

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS
RECURSOS NATURALES**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL PH, LA TEMPERATURA Y
EL MEDIO NUTRITIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE
LA FERMENTACIÓN DE LACTO SUERO CON *Aspergillus carbonarius***

AUTORA:

SAMANTHA DEL PILAR ROSALES MITTE

TUTORA:

Dra. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS, PhD

Cuenca - Ecuador

2019

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Samantha del Pilar Rosales Mitte, con documento de identificación N° 0105724397, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL PH Y LA TEMPERATURA EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DE LACTO SUERO CON *Aspergillus carbonarius***, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora, me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega el trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, marzo de 2019.



.....

Samantha del Pilar Rosales Mitte

C.I.: 0105724397

CERTIFICACIÓN

Yo, Inés Patricia Malo Cevallos, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL PH, LA TEMPERATURA Y EL MEDIO NUTRITIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DE LACTO SUERO CON *Aspergillus carbonarius***, realizado por Samantha del Pilar Rosales Mitte; obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, marzo de 2019.



.....

Dra. Inés Patricia Malo Cevallos

C.I.: 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Samantha del Pilar Rosales Mitte, con número de cédula 0105724397, autora del trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL PH, LA TEMPERATURA Y EL MEDIO NUTRITIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE LA FERMENTACIÓN DE LACTO SUERO CON *Aspergillus carbonarius***, certifico que el contenido total de este *Trabajo Experimental* es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, marzo de 2019.



.....

Samantha del Pilar Rosales Mitte

C.I.: 0105724397

DEDICATORIA

Dedicado con mucho cariño a mi hijo Tomás, quien me ha acompañado en los días y noches de estudio. A él, quien cada día me motiva a ser una mejor persona.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente...

A mis padres, quienes incondicionalmente han estado conmigo guiándome y apoyándome con amor y paciencia en el camino de la vida.

A mis hermanas: Diana, Verónica y Andrea. Mis consejeras de estudio y de vida. Ellas, mi ejemplo a seguir como persona y profesional.

Mi familia y amigos, quienes estuvieron conmigo cuando más lo necesité a pesar de mis errores y defectos.

A cada uno de los profesores que me han acompañado a lo largo de la carrera, quienes a través de su ejemplo me han enseñado mucho más que sólo conocimientos teóricos.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ANOVA: análisis de varianza

BSA: seroalbúmina bovina

CMP: caseinmacropéptido

CYA: siglas en inglés de Czapek Yeast Agar, agar Czapek-levadura

DCC: Diseño Central Compuesto

g: gramos

Igs: inmunoglobulinas

L: litros

LF: lactoferrina

LP: lactoperoxidasa

MEA: siglas en inglés de Malt Extract Agar, agar extracto de malta

mm: milímetros

mL: mililitro

MSR: Metodología de Superficie de Respuesta

OTA: ocratoxina A

OPN: osteopontina

s: segundos

SE: suero entero

SD: suero deslactosado

SDH: suero desproteinizado hidrolizado

SDHE: suero desproteinizado hidrolizado evaporado

rpm: revoluciones por minuto

t: temperatura Celsius

vvm: volumen de aire por volumen de líquido por minuto

WPC: siglas en inglés de whey protein concentrate, concentrado de proteína de suero

WPI: siglas en inglés de whey protein isolate, aislado de proteína de suero

°C: grados Celsius

μm: micrómetro, micrón o micra

α-LA: α-lactoalbúmina

β-LG: β-lactoglobulina

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Planteamiento del problema.....	3
1.2 Antecedentes	5
1.3 Justificación	8
1.4 Objetivos	9
1.4.1 Objetivo general	9
1.4.2 Objetivos específicos	9
1.5 Hipótesis.....	10
CAPÍTULO 2	11
2. MARCO DE REFERENCIA	11
2.1 Suero de leche	11
2.1.1 Generalidades del suero de leche	11
2.1.2 Tipos de lactosuero y su composición nutricional	12
2.1.3 Impacto ambiental del suero de leche	13
2.1.4 Aprovechamiento industrial	14
2.2 Ácido cítrico.....	23
2.2.1 Definición y propiedades	23

2.2.2	Bioquímica del ácido cítrico	23
2.2.3	Métodos de obtención y rendimiento	25
2.2.4	Proceso fermentativo y factores influyentes	29
2.2.5	Métodos de detección y cuantificación de ácido cítrico	30
2.2.6	Microorganismos productores de ácido cítrico	31
2.2.7	Producción y consumo mundial y nacional.....	32
2.2.8	Aplicaciones del ácido cítrico	32
2.3	Género <i>Aspergillus</i>	34
2.3.1	<i>Aspergillus</i> sección Nigri	35
2.3.2	<i>Aspergillus carbonarius</i>	36
CAPÍTULO 3		42
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	42
3.1	Aislamiento del hongo <i>Aspergillus carbonarius</i> a partir de frutos secos de <i>Vitis vinifera</i> caracterizándolo mediante claves taxonómicas	42
3.1.1	Recolección de muestras de pasas.....	42
3.1.2	Aislamiento del hongo filamentoso en condiciones de laboratorio	43
3.2	Establecimiento de la temperatura, el medio nutritivo y el valor de pH para el cultivo de <i>Aspergillus carbonarius</i> que permitan la obtención de las más altas concentraciones de ácido.....	47
3.2.1	Proceso fermentativo en matraces Erlenmeyer	47
3.2.2	Método de análisis.....	50
3.2.3	Técnicas de procesamiento y análisis de datos	51

3.3	Determinación de la cinética de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación del ácido a partir de <i>A. carbonarius</i> utilizando un biorreactor para la simulación de un proceso industrial	52
3.3.1	Proceso fermentativo en biorreactor	52
3.3.2	Métodos de análisis	54
3.3.3	Equipos, materiales y reactivos utilizados en el proceso fermentativo..	55
CAPÍTULO 4		57
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.1	Aislamiento y caracterización de una cepa nativa de <i>Aspergillus carbonarius</i> ..	57
4.1.1	Cultivos resultantes de la siembra directa de pasas y sus resiembras	57
4.1.2	Identificación microscópica de <i>Aspergillus carbonarius</i>	58
4.1.3	Caracterización de la colonia identificada como <i>A. carbonarius</i>	58
4.2	Establecimiento de la temperatura, el medio nutritivo y el valor de pH que permitan la obtención de las más altas concentraciones de ácido.....	63
4.2.1	Producción de ácido cítrico en los diferentes tratamientos	63
4.2.2	Efectos de la temperatura, pH y medio nutritivo en la producción de ácido cítrico	65
4.2.3	Optimización de las variables independientes	73
4.3	Cinética de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación del ácido a partir de <i>Aspergillus carbonarius</i> utilizando un biorreactor	74
CAPÍTULO 5		77
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
5.1	Conclusiones	77

5.2	Recomendaciones.....	78
	LISTA DE REFERENCIAS.....	80
	ANEXOS	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Obtención de suero pretratado.....	16
Figura 2. Productos obtenidos del fraccionamiento del lactosuero	18
Figura 3. Fórmula estructural del ácido cítrico.....	23
Figura 4. Ciclo de Krebs	24
Figura 5. Modelo de biorreactor para fermentaciones sumergidas.....	28
Figura 6. Conidióforos del género <i>Aspergillus</i>	34
Figura 7. Cepa de <i>Aspergillus carbonarius</i> en agar extracto de malta.	36
Figura 8. Vista macro y microscópica de <i>Aspergillus carbonarius</i>	38
Figura 9. Curva de crecimiento microbiano	40
Figura 10. Colonias presentes en el medio de crecimiento.....	43
Figura 11. Colonia resemebrada después de 7 días de incubación.....	44
Figura 12. Suspensión de esporas en medio de extracto de levadura.	44
Figura 13. Esporas germinadas después de 24 horas.....	45
Figura 14. Cultivos puros en MEA y Czapek.....	45
Figura 15. a) Micelio esporulado. b) <i>A. carbonarius</i> utilizado para el lavado de esporas.....	48
Figura 16. Fermentación de los diferentes tratamientos en una incubadora con agitación.	50
Figura 17. Sal de citrato de sodio obtenido después de la titulación.....	50
Figura 18. Biorreactor y sus partes dentro de la cámara climática.	53
Figura 19. Fórmula para determinar azúcares reductores.....	55
Figura 20. Precipitado después de 24 horas a 105 °C.....	55
Figura 21. Ejemplos de cultivos puros de <i>Aspergillus</i> negros en CYA y MEA.....	57
Figura 22. Conidios de <i>Aspergillus carbonarius</i> bajo el objetivo de 40X	58
Figura 23. Características macroscópicas de las colonias a los 7 días de incubación a 25 °C: vista	

anterior y posterior de las colonias en MEA (a y b) y en CYA (c y d); micelio de la colonia en CYA (e).....	60
Figura 24. Cabeza conidial de <i>Aspergillus carbonarius</i> aumentada 40X en microscopio	62
Figura 25. Producción de ácido cítrico con <i>A. carbonarius</i> en diferentes tratamientos: suero entero (SE), suero deslactosado (SD).	63
Figura 26. a) Cultivo con pellets esféricos. b) Cultivo con pellets amorfos.....	65
Figura 27. Test de Normalidad obtenido mediante el programa estadístico Minitab® 18.....	66
Figura 28. Gráfica de residuos vs. orden.	67
Figura 29. Diagrama de Pareto: pH (A), temperatura (B), sustrato (C).	69
Figura 30. Gráfica de efectos normales absolutos estandarizados.....	70
Figura 31. Gráfica normal de efectos estandarizados.....	70
Figura 32. Efectos principales de las variables del diseño central compuesto: pH, temperatura (t), suero entero (SE), suero deslactosado (SD).....	71
Figura 33. Interacciones de las variables en el diseño central compuesto: pH, temperatura (t), suero entero (SE), suero deslactosado (SD).....	72
Figura 34. Modelo de regresión lineal de primer orden.	73
Figura 35. Optimización de las variables de estudio mediante Minitab® 18: pH, temperatura (t), suero entero (SE), suero deslactosado (SD).....	73
Figura 36. Gráfica de Superficie de Respuesta de ácido cítrico vs. temperatura y pH en suero deslactosado.	74
Figura 37. Consumo de sustrato, crecimiento de biomasa y biosíntesis de ácido cítrico durante el cultivo en biorreactor.	74
Figura 38. Caldo fermentativo extraído del biorreactor..	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Composición de los sueros de leche dulce y ácido.</i>	13
Tabla 2. <i>Aplicaciones de las proteínas extraídas de suero de quesería.</i>	20
Tabla 3. <i>Productos obtenidos por fermentación del lactosuero.</i>	22
Tabla 4. <i>Materias primas utilizadas en fermentaciones para producir ácido cítrico.</i>	26
Tabla 5. <i>Microorganismos productores de ácido cítrico.</i>	31
Tabla 6. <i>Aplicaciones del ácido cítrico.</i>	33
Tabla 7. <i>Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus carbonarius</i>.</i>	37
Tabla 8. <i>Características macroscópicas de <i>Aspergillus carbonarius</i>.</i>	38
Tabla 9. <i>Características microscópicas de <i>Aspergillus carbonarius</i>.</i>	38
Tabla 10. <i>Variables estudiadas en la producción de ácido cítrico por <i>A. carbonarius</i>.</i>	39
Tabla 11. <i>Clasificación de las fermentaciones.</i>	40
Tabla 12. <i>Equipos, materiales y reactivos usados para el aislamiento de <i>A. carbonarius</i> en laboratorio.</i>	46
Tabla 13. <i>Materiales, equipo y reactivos utilizados en la preparación del medio fermentativo.</i> 48	
Tabla 14. <i>Equipos, materiales y reactivos necesarios en la preparación del inóculo fúngico.</i> .. 49	
Tabla 15. <i>Equipos, materiales y reactivos utilizados en la cuantificación de ácido cítrico.</i>	51
Tabla 16. <i>Factores y dominio experimental del Diseño Central Compuesto [DCC].</i>	52
Tabla 17. <i>Equipos, reactivos y materiales usados en la fermentación en biorreactor.</i>	56
Tabla 18. <i>Características macroscópicas de las colonias de <i>Aspergillus carbonarius</i></i>	59
Tabla 19. <i>Características microscópicas de las colonias de <i>Aspergillus carbonarius</i>.</i>	61
Tabla 20. <i>Prueba de ajuste en los diferentes modelos ensayados.</i>	68
Tabla 21. <i>ANOVA para la producción de ácido cítrico.</i>	68

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I. Conteo de conidios en cámara de Neubauer y preparación de los inóculos a concentraciones de 2×10^7 esporas/mL.....	93
ANEXO II. Estandarización de NaOH 0.01 N con ftalato de potasio.....	95
ANEXO III. Cálculo del título de Fehling.	97
ANEXO IV. Promedio de los resultados de la fermentación en biorreactor.	98

RESUMEN

En la actualidad, el suero de quesería continúa siendo el principal residuo de la industria láctea a pesar de los esfuerzos por reutilizarlo. Debido a esto, la presente investigación buscó aprovechar los nutrientes de este subproducto para la producción de ácido cítrico por fermentación sumergida utilizando una cepa aislada a partir de pasas caracterizada como *Aspergillus carbonarius*. Se planteó un Diseño Central Compuesto de Superficie de Respuesta mediante el cual se evaluaron los efectos de la temperatura, el pH y la forma de la fuente carbonada [lactosa y lactosa hidrolizada]. En la fermentación en Erlenmeyer se obtuvo un máximo de 7.62 g/L de ácido con suero deslactosado, a pH inicial de 6.5 y 30 °C. Sin embargo, para la maximización de la respuesta el diseño proyectó como condiciones óptimas: pH 7, temperatura 31 °C y suero deslactosado. En un biorreactor y bajo estas condiciones, la concentración de ácido cítrico alcanzó apenas los 4.10 g/L debido al cambio de escala y a una incorrecta relación aireación-agitación.

Palabras clave: ácido cítrico, *Aspergillus carbonarius*, pH, temperatura, lactosuero, biorreactor.

ABSTRACT

Currently, whey remains the main residue of the dairy industry despite efforts to reuse it. Due to this, the present investigation sought to take advantage of the nutrients of this by-product to produce citric acid by submerged fermentation using an isolated strain characterized as *Aspergillus carbonarius*. The effects of temperature, pH and the carbon source [lactose and hydrolyzed lactose] were evaluated through a Central Design Composed of Response Surface. In fermentation in Erlenmeyer, a maximum of 7.62 g/L of acid was obtained with hydrolyzed whey, at an initial pH of 6.5 and 30 °C. However, for the maximization of the response the design projected as optimal conditions: pH 7, temperature 31 °C and hydrolyzed whey. In a bioreactor and under these conditions, the concentration of citric acid reached barely 4.10 g/L due to the change in scale and to an incorrect aeration-agitation ratio.

Keywords: citric acid, *Aspergillus carbonarius*, pH, temperature, whey, bioreactor.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

El suero lácteo es un líquido amarillo verdoso, obtenido después de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso (González, 2012). Este subproducto se caracteriza por tener más de la mitad de los sólidos presentes en la leche original (M. Hernández & Vélez, 2014), por lo que presenta un alto valor nutritivo al estar compuesto de proteínas como la α - lacto-albúmina y la β -lacto- globulina, vitaminas del complejo B, minerales como el calcio y fósforo, y altos porcentajes de lactosa usada como carbohidrato estructural (Miranda et al., 2014).

A pesar de su valiosa composición nutricional, el lactosuero ha sido considerado el principal desecho de la industria láctea debido a los elevados volúmenes producidos. Puesto que para obtener 1 kilogramo de queso se necesitan 10 litros de leche y se generan nueve litros de lacto suero (M. Hernández & Vélez, 2014). Partiendo de ello, a nivel mundial se producen entre 110 a 115 toneladas métricas de suero por año de los cuales el 45% son eliminados como efluentes altamente contaminantes (González, 2012). Su alto poder contaminante es ocasionado por su considerable contenido de materia orgánica que alcanza una DBO5 de 40 000-60 000 mg/L (Pasmay, 2015). Dicho valor se encuentra muy por encima de su máximo permisible de "100 mg/L" según los "Límites de Descarga a un Cuerpo de Agua Dulce" y de "250 mg/L" según los "Límites de Descarga al Sistema de Alcantarillado Público" establecidos por el Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA) (2015).

Por otra parte, el 55% de suero de leche que si es aprovechado, tradicionalmente ha servido de alimento para ganado vacuno y porcino por ser una rica fuente de proteínas, minerales y energía (González, 2012). Sin embargo, considerando su valor nutricional, farmacológico, fisiológico y

tecnológico en la actualidad se busca establecer al lactosuero ya no como un "desecho" sino como un "coproducto" de la industria láctea (Ramírez, 2013). Para tal fin, en los últimos años se han venido implementando múltiples tecnologías que permiten aprovechar este coproducto como materia prima para la obtención de bioproductos con mayor valor agregado. Entre estas tecnologías se encuentran el fraccionamiento, la deshidratación y la fermentación del suero lácteo. En países como Irlanda, Estados Unidos, Dinamarca y Nueva Zelanda son utilizadas las tecnologías mencionadas en la producción de medios de cultivo, de fórmulas infantiles y etanol (Pasmay, 2015), ejemplo que podría seguir Ecuador para dar un mejor uso del suero producido en el país. Puesto que, de 900 000 litros de suero lácteo obtenidos diariamente de la industria láctea formal, sólo se ocupa el 10% principalmente en la preparación de quesos de suero de leche, como el ricotta y bebidas de lactosuero fermentadas y no fermentadas (Mendoza & González, 2018).

Aunque a nivel nacional se prohíbe la descarga directa de suero de leche al desagüe sin un tratamiento previo que remueva los nutrientes que lo hacen altamente contaminante, los controles no son rigurosos. Sin embargo, si se considera que estos componentes convierten al suero lácteo en un excelente medio de cultivo para fermentaciones industriales ya no serían fácilmente desechados. Este coproducto contiene todos los macro y micronutrientes, elementos traza necesarios para el desarrollo de diferentes microorganismos y la posterior producción de metabolitos, siendo la lactosa el componente más utilizado en dicho proceso (Ramírez, 2013; Sánchez, Ortiz, & Betancourt, 2004). De esta manera se evidencia la viabilidad de utilizar el lactosuero como medio de cultivo de bajo costo para obtener nuevos productos de alto valor agregado.

El suero de leche ha sido utilizado como medio de cultivo de numerosos microorganismos incluyendo bacterias, levaduras y mohos que han permitido obtener una amplia gama de productos. Entre ellos se pueden mencionar ácidos grasos, ácidos orgánicos, alcoholes, bacteriocinas, bebidas, biomasa, biogases, biopolímeros, enzimas, insecticidas, solventes, tensoactivos, vitaminas, entre otros (Ramírez, 2013). En este contexto, el presente trabajo propone aprovechar el lactosuero como sustrato para producir ácido cítrico empleando una cepa nativa de *Aspergillus carbonarius*. Si bien la obtención industrial de ácido cítrico se lleva a cabo empleando el hongo *Aspergillus niger* usando como sustratos principalmente la sacarosa de las melazas de caña y de remolacha, estudios Sánchez et al. (2004) y Soria (1997) han demostrado la capacidad que tiene *A. carbonarius* para sintetizar mayores concentraciones de ácido cítrico que *A. niger* a partir de lactosa y maltosa respectivamente.

1.1 Planteamiento del problema.

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2017), la industria láctea ecuatoriana produce 5 135 405 litros de leche diariamente de los cuales 1,2 millones de litros son destinados a la elaboración formal de queso, generando 900 000 litros de suero diariamente y siendo reutilizados por la misma industria sólo 90 000 litros (Mendoza & González, 2018). Granda (2018) afirma que a nivel nacional este subproducto es tratado en plantas de aguas residuales que lo transforman en abono y agua inocua; mientras que tan solo 5 de las 67 industrias lácteas, registradas en el Centro de la Industria Láctea (CIL), han invertido en maquinarias para procesar el lactosuero y obtener nuevos productos, como son bebidas lácteas y suplementos proteicos.

Dentro del aspecto industrial, el reciclaje del lactosuero permite la producción de una amplia gama de productos. Puesto que Ecuador importa anualmente USD 80 millones en insumos que contienen como materia prima suero de leche, tales como bebidas materno-infantiles, suplementos para deportistas y productos farmacéuticos (“La industria lechera”, 2014), la mayoría de ellos obtenidos de la separación de los componentes del lactosuero. Asimismo, existen otros productos importados por Ecuador y que pueden ser obtenidos por medio de la fermentación del lactosuero, como es el caso del ácido cítrico, del cual sólo en el 2017 ingresaron al país alrededor de 4 752.80 toneladas métricas por un costo de USD 4 834 900 (Banco Central del Ecuador, 2018). De esta manera, el gasto en importaciones se podría disminuir al elaborar derivados del suero lácteo a nivel nacional.

Cabe recalcar que en el país han existido desacuerdos al industrializar el suero de leche, ya que las industrias lácteas lo han venido usando como parte de la materia prima de sus productos para abaratar costos, puesto que el litro de leche lo obtienen a USD 0.42, mientras que un litro de suero cuesta entre USD 0.02 y USD 0.07 (“Uso de suero de leche”, 2018). En consecuencia, los productores de leche se ven afectados por esta competencia injusta que se tiene frente a este subproducto. Sin embargo, el portafolio de productos que se pueden elaborar a partir de lactosuero a nivel mundial es extenso, entre ellos los ácidos orgánicos, que en lugar de competir con la industria láctea se abrirían espacio en otros mercados.

Otro aspecto no menos importante dentro de esta problemática es la contaminación ambiental. Aunque se afirma que el suero lácteo es tratado antes de ser desechado (Granda, 2018), no se encuentra información sobre el monitoreo de efluentes de industrias lácteas a cuerpos naturales de agua (Prócel, Posligua, & Banchón, 2016). Añadiendo a esta realidad, en Ecuador más del 80% de empresas industriales, agroindustriales, de comercio y servicios no depuran sus aguas

residuales (A. Sánchez, 2014). Lo que significa que el impacto ambiental negativo de esta industria debido a sus efluentes altamente contaminantes seguirá incrementando si no se toman las medidas pertinentes.

1.2 Antecedentes

La mayor parte del ácido cítrico que se produce en el mundo es por fermentación de materiales sacáridos empleando cepas de *Aspergillus niger*. Debido a ello, la mayoría de las investigaciones y trabajos analizados se enfocan a la optimización de la producción de ácido cítrico con dicha cepa. Entre los estudios realizados con *A. niger* empleando como sustrato suero de leche se encuentran los realizados por López, Zuluaga, Herrera, Ruiz, y Medina (2006), Leal, Pico, Castro, Guerra, y Castro (2011), Concha (2014) y Pérez, Ley, Rodríguez, y González (2016).

