 10-mar.-2023 06:19a. m. (UTC-0800)
Identificador de la entrega: 2033895202



REPORTE INFORME TESIS

INFORME DE ORIGINALIDAD

41%

INDICE DE SIMILITUD

40%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

16%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	10%
2	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	9%
3	docplayer.es Fuente de Internet	5%
4	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	2%
5	doctoradoagrarias.files.wordpress.com Fuente de Internet	2%
6	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	www.sedapal.com.pe Fuente de Internet	1%
8	elementos.buap.mx Fuente de Internet	1%
9	ri.ues.edu.sv Fuente de Internet	1%

10	zdocs.mx Fuente de Internet	1 %
11	energia.azc.uam.mx Fuente de Internet	1 %
12	www.scielo.org.co Fuente de Internet	1 %
13	bdigital.unal.edu.co Fuente de Internet	1 %
14	www.revistas.unal.edu.co Fuente de Internet	1 %
15	www.riuc.bc.uc.edu.ve Fuente de Internet	< 1 %
16	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %
17	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	< 1 %
18	xa.yimg.com Fuente de Internet	< 1 %
19	Submitted to Universidad Nacional de Trujillo Trabajo del estudiante	< 1 %
20	es.slideshare.net Fuente de Internet	< 1 %
21	www.scribd.com Fuente de Internet	< 1 %

22	1library.co Fuente de Internet	< 1 %
23	Submitted to Universidad Nacional de Frontera Trabajo del estudiante	< 1 %
24	dspace.utpl.edu.ec Fuente de Internet	< 1 %
25	repositorio.utc.edu.ec Fuente de Internet	< 1 %
26	www.dinarte.es Fuente de Internet	< 1 %
27	Submitted to tec Trabajo del estudiante	< 1 %
28	medicalresearchjournal.org Fuente de Internet	< 1 %
29	Bustos, G.. "Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates trough continuous production of lactic acid and biosurfactants by L. pentosus", Journal of Food Engineering, 200701 Publicación	< 1 %
30	repository.unad.edu.co Fuente de Internet	< 1 %
31	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Trabajo del estudiante	< 1 %

32	repositorio.unc.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %
33	Submitted to Universidad de Salamanca Trabajo del estudiante	< 1 %
34	hdl.handle.net Fuente de Internet	< 1 %
35	prezi.com Fuente de Internet	< 1 %
36	www.redalyc.org Fuente de Internet	< 1 %
37	repositorio.puce.edu.ec Fuente de Internet	< 1 %
38	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %
39	es.scribd.com Fuente de Internet	< 1 %
40	repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080 Fuente de Internet	< 1 %
41	dspace.uclv.edu.cu Fuente de Internet	< 1 %
42	edoc.pub Fuente de Internet	< 1 %
43	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	< 1 %

44

www.bdigital.unal.edu.co

Fuente de Internet

< 1 %

45

www.sech.info

Fuente de Internet

< 1 %

46

Submitted to Escuela Politecnica Nacional

Trabajo del estudiante

< 1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 15 words

Excluir bibliografía

Activo