En Colombia se usó la cepa de *Aspergillus niger* NRRL 2270 para fermentar durante 10 días suero lácteo entero y suero desproteinizado – hidrolizado en cultivo sumergido discontinuo agitado. Se evaluó el efecto del pH, el tipo de sustrato entero o hidrolizado, la adición de nitrógeno, sacarosa, fósforo, carboximetil celulosa (CMC), gelatina y metanol. Los mejores resultados se obtuvieron con el suero entero a pH 4 adicionado con 0.75% v/v de metanol, 4 g/L de gelatina y 480 ppm de PO_4^{-3} produciéndose 38 g/L de ácido cítrico, descartando el uso de sacarosa, CMC y nitrógeno al tener efectos negativos (López & et. al., 2006).

Otra investigación colombiana enfocó su estudio únicamente al tipo de sustrato fermentando *Aspergillus niger* 765 en suero entero y suero hidrolizado, ambos desproteinizados, adicionados con 48 mg de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ durante ocho días. Obteniendo 9.9g/L y 9.6g/L de ácido respectivamente, concluyendo que en los dos casos se generan concentraciones similares de

ácido cítrico y resaltando que esta especie es capaz de desdoblar por si sola la lactosa. La única diferencia observable es que la producción de biomasa fue mayor en el suero hidrolizado con 15.2g/L debido a la mayor disponibilidad de glucosa (Leal et al., 2011).

En Perú se plantearon como variables la fuente carbonada -suero entero y suero desproteinizado suplementados con 250 mL de caldo de adaptación- y la temperatura entre 20 °C y 30 °C para la fermentación sumergida con *Aspergillus niger* en biorreactor tipo batch. Consecuentemente, en ocho días se alcanzó una concentración máxima de ácido cítrico de 3.4390 g/L en suero desproteinizado suplementado a 30 °C, con un pH inicial de 6, aireación de 1 vvm y agitación de 300 rpm (Concha, 2014).

En Cuba se analizaron por revisión bibliográfica tres sustratos azucarados, mieles finales de caña, suero de leche y azúcar refino, fermentados con *Aspergillus niger*. Los parámetros analizados fueron productividad y costo, basándose en un balance de masa y energía en cada etapa del proceso de producción, en el que las mejores combinaciones de dichos parámetros se alcanzaron con miel fina, seguida de azúcar refino y suero de leche. La alternativa de mieles finales presenta los mejores resultados y por consiguiente es la más atractiva económicamente, debido a que presenta el menor tiempo de producción, menor cantidad de fermentadores y menor consumo de energía (O. Pérez et al., 2016).

A nivel nacional se comparó la producción de ácido cítrico a partir de la fermentación de melaza y de cachaza [primera espuma generada en el proceso de clarificación de los guarapos de la caña] utilizando una cepa de *A. niger*, concluyendo que la melaza es un medio de cultivo idóneo para el desarrollo de esta cepa. Esto se confirma con los resultados de los análisis físicos y químicos que evidencian un alto contenido de carbohidratos, mientras que, al utilizar cachaza,

se observó que no existe crecimiento del microorganismo, ya que este sustrato no aportó con los carbohidratos necesarios para el desarrollo de la cepa (Rosas & Terán, 2015). En otro estudio se experimentó con pulpa de banano donde la máxima concentración de ácido cítrico fue de 21.12 g/L, utilizando 150 g/L de azúcar reductores provenientes de la pulpa de banano maduro, a las 168 horas del proceso fermentativo (Calderón & Ayala, 2015).

Con respecto al uso de la cepa *Aspergillus carbonarius* para la producción de ácido cítrico existe poca información. Sin embargo, se han recolectado dos estudios que emplean esta cepa en sus investigaciones. En el primero, se analizó (O. Sánchez et al., 2004) la producción de ácido cítrico a partir de suero de leche entero desproteinizado, hidrolizado y evaporado por fermentación sumergida con dos cepas de *A. carbonarius* NRRL 368 y NRRL 67 y una de *A. niger*. Este estudio demostró la viabilidad de las dos cepas de *A. carbonarius* para biosintetizar ácido cítrico a partir de suero de leche, independientemente de la forma como esté presente la fuente de carbono - lactosa o lactosa hidrolizada -. De igual manera, la desproteinización del suero no representó ninguna ventaja en la biosíntesis. La cepa de *A. carbonarius* NRRL 368 presentó un promedio de concentraciones de ácido cítrico para todos los tratamientos de 9.27 g/L, es decir una mayor concentración a la alcanzada por *A. niger* de 0.34 g/L (O. Sánchez et al., 2004).

La segunda investigación llevada a cabo con *A. carbonarius* NRRL 67 es de Soria (1997) quien analizó la producción de ácido cítrico con la cepa mencionada utilizando como fuente de carbono hidrol y maltosa. Este estudio se enfoca a determinar los parámetros que permitan un buen desarrollo morfológico de *A. carbonarius*, ya que las diferencias en las condiciones de cultivo que permiten un desarrollo normal de *A. niger*, inducen el crecimiento filamentoso de *A. carbonarius* y la inhibición de la síntesis de ácido cítrico. Uno de los resultados más relevantes

de este estudio es la producción de ácido de 12 g/L a las 72 horas de fermentación. Para ello se partió de un pH inicial óptimo de 6.5, superior al pH inicial normal para la mayoría de las cepas de *A. niger*, y con mayor consumo de sustrato al presentar morfología con *pellets* pequeños y numerosos.

1.3 Justificación

El crecimiento de la industria láctea y, por ende, de sus residuos, hace indispensable la aplicación de tecnologías eficientes para tratar las aguas residuales producto de esta actividad. Sin embargo, en el caso de la industria quesera, su mayor residuo, el lactosuero, por sus características nutritivas es idóneo para usarlo como materia prima en la obtención de productos de interés comercial en lugar de someterlo a un tratamiento como cualquier otra agua residual. El ácido cítrico representa uno de los muchos productos que se pueden obtener a partir de este desperdicio industrial (Rosas & Terán, 2015).

A nivel nacional, el ácido cítrico es un componente importante para diferentes industrias tales como química, alimenticia, farmacéutica, cosmética, agrícola, detergentes, entre otras. Sin embargo, al no existir producción nacional, el único método para obtener ácido cítrico es su importación desde China, Estados Unidos, Alemania, Colombia, Italia, Uruguay y Brasil, representando costos elevados (Álvarez, 2017). Dado que Ecuador es un país importador de este insumo, sería de gran interés sustituirlo por un producto nacional. Además, dicha iniciativa impulsaría el cambio de la matriz productiva al crear nuevas industrias que permiten el desarrollo del país.

Por otro lado, siguiendo el concepto de producción más limpia, la utilización de *Aspergillus carbonarius* es una alternativa viable al ser un proceso sostenible y sustentable, sumado a la

innovación que representa la producción con una cepa poco estudiada y cuyo potencial de síntesis de ácido cítrico ha mostrado ser mayor que algunas cepas de *Aspergillus niger*, comúnmente usado a nivel mundial (O. Sánchez et al., 2004; Soria, 1997).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar los efectos del pH, la temperatura y el medio nutritivo en la síntesis de ácido cítrico usando cepas de *Aspergillus carbonarius* en sustratos de lacto suero para la optimización de la producción del ácido.

1.4.2 Objetivos específicos

- Aislar el hongo *Aspergillus carbonarius* a partir de frutos secos (pasas) de *Vitis vinífera* (uvas) caracterizándolo mediante claves taxonómicas.
- Establecer la temperatura, el medio nutritivo y el valor de pH para el cultivo de *Aspergillus carbonarius* que permitan la obtención de las más altas concentraciones de ácido.
- Determinar la cinética de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación del ácido a partir de *Aspergillus carbonarius* utilizando un biorreactor para la simulación de un proceso industrial.

1.5 Hipótesis

Si la temperatura, el pH y el sustrato influyen en la producción de ácido cítrico a partir de *Aspergillus carbonarius* entonces se pueden establecer valores óptimos de éstos para obtener máximas concentraciones de dicho ácido.

CAPÍTULO 2

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Suero de leche

2.1.1 Generalidades del suero de leche

La Norma Técnica Ecuatoria NTE INEN 2594:2011 define al suero de leche de la siguiente manera:

Suero de leche. Es el producto lácteo líquido obtenido durante la elaboración del queso, la caseína o productos similares, mediante la separación de la cuajada, después de la coagulación de la leche pasteurizada y/o los productos derivados de la leche pasteurizada. La coagulación se obtiene mediante la acción de, principalmente, enzimas del tipo del cuajo (INEN, 2011, p. 1).

La producción de quesos se basa en la coagulación de la caseína ya sea por vía enzimática (uso de la enzima quimosina o rennina), ácida o bacteriana produciendo el rompimiento del sistema coloidal de la leche en dos fracciones. La fracción sólida, que constituye el queso formado por proteínas insolubles y lípidos; y la fracción líquida, correspondiente al lactosuero, que contiene en suspensión todos los componentes nutricionales solubles y no solubles que no fueron integrados a la coagulación de la caseína (Poveda, 2013).

Este subproducto se caracteriza por ser un líquido fluido, de color amarillo verdoso translúcido, o a veces un poco azulado, debido al alto contenido de lactoflavina o vitamina B2 resultante de la coagulación de la leche. Además, presenta un sabor agradable, débilmente dulce, de carácter ácido y con un contenido de nutrientes o extracto seco del 5.5 al 7 % proveniente de

su materia prima (Concha, 2014; Sanjurjo, 2015). Entre sus nutrientes más abundantes están la lactosa, proteínas solubles, grasa butírica, sales minerales y una alta concentración de vitaminas del complejo B (M. González, 2012).

2.1.2 Tipos de lactosuero y su composición nutricional

Los tipos de suero lácteo y sus características fisicoquímicas dependen principalmente de la leche utilizada para la elaboración del queso, el tipo de queso producido y el proceso tecnológico empleado (Poveda, 2013). A partir de estos aspectos se encuentran con mayor frecuencia dos tipos de lactosuero: el suero ácido y el suero dulce.

El suero dulce se obtiene cuando la caseína es fragmentada, desestabilizada y precipitada por enzimas proteolíticas o coagulantes - quimosina o diferentes renninas – bajo condiciones específicas - temperatura entre 15 a 50 °C y pH entre 5.9 a 6.6 -. Por otra parte, cuando la precipitación se realiza por acidificación de la leche a pH entre 4.3 a 4.6 - empleando bacterias productoras de ácido láctico o por agregado de ácidos orgánicos o minerales – se alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas produciendo que la micela de caseína se desestabilice y precipite dejando como remanente una solución ácida denominada suero ácido (M. Hernández & Vélez, 2014; Urtasun, Hirsch, Baieli, Miranda, & Cascone, 2018).

Respecto a la composición nutricional, el lactosuero representa alrededor del 85-95% del volumen de la leche y retiene el 55% de los nutrientes (Ramírez, 2013). Partiendo de ello, este subproducto está compuesto fundamentalmente por lactosa, proteínas solubles (lactoalbúminas y lactoglobulinas), grasa, sales minerales - entre las que destacan citratos, fosfatos, calcio, magnesio y potasio- y vitaminas hidrosolubles - como la riboflavina, el ácido pantoténico y la vitamina C- pues las liposolubles debido a su alto contenido de grasa están ausentes (Guerrero,

Ramírez, & Puente, 2011). En la Tabla 1 se presenta una descripción más detallada de la composición del lactosuero dulce y ácido.

Tabla 1. *Composición de los sueros de leche dulce y ácido.*

COMPONENTE	SUERO DULCE	SUERO ÁCIDO
% de Agua	93 - 94	94 - 95
% de Grasa	0.8	0
% de Proteínas	0.9	0.9
% de Lactosa	4.5 - 5	3.8 - 4.4
% de Ácido láctico	0	0.8
% de Ácido cítrico	0.15	0.1
% de Minerales	0.5	0.7
% Sólidos totales	6 - 7	5 - 6
pH	5.8 - 6.6	4.5 - 5
Densidad relativa (kg/L)	1.026	1.024 - 1.025

Nota. Adaptado de Van der Schans (2002) citado en Recinos & Saz (2006), p. 16; Spreer (1991) citado en Concha (2014, p. 31).

2.1.3 Impacto ambiental del suero de leche

Anualmente se producen a nivel mundial aproximadamente 200 millones de toneladas de lactosuero, de los cuales el 60 % es industrializado mientras que el 40 % restante se dispone como alimento animal, fertilizante o es descargado a cursos de agua o al drenaje como desperdicio (Urtasun et al., 2018). En los dos últimos casos, el suero de leche debido a su alta composición de nutrientes representa un grave problema medioambiental, especialmente en

países en desarrollo en los que el mayor porcentaje de suero no es aprovechado industrialmente y cuyas leyes no regulan estrictamente su adecuada disposición.

En el caso de los suelos, la descarga continua de suero de leche modifica sus propiedades fisicoquímicas alterando su estructura y reduciendo el rendimiento de los cultivos, además provoca lixiviación de nitratos debido a que el lactosuero contiene nitrógeno soluble en agua el cual es arrastrado hasta los mantos freáticos provocando no sólo pérdidas agrícolas sino también contaminación de acuíferos y potenciales riesgos a la salud humana y animal (Valencia & Ramírez, 2009).

Con respecto a la contaminación del agua, el lactosuero debido a su alto contenido nutricional -especialmente de lactosa- genera una demanda biológica de oxígeno (DBO) de 40 000 a 60 000 ppm y una demanda química de oxígeno (DQO) de 50 000 a 80 000 ppm, las mismas que sobrepasan la concentración de oxígeno disuelto -7 a 8 ppm- presente en la mayoría de los cursos de agua creando así concentraciones anóxicas para los microorganismos degradadores (Petrenko, 2005).

2.1.4 Aprovechamiento industrial

Las mismas características nutritivas que dan al lactosuero un alto poder contaminante, son las que lo convierten en una excelente materia prima para la obtención de diferentes sustancias con valor agregado y que son utilizadas en diversas industrias.

Cabe recalcar que el uso del suero de leche no es algo nuevo ya que se lo ha venido utilizando desde la antigüedad – 7 mil años atrás – con fines medicinales, como el tratamiento de infecciones, cicatrización de heridas, enfermedades estomacales, así como también en la elaboración de alimentos como bebidas funcionales, sopas y mantecas de suero (Muset &

Castells, 2017). A pesar de esto, en la edad moderna se comenzó a eliminar el suero como un desperdicio más, debido entre otros aspectos al desconocimiento de algunos productores sobre sus potenciales usos, a la falta de tecnologías para procesarlo o a una insuficiente normativa alimentaria que regule su uso como ingrediente alimenticio (Poveda, 2013).

Sin embargo, a partir de 1977 hasta la actualidad se han venido desarrollando tecnologías que permiten dar mayor número de usos al lactosuero, así como también obtener sustancias con diferentes niveles de valor agregado (L. Silva, Bermúdez, & Betancourt, 2013) .

2.1.4.1 Procesamiento y usos del lactosuero

El suero de quesería puede ser usado directamente para la obtención de quesos de suero, bebidas fermentadas y no fermentadas, biogás, fertilizantes y alimentación animal; mientras que de manera indirecta con el empleo de diferentes tecnologías el suero puede ser deshidratado, desmineralizado, fraccionado o fermentado para obtener productos de bajo, medio y alto valor agregado.

Como etapa inicial para el procesamiento del lactosuero se necesita un pretratamiento que consiste en una filtración o clarificación, un descremado (opcional), una pasteurización y un almacenamiento en frío no mayor a 24 horas como se muestra en la Figura 1, con el objetivo de que obtenga las condiciones y características requeridas por los distintos procesos a los que será sometido (Parzenese, 2008). Este pretratamiento puede ser omitido para el uso como fertilizantes o alimento animal por sus bajos requerimientos de calidad, y para uso inmediato en la elaboración de bebidas fermentadas y no fermentadas (Muset & Castells, 2017).

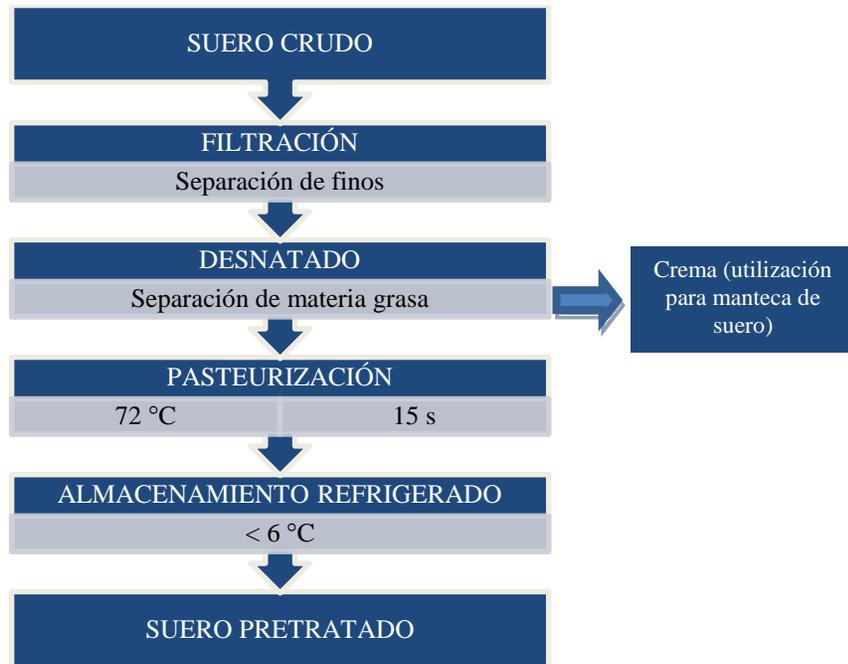


Figura 1. Obtención de suero pretratado (Muset & Castells, 2017).

Entre los principales usos directos que se le da al lactosuero dulce – especialmente en los países de la cuenca mediterránea - está la producción de quesos de suero como el Ricota, el Brocciu y la variedad de quesos marrones, además en algunos países europeos se usa suero crudo como cultivo iniciador para la fabricación de quesos como el Provolone, Grana, Mozzarella, Oaxaca, Gruyere o Emmental (Berruga, 1999; Muset & Castells, 2017).

Siguiendo el contexto alimenticio, tanto el suero ácido y el dulce son utilizados para la elaboración de bebidas fermentadas y no fermentadas que aportan un alto contenido de nutrientes a los consumidores. En el caso de las bebidas fermentadas, la lactosa del suero dulce es degradada por una mezcla de levaduras y bacterias ácido lácticas para producir kéfir y liberar organismos probióticos en el intestino humano; mientras que las bebidas no fermentadas o refrescantes utilizan principalmente suero ácido desproteinizado y desnatado, ya que su acidez es más compatible con bebidas de frutas cítricas (Parra, 2009).

Por otro lado, una de las primeras alternativas de valorización del lactosuero para los pequeños productores de queso ha sido como alimento de ganado. Esto se debe a que el suero fresco es suministrado directamente en forma de agua de bebida o como sustituto parcial del alimento animal, sin necesidad de realizar mayores inversiones. Además, estudios que comprueban su efecto como prebiótico, inmunomodulador, estimulador de la microbiota benéfica y mejorador del bienestar animal han incrementado su uso (Muset & Castells, 2017).

Dentro de la agricultura, el lactosuero ha sido ampliamente utilizado como fertilizante de suelos por su contenido de nutrientes. Sin embargo, su uso para riego de terrenos debe ser muy controlado puesto que puede producir lixiviación como se mencionó en el apartado 2.1.3 o también conducir a una excesiva salinización de los suelos por su alto contenido de minerales (Berruga, 1999).

Aunque una solución que se ha dado para combatir estos impactos negativos es la fermentación anaeróbica del suero lácteo - sólo o junto con excretas del ganado - en biodigestores en los cuales se transforma los elementos contaminantes (lactosa, proteínas y lípidos del suero) en metano y en fertilizantes líquidos y sólidos. De esta manera se logra obtener biogás capaz de satisfacer las necesidades energéticas del proceso productivo del queso y además biofertilizantes que no alteran las características de los suelos y sustituyan a los abonos químicos (Muset & Castells, 2017; Recinos & Saz, 2006; Valencia & Ramírez, 2009).

En cuanto al procesamiento del lactosuero para obtener subproductos se emplean principalmente tecnologías de membrana para el fraccionamiento y extracción de compuestos específicos, de secado por aerosol para la obtención de polvos y fermentaciones para la producción de bioproductos (Parzenese, 2008; Ramírez, 2013)

Las tecnologías de membrana empleadas para el fraccionamiento del lactosuero se basan en el uso de membranas semipermeables combinadas con técnicas de filtrado como son la microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF), ósmosis inversa, diafiltración, electrodiálisis y cromatografía con el objetivo de obtener dos corrientes: el permeado que contiene aquellos compuestos filtrados por la membrana y el concentrado o retenido compuesto por la sustancia de interés (Ramírez, 2013). En la Figura 2 se pueden apreciar los distintos procesos por los que atraviesa el suero para la obtención de los distintos subproductos.

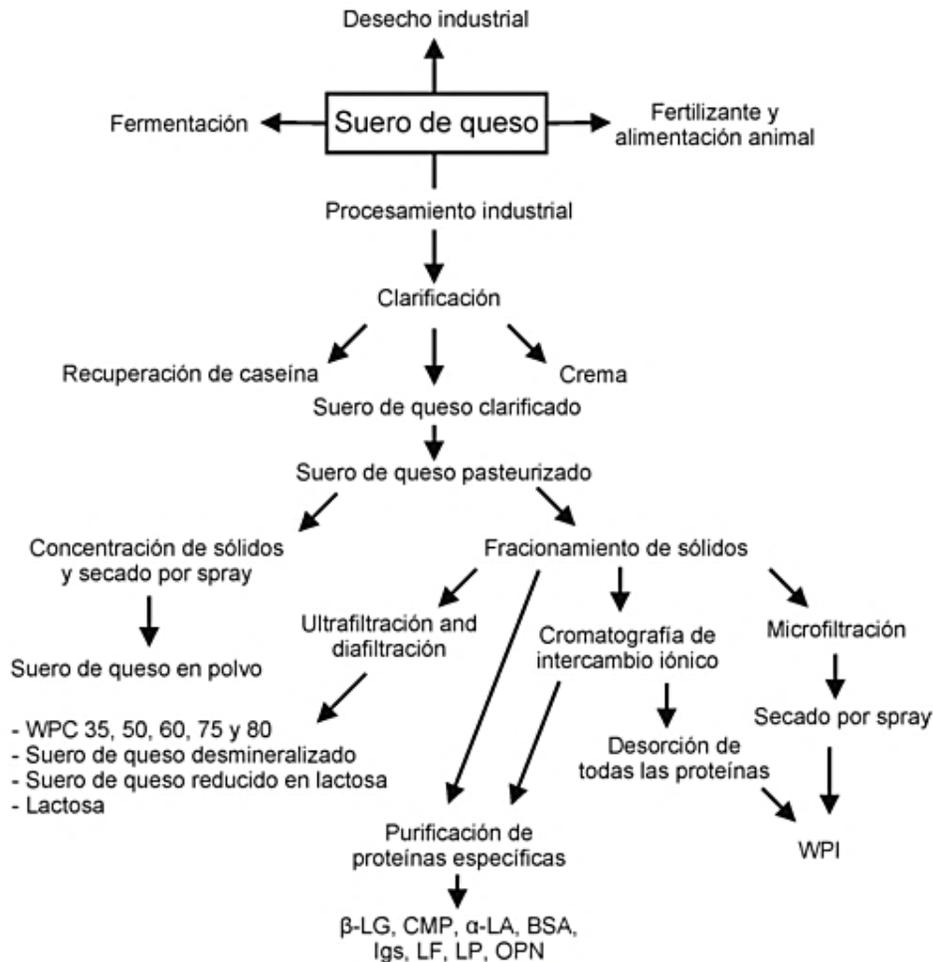


Figura 2. Productos obtenidos del fraccionamiento del lactosuero: WPC (concentrado de proteína de suero), WPI (aislado de proteína de suero), β -LG (β -lactoglobulina), CMP (caseinmacropéptido), α -LA (α -lactoalbúmina), BSA (seroalbúmina bovina), Igs (inmunoglobulinas), LF (lactoferrina), LP (lactoperoxidasa), OPN (osteopontina) (Urtasun et al., 2018, p. 50)

Entre los componentes obtenidos del fraccionamiento del lactosuero, los de mayor importancia para las industrias son las proteínas, la lactosa, las vitaminas y los minerales debido a sus propiedades y características que les dan un alto rango de aplicaciones.

Proteínas: La separación de las proteínas se realiza por ultrafiltración, diafiltración y secado del suero para obtener concentrado de proteína [WPC, por sus siglas en inglés Whey Protein Concentrate] – compuesto por 34 a 75 % de proteínas, grasa, restos de lactosa y sales - y el permeado – formado por agua, lactosa, minerales y nitrógeno no proteico -.

Por otro lado, al someter al suero a un proceso de ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico se obtiene aislado de proteína [WPI, por sus siglas en inglés Whey Protein Isolate] cuyo contenido proteico es de 90 a 95 %, libre de grasa, lactosa y sales (Berruga, 1999).

En ambos casos el concentrado proteico obtenido se compone aproximadamente de 45 % β -lactoglobulina, 20 % de caseinmacropéptido, 10 % de inmunoglobulinas, 5 % seroalbúmina bovina y otras minoritarias como lactoferrina, lactoperoxidasa, lisozima y factores de crecimiento (Urtasun et al., 2018).

Todas las proteínas mencionadas presentan propiedades químicas, físicas y funcionales que les permiten ser aprovechadas en industrias como la alimenticia, médica y farmacológica. En la Tabla 2 se pueden encontrar diversos usos que se les da a las diferentes seroproteínas.

Tabla 2. Aplicaciones de las proteínas extraídas de suero de quesería.

Tipo de componente	Componentes individuales	Propiedades	Usos
Proteínas mayoritarias	β -lactoglobulina	Estabilizantes de espumas	Confitería, panadería, embutidos
	α -lactoalbúmina	Propiedades gelificantes	Fórmulas infantiles y nutracéuticos
	Seroalbúmina bovina	Espumante	Productos como merengue
	Inmunoglobulinas	Emulsionantes Enlaces con lípidos Composición en aminoácidos Afinidad por receptores glicosilados Efecto inmunoregulatorio	Alimentos funcionales
Proteínas minoritarias	Lactoferrina	Actividad antimicrobiana	Farmacéutica
	Lactoperoxidasa	Efecto bactericida	Fórmulas infantiles
	Factores de crecimiento	Promotores de utilización del hierro	Aplicaciones nutracéuticas
	Péptidos bioactivos	Actividad antihipertensiva	Ingredientes bioactivos en suplementos alimentarios
	Caseinmacropéptidos	Actividad antitrombótica, antienvjecimiento	Cuidado de la piel y salud bucal

Nota. Tomado de Muset & Castells (2017, p. 19).

Minerales y vitaminas: El suero de leche también contiene una importante cantidad de sales minerales - destacando el potasio, calcio, fósforo, sodio y magnesio – y vitaminas hidrosolubles - tiamina, ácido pantoténico, riboflavina, piridoxina, ácido nicotínico, cobalamina y ácido ascórbico – compuestos indispensables en la dieta para el desarrollo y fortalecimiento de huesos

y tejidos (Mattos, 2015; Uribe et al., 2008). Ambos nutrientes pueden ser aprovechados directamente en bebidas a base de suero, o por el contrario pueden ser fraccionados por diferentes técnicas de separación para usarlos como productos separados. Como en el caso de los minerales, el suero se desmineraliza por electrodiálisis u ósmosis inversa para eliminar el sabor metálico del suero y las sales extraídas son aprovechadas para la fabricación de bebidas o fórmulas infantiles (Berruga, 1999; Parra, 2009)

Lactosa: Es un glúcido reductor formado por una molécula de glucosa y una de galactosa unidas por un enlace glicosídico, representa el componente mayoritario del lactosuero después del agua y es el responsable de sus altos niveles de DQO (Mattos, 2015).

Su proceso de obtención a partir de lactosuero comienza concentrando las proteínas del suero por micro y ultrafiltración y tratando el permeado obtenido con membranas de nanofiltración para retirar las sales minerales y purificarlo mediante cristalización (M. Hernández & Vélez, 2014). Esta lactosa obtenida es ampliamente utilizada como ingrediente alimenticio en fórmulas de bebés, en alimentos dietéticos y en repostería (Muset & Castells, 2017), además es usada como excipiente en fármacos y como materia prima para obtener bioproductos – por fermentaciones – y derivados de la lactosa como lactulosa, lactitol, ácido lactobiónico, lactosil urea y galacto-oligosacáridos (Almécija, 2007).

Otra tecnología que aprovecha las características nutritivas del suero de quesería es la fermentación, en la cual se ocupa la lactosa como sustrato de crecimiento de diversos microorganismos que producen bioproductos específicos (Ramírez, 2013). Existe una amplia gama de productos obtenidos mediante esta tecnología, en la Tabla 3 se exponen algunos de ellos.

Tabla 3. *Productos obtenidos por fermentación del lactosuero.*

Producto	Microorganismo	Medio
Ácidos grasos		
Ácido oleico, palmítico y triglicéridos.	<i>Apiotrichwn curvatum</i> , <i>Candida curvata</i> y <i>Tricbosporon cutaneum</i>	Permeado de lactosuero
Ácidos orgánicos		
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> y <i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Lactosuero desproteínizado, evaporado e hidrolizado
Alcoholes		
Bioetanol	<i>Candida pseudotropicalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>K. fragilis</i> , <i>K. bulgaricus</i> , etc	Suero permeado, desproteínizado, hidrolizado y/o suplementado con extracto de levadura
Bacteriocinas		
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	Lactosuero permeado
Biomasa o proteína unicelular		
	<i>Kluyveromyces marxianus</i> y <i>K. fragilis</i>	Lactosuero entero o desproteínizado
Biogases		
Metano e hidrógeno renovable	<i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Bacillus</i>	Lactosuero
Biopolímeros		
Ácido poliláctico, polilactato, polihidroxialcanoatos	<i>Alcaligenes</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhizobium</i> y <i>E. coli recombinante</i>	Lactosuero
Enzimas		
β -D-galactosidasa	<i>Candida pseudotropicalis</i> y <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactosuero desproteínizado y suplementado
Insecticidas		
Endotoxina	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Lactosuero entero dulce
Solventes		
Acetona	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Lactosuero permeado
Tensoactivos		
Soforolípidos	<i>Cryptococcus curvatus</i>	Lactosuero desproteínizado concentrado
Vitaminas		
Vitamina B12	<i>Propionibacterium shermanii</i>	Lactosuero suplementado con extracto de levadura y minerales

Nota. Adaptado de Ramírez (2013).

2.2 Ácido cítrico.

2.2.1 Definición y propiedades

El ácido cítrico o ácido 2-hidroxi-1,2,3- propanotricarboxílico [Figura 3] es un ácido orgánico débil cuya fórmula química es $C_6H_8O_7$ y su peso molecular es 192.12 g/mol (Á. González, 2015). Es un ácido tricarboxílico presente naturalmente en todos los organismos aerobios ya que funciona como intermediario en el ciclo de Krebs (A. Muñoz, Galindo, López, Cantú, & Barajas, 2014).

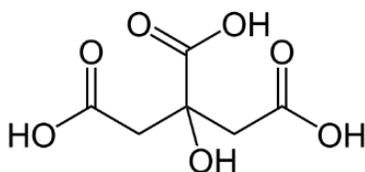


Figura 3. Fórmula estructural del ácido cítrico (Muñoz et al., 2014, p, 19).

Este ácido orgánico se puede presentar de manera anhidra o como monohidrato con 91.42% de ácido cítrico anhidro y 8,5% de agua (A. Muñoz et al., 2014). El ácido cítrico anhidro está formado por cristales incoloros translúcidos que constituyen un polvo fino o granular, blanco, inodoro, soluble en agua, de sabor ácido, con punto de fusión entre los 153 a 159 °C y una densidad de 1.66 g/cm³ (Concha, 2014; Á. González, 2015). Además, posee tres valores de pK_a a pH de 3.1, 4.7 y 6.4 debido a los tres grupos carboxílicos presentes en su estructura (Show et al., 2015).

2.2.2 Bioquímica del ácido cítrico

Desde el punto de vista bioquímico el ácido cítrico es el primer intermediario del ciclo de Krebs [Figura 4] producto de la reacción entre el oxalacetato con la acetil- CoA y catalizado por

la enzima citrato sintasa (Sanagustín, 2014). El ciclo del Krebs llamado también ciclo del ácido cítrico es una ruta metabólica mediante la cual se oxidan por vía catalítica combustibles metabólicos - hidratos de carbono, ácidos grasos y aminoácidos – hasta convertirlos en dióxido de carbono y energía metabólica que impulsará la síntesis de ATP (Pratt & Cornely, 2012). En condiciones normales, todos los intermediarios del ciclo se mantienen constantes gracias a las enzimas que intervienen en las ocho reacciones del ciclo; sin embargo, para la acumulación de ácido cítrico y su posterior extracción es necesario alterar dicha ruta ya sea por ingeniería genética y/o manipulación del medio de crecimiento (Á. González, 2015).

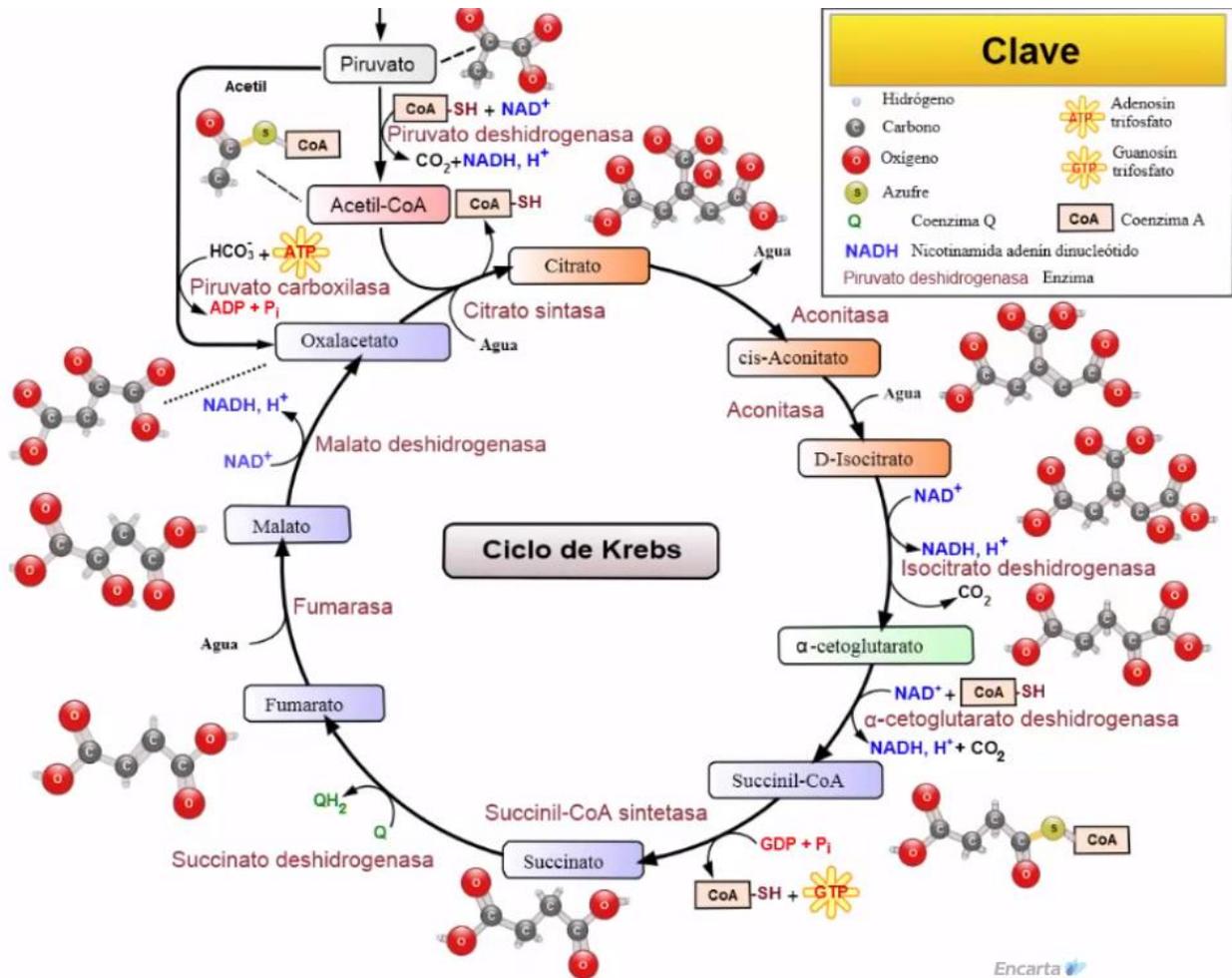


Figura 4. Ciclo de Krebs (Sanagustín, 2014).

2.2.3 Métodos de obtención y rendimiento

2.2.3.1 Antecedentes de producción

El ácido cítrico es un compuesto abundante en las frutas cítricas como son el limón, naranja, mandarina, entre otros y en los huesos, músculos y sangre de los animales. La primera obtención de este ácido orgánico la realizó Scheele en 1784 a partir del jugo de limón; sin embargo, recién en 1920 se consiguió producirlo comercialmente empleando carbonato de calcio para obtener un precipitado de citrato de calcio, ácido sulfúrico para recuperar la molécula del ácido cítrico y carbón activado para purificarlo. Con este proceso se producía una tonelada de ácido partiendo de 30 toneladas de limones constituyéndose la materia prima en un limitante de su producción (Blanco & Herryman, 2005).

En 1893, Wehmer obtuvo ácido cítrico fermentando medios azucarados con *Penicillium glaucum* pero este método no se industrializó por su larga duración – varias semanas- y por la neutralización del ácido que provocaba problemas de contaminación y formación de ácido oxálico (Soccol, Vandenberghe, Rodrigues, & Pandey, 2006; Soria, 1997).

Posteriormente, James Currie en 1916 descubrió que varias cepas de *Aspergillus niger* producían concentraciones significativas de ácido cítrico a pH 2 lo que reducía los riesgos de contaminación, además estas cepas lograron conversiones de hidratos de carbono a ácido cítrico mayores al 60 % en lapsos de una a dos semanas (Show et al., 2015). A partir de este descubrimiento la extracción tradicional desde frutos cítricos fue desplazada por los procesos fermentativos, brindando a las industrias una opción de producción sustentable al poder aprovechar diversas fuentes de azúcares, - especialmente provenientes de residuos – para las fermentaciones (Álvarez, 2017; Soria, 1997).

2.2.3.2 Métodos de obtención

La obtención del ácido cítrico se puede lograr tanto por síntesis química como por síntesis biológica. Químicamente, el ácido cítrico fue obtenido por Grimaux y Adam en 1880 usando glicerol como materia prima, pero este método no resultó ser competitivo frente a los procesos fermentativos (Show et al., 2015).

Por el contrario, la síntesis biológica de ácido cítrico mediante la fermentación de diversos sustratos [Tabla 4] con diferentes microorganismos [apartado 2.2.4] abrió paso a la comercialización de dicho producto. Existen dos métodos que son utilizados para la bioproducción del ácido: la fermentación superficial – en fase sólida o líquida – y la fermentación sumergida.

Tabla 4. *Materias primas utilizadas en fermentaciones para producir ácido cítrico.*

Tipo de fermentación	Materia prima
Cultivo superficial en fase líquida	Desechos de cervecería, algarrobo, desperdicios de algodón, tubérculos de <i>Asphodelus aestivus</i> , nabo (enriquecido con melaza).
Cultivo superficial en fase sólida	Residuos de zanahoria, bagazo de yuca, hidrolizado de celulosa y caña de azúcar, cáscara de café, mazorca de maíz, salvado de arroz desollado, orujo de uva y manzana, cáscara de kiwi, melaza, desechos de procesamiento de mejillones, residuos de naranja, residuos de piña, salvado de arroz y de trigo, sacarosa.
Cultivo sumergido	Hidrolizados de bagazo, melaza de remolacha, melaza de faja negra, desechos de cervecería, melaza de caña, extracto de vaina de algarroba, aceite de coco, almidón de maíz, jarabe de dátiles, glicerol, almidón hidrolizado, n-parafina, aceite de palma, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de colza, licor de grano gastado, hemicelulosa de madera, permeado de suero de leche.

Nota. Adaptado de Show et al. (2015, p. 276).

La fermentación superficial en fase sólida es el método más sencillo de obtención, en ésta se utilizan como sustratos residuos sólidos ricos en almidón como la pulpa de batatas, salvado de arroz y trigo, los cuales son inoculados con esporas del hongo responsable de la degradación de los carbohidratos y excreción de ácido cítrico. Después de 90 horas de fermentación, se prensa el sustrato y se extrae con agua caliente una solución de citrato de calcio de la cual por precipitaciones y extracciones se obtienen aproximadamente 4 % de ácido cítrico. Como consecuencia de su bajo rendimiento este proceso no es aplicado a gran escala (Soria, 1997).

Por su parte, el cultivo superficial en fase líquida es el método más antiguo empleado para producir ácido cítrico. Este proceso se lleva a cabo en cuartos de fermentación con sistemas de ventilación, utilizando bandejas de acero para colocar el medio líquido – generalmente melazas diluidas y suplementadas - sobre el cual se inoculan las esporas del hongo. Así, el micelio crece en la superficie y el ácido cítrico es secretado en el medio, permitiendo retirar el medio con ácido y recargar medio nuevo sin la destrucción del micelio. Después de 9 a 12 días de fermentación se lava el micelio por filtración y el residuo líquido es tratado para extraer el ácido cítrico con un rendimiento de 0.4 kg/m³ por hora (Á. González, 2015; Soria, 1997). A pesar de que este método tiene una operación simple y es menos sensible a las condiciones ambientales, su baja productividad vuelve obsoleta esta técnica para su uso industrial (A. Muñoz et al., 2014).

Otra técnica de fermentación es el cultivo sumergido, este método es el más importante ya que es utilizado a nivel industrial para satisfacer aproximadamente el 80 % de la demanda mundial de ácido cítrico (G. Pérez, 2013). El cultivo sumergido se lo realiza en biorreactores de acero inoxidable con capacidades desde 50 000 hasta 200 000 litros, éstos son llenados con el medio de cultivo en el cual se inocula el microorganismo y se oxigenan con aire estéril lo que aumenta la

superficie de contacto líquido–aire y consecuentemente la producción de ácido (A. Muñoz et al., 2014).

Según las características del cultivo sumergido existen diversos modelos de biorreactores, en el caso del ácido cítrico se utilizan modelos en columna o torre para que los microorganismos se desarrollen libres en el medio de crecimiento. Estos modelos en columna, también se clasifican en dos tipos: reactores con agitación mecánica [Figura 5] y reactores con agitación neumática (M. A. Muñoz, 2012). Además, el proceso fermentativo puede llevarse a cabo por tres sistemas de operación tipo discontinuo o batch, discontinuo-alimentado [feed-batch] o continuo, siendo el primero el más usado en la fermentación cítrica (Soccol et al., 2006).

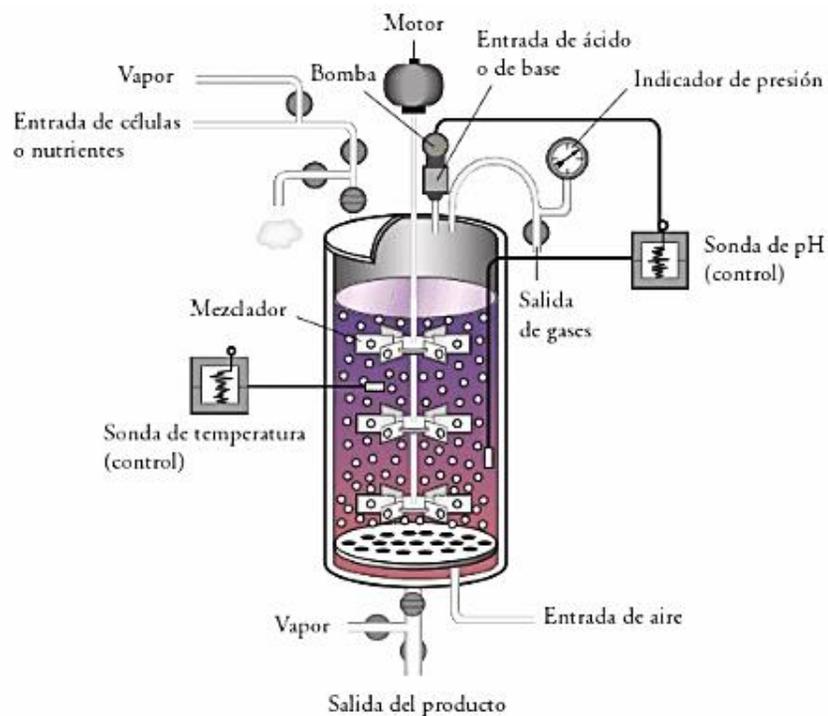


Figura 5. Modelo de biorreactor para fermentaciones sumergidas (M. A. Muñoz, 2012, p. 116).

Entre las limitaciones que presenta esta técnica se encuentran los mayores costos de energía, instalaciones más sofisticadas y controles más rigurosos (Show et al., 2015); sin embargo, todas

ellas son compensadas por su alta productividad y rendimiento, bajo costo de mantenimiento y mano de obra, menos riesgo de contaminación y menor sensibilidad a elementos traza (O. Pérez et al., 2016).

2.2.4 Proceso fermentativo y factores influyentes

Todo proceso fermentativo, independientemente de su tipo – aerobio o anaerobio -, tiene tres etapas: preparación e inoculación, fermentación y recuperación del bioproducto (Show et al., 2015).

En el caso del ácido cítrico la preparación del medio es muy importante en procesos de fermentación sumergida ya que de su composición depende en gran medida la producción de ácido. Los factores que deben considerarse al preparar el medio son el tipo y la concentración de la fuente de carbono, nitrógeno, fosfato, oligoelementos y pH (A. Muñoz et al., 2014; G. Pérez, 2013). Todos ellos son establecidos acorde a las necesidades nutricionales del microorganismo empleado, ya que ciertos nutrientes deben encontrarse en exceso, otros en niveles limitantes y algunos por debajo de los valores umbrales para evitar problemas de inhibición del metabolismo o producción colateral de ácido oxálico (Garriga, Suárez, & Cruz, 2005; A. Muñoz et al., 2014).

Por otro lado, el inóculo se prepara a partir de la esporulación del hongo en un medio de cultivo apropiado y su posterior lavado para obtener una suspensión de esporas que será añadida al medio. Las cepas utilizadas a nivel industrial – principalmente *Aspergillus niger*- no se comercializan, por ello las cepas empleadas a nivel de laboratorio pueden ser obtenidas en bancos de cultivos o mediante su aislamiento y caracterización (Álvarez, 2017).

En cuanto a la etapa de fermentación *per se*, se consideran las condiciones ambientales que requiere el cultivo dentro del biorreactor como son: temperatura, flujo de aireación – que

determina la cantidad de oxígeno – y la velocidad de agitación – que influye en la estructura micelial (Concha, 2014; G. Pérez, 2013).

Finalmente, el ácido cítrico es recuperado del caldo fermentativo mediante tres operaciones unitarias: precipitación, extracción y adsorción. Para la precipitación se necesita filtrar previamente el caldo para retirar el micelio del hongo y materiales suspendidos. Una vez filtrado se adiciona hidróxido de calcio obteniendo un precipitado de citrato de calcio, que es filtrado y lavado con agua destilada. La extracción del ácido cítrico a partir del citrato de calcio se logra tratando al precipitado con ácido sulfúrico para descomponer el citrato, posteriormente se filtra para obtener un licor madre. A este licor se le eliminan las impurezas a través de adsorción con carbón activado e intercambiadores de iones y cationes, se lo concentra con evaporación al vacío a 40 °C y se forman cristales de monohidrato de ácido cítrico en un cristizador al vacío a temperaturas de 20-25 °C o ácido cítrico anhidro a temperaturas mayores a los 36.5 °C (Rosas & Terán, 2015; Show et al., 2015).

En los últimos años se han venido desarrollando otras tecnologías para la recuperación del ácido cítrico entre ellas se encuentran la extracción con solventes – usando octanol – o la electrodiálisis, aprovechando la diferencia del potencial eléctrico entre los iones y la solución acuosa; sin embargo, estos procesos resultan más costosos que la técnica descrita (Soccol et al., 2006).

2.2.5 Métodos de detección y cuantificación de ácido cítrico

En análisis de laboratorio, la detección de ácido cítrico se puede realizar empleando indicadores ácido – base como el verde bromocresol o la fenolftaleína; mientras que la cuantificación se puede realizar por espectrofotometría, cromatografía de gases, cromatografía

líquida, resonancia magnética nuclear y el método tradicional de titulación (Álvarez, 2017; Bakhiet & Al-mokhtar, 2015).

2.2.6 *Microorganismos productores de ácido cítrico*

Un gran número de microorganismos incluyendo bacterias, mohos y levaduras [Tabla 5] han sido empleados para la producción de ácido cítrico. Sin embargo, la mayoría de ellos no son capaces de producir rendimientos comercialmente aceptables - ya que este ácido se produce únicamente bajo condiciones de desequilibrios drásticos - o sintetizan productos indeseables como el ácido isocítrico en el caso de las levaduras (Soccol et al., 2006).

En la industria el microorganismo preferido para la producción de ácido cítrico debido a su estabilidad genética, alto rendimiento, capacidad de fermentar una amplia gama de materias primas de bajo costo y ausencia de reacciones indeseables es el *Aspergillus niger* (Bakhiet & Al-mokhtar, 2015).

Tabla 5. *Microorganismos productores de ácido cítrico.*

Microorganismos	Especies
Bacterias	<i>Arthrobacter paraffinens, Bacillus lincheniformis, Corynebacterium ssp.</i>
Mohos	<i>Aspergillus niger, A. aculeatus, A. carbonarius, A. awamori, A. foetidus, A. fonsecaeus, A. phoenicis y A. wenti, Trichoderma viride, Mucor pyriformis, Penicillium janthinellum</i>
Levaduras	<i>Candida tropicalis, C. oleophila, C. guilliermondii, C. citroformans, Hansenula anamola, Yarrowia lipolytica, Torulopsis, Debaromyces, Torula, Pichia, Kloekera, Saccharomyces, Zygosaccharomyces</i>

Nota. Adaptado de Show et al. (2015) y Soccol et al. (2006).

2.2.7 Producción y consumo mundial y nacional

La producción mundial de ácido cítrico en el 2015 excedió los 2 millones de toneladas, con una demanda creciente de aproximadamente 3.7 % anual hasta el 2020 (Ciriminna, Meneguzzo, Delisi, & Pagliaro, 2017). Los países con mayor producción de ácido cítrico son China y Canadá, entre los dos acaparan entre el 40 y 50 % del mercado internacional debido a sus bajos precios en comparación con las empresas estadounidenses y europeas (Rivada, 2008).

Las ventas de este producto, según su uso, se distribuyen de la siguiente manera: 70 % industria de alimentos, 12 % industria farmacéutica y 18 % para otras aplicaciones (Passos & Ribeiro, 2010).

A nivel nacional, no se produce industrialmente este ácido; sin embargo, su uso es evidente ya que desde el año 2015 hasta el 2018 se han importado 15 107.6 toneladas de ácido cítrico con un costo total de \$ 13 900 000. El principal proveedor de Ecuador es China, pero también se registran importaciones desde otros 13 países entre ellos Colombia, Uruguay y Estados Unidos (Banco Central del Ecuador, 2018).

2.2.8 Aplicaciones del ácido cítrico

Las características fisicoquímicas, versatilidad y no toxicidad del ácido cítrico lo han llevado a tener un papel importante dentro de varias industrias. Sumado a ello, su aceptación a nivel mundial como un producto Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) y su aprobación como aditivo alimentario por el comité FAO/OMS amplían aún más su rango de aplicaciones (Show et al., 2015). Algunos ejemplos de aplicaciones del ácido cítrico se exponen en la Tabla 6.

Tabla 6. *Aplicaciones del ácido cítrico.*

Producto	Función
Bebidas	Proporciona acidez y complementa los sabores de las frutas y bayas. Aumenta la eficacia de los conservantes antimicrobianos. Se utiliza en el ajuste del pH para proporcionar acidez uniforme.
Jaleas, mermeladas y conservas	Proporciona acidez. Ajuste del pH.
Dulces	Proporciona acidez. Minimiza la inversión de la sacarosa. Produce un color oscuro en caramelos duros. Actúa como acidulante.
Fruta congelada	Disminuye el pH para inactivar las enzimas oxidativas. Protege el ácido ascórbico por inactivación de trazas de metales.
Productos lácteos	Como emulsionante en helados y quesos procesados, agente acidificante en muchos productos de queso y como antioxidante.
Grasas y aceites	Sinergista de otros antioxidantes, como secuestrador.
Farmacia	Como efervescente en polvos y comprimidos en combinación con bicarbonatos. Proporciona una rápida disolución de los ingredientes activos. Acidulante en la formulación astringente suave. Anticoagulante, el citrato quela el calcio.
Cosméticos y artículos de tocador	Ajuste del pH, antioxidante como un quelante metálico de litio, agente buffer.
Aplicaciones industriales	Secuestrante de iones metálicos, agente neutralizante, agente buffer.
Limpieza de metales	Elimina los óxidos metálicos de la superficie de los metales ferrosos y no ferrosos, por limpieza preparativa y operativa de óxidos de hierro y cobre
Remediación ambiental	Actúa como agente quelante que secuestra metales pesados, incluidos los isótopos radiactivos, facilitando también la eliminación de compuestos orgánicos hidrófobos.
Otros	En galvanoplastia, chapado en cobre, curtido de cuero, tintas de impresión, piso de cemento, textiles, reactivos fotográficos, hormigón, yeso, materiales refractarios y moldes, adhesivos, papel, polímeros, tabaco, tratamiento de residuos.

Nota. Adaptado de Ciriminna et al. (2017, p. 4) y A. Muñoz et al. (2014, p. 22).

2.3 Género *Aspergillus*

El género *Aspergillus* fue descrito por primera vez en 1729 por Micheli y validado por Link en 1809. El *Aspergillus* es un hongo mitospórico cuyas formas perfectas se ubican dentro de la familia *Trichocomaceae*, incluido en el orden *Eurotiales* y perteneciente al *phylum Ascomycota* (Accensi, 2008). Su nombre está dado por la similitud morfológica que posee su cabeza conidial con un *aspergillum* – instrumento litúrgico usado para rociar agua bendita – (A. González, 2009) y se caracteriza por presentar unas hifas especiales – llamadas conidióforos – donde se sitúan las estructuras productoras de las esporas asexuales o conidios [Figura 6] (Accensi, 2008).

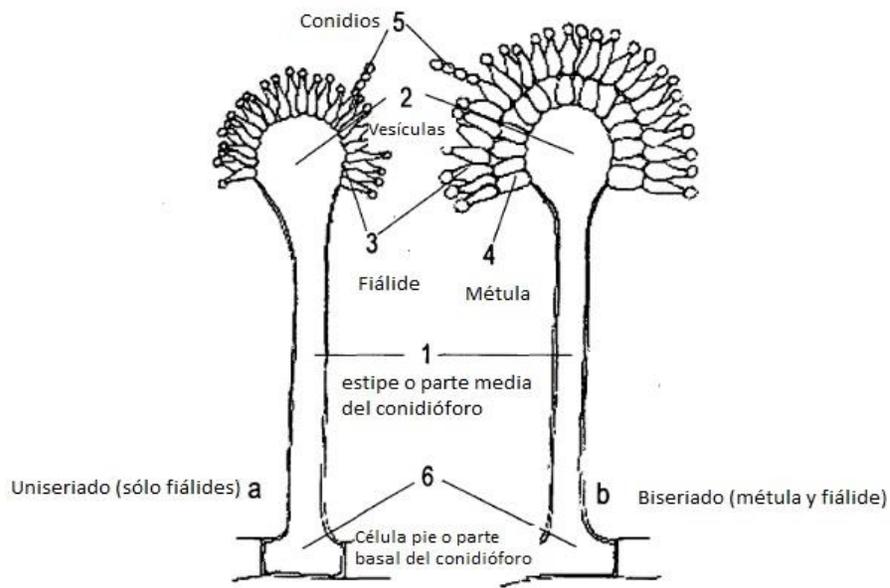


Figura 6. Conidióforos del género *Aspergillus*. Adaptado de Accensi (2008, p. 7).

La clasificación de las especies de este género se basa principalmente en características morfológicas, macro y microscópicas, aunque en los casos en que éstas no han sido suficientes se emplean criterios bioquímicos y moleculares (Accensi, 2008). En la clasificación realizada por

Gams *et al.* en 1985 (citado en Accensi, 2008) se presentan cinco subgéneros con sus respectivas secciones:

- I. Subgénero *Aspergillus* Gams *et al.*: sección *Aspergillus* y sección *Restricti*
- II. Subgénero *Fumigati* Gams *et al.*: sección *Fumigati* y sección *Cervini*
- III. Subgénero *Omati*
- IV. Subgénero *Clavati* Gams *et al.*: sección *Clavati*
- V. Subgénero *Nidulantes* Gams *et al.*: sección *Nidulantes*, sección *Versicolores*, sección *Usti*, sección *Terrei*, sección *Flavipedes*
- VI. Subgénero *Circumdati* Gams *et al.*: sección *Wentii*, sección *Flavi*, sección *Nigri*, sección *Circumdati*, sección *Candidi*, sección *Cremeri*, sección *Sparsi*

2.3.1 *Aspergillus* sección *Nigri*

Los *Aspergillus* de la sección *Nigri*, conocidos como aspergillus negros por sus cabezas conidiales oscuras, son un grupo de especies importantes en la micología alimentaria, micología médica y biotecnología. Esto se debe a que muchas de ellas causan deterioro de los alimentos, algunas sintetizan micotoxinas y otras son muy reconocidas por su uso en la industria de fermentaciones tanto por tener características propicias para estos procesos como también por ser buenas candidatas para manipulación genética (Samson *et al.*, 2007).

Estas especies se desarrollan en una gran variedad de sustratos como son semillas, granos, forrajes, piensos, frutas, verduras y cuero, entre otros, en un amplio rango de temperatura, humedad y aerobiosis. Debido a esto se presentan mundialmente de forma ubicua (Franco, 2006;

A. González, 2009). Dentro de esta sección se encuentra el moho utilizado en este trabajo, *Aspergillus carbonarius*, por lo que en el siguiente apartado se abordará a profundidad esta especie en particular.

2.3.2 *Aspergillus carbonarius*

El hongo *Aspergillus carbonarius* [Figura 7] fue descrito por primera vez por Georger Barnier (Ward, 2018) y es el miembro más distintivo de las especies biseriadas de la sección *Nigri* debido a que es el mayor productor de ocratoxina A (OTA) en productos como el vino (Abarca, Accensi, Cano, & Cabañes, 2004; Sinha, Sørensen, Ahamed, & Kiær, 2015). Esta especie ha sido aislada de uvas, pasas y vino (Abarca, Accensi, Bragulat, Castellá, & Cabañes, 2003); aunque también se ha obtenido de granos de café (Djossou et al., 2015), maíz y suelo (Nyongesa, Okoth, & Ayugi, 2015).

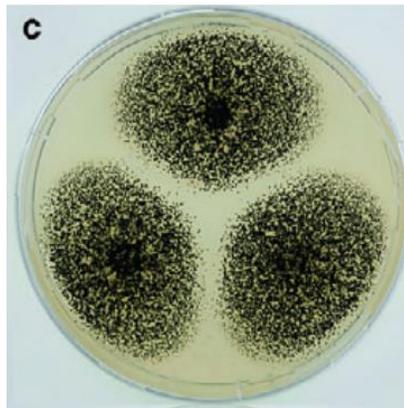


Figura 7. Cepa de *Aspergillus carbonarius* en agar extracto de malta (Simões, Santos, & Lima, 2013).

2.3.2.1 Clasificación taxonómica de *Aspergillus carbonarius*

Acorde al Sistema del Catálogo de la Vida (2017) el hongo *Aspergillus carbonarius* presenta la siguiente taxonomía:

Tabla 7. Clasificación taxonómica de *Aspergillus carbonarius*.

Nombre válido	<i>Aspergillus carbonarius</i> (Bainier) Thom 1916
Reino	Fungi
Filo	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Eurotiomycetes</i>
Orden	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>
Género	<i>Aspergillus</i>
Subgénero	<i>Circumdati</i>
Sección	<i>Nigri</i>
Especie	<i>Aspergillus carbonarius</i>

Nota. Adaptado de Catálogo de la Vida (2017) y Accensi (2008).

2.3.2.2 Características morfológicas

La taxonomía de los hongos pertenecientes a la sección *Nigri* es una de las más confusas y complejas debido a las sutiles diferencias entre las especies. Sin embargo, durante mucho tiempo, su clasificación e identificación se ha realizado a través de criterios morfológicos (D. Silva et al., 2011). En este sentido, las cepas de *Aspergillus carbonarius* pueden ser fácilmente reconocidas bajo el microscopio gracias al gran tamaño que presentan sus conidios en comparación con las otras especies biseriadas de la sección *Nigri*. Entre otras características de esta especie están su ornamentación conidial biseriada y rugosa, cabeza conidial globular y rica en melanina que le da su color negro característico, sistema conidial multinucleado y la producción ocasional de esclerocios (Djossou et al., 2015; Kevei, Hamari, Varga, Kozakiewicz, & Croft, 1996; Khuang et al., 2016; D. Silva et al., 2011).



Figura 8. Vista macro y microscópica de *Aspergillus carbonarius* (Frank, s. f.)

Las diferentes características macroscópicas y microscópicas de *Aspergillus carbonarius* se observan en las Tablas 8 y 9 respectivamente.

Tabla 8. Características macroscópicas de *Aspergillus carbonarius*.

Especie	Colonia en CYA a 25 °C			Colonia en MEA a 25 °C				
	Diámetro de la colonia	Aspecto anterior	Color posterior	Diámetro de la colonia	Color anterior	Color posterior	t máxima	Producción de OTA
<i>Aspergillus carbonarius</i>	65 a 67 mm	Negro, granular	Incoloro	51 a 57 mm	Blanco	Incoloro	36 °C	+

Nota. Adaptado de D. Silva et al. (2011, p. 766), Piontelli (2008, p.63) y Nyongesa et al. (2015, p. 214).

Tabla 9. Características microscópicas de *Aspergillus carbonarius*.

Especie	Diámetro de la conidia	Textura de la conidia	Forma de la conidia	Diámetro de la vesícula	Ornamentación conidial (MEV)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	7 a 10 um	Rugosa	Globular	49 a 85 um	Biseriada Verrugosa

Nota. Adaptado de D. Silva et al. (2011, p. 768) y Simes, Santos, & Lima (2013, p. 1157).

2.3.2.3 Producción de ácido cítrico con *Aspergillus carbonarius*

Pocas son las cepas de *Aspergillus carbonarius* que han sido estudiadas para la producción de ácido cítrico, es por ello que como referencia del presente trabajo se usaron principalmente los estudios de Soria (1997) y O. Sánchez et al. (2004). Los principales factores estudiados y sus variables se presentan en la siguiente tabla de resumen:

Tabla 10. Variables estudiadas en la producción de ácido cítrico por *A. carbonarius*.

Cepa	Sustrato	Tipo de cultivo	Nutrientes adicionados	pH inicial	t	Tiempo	Agitación	Producción de Ácido cítrico
<i>Aspergillus carbonarius</i> NRRL 368	SE	Sumergido	-	3	30 °C	240 h	180 rpm	6.72 g/L
	SD							8.69 g/L
	SDH							10.51 g/L
	SDHE							11.15 g/L
<i>Aspergillus carbonarius</i> NRRL 67 (1)	SE	Sumergido	-	3	30 °C	240 h	180 rpm	6.51 g/L
	SD							7.13 g/L
	SDH							0.93 g/L
	SDHE							7.58 g/L
<i>Aspergillus carbonarius</i> NRRL 67 (2)	Glucosa 40 g/L	Sumergido	NH ₄ NO ₃	*2.1	30 °C	75 h	220 rpm	30 g/L
	Glucosa 120 g/L		KH ₂ PO ₄	4.3		100 h		30 g/L
			MgSO ₄	4.3		216 h		78 g/L
			CuSO ₄	4.3		260 h		65 g/L
			ZnSO ₄	6.5				
Hidrol 100 g/L de glucosa	Sumergido	NH ₄ NO ₃	6.5	30 °C	240 h	220 rpm	26 g/L	
			ZnSO ₄					
			FeSO ₄					

Nota. Adaptado de O. Sánchez et al. (2004) (*A. carbonarius* NRRL 368 y NRRL 67 (1)) y Soria (1997) (*A. carbonarius* NRRL 67 (2)). Sustratos: suero entero (SE), suero desproteínizado (SD), suero desproteínizado hidrolizado (SDH) y suero entero desproteínizado hidrolizado evaporado (SDHE). * Se ajustó el pH a 2.1 con buffer a las 48 h.

2.3.2.4 Cinética de reacción microbiana

La producción de ácido cítrico o de cualquier bioproducto a través de fermentaciones, depende de la biocinética de la fermentación. La biocinética estudia el consumo del sustrato, el crecimiento y reproducción del microorganismo, y finalmente la biosíntesis del producto de interés (Concha, 2014). Dependiendo de la relación existente entre las tres etapas mencionadas, las fermentaciones se clasifican de la siguiente manera:

Tabla 11. Clasificación de las fermentaciones.

Tipo	Relación específica de velocidad	Ejemplo
I	Formación de producto relacionada directamente con la utilización del carbohidrato	Etanol
II	Formación de producto indirectamente relacionada con el uso del carbohidrato	Ácido cítrico
III	Formación del producto aparentemente no relacionada con el uso del carbohidrato	Penicilina

Nota. Tomado de Concha (2014, p. 48).

En el caso del ácido cítrico se emplean fermentaciones del tipo II con un sistema de operación tipo batch o por lotes en las cuales se observan cuatro fases de crecimiento celular [Figura 9].

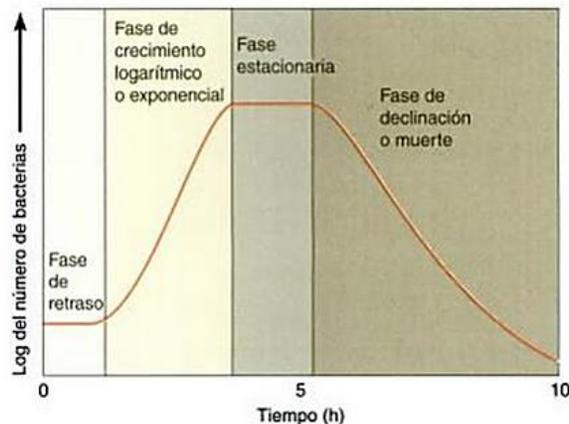


Figura 9. Curva de crecimiento microbiano (Tortora, Funke, & Case, 2007, p. 177)

Fase de latencia, retraso o adaptación: se presenta inmediatamente después de la inoculación de la población microbiana en el medio, en esta etapa los microorganismos presentan una intensa actividad metabólica ya que sintetizan enzimas y diversas moléculas para adaptarse al nuevo medio. Este proceso puede durar horas o incluso días (Ramírez, 2013; Tortora et al., 2007)

Fase logarítmica o de crecimiento exponencial: se caracteriza porque la reproducción celular alcanza una actividad máxima en un tiempo de generación mínimo constante, además es la etapa donde las células presentan la más alta actividad metabólica y por ello es la preferida en producción industrial. Sin embargo, durante la reproducción los microbios son también muy sensibles a cambios adversos por lo que se pueden presentar interferencias (Tortora et al., 2007).

Fase estacionaria: en esta fase el crecimiento microbiano se estabiliza ya que el agotamiento de los nutrientes o la acción inhibitoria del exceso de producto de desecho fabricado en el medio provocan la muerte de una cantidad importante de microorganismos. A pesar de ello, la concentración de células producidas en la fase anterior se mantiene constante continuando con todas las funciones celulares y es en esta fase donde se producen la mayor parte los metabolitos secundarios (Ramírez, 2013).

Fase de decline o muerte: cuando el número de muertes supera el número de nuevas células formadas el cultivo entra en la fase de muerte, disminuyendo lentamente la viabilidad de las células debido al agotamiento de nutrientes. (Ramírez, 2013; Tortora et al., 2007).

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de titulación de tipo investigativo - experimental busca explicar los efectos de tres variables – sustrato, pH y temperatura - en la producción de ácido cítrico con *Aspergillus carbonarius* mediante un diseño experimental puro, para someter a la cepa fúngica en estudio a diferentes tratamientos que permiten crear relaciones entre las variables dependientes e independientes y alcanzar una optimización del proceso.

La investigación se divide en tres etapas que comprenden el aislamiento de la cepa fúngica, fermentación del lactosuero con los diferentes tratamientos y finalmente el escalado del proceso optimizado en un biorreactor tipo torre de 3 litros de capacidad.

Las etapas mencionadas se desarrollaron en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca.

3.1 Aislamiento del hongo *Aspergillus carbonarius* a partir de frutos secos de *Vitis vinífera* caracterizándolo mediante claves taxonómicas

3.1.1 *Recolección de muestras de pasas*

Las muestras de pasas se compraron en diez diferentes mercados y supermercados ubicados en el cantón Cuenca, provincia del Azuay. Se recolectaron cuatro onzas de pasas en cada punto de venta y se almacenaron por separado a 4 °C en recipientes de vidrio hasta el día de siembra (Abarca et al., 2003).

3.1.2 Aislamiento del hongo filamentoso en condiciones de laboratorio

3.1.2.1 Metodología

Según la metodología aplicada por Abarca et al. (2003) el aislamiento se lo realizó en dos etapas. En la primera etapa se sembraron por triplicado nueve fragmentos de pasas de cada muestra directamente en medio de cultivo rosa de bengala cloranfenicol incubando las placas a 28 °C de durante 7 días.

Transcurrido los siete días de incubación, se realizó en un contador de colonias la observación de los diferentes mohos y levaduras presentes en los cultivos [Figura 10] y en base a las características macroscópicas descritas en la Tabla 8 se seleccionaron las posibles colonias de *Aspergillus carbonarius*.

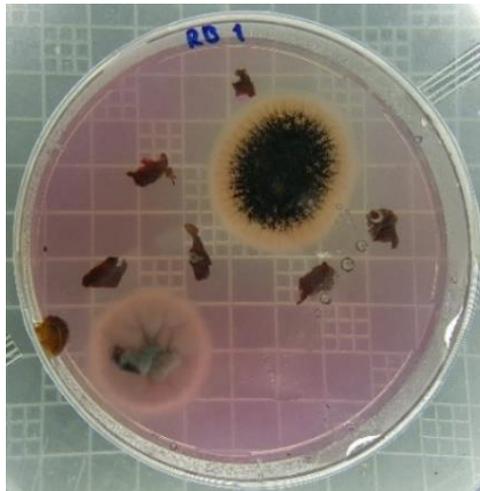


Figura 10. Colonias presentes en el medio de crecimiento.

Fuente: Autor.

La segunda etapa consistió en subcultivar por triplicado las colonias seleccionadas en medio extracto de malta [MEA, por sus siglas en inglés Malt Extract Agar] y Czapek-levadura [CYA, por sus siglas en inglés Czapek Yeast Agar] para obtener cultivos puros e identificarlos de acuerdo con sus características específicas de la especie descritas en el apartado 2.3.2.2.

La técnica empleada para la obtención de cultivos puros se basó en la metodología planteada por Zhang, Su, & Cai (2013). En primer lugar, se resembraron con asa de inoculación cada una de las colonias seleccionadas en la primera etapa sobre agar rosa de bengala y se incubaron durante 7 días a 28 °C obteniendo cultivos similares a la Figura 11.

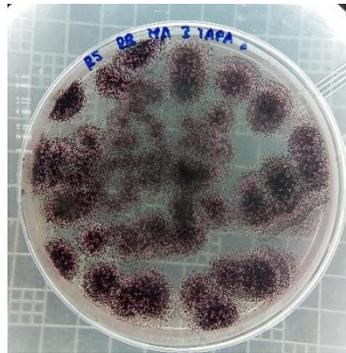


Figura 11. Colonia resembrada después de 7 días de incubación.

Fuente: Autor.

Una vez transcurridos los días de incubación se realizaron lavados de cada caja Petri con agua destilada para obtener suspensiones de esporas, las mismas que se filtraron con gasas estériles y se colocaron en tubos de ensayo para ser homogeneizadas en un vórtex. Posteriormente, se dibujaron cuadrículas de un centímetro de lado sobre cajas Petri previamente preparadas con medio de extracto de levadura, en cada una se coloca con una micropipeta una gota de la suspensión obtenida como se indica en la Figura 12 y se incubaron a 25 °C por 12 horas.

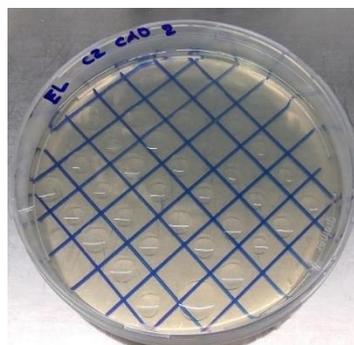


Figura 12. Suspensión de esporas en medio de extracto de levadura.

Fuente: Autor.

Pasadas las 12 horas se observaron bajo un estereomicroscopio las esporas germinadas en cada cuadrícula [Figura 13].



Figura 13. Esporas germinadas después de 24 horas.

Fuente: Autor.

Finalmente se extrajeron las esporas germinadas y se trasplantaron a los medios extracto de malta y czapeck – levadura como se muestra en la Figura 14.

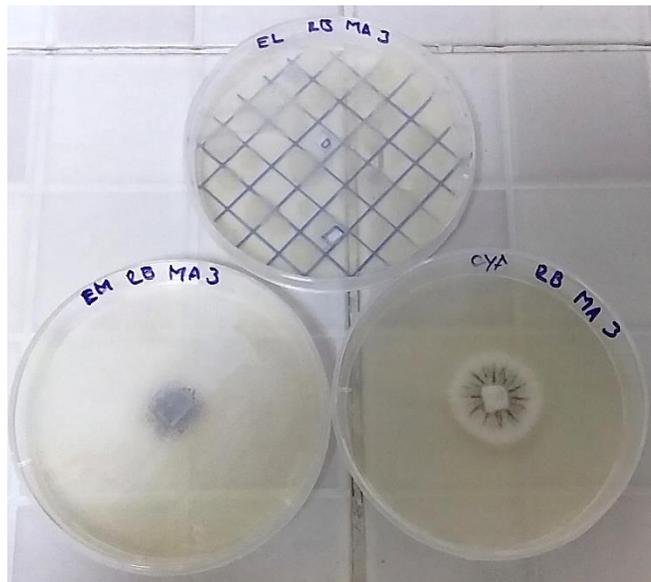


Figura 14. Cultivos puros en MEA y Czapek.

Fuente: Autor.

Luego de siete días de incubación a 25 °C se caracterizaron morfológicamente considerando aspectos macro y microscópicos registrados principalmente en los estudios de Nyongesa et al.

(2015), D. Silva et al. (2011) y Piontelli (2008). En cuanto a las características macroscópicas se consideraron diámetro de la colonia, su color anterior y posterior y la textura presentada en cada medio de cultivo, mientras que las características microscópicas se enfocaron en el diámetro y forma de los conidios, el diámetro de las vesículas y en la presencia de las estructuras particulares de las especies biseriadas, métulas.

Cabe recalcar que la característica más notable de la especie *Aspergillus carbonarius* es el gran tamaño de sus conidios, por lo que una vez obtenidas las cepas puras se determinó inicialmente el diámetro de estos a través de un microscopio compuesto con pantalla. Las muestras para el análisis microscópico se prepararon con una solución de hidróxido de potasio al 1%.

3.1.2.2 Materiales, equipos y reactivos

Tabla 12. Equipos, materiales y reactivos usados para el aislamiento de *A. carbonarius* en laboratorio.

Equipos	Materiales	Reactivos
Cabina de flujo laminar	Matraces Erlenmeyer	Agua destilada
Autoclave	Cajas Petri	Hidróxido de potasio
Hornilla	Mecheros	Agar rosa de bengala
Vórtex	Asa de inoculación	Agar Czapek – levadura
Estereomicroscopio	Bisturí	Agar extracto de malta
Microscopio compuesto con pantalla	Pinzas	
Estufa Memmert	Tubos de ensayo	
Micropipetas	Gasa estéril	
Contador de colonias	Cubre y portaobjetos	

Fuente: Autor

3.2 Establecimiento de la temperatura, el medio nutritivo y el valor de pH para el cultivo de *Aspergillus carbonarius* que permitan la obtención de las más altas concentraciones de ácido

3.2.1 Proceso fermentativo en matraces Erlenmeyer

3.2.1.1 Obtención y preparación de suero de quesería

El lactosuero utilizado fue suministrado por una fábrica de productos lácteos ubicada en la parroquia Cañaribamba / cantón Cuenca / provincia del Azuay, procedente de la elaboración de queso fresco. Las muestras fueron recolectadas en envases estériles, transportadas en una nevera portátil a 4 °C y caracterizadas en los laboratorios utilizando un medidor multiparamétrico, analizador de leche y crioscopio.

Una vez caracterizado el suero crudo, este fue pretratado mediante filtración, desnatado, pasteurizado a 72 °C por 15 segundos y refrigerado a temperaturas menores a los 6 °C acorde a lo sugerido por Muset & Castells (2017).

Para la preparación del medio fermentativo la totalidad de la muestra fue desproteinizada por termocoagulación a 90 °C a un pH de 6 por 20 minutos, centrifugado y filtrado (Rojas, Bastidas, & Montaña, 2015) con la finalidad de concentrar el contenido de nutrientes, especialmente lactosa, ya que a los medios preparados no se adicionaron ningún tipo de nutrimento (Concha, 2014). Posteriormente, la mitad de la muestra fue sometida a hidrólisis enzimática empleando la enzima Ha-Lactase™5200 (lactasa comercial) adicionando 2 mL de enzima por cada litro de suero a 40 °C y pH 6.5 durante una hora en una incubadora con agitador para lograr una hidrólisis del 99.99%. Finalmente se esterilizaron los medios preparados en autoclave a una

presión de 1 atmósfera a 120 °C por 15 minutos y una vez fríos se acondicionaron los pH a 3.4, 4, 5.25, 6.5 y 7 según el diseño experimental.

Tabla 13. *Materiales, equipo y reactivos utilizados en la preparación del medio fermentativo.*

Equipos	Materiales	Reactivos
Medidor multiparamétrico METTLER TOLEDO SevenMulti	Matraces Erlenmeyer	Enzima comercial Ha-Lactase™ 5200
Autoclave	Pipetas	Hidróxido de sodio
Crioscopio ADVANCED INSTRUMENTS 4250	Papel filtro	Ácido clorhídrico
Incubadora con agitación		
Analizador de leche MILKOTESTER Master Eco		
Cabina de flujo laminar		
Centrífuga		

Fuente: Autor

3.2.1.2 Preparación del inóculo fúngico

El inóculo fue obtenido mediante un lavado de esporas realizada a partir de la cepa purificada de *A. carbonarius* cultivada en seis matraces de 1000 mL con agar rosa de bengala por 7 días.

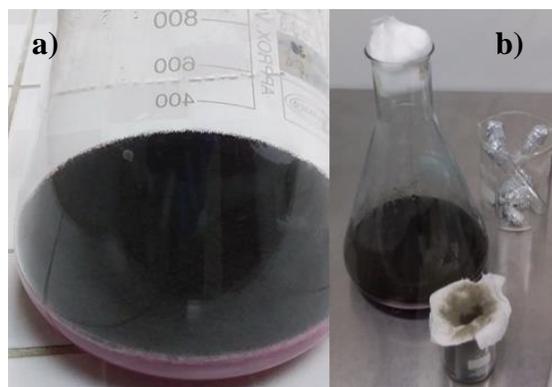


Figura 15. a) Micelio esporulado. b) *A. carbonarius* utilizado para el lavado de esporas.

Fuente: Autor.

La suspensión de esporas se preparó lavando 5 veces cada cultivo [Figura 15a] con 10 mL de suero fisiológico agitando vigorosamente los matraces para remover el mayor número de esporas. Seguidamente se filtró la suspensión a través de una gasa estéril [Figura 15b] para retener fragmentos grandes de hifas y partes del medio de cultivo desprendidos durante la agitación (Soria, 1997). Al filtrado obtenido se le realizó un conteo de esporas en la cámara de Neubauer y diluciones [véase Anexo I] para conseguir inóculos de 5 mL con una concentración de 2×10^7 esporas/mL utilizada en los estudio de Concha (2014) y López et al. (2006).

Tabla 14. *Equipos, materiales y reactivos necesarios en la preparación del inóculo fúngico.*

Equipos	Materiales	Reactivos
Cabina de flujo laminar	Vasos de precipitados	Agua destilada
Autoclave	Mecheros	Agar rosa de bengala
Hornilla	Tubos de ensayo	Suero fisiológico
Vórtex	Gasa estéril	
Microscopio		
Cámara de Neubauer		
Estufa Memmert		
Micropipeta de 10 uL		

Fuente: Autor.

3.2.1.3 *Fermentación*

Para la fermentación se empleó un cultivo sumergido en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 95 mL de cada medio preparado en la sección 3.3.1.1 y 5 mL de inóculo. Así el volumen del inóculo corresponde al 5% del volumen del medio, el cual se encuentra dentro de lo recomendado para inóculos fúngicos (Mateos, 2014). Cada matraz fue cubierto con tapones de algodón y gasa estéril para permitir el paso de aire necesario para la fermentación aerobia y a la vez evitar su contaminación. En cuanto al proceso fermentativo, este se llevó a cabo a 25 y 30 °C

- según los tratamientos establecidos en el diseño experimental - en una incubadora con agitación de 170 rpm durante 240 horas [Figura 16].



Figura 16. Fermentación de los diferentes tratamientos en una incubadora con agitación.

Fuente: Autor.

3.2.2 Método de análisis

Luego de establecer las variables a manejar y las condiciones de producción de ácido cítrico, se realizó un seguimiento durante 10 días tomando muestras del caldo fermentativo cada 24 horas y monitoreando la producción de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico. La cuantificación se realizó empleando la técnica de titulación potenciométrica utilizando una solución estandarizada de NaOH 0.01 N [véase Anexo II] y determinando la concentración final de ácido mediante cálculos estequiométricos basados en la reacción presente en la Figura 17.

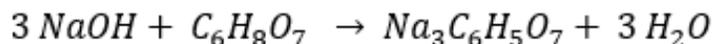


Figura 17. Sal de citrato de sodio obtenido después de la titulación.

Fuente: Autor.

Las muestras diarias de cada tratamiento se prepararon a partir de 8 mL de caldo fermentativo centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para analizar por triplicado cada muestra, de esta manera el procedimiento descrito a continuación se lo realizó tres veces. Se colocaron 2 mL de sobrenadante en un vaso de precipitados sobre un agitador magnético, se adicionó 18 mL de agua destilada y se procedió con la titulación (Concha, 2014). Se añadió gota a gota la solución de NaOH 0.01 N monitoreando el pH hasta alcanzar rangos alcalinos de 8.3 y anotando el volumen total de hidróxido de sodio gastado (Norma Mexicana, 1978).

Tabla 15. *Equipos, materiales y reactivos utilizados en la cuantificación de ácido cítrico.*

Equipos	Materiales	Reactivos
Cabina de flujo laminar	Vasos de precipitados	Agua destilada
Agitador magnético	Mecheros	NaOH 0.01N
Centrífuga	Tubos de centrífuga	
Medidor multiparamétrico METTLER TOLEDO SevenMulti	Bureta	
	Pipetas	

Fuente: Autor.

3.2.3 Técnicas de procesamiento y análisis de datos

El objetivo de optimizar la variable de interés – concentración de ácido cítrico – mediante la determinación de las condiciones óptimas de las variables independientes – temperatura, pH y medio nutritivo – se alcanzó aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta con un Diseño Central Compuesto modelado con 8 puntos de cubo, 10 puntos centrales en el cubo y 8 puntos axiales [explicados en la Tabla 16]. Los datos obtenidos de las 26 unidades experimentales

fueron analizados en el software estadístico Minitab® 18 con el fin de analizar la superficie de respuesta y determinar la ecuación polinomial que calcule valores óptimos de producción de ácido cítrico en función de los factores y sus niveles analizados.

Tabla 16. Factores y dominio experimental del Diseño Central Compuesto [DCC].

Factores	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)	Punto axial		Punto Central (0)
			Bajo (-1.68)	Alto (+1.68)	
Temperatura	25 °C	30 °C	23.96	31.03	27.5
pH	4	6.5	3.48	7.01	5.25
Medio de cultivo	Suero entero	Suero hidrolizado			

Fuente: Autor.

3.3 Determinación de la cinética de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación del ácido a partir de *A. carbonarius* utilizando un biorreactor para la simulación de un proceso industrial

La metodología de superficie de respuesta aplicada en el diseño experimental permitió establecer los valores de los factores que optimizan el rendimiento de la variable dependiente, en base a ellos se realizó la fermentación en el biorreactor.

3.3.1 Proceso fermentativo en biorreactor

3.3.1.1 Características del biorreactor

El biorreactor discontinuo utilizado en la fermentación es un modelo en columna con 3 litros de capacidad compuesto por agitadores mecánicos tipo paleta que proporcionan agitación constante en el interior del reactor. Estas paletas son impulsadas por un motor externo [1]

conectado a un temporizador [2] que controla el tiempo de operación de estas con el objetivo de no sobrecalentar el caldo de fermentación. Además, posee un compresor [3] que regula el flujo del aire suministrado por una bomba [4] y un sistema para toma de muestras [5]. Las distintas partes mencionadas se muestran en la Figura 18.



Figura 18. Biorreactor y sus partes dentro de la cámara climática.

Fuente: Autor.

3.3.1.2 Fermentación

La preparación tanto del medio de crecimiento como del inóculo se rigieron a los procedimientos explicados en las secciones 3.3.1.1 y 3.3.1.2 respectivamente. Respecto al proceso fermentativo, se colocaron 1900 mL de medio y 100 mL de inóculo en el biorreactor previamente desinfectado con sal de amonio cuaternaria y esterilizado con radiación ultravioleta durante 30 minutos. Una vez armado y cerrado el biorreactor en la cabina de flujo laminar se lo ubicó en una cámara climática (BINDER KBF 240) para proporcionar al cultivo la temperatura

necesaria [Figura 18]. La agitación de 250 rpm fue constante y la aireación se mantuvo a 0.6 vvm [volumen de aire por volumen de líquido por minuto]. Bajo esas condiciones se mantuvo la fermentación durante 10 días, recolectando una muestra de 50 mL de caldo fermentativo cada 24 horas a partir de las cuales se determinaron la concentración de ácido cítrico, el consumo de sustrato y el crecimiento celular.

3.3.2 Métodos de análisis

A partir de la muestra de 50 mL recolectada cada día, se preparan las alícuotas para realizar por duplicado los diferentes análisis colocando en dos tubos de centrifuga 10 mL y 40 mL de la muestra que se centrifugan a 3500 rpm durante 10 minutos.

El sobrenadante obtenido de ambos tubos fue retirado y se utilizó para la cuantificación de ácido cítrico y azúcares reductores, mientras que el precipitado presente en el tubo de 10 mL se emplea para el cálculo del crecimiento microbiano.

La cuantificación de ácido cítrico se realizó con el mismo procedimiento empleado en la sección 3.3.2.

El consumo de sustrato se determinó mediante el método de Fehling empleado por Concha (2014) basándose en el poder reductor de los azúcares presentes en el lactosuero hidrolizado – glucosa y galactosa – sobre la sal cúprica. En primer lugar, se coloca en una bureta el sobrenadante obtenido. Posteriormente se agregan 10 mL de Fehling A, 10 mL de Fehling B y 25 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer sometiéndolo al calor hasta ebullición constante. Se deja caer gota a gota el contenido de la bureta sobre el matraz hasta viraje de color azul a color pardo o rojo ladrillo. Por último, se registra el volumen gastado de lactosuero y se lo aplica en la siguiente fórmula:

$$g \text{ de azúcares reductores totales} = \frac{\text{Título de Fehling}}{\text{Gasto de lactosuero}} \times 100$$

Figura 19. Fórmula para determinar azúcares reductores (Concha, 2014, p. 97).

El cálculo del título de Fehling se encuentra en el Anexo III.

Finalmente, la cinética de crecimiento celular se evaluó mediante la estimación del peso seco por gramo o mililitro de muestra. Acorde a la metodología propuesta por Arana, Orruño y Barcina (2012) al precipitado obtenido de la centrifugación de 10 mL de caldo de cultivo se añadieron 3 mL de suero fisiológico y se agitó hasta obtener una suspensión. Un mililitro de la suspensión preparada se colocó sobre papel aluminio – previamente pesado – y se dejó secar en una estufa a 105 °C durante 24 horas. Después de ese lapso, se retiró el papel aluminio con la muestra seca y se vuelve a pesar [Figura 20]. De esta manera el peso seco expresado en gramos por mililitro se determinó por la diferencia de pesos.



Figura 20. Precipitado después de 24 horas a 105 °C.

Fuente: Autor.

3.3.3 Equipos, materiales y reactivos utilizados en el proceso fermentativo

Todos los equipos, materiales y reactivos empleados tanto en el proceso de fermentación en biorreactor como en los análisis hechos a cada muestra, se mencionan en la Tabla 17.

Tabla 17. *Equipos, reactivos y materiales usados en la fermentación en biorreactor.*

Equipos	Materiales	Reactivos
Biorreactor tipo batch	Vasos de precipitados	Fehling A
Cámara climática BINDER modelo KBF 240	Tubos de centrifuga	Fehling B
Cabina de flujo laminar	Matraces Erlenmeyer	Agua destilada
Estufa Memmert	Pipetas	Suero fisiológico
Centrífuga	Buretas	
Agitador magnético con placa calefactora	Papel aluminio	
Balanza analítica		

Fuente: Autor.

CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento y caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus carbonarius*

Si bien *Aspergillus niger* ha sido utilizado industrialmente para la producción de ácido cítrico, la búsqueda de mejores rendimientos motiva a los investigadores a aislar y estudiar otros microorganismos.

4.1.1 Cultivos resultantes de la siembra directa de pasas y sus resiembras

A partir de las diez muestras de pasas sembradas por triplicado se obtuvieron 30 cajas Petri, en las cuales se identificaron 16 colonias fúngicas que exhibieron características macroscópicas relacionadas a *Aspergillus carbonarius*. Consecuentemente, estas fueron subcultivadas en medios específicos - CYA y MEA - para su posterior caracterización. De esta manera se desarrollaron 32 cultivos puros de 16 colonias seleccionadas, algunas de ellas se pueden observar en la Figura 21.

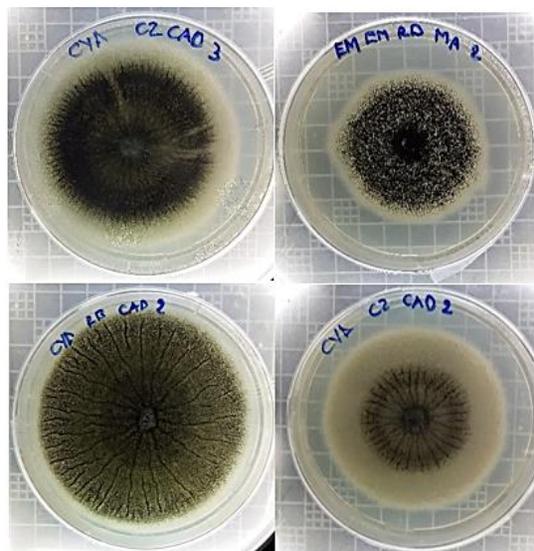


Figura 21. Ejemplos de cultivos puros de *Aspergillus* negros en CYA y MEA incubados 7 días a 25 °C.

Fuente: Autor.

4.1.2 Identificación microscópica de *Aspergillus carbonarius*

Para la identificación de las posibles colonias de *A. carbonarius* se midieron los diámetros de los conidios de los 32 cultivos puros antes de examinar las características macroscópicas. Se procedió de esta manera debido a que muchos estudios reiteran que las cepas de la especie *Aspergillus carbonarius* se reconocen fácilmente por presentar conidios mucho más grandes – 7 a 10 μm - que los de otras especies de la sección *Nigri* (Abarca et al., 2004; Kevei et al., 1996; Samson et al., 2007).

Las mediciones revelaron que una sola cepa – crecida pura en CYA y MEA - presentaba conidios con diámetros mayores a 6 μm [Figura 22]. En la presunta cepa de *A. carbonarius* se midieron y registraron 100 conidios – 50 del medio CYA y 50 del medio MEA – obteniendo un diámetro promedio de 12.112 μm .



Figura 22. Conidios de *Aspergillus carbonarius* bajo el objetivo de 40X de un microscopio con pantalla.

Fuente: Autor.

4.1.3 Caracterización de la colonia identificada como *Aspergillus carbonarius*

Al presunto cultivo identificado como *Aspergillus carbonarius* se lo caracterizó mediante claves taxonómicas basadas en aspectos tanto macroscópicos como microscópicos.

4.1.3.1 Características macroscópicas de la cepa fúngica

La caracterización macroscópica se la realizó mediante una observación a simple vista de las estructuras y rasgos que presentaba la colonia de acuerdo con lo estudiado por Nyongesa et al., (2015) y D. Silva et al. (2011). En la Tabla 18 se detallan las características macroscópicas apreciadas en las colonias de estudio [Figura 23].

Tabla 18. Características macroscópicas de las colonias de *Aspergillus carbonarius*

Claves de identificación	Colonia en CYA a 25 °C	Colonia en MEA a 25 °C
Diámetro	66 mm	56 mm
Color anterior	Negro oscuro con borde blanco	Negro
Color posterior	Incoloro	Incoloro
Textura	Aterciopelada, esporulada	Esporulada
Crecimiento	Rápido	Lento
Formación de surcos	Sí	Sí
Producción de esclerocios	No	No

Fuente: Autor.

Los resultados del diámetro, el color y la producción de esclerocios se encuentran dentro de los parámetros reportados por D. Silva et al. (2011), quienes establecen que el diámetro de la colonia puede tener entre 65 a 67 mm en medio CYA y 51 a 57 mm en medio MEA, medidas muy cercanas a las especificadas por Nyongesa et al. (2015), 60 a 63 mm en CYA y 40 a 60 mm en MEA 40 - 60 mm. En cuanto a los colores de la colonia, tanto de la parte anterior como de la posterior, coinciden con el estudio de D. Silva et al. (2011). Sin embargo, estos difieren un poco de los obtenidos por Nyongesa et al. (2015) ya que en ambos medios de cultivo obtuvieron

colonias de color marrón oscuro en su parte anterior y de color ligeramente amarillo claro en la posterior. Respecto a la producción de esclerocios, aunque algunos autores (Samson et al., 2004) mencionan su presencia ocasional en diversas cepas de *Aspergillus carbonarius*, en esta investigación como en la de D. Silva et al. (2011) se encuentran ausentes dichas estructuras.

Las características de crecimiento, textura y surcos coinciden con las descritas por Nyongesa et al. (2015). La velocidad de crecimiento se evidenció por la diferencia en los diámetros alcanzados por las colonias en 7 días con los diferentes medios: 66 mm en CYA y 56 mm en MEA. Igualmente, la formación de surcos se notó a medida que incrementaba la edad del cultivo.

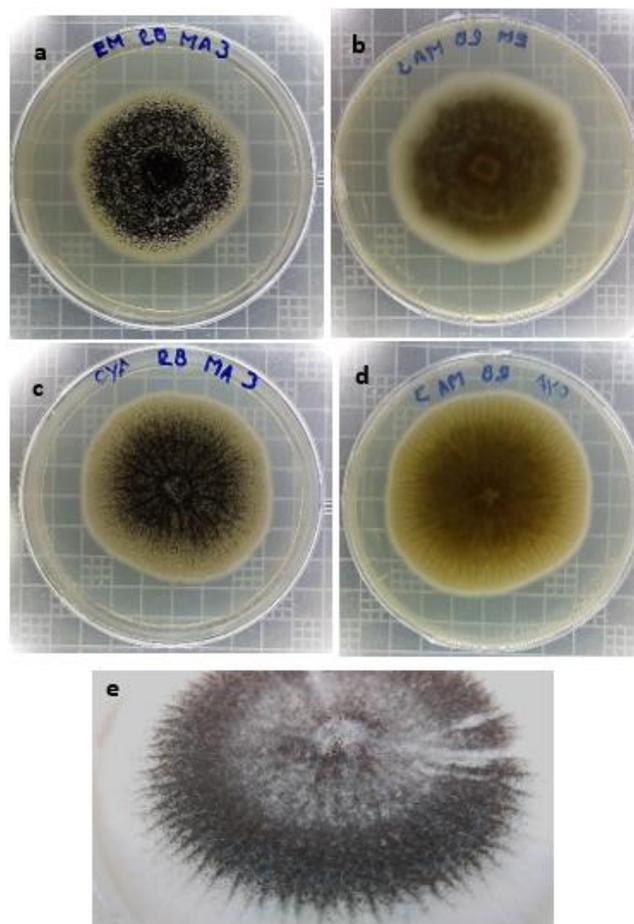


Figura 23. Características macroscópicas de las colonias a los 7 días de incubación a 25 °C: vista anterior y posterior de las colonias en MEA (a y b) y en CYA (c y d); micelio de la colonia en CYA (e). **Fuente:** Autor.

Los estudios sobre las características macroscópicas de *A. carbonarius* son limitados debido a que en la actualidad se emplean técnicas moleculares para la identificación de especies. Sin embargo, en base a la información recopilada se puede comprobar que la cepa en estudio cumple con las características distintivas de la especie.

4.1.3.2 Características microscópicas de la cepa fúngica

Como se mencionó anteriormente, el gran tamaño de los conidios de *Aspergillus carbonarius* es su característica microscópica más notable. Sin embargo, en el análisis bajo el microscopio de esta especie también se consideran los aspectos morfológicos de distintas estructuras que conforman el conidióforo. Para determinar los parámetros a analizar se usaron como guía los estudios realizados por Kevei et al. (1996), Nyongesa et al. (2015), Piontelli (2008), Samson et al. (2007) y D. Silva et al. (2011). En base a ellos se elaboró la Tabla 19 en donde se registran las características microscópicas de la cepa en estudio, en el caso de las mediciones se utilizó una muestra de 20 conidióforos para obtener los promedios.

Tabla 19. Características microscópicas de las colonias de *Aspergillus carbonarius*.

Clave de identificación	Resultado
Cabezas conidiales	Biseriadas
Diámetro de los conidios	12.112 μm
Forma de los conidios	Subglobosa a globosa
Color de los conidios	Negros
Diámetro de las vesículas	65.956 μm
Forma de las vesículas	Globosa

Fuente: Autor.

La presencia de métulas en la cabeza conidial indican que la cepa en estudio se trata de una especie biseriada (Piontelli, 2008). La forma entre globosa y subglobosa de sus conidios coincide con las registradas por Nyongesa et al. (2015). Mientras que el diámetro y la forma de sus vesículas concuerdan con las especificaciones de D. Silva et al. (2011).



Figura 24. Cabeza conidial de *Aspergillus carbonarius* aumentada 40X en microscopio con pantalla.

Fuente: Autor.

En cuanto al diámetro de los conidios, algunos autores presentan medidas cercanas como Nyongesa et al. (2015) con conidios de 6 a 10 μm , Piontelli (2008) y Samson et al. (2007) con conidios de 7 a 9 μm o Kevei et al. (1996) quienes reportaron uno de los conidios más grandes de hasta 10.98 μm . Además, en otro estudio se confirma que *A. carbonarius* presenta los conidios de mayor tamaño dentro de la sección *Nigri* con diámetros de $7.658 \pm 0.259 \mu\text{m}$ (Simões et al., 2013). Sin embargo, ninguno de los estudios señala diámetros tan grandes para *Aspergillus carbonarius* - ni para otra especie dentro de las especies *Nigri* - como los observados en esta investigación.

El hallazgo de conidios con diámetros de hasta 15 μm podría explicarse por dos razones: la primera porque se trata de una nueva subespecie de *Aspergillus carbonarius* y la segunda porque es una cepa mutante de alguna subespecie ya identificada. Esta última explicación se respalda en un estudio realizado por Kevei et al. (1996): "Molecular polymorphism and phenotypic variation

in *Aspergillus carbonarius*” en donde se encontraron conidios de hasta 10.98 μm en una cepa mutante de esta especie.

En base a los análisis macroscópicos y microscópicos, así como también a la revisión bibliográfica se identificó a la cepa encontrada como *Aspergillus carbonarius*.

4.2 Establecimiento de la temperatura, el medio nutritivo y el valor de pH que permitan la obtención de las más altas concentraciones de ácido

A través de las corridas experimentales se recolectaron los datos de la producción de ácido cítrico, los cuales permitieron evaluar los efectos que cada variable, en sus distintos niveles, ejerció sobre la excreción de ácido por parte de *A. carbonarius*.

4.2.1 Producción de ácido cítrico en los diferentes tratamientos

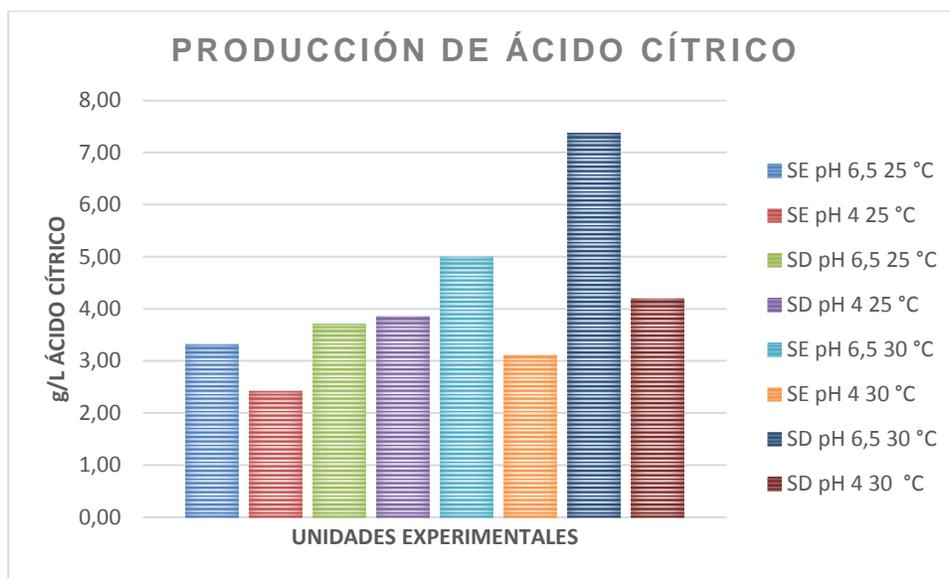


Figura 25. Producción de ácido cítrico con *A. carbonarius* en diferentes tratamientos: suero entero (SE), suero deslactosado (SD). Fuente: Autor.

La cepa nativa de *Aspergillus carbonarius* biosintetizó ácido cítrico en todos los ensayos realizados, como se evidencia en la Figura 25. Este hecho demuestra que dicha cepa tiene la

capacidad de metabolizar la fuente de carbono independientemente de la forma en que se suministra, ya sea como lactosa o lactosa hidrolizada. El tratamiento que inició con pH de 6.5 a 30 °C y en suero deslactosado produjo la mayor concentración de ácido con 7.62 g/L. Aunque la concentración mencionada supera a los 0.96 g/L obtenidos por O. Sánchez et al. (2004) con la cepa de *Aspergillus carbonarius* NRRL 67 en suero hidrolizado, la cepa de *A. carbonarius* NRRL 368 utilizada en el mismo estudio con igual medio nutritivo alcanzó rendimientos superiores a los 10 g/L de ácido cítrico. A pesar de las diferencias en las concentraciones de ácido cítrico obtenidas con las dos cepas acreditadas y la cepa nativa, esta última produce valores aceptables de ácido que sugieren un alto potencial de producción de ácido si se optimizan las variables o se suplementa el lactosuero para tener mayor sustrato disponible.

Por otro lado, algunos estudios que emplearon *Aspergillus niger* para la fermentación del suero de quesería sin adición de nutrientes reportan concentraciones inferiores a las obtenidas en esta investigación. Por ejemplo, en el estudio de O. Sánchez et al. (2004) se alcanzó una concentración de 0.34 g/L a los 10 días de fermentación en cultivo sumergido. En el caso de Roobini y Gnanavel (2018) obtuvieron 2.26 g/L a los 10 días en cultivo superficial, resultado similar al obtenido por El-Holi y Al-Delaimy (2003) con 2.28 g/L de ácido cítrico. Estos resultados demuestran que la cepa nativa de *A. carbonarius* empleada en esta investigación aprovecha mejor los nutrientes presentes naturalmente en el suero de leche en comparación con algunas cepas de *A. niger*.

En cuanto a la morfología macroscópica de los cultivos, en aquellos que iniciaron la fermentación con pH de 6.5 se observó crecimiento de *pellets* esféricos bien definidos de hasta 5 mm como se muestra en la Figura 26a, mientras que en los cultivos que se iniciaron con pH de 4 se presentaron menor número de *pellets* con diferentes formas de 12 mm de longitud

aproximadamente como en la Figura 26b. Además, se evidenció que los cultivos que generaron *pellets* compactos y homogéneos produjeron cantidades mayores de ácido cítrico, lo que coincide con la morfología que favoreció la producción de ácido en la investigación de Soria (1997) y con las estructuras recomendadas para la producción de metabolitos secundarios en hongos filamentosos (López et al., 2006).

La presencia y la forma de estas estructuras indican que el tamaño del inóculo fue apropiado y que el medio de crecimiento satisfizo todos los requerimientos nutricionales del microorganismo y aunque no asegura un mejor rendimiento si demuestra un adecuado manejo de las condiciones de operación como temperatura, pH, agitación y aireación (G. Pérez, 2013). En cuanto al pequeño tamaño alcanzado, este es deseable para las fermentaciones ya que los nutrientes – especialmente el oxígeno disuelto - pueden llegar a la región central del *pellet* y evitar la autólisis de las hifas más internas (Papagianni, 2004).

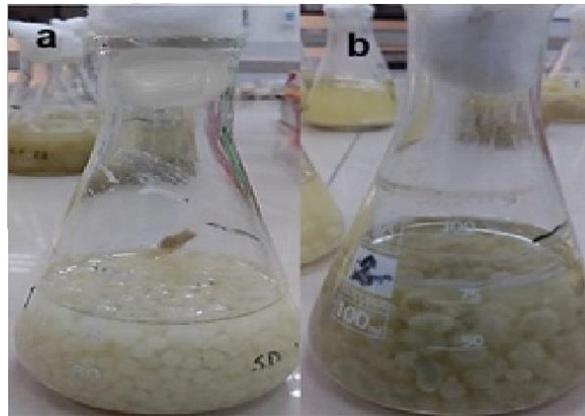


Figura 26. a) Cultivo con *pellets* esféricos. b) Cultivo con *pellets* amorfos.

Fuente: Autor.

4.2.2 Efectos de la temperatura, pH y medio nutritivo en la producción de ácido cítrico

Una vez obtenidos los resultados de las corridas experimentales, se realizó el análisis, el modelado y la optimización del diseño tratando los datos con Metodología de Superficie de

Respuesta [MSR]. Los resultados se sometieron al análisis de varianza [ANOVA], pruebas de significancia estadística y test de falta de ajuste del modelo.

Como paso previo al tratamiento de los datos y con la finalidad de corroborar la validez de los resultados de los diferentes tratamientos se aplicó la prueba de Anderson-Darling para determinar si se cumple el supuesto de normalidad en los datos obtenidos.

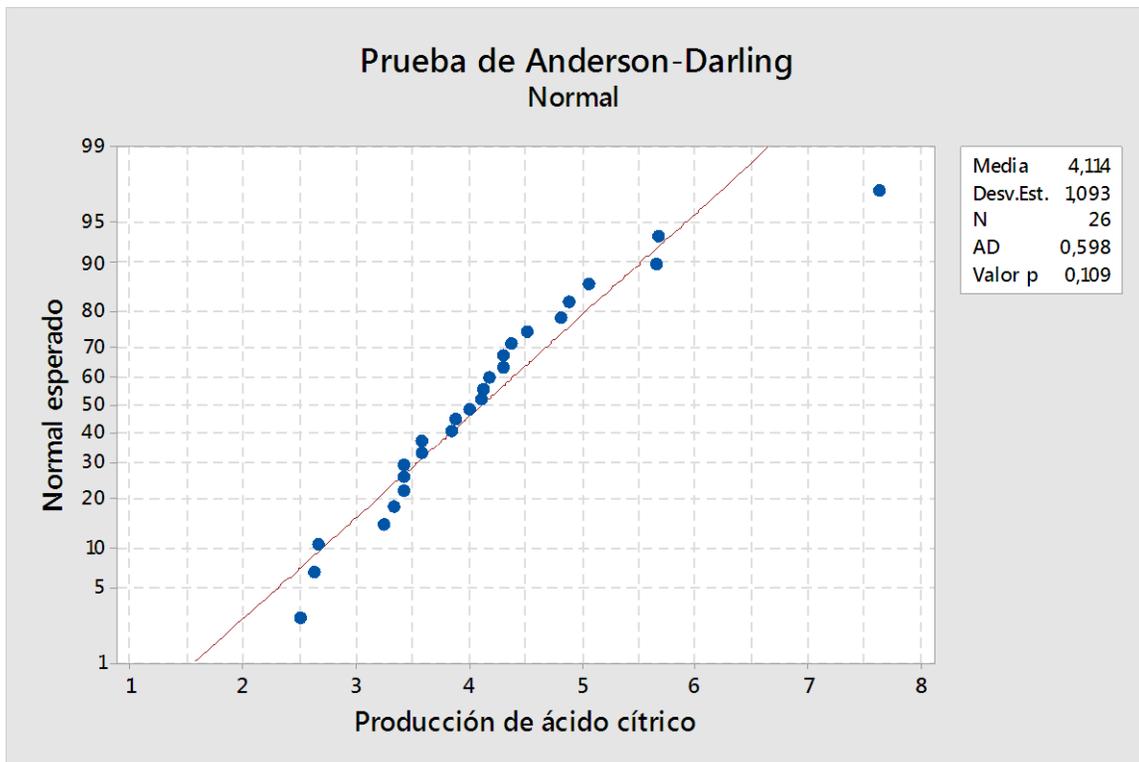


Figura 27. Test de Normalidad obtenido mediante el programa estadístico Minitab® 18.

Fuente: Autor.

El valor-p de 0.109 obtenido en la prueba de Anderson-Darling [Figura 27] es mayor al valor de la significancia 0.05. Consecuentemente, se demuestra el cumplimiento del supuesto de normalidad y por ende la existencia de una distribución normal en los resultados.

Adicionalmente, se corrobora el supuesto de que los residuos son independientes entre sí mediante la gráfica de residuos vs. orden. Como se observa en la Figura 28 los residuos se

ubican aleatoriamente alrededor de la línea central, sin observación de tendencias ni patrones lo que indica que los residuos no se correlacionan y por lo tanto son independientes.

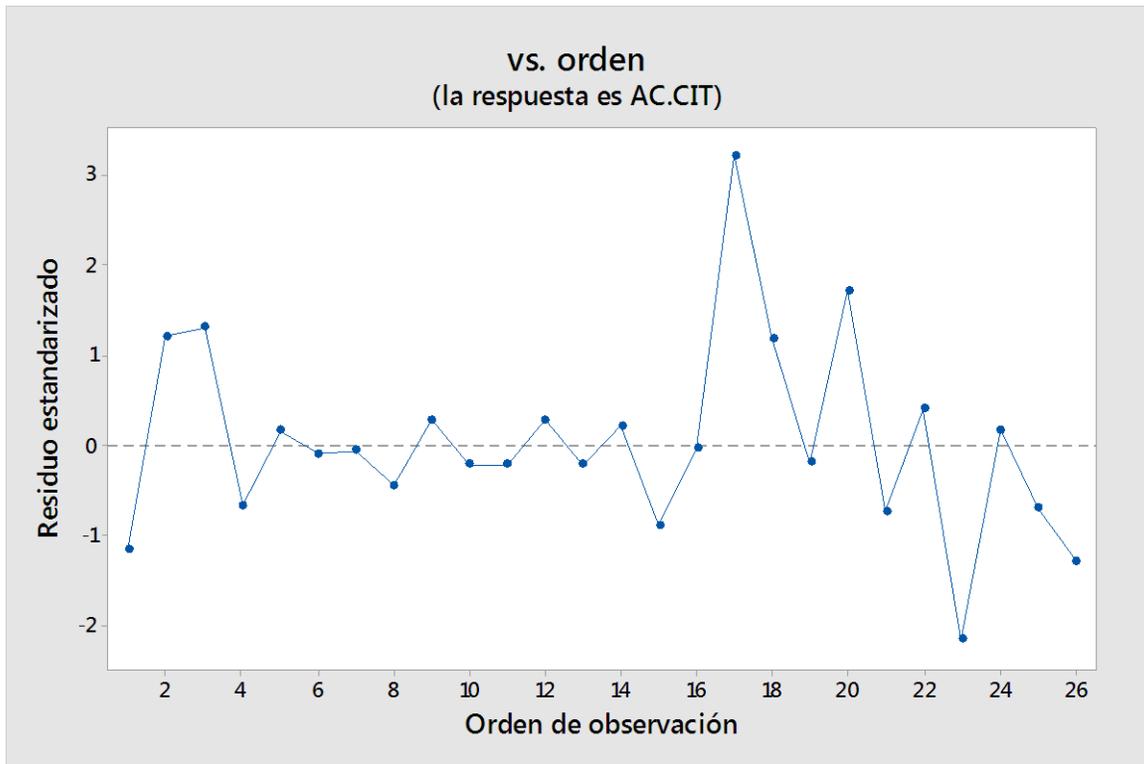


Figura 28. Gráfica de residuos vs. orden.

Fuente: Autor.

Tras la demostración de la normalidad y la independencia de los datos se procedió a realizar el análisis estadístico del modelo de Superficie de Respuesta. En primer lugar, para determinar cual modelo es el más apropiado para describir los datos de la investigación se empleó la prueba de falta de ajuste. Para ello se probaron cuatro diferentes modelos estadísticos: lineal, lineal + cuadrados, lineal + interacciones y cuadrático completo. En la Tabla 20 se muestra el valor-p para la falta de ajuste de cada modelo ensayado, como se puede observar en la tabla el modelo lineal + interacciones y el modelo cuadrático completo son los que presentan valor-p mayor que 0.05; sin embargo, el modelo lineal + interacciones presenta más alto valor-p y mayor porcentaje de variabilidad [R^2] razón por la cual se lo consideró el más idóneo.

Tabla 20. Prueba de ajuste en los diferentes modelos ensayados.

Modelo	Valor-p para la falta de ajuste	Coefficiente de Determinación [R²]
Lineal	0.020	83.46 %
Lineal + cuadrados	0.016	84.35 %
Lineal + interacciones	0.108	91.85 %
Cuadrático completo	0.100	90.74 %

Fuente: Autor.

Una vez definido el modelo estadístico apropiado, se evidencia a partir del test de Fisher [Tabla 21] que el modelo de regresión es altamente significativo [$F_{\text{modelo}} = 35.69$; valor- $p < 0.05$]. Además, el coeficiente de determinación o R^2 alcanzado con este modelo explica el 91.85% de la variabilidad de producción de ácido cítrico.

Tabla 21. ANOVA para la producción de ácido cítrico.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	6	27.4233	4.5705	35.69	0.000
Lineal	3	24.9177	8.3059	64.85	0.000
PH	1	7.1380	7.1380	55.73	0.000
t	1	7.5263	7.5263	58.77	0.000
SUSTRATO	1	10.2534	10.2534	80.06	0.000
Interacción de 2 factores	3	2.5056	0.8352	6.52	0.003
PH*t	1	2.3013	2.3013	17.97	0.000
PH*SUSTRATO	1	0.0143	0.0143	0.11	0.742
t*SUSTRATO	1	0.1899	0.1899	1.48	0.238
Error	19	2.4334	0.1281		
Falta de ajuste	11	1.8744	0.1704	2.44	0.108
Error puro	8	0.5590	0.0699		
Total	25	29.8567			

Fuente: Autor

El análisis de los efectos de la temperatura, pH y medio nutritivo sobre la producción de ácido cítrico se realizó con ANOVA, el cual divide la variabilidad de la producción de ácido cítrico en valores separados para cada efecto, probando su significancia estadística tanto individual como con interacciones. En este caso, se encontraron 4 efectos con un valor-p menor que 0.05 lo que indica que son significativos en la producción de ácido cítrico.

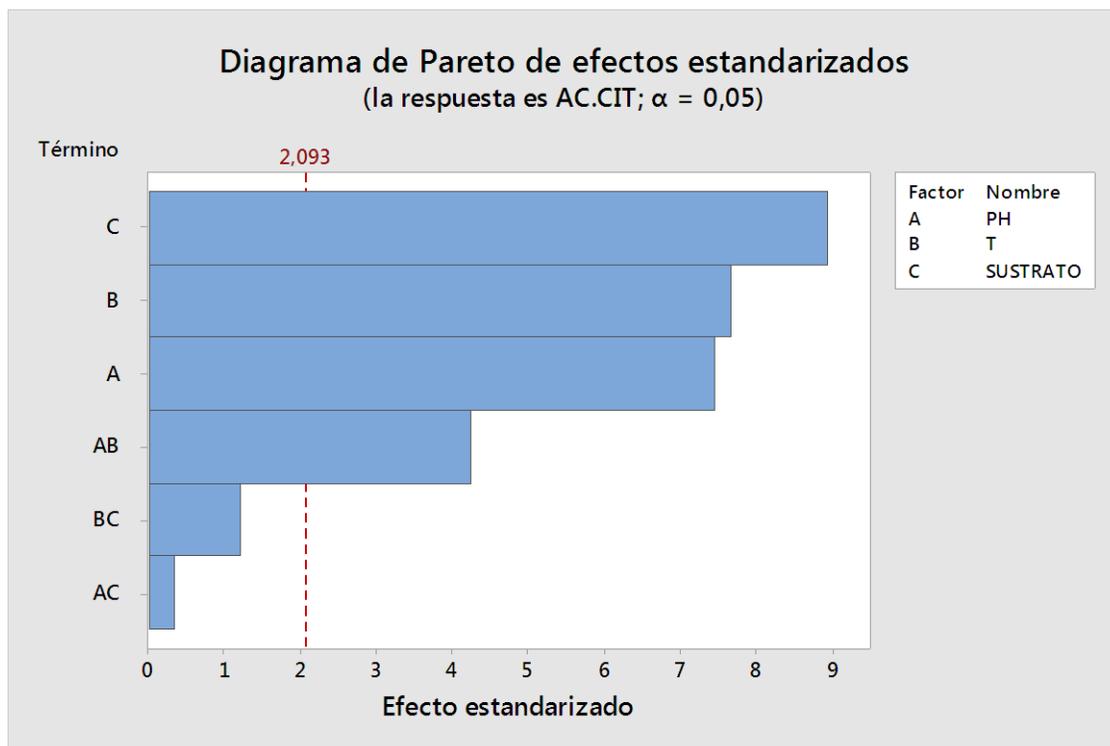


Figura 29. Diagrama de Pareto: pH (A), temperatura (B), sustrato (C).

Fuente: Autor.

En el Diagrama de Pareto [Figura 29] se pueden observar los términos que tienen mayor influencia sobre la producción de ácido. Como se evidencia en la Figura 29 los términos individuales influyen más que las interacciones entre ellos; especialmente la estructura de la fuente carbonada demuestra ser la variable más significativa, seguida de la temperatura, el pH y finalmente la interacción pH-temperatura.

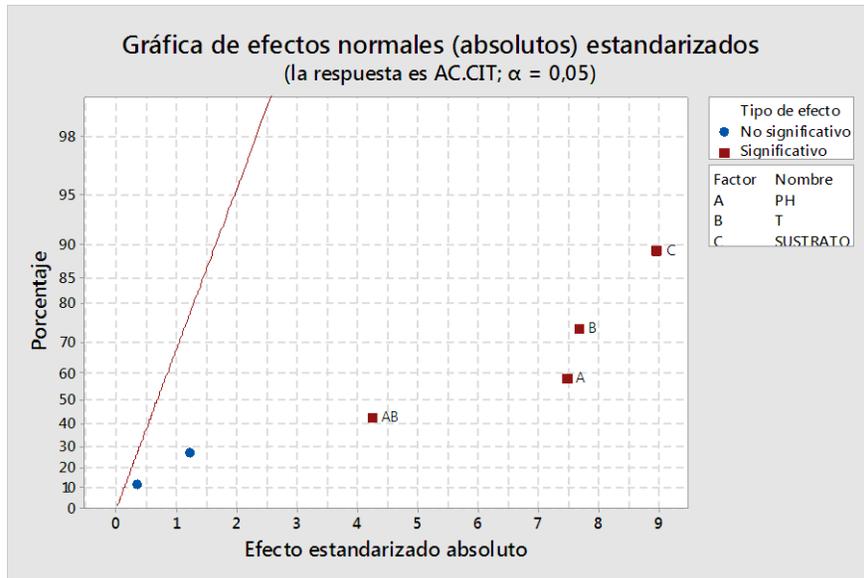


Figura 30. Gráfica de efectos normales absolutos estandarizados.

Fuente: Autor.

Lo expuesto en el Diagrama de Pareto se corrobora con la gráfica de efectos normales absolutos estandarizados [Figura 30], donde se pueden determinar cuáles variables presentan mayores efectos sobre la producción de ácido. De esta manera se reitera el mayor efecto que presenta el tipo de sustrato en comparación con las otras variables.

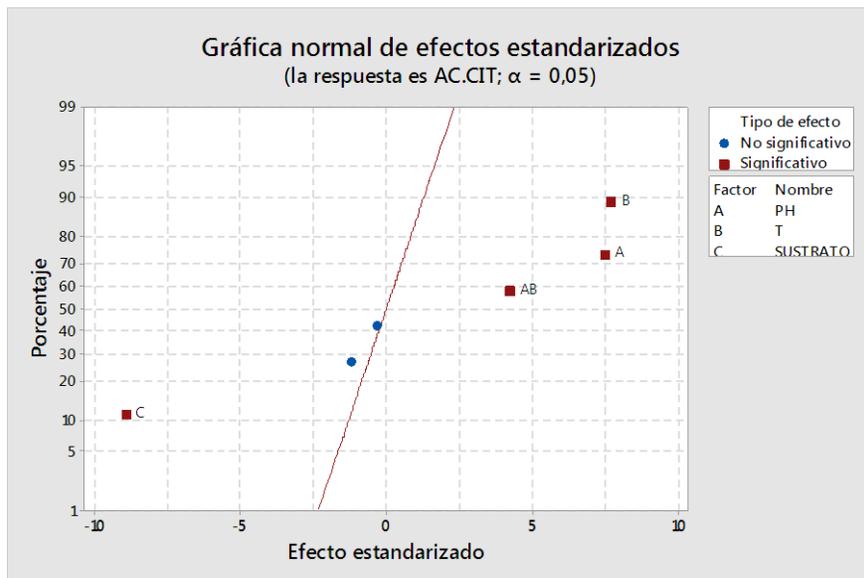


Figura 31. Gráfica normal de efectos estandarizados.

Fuente: Autor.

Por su parte la gráfica normal de efectos estandarizados [Figura 31] permite observar además de la significancia de las variables los efectos positivos y negativos al variar entre el nivel bajo y el nivel alto. De esta manera se muestra que el sustrato presenta un efecto negativo en la producción de ácido cítrico al usarse suero entero.

Los efectos principales y las interacciones se interpretaron a partir de las Figuras 32 y 33 en base a la pendiente presentada. En la Figura 32 se muestra cómo afectan los cambios en un solo factor a la media de ácido cítrico, notándose gran diferencia entre los niveles altos y bajos de los tres factores. De esta manera se deduce que con suero deslactosado y a pH y temperatura más alta se obtienen mayores concentraciones de ácido cítrico. Cabe mencionar que estos efectos son representativos para los niveles establecidos para cada una de las variables.

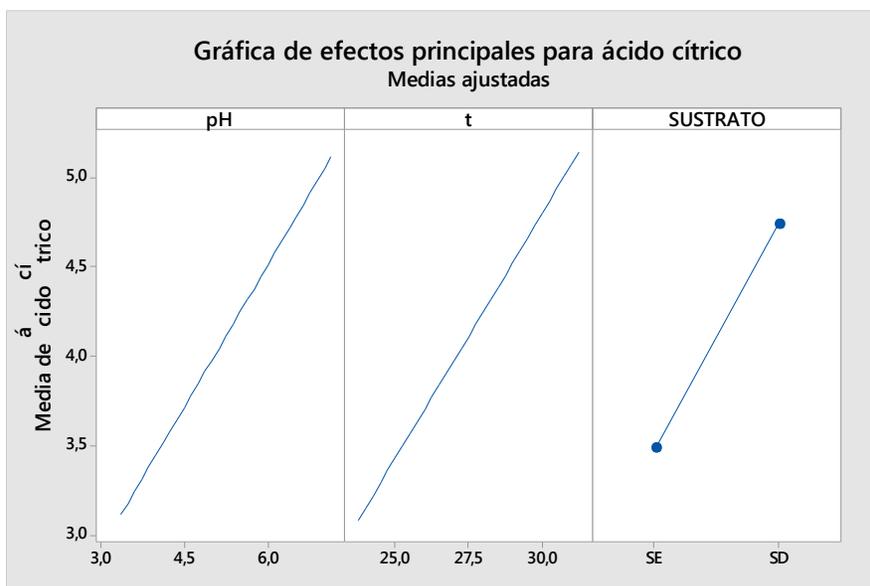


Figura 32. Efectos principales de las variables del diseño central compuesto: pH, temperatura (t), suero entero (SE), suero deslactosado (SD). Fuente: Autor.

Los resultados arrojados por los efectos principales coinciden con el estudio de O. Sánchez et al. (2004) en cuanto al sustrato se refiere, ya que en su investigación los mayores títulos de ácido cítrico se alcanzaron con sueros hidrolizados. Respecto al pH, Soria (1997) alcanzó

mayores concentraciones de ácido al aumentar el pH inicial del medio de cultivo al igual que lo obtenido en esta investigación. Acerca de la temperatura, tanto O. Sánchez et al. (2004) como Soria (1997) trabajaron únicamente con 30 °C por lo que no se puede realizar una comparación en cuanto a temperaturas, pero si corroborar que esta es la más apropiada para la producción de ácido cítrico con *A. carbonarius*.

Con relación a las interacciones de los factores y el cambio de la media de ácido cítrico, mediante la gráfica de interacción [Figura 33] se puede observar que las líneas con tendencia paralela se encuentran en las interacciones que presentaron ser no significativas en el análisis de varianza, mientras que la interacción pH-temperatura al ser significativa muestra líneas no paralelas. Ahora bien, se pueden concluir que a una temperatura y un pH altos se favorece la producción de ácido por lo que estas condiciones de operación son las que se deben establecer en el sistema.

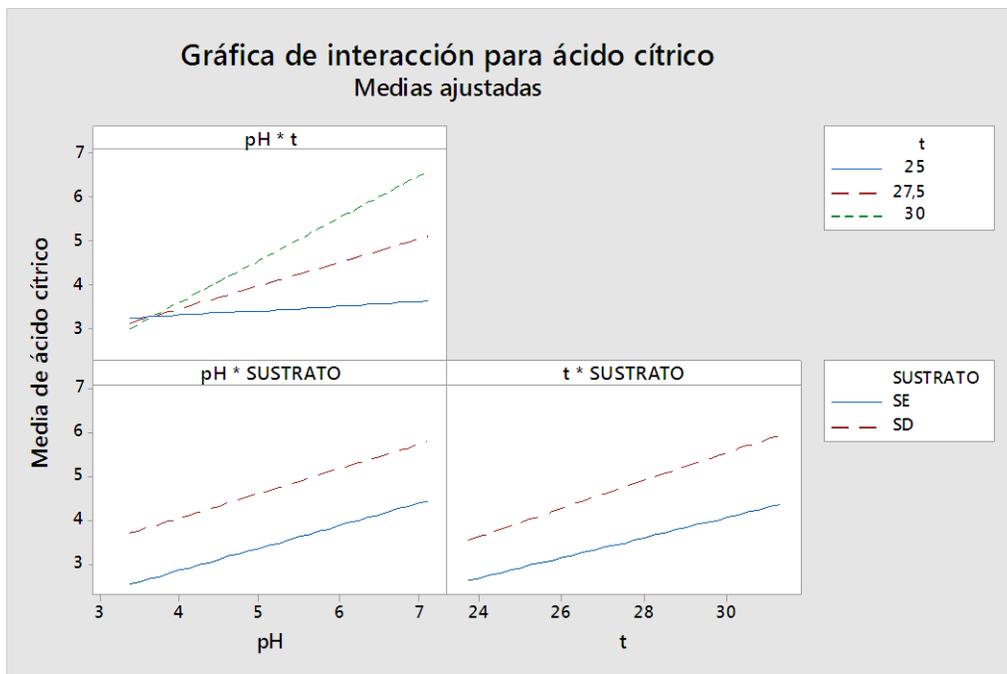


Figura 33. Interacciones de las variables en el diseño central compuesto: pH, temperatura (t), suero entero (SE), suero deslactosado (SD). Fuente: Autor.

4.2.3 Optimización de las variables independientes

La ausencia de curvatura en los datos permite correlacionar las variables estudiadas, estimar la superficie de respuesta y el óptimo a través del modelo de regresión lineal de primer orden expuesto en la Figura 34.

SUSTRATO	
SD	Ácido cítrico = $17,85 - 4,16 \text{ pH} - 0,583 \text{ t} + 0,1716 \text{ pH} \cdot \text{t}$

Figura 34. Modelo de regresión lineal de primer orden.

Fuente: Autor.

Las condiciones óptimas para alcanzar una máxima respuesta [7.92 g/L], obtenidas a partir de las relaciones entre los efectos de las tres variables estudiadas, fueron las siguientes: pH 7, temperatura 31 °C y suero deslactosado [Figura 35].

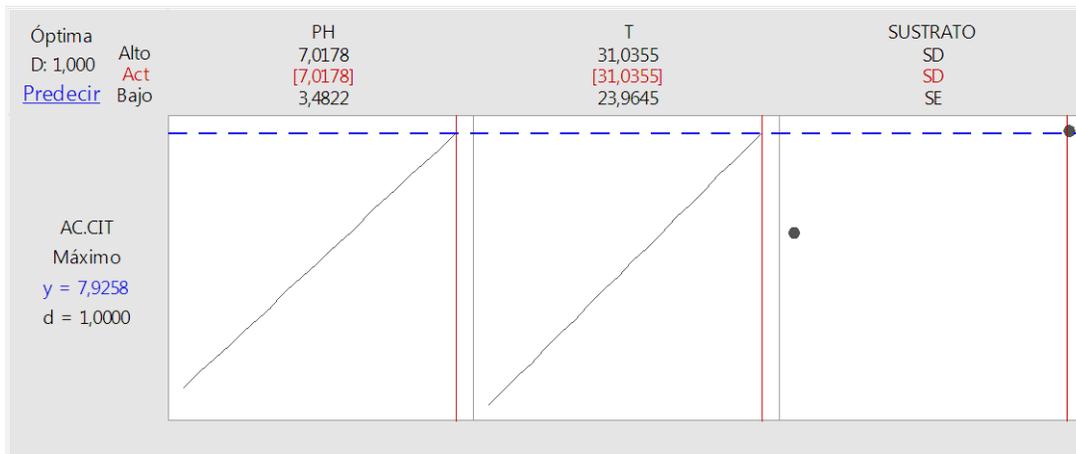


Figura 35. Optimización de las variables de estudio mediante Minitab® 18: pH, temperatura (t), suero entero (SE), suero deslactosado (SD). Fuente: Autor.

Las condiciones óptimas se representan mediante una gráfica de superficie de respuesta generada por el diseño central compuesto [Figura 36], la cual permite visualizar las regiones óptimas y determinar la influencia de los factores sobre la producción de ácido cítrico.

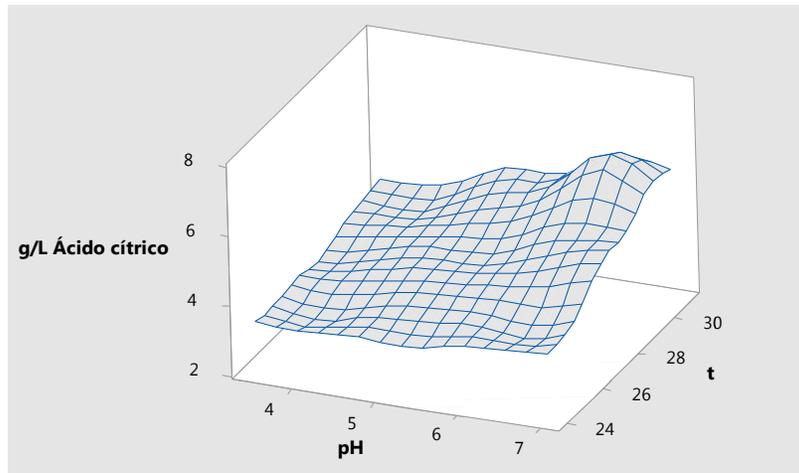


Figura 36. Gráfica de Superficie de Respuesta de ácido cítrico vs. temperatura y pH en suero deslactosado.

Fuente: Autor.

4.3 Cinética de crecimiento celular, consumo de sustrato y formación del ácido a partir de *Aspergillus carbonarius* utilizando un biorreactor

A partir de los resultados obtenidos en la optimización del proceso, se realizó la fermentación en un biorreactor por 10 días monitoreando el crecimiento de biomasa, el consumo de azúcares reductores y la producción de ácido cítrico cada 24 horas [véase Anexo IV]. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 37.

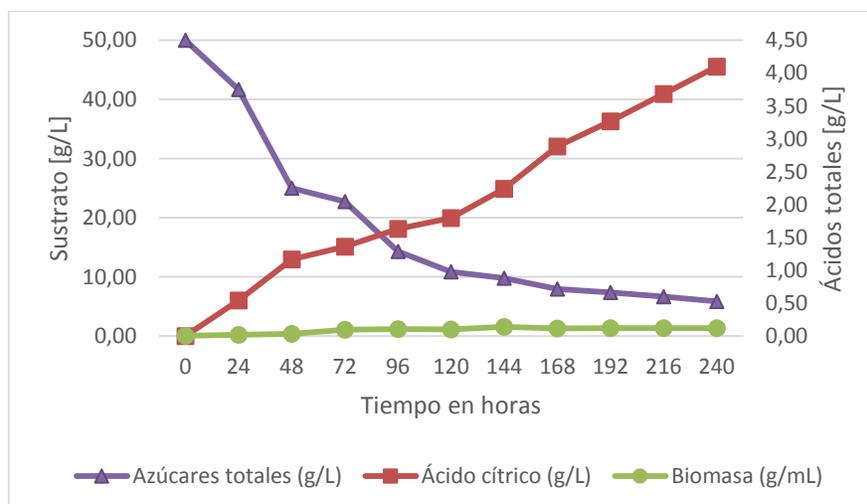


Figura 37. Consumo de sustrato, crecimiento de biomasa y biosíntesis de ácido cítrico durante el cultivo en biorreactor. Fuente: Autor.

La fermentación inició con 50 g/L de azúcares reductores, los cuales descendieron a 25 g/L en las primeras 48 horas y a partir de ese tiempo el consumo de sustrato se mantuvo con una reducción constante a lo largo de los 10 días de fermentación terminando con una concentración de 5.88 g/L. La disminución marcada de los azúcares en las primeras 48 horas coincide con la etapa de adaptación del microorganismo, ya que después del tiempo mencionado aumentó considerablemente la biomasa hasta las 144 horas cultivo alcanzado un máximo de 0.141g/mL. En las horas posteriores el crecimiento microbiano se redujo ligeramente hasta estabilizarse en una concentración de 0.120 g/L. Una vez que el microorganismo entró en fase estacionaria - aproximadamente a las 168 horas - se evidencia un aumento constante en la producción de ácido cítrico hasta alcanzar un valor final de 4.10 g/L. Como un indicador adicional se monitoreó el pH y se registró un pH final de 1.9. Este dato corrobora la presencia de ácido cítrico, ya que acorde a Soria (1997) si el pH del cultivo no cae por debajo de 3 se excreta ácido oxálico en lugar de ácido cítrico.

Tras la interpretación de los datos obtenidos, se puede diferenciar claramente la trofofase de la idiofase y además demostrar que el cultivo presentó las fases características de un cultivo tipo batch, menos la de muerte celular (Papagianni, 2004). Debido a que no se notó reducción notable de la biomasa ni limitación del sustrato y la producción de ácido no disminuyó al décimo día, se deduce que el tiempo de fermentación no fue suficiente para alcanzar la concentración óptima deseada.

Si bien la cepa nativa demostró ser capaz de sintetizar ácido cítrico dentro del biorreactor, la concentración alcanzada [4.10 g/L] fue evidentemente menor de lo esperado al optimizar las variables [7.92 g/L]. El cambio de escala podría explicar el desarrollo morfológico inapropiado del cultivo, el aumento en el tiempo de fermentación y por ende los bajos títulos de ácido (O.

Sánchez et al., 2004). En la Figura 38 se muestra el caldo fermentativo al finalizar la fermentación, en donde se puede distinguir un crecimiento micelial fragmentado poco deseado para las fermentaciones (G. Pérez, 2013). Acorde a Soria (1997), este tipo de crecimiento puede deberse a una incorrecta relación entre la aireación y la agitación del sistema al interior del biorreactor, sumado a la fragilidad de los *pellets* formados por *Aspergillus carbonarius*.



Figura 38. Caldo fermentativo extraído del biorreactor.

Fuente: Autor.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En búsqueda de alternativas para reducir la contaminación ambiental y al mismo tiempo aprovechar los residuos de la industria quesera del país, se planteó el aislamiento y la utilización de una cepa nativa de *Aspergillus carbonarius* para la producción de ácido cítrico mediante fermentación sumergida en lactosuero.

Tras la culminación de los procedimientos respectivos para alcanzar los objetivos planteados y el análisis correspondiente de los resultados, se obtienen las conclusiones que a continuación se detallan.

La cepa aislada a partir de pasas, caracterizada macroscópica y microscópicamente corresponde a la especie *Aspergillus carbonarius*.

La cepa nativa de *A. carbonarius* presenta la capacidad de metabolizar la lactosa presente en el suero de quesería entero, así como también la glucosa y galactosa del lactosuero hidrolizado. En cultivo sumergido exhibe un desarrollo morfológico tipo *pellet* bajo condiciones de operación específicas, las mismas que lograron orientar la ruta metabólica del microorganismo hacia la sobreproducción de ácido cítrico. Las condiciones que favorecieron la síntesis de ácido fueron pH iniciales altos [6.5 - 7], temperaturas altas [30 - 31 °C] y suero hidrolizado. De esta manera, *A. carbonarius* biosintetizó 7.62 g/L como título máximo de ácido cítrico en matraces Erlenmeyer a 30 °C, con pH inicial de 6.5 y en suero deslactosado.

En base al análisis estadístico realizado a los resultados obtenidos se acepta la hipótesis alterna, la cual establece que el pH, la temperatura y la forma del sustrato influyen significativamente en la biosíntesis de ácido cítrico por parte de *A. carbonarius*. La variable con mayor significancia estadística es la forma del sustrato, puesto que el microorganismo posee mayor facilidad al metabolizar la lactosa hidrolizada.

La optimización de la producción de ácido cítrico basada en el diseño experimental planteó las siguientes condiciones de operación: pH inicial de 7, temperatura de 31 °C y lactosuero deslactosado. Si bien hubo producción de ácido cítrico en el biorreactor, no se alcanzó la respuesta optimizada debido posiblemente a la influencia de la agitación y aireación, variables que en cultivos en Erlenmeyer no fueron consideradas.

En relación con el aspecto ambiental en torno al que gira el aprovechamiento de residuos, *Aspergillus carbonarius* demostró ser capaz de reducir en 10 días hasta el 88% de los azúcares presentes en el lactosuero. De esta manera, se evidencia su función como agente reductor de la carga contaminante de las aguas residuales de la industria quesera.

5.2 Recomendaciones

En cuanto a la cepa aislada de *Aspergillus carbonarius*, al presentar esporas de mayor tamaño que las registradas en las diferentes especies de la sección *Nigri*, sería necesario una identificación molecular para corroborar si se trata de una nueva cepa de *A. carbonarius*, o un mutante de alguna ya existente.

En el caso de la especie *Aspergillus carbonarius*, es muy poco estudiada en procesos fermentativos por lo que la determinación de la temperatura, pH y sustrato óptimos es sólo una

pequeña porción del gran número de variables que influyen en la producción de ácido cítrico y que quedan por investigar.

A partir de lo anterior se sugiere preparar inóculos en base a *pellets* ya adaptados al lactosuero para poder determinar si este tipo de inóculo reduce el tiempo de adaptación y consecuentemente el de fermentación, a comparación del inóculo con esporas. Además, una caracterización de los macro y micronutrientes del lactosuero permitiría estudiar el efecto de los distintos nutrientes a varias concentraciones sobre el desarrollo morfológico de la cepa y la producción de ácido cítrico. Otras variables por considerar dentro de las fermentaciones en biorreactores son los efectos individuales o interacciones de la agitación y aireación, ya que de estas depende en gran medida la formación de *pellets* y la producción de ácido cítrico.

Con respecto a las metodologías utilizadas en esta investigación se propone emplear técnicas de cuantificación de ácido cítrico, biomasa y sustrato más sofisticadas que permitan reducir el tiempo de análisis y además obtener resultados más exactos. Además, se incentiva a los investigadores a ampliar el alcance de la investigación hasta la purificación del ácido cítrico con el objetivo de utilizar técnicas innovadoras que sean económicamente accesibles a pequeñas y medianas empresas.

Finalmente se invita a continuar los estudios sobre la cepa nativa y sus posibles aplicaciones industriales, ya que aportará al conocimiento y explotación de la diversidad fúngica del país.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M., Castellá, G., & Cabañes, F. J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. [*Aspergillus carbonarius* como principal fuente de contaminación con ocratoxina A en frutos de vid secos en el mercado español]. *Journal of Food Protection*, 66(3). <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.3.504>
- Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J., & Cabañes, F. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. [Taxonomía y significado de los aspergillus negros]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 86(1), 33–49. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024907.85688.05>
- Accensi, F. (2008). *Aportación al conocimiento de Aspergillus sección Nigri*. Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2QRgain>
- Almécija, M. (2007). *Obtención de lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero*. Universidad de Granada. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2LtEmBv>
- Álvarez, J. (2017). *Evaluación de la funcionalidad de producción de ácido cítrico usando cepas de Aspergillus niger identificadas molecularmente*. Universidad San Francisco de Quito. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2L3hUiu>
- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2012). *Cálculos de biomasa*. Lejona. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2QoQZP2>
- Bakhiet, S. E. A., & Al-mokhtar, E. A. I. (2015). Production of Citric Acid by *Aspergillus niger* using Sugarcane Molasses as Substrate [Producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* utilizando melaza de caña de azúcar como sustrato]. *Jordan Journal of Biological Sciences*,

8(3), 211–215. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2BC815T>

Banco Central del Ecuador. (2018). Estadísticas de Comercio Exterior. Recuperado 20 de diciembre de 2018, a partir de <https://bit.ly/2C99bIt>

Berruga, M. (1999). *Desarrollo de procedimientos para el tratamiento de efluentes de quesería*. Universidad Complutense de Madrid. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2S93Syt>

Blanco, G., & Herryman, M. (2005). Situación mundial y tendencias en la producción y uso del ácido cítrico. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*, (1), 48–51. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2LA3gQg>

Calderón, C., & Ayala, H. (2015). Obtención de ácido cítrico a partir de pulpa de banano maduro, utilizando el hongo *Aspergillus niger*. En *I Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología UTMACH 2015* (pp. 25–30). Machala. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2PsdDG6>

Catálogo de la Vida. (2017, octubre 27). Detalles de la especie: *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom 1916. Recuperado 22 de diciembre de 2018, a partir de <https://bit.ly/2SitgCc>

Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., & Pagliaro, M. (2017). Citric acid: emerging applications of key biotechnology industrial product. [Ácido cítrico: aplicaciones emergentes de productos clave obtenidos por biotecnología industrial]. *Chemistry Central Journal*, 11(22), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y>

Concha, W. (2014). *Producción biológica de ácido cítrico a partir de lactosuero de residuo*

quesero entero y deproteinizado utilizando una cepa fungal de Aspergillus niger sp. en cultivo sumergido. Universidad Católica de Santa María. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2AYnsX5>

Djossou, O., Roussos, S., Isabelle, P., Macarie, H., Germain, K., & Yoan, L. (2015). Fungal population , including Ochratoxin A producing Aspergillus section Nigri strains from Ivory Coast coffee bean. [Población de hongos, incluidas las cepas de la sección Nigri que producen Ocratoxina A en el grano de café de Costa de Marfil]. *African Journal of Agricultural Research*, 10(26), 2576–2589. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.9494>

El-holi, M. A., & Al-delaimy, K. S. (2003). Citric acid production from whey with sugars and additives by Aspergillus niger. [Producción de ácido cítrico desde suero de leche con azúcares y aditivos usando Aspergillus niger]. *African Journal of Biotechnology*, 2(10), 356–359. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1073>

Franco, A. (2006). *Aspergillus sección Nigri: Estudio fisiológico y molecular de especies ocratoxígenas.* *International Journal of Food Microbiology*. Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2Q38414>

Frank, J. (s. f.). *Aspergillus carbonarius*. Recuperado 25 de diciembre de 2018, a partir de <https://bit.ly/2QaU5Xb>

Garriga, M., Suárez, G., & Cruz, D. (2005). Avances en la producción de ácido cítrico a partir de miel final por *Aspergillus niger*. *Revista Cubana de Química*, XVII(1), 171–178. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2GJPY1b>

Gilchrist, L., Fuentes, C., Martínez, R., López, E., Duveiller, R., Singh, M., ... García, A. (2005).

Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. (Segunda ed). Mexico D.F.: CIMMYT. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2scGdSB>

González, A. (2009). *Diagnóstico y control de especies de Aspergillus productoras de ocratoxina A.* Universidad Complutense de Madrid. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2CyjVRl>

González, Á. (2015). Estudio de viabilidad de una planta de producción de ácido cítrico por fermentación. *Cuadernos del Tomás*, 7, 151–178. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2A9wsZE>

González, M. (2012). Aspectos medio ambientales asociados a los procesos de la industria láctea. *Mundo Pecuario*, 8, 16–32. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2AXSfmD>

Granda, A. (2018, diciembre 2). Cinco de 67 industrias lecheras procesan el lactosuero. *El Telégrafo*. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2zNVz3Z>

Guerrero, J., Ramírez, A., & Puente, W. (2011). Caracterización del suero de queso blanco del combinado lácteo Santiago. *Tecnología Química*, 31(3), 313–323. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2SLawLl>

Hernández, M., & Vélez, J. (2014). Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(2), 13–22. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2rHsT7X>

Hernández, N., López, F., & Reyes, G. (2017). *Preparación y uso de disoluciones patrón ácido - base.* Ciudad de México. <https://doi.org/dfgdfg>

INEC, E. (2017). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2017*. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2Ms3esL>

INEN. Norma Técnica Ecuatoriana, NTE INEN 2594:2011: Suero de leche líquido. Requisitos (2011). Ecuador. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2S1a3Vg>

Kevei, F., Hamari, Z., Varga, J., Kozakiewicz, Z., & Croft, J. (1996). Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. [Polimorfismos moleculares y variaciones fenotípicas en *Aspergillus carbonarius*]. *Antonie van Leeuwenhoe*, 70(1), 59–66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00393570>

Khuang, K., Strub, C., Montet, D., Alter, P., Meile, J., Schorr, S., & Stadler, M. (2016). Effect of different light wavelengths on the growth and ochratoxin A production in *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus westerdijkiae*. [Efecto de diferentes longitudes de onda de la luz sobre el crecimiento y la producción de ocratoxina A en *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus westerdijkiae*]. *Fungal Biology*, 120(5). <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.02.005>

La industria lechera busca generar mayor valor agregado. (2014, abril 28). *Diario El Telégrafo*. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2B3hQuK>

Leal, D., Pico, Y., Castro, J., Guerra, J., & Castro, G. (2011). Producción de ácido cítrico a partir de suero lácteo entero e hidrolizado con *Aspergillus niger*, por vía fermentativa. *Alimentos Hoy*, 19(19), 32–38. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2RH3ZkN>

López, C., Zuluaga, A., Herrera, S., Ruiz, A., & Medina, V. (2006). Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. *DYNA*, 73(150), 39–57.

Recuperado a partir de <https://bit.ly/2rrSCBQ>

Mateos, P. (2014). *Preparación y propagación de inóculos*. Salamanca. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2R6YsYq>

Mattos, C. (2015). Valorización del lacto suero. *Alimentos Hoy*, 23(36), 7–20. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2EuPE8e>

Mendoza, M., & González, P. (2018, noviembre 26). Industria usa el 10 % del suero de la leche que se produce en el país. *El Comercio*. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2zrJUrp>

Miranda, O., Fonseca, P., Ponce, I., Cedeño, C., Rivero, L. S., & Vásquez, L. M. (2014). Elaboración de una bebida fermentada a partir del suero de leche que incorpora *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 24(1), 7–16. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.341.2762>

Muñoz, A., Galindo, A., López, L., Cantú, L., & Barajas, L. (2014). Ácido Cítrico: Compuesto Interesante. *Acta Química Mexicana*, 6(12), 1–6. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2P2zMP5>

Muñoz, M. A. (2012). Procesos fermentativos o bioprocesos. En *Biotecnología* (Segunda, pp. 107–120). Universidad Nacional de Quilmes. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2CsfPKr>

Muset, G., & Castells, M. (2017). *Valorización del lactosuero*. (Primera ed). San Martín: Transferencia Tecnológica. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2A9Ay3U>

Naga, M. (2014). *La cuantificación de las células bacterianas o esporas de hongos mediante el uso de cámara de Neubauer*. Puyo. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2BZf4Hj>

- NMX. Norma Mexicana, NMX-F-102-S-1978: Determinación de la acidez titulable en productos elaborados a partir de frutas y hortalizas. (1978). México. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2RqTjtM>
- Nyongesa, B. W., Okoth, S., & Ayugi, V. (2015). Identification Key for *Aspergillus* Species Isolated from Maize and Soil of Nandi. [Claves de identificación para especies de *Aspergillus* aisladas del maíz y el suelo de Nandi]. *Advances in Microbiology*, 5, 205–229. <https://doi.org/10.4236/aim.2015.54020>
- Palencia, G., & Ruiz, A. (s. f.). *Estandarización de Soluciones*. Cali. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2Qk09wk>
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. [Morfología fúngica y producción de metabolitos en procesos miceliales]. sumergidos. *Biotechnology Advances*, 22(3), 189–259. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2003.09.005>
- Parra, R. A. (2009). Lactosuero: Importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional Agropecuaria Medellín*, 62(1), 4967–4982. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.011>
- Parzenese, M. (2008). Tecnologías para la Industria Alimentaria - Procesamiento de lactosuero. *Alimentos Argentinos*, 13, 1–9. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2LvjqAM>
- Pasmay, H. (2015). *Caracterización del Suero Lácteo de una Quesería Artesanal, localizada en la Zona 5 del Ecuador*. Escuela Superior Politécnica del Litoral. <https://doi.org/10.1080/17450910902921567>

- Passos, M., & Ribeiro, C. (Eds.). (2010). Application of Solid-State Fermentation to Food Industry. En *Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products. [Innovación en Ingeniería de Alimentos: Nuevas Técnicas y Productos]* (1ra. Ed., pp. 107–136). Boca Ratón: CRC Press. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2Afn46I>
- Pérez, G. (2013). *Escalado del tamaño de pellet obtenido en la fermentación sumergida de sacarosa con Aspergillus niger, desde un reactor de 2 L hasta uno de 14 L, con el coeficiente kLa de transferencia de masa. constante.* Escuela Politécnica Nacional. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2Q25g4i>
- Pérez, O., Ley, N., Rodríguez, K., & González, E. (2016). Oportunidades de producción de ácido cítrico por vía fermentativa a partir de sustratos azucarados en cuba. *Centro Azúcar*, 43(2), 85–99. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2ro8ftI>
- Permitir uso de suero de leche es “firmar acta de defunción para lecheros”, afirma Francis Abad. (2018). Recuperado 3 de diciembre de 2018, a partir de <https://bit.ly/2BXY0c>
- Petrenko, O. (2005). *Estudio de algunas características de las cepas de levaduras y de su rendimiento celular utilizando un suero lácteo.* Universidad de Belgrano. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2rLApis>
- Piontelli, E. (2008). Aportes morfotaxonómicos en el género *Aspergillus* Link: Claves para las especies ambientales y clínicas más comunes. *Boletín Micológico*, 23(1809), 49–66. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2AmmJ2q>
- Poveda, E. (2013). Suero lácteo , generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista chilena de nutrición*, 40(397), 397–403.

<https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>

Pratt, C., & Cornely, K. (2012). Ciclo del ácido cítrico. En *Bioquímica* (pp. 359–383). El Manual Moderno. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2CsfPKr>

Prócel, D., Posligua, P., & Banchón, C. (2016). Biodegradación de contaminantes orgánicos de la industria láctea. *Enfoque UTE*, 7(1), 22–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v7n1.85>

Ramírez, J. (2013). Uso de la fermentación para el aprovechamiento del lactosuero. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 77, 52–61. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2UsqP14>

Recinos, L., & Saz, O. (2006). *Caracterización del suero lácteo y diagnóstico de alternativas de sus usos potenciales en El Salvador*. Universidad de El Salvador. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2EthhOQ>

Rivada, F. (2008). *Planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de remolacha*. Universidad de Cádiz. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2UBHD5w>

Rojas, A. M., Bastidas, M. J., & Montañó, L. P. (2015). Producción de ácido láctico a partir del lactosuero utilizando *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. *Revista Colombiana de Química*, 44(3), 5–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55604>

Roobini, U., & Gnanavel, G. (2018). Citric acid production by *Aspergillus niger*. [Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger*]. *Journal of Engineering (IOSRJEN)*, 8(9), 65–71. <https://doi.org/10.2307/2436248>

- Rosas, M., & Terán, D. (2015). *Obtención de ácido cítrico a partir de melaza o cachaza, mediante fermentación utilizando cepa de Aspergillus niger ATCC 16888*. Universidad Técnica del Norte. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2G8XtID>
- Samson, R., Houbraeken, J., Kuijpers, A., Frank, J., Jens, C., & Lyngby, D. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in Mycology*, *50*, 45–61. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2PZmiA1>
- Samson, R., Noonim, P., Meijer, M., Houbraeken, J., Frisvad, J. C., & Varga, J. (2007). Diagnostic tools to identify black aspergilli. [Herramientas de diagnóstico para identificar aspergillus negros]. *Studies in Mycology*, *59*, 129–145. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.13>
- Sanagustín, A. [Alberto Sanagustín]. (2014, diciembre 21). Ciclo de Krebs, paso a paso. [Archivo de video] Recuperado a partir de <https://bit.ly/2Jq7Te9>
- Sánchez, A. (2014). Aguas residuales: Realidad y Perspectivas. Recuperado 30 de noviembre de 2018, a partir de <https://bit.ly/2PpQMee>
- Sánchez, O., Ortiz, M., & Betancourt, A. (2004). Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus spp.* *Revista Colombiana de Biotecnología*, *1*(26), 43–54. <https://doi.org/10.1024/0301-1526.32.1.54>
- Sanjurjo, B. (2015). *Evaluación del crecimiento micelial de Ganoderma spp. en suero de leche*. Universidad Nacional de Trujillo. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2SKmiWk>
- Show, P. L., Oladele, K. O., Siew, Q. Y., Aziz, F. A., Lan, J. C., & Ling, T. C. (2015). Overview

- of citric acid production from *Aspergillus niger* [Descripción general de la producción de ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger*]. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 271–283. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>
- Silva, D., Batista, L., Rezende, E., Fungaro, M., Sartori, D., & Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* Section Nigri using polyphasic taxonomy. [Identificación de hongos del género *Aspergillus* Sección Nigri usando taxonomía polifásica]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 761–773. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2ETJkr5>
- Silva, L., Bermúdez, A., & Betancourt, R. (2013). *Uso del suero de leche en alimentos y sus sustitutos*. *Boletín Tecnológico*. Bogotá. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2EuGLex>
- Simes, M. F., Santos, C., & Lima, N. (2013). Structural diversity of *aspergillus* (section nigri) spores. *Microscopy and Microanalysis*, 19(5), 1151–1158. <https://doi.org/10.1017/S1431927613001712>
- Simões, M. F., Santos, C., & Lima, N. (2013). Structural Diversity of *Aspergillus* (Section Nigri) Spores. [Diversidad estructural de las esporas de *Aspergillus* (Sección Nigri)]. *Microscopy and Microanalysis*, 19(5), 1151–1158. <https://doi.org/10.1017/S1431927613001712>
- Sinha, M., Sørensen, A., Ahamed, A., & Kiær, B. (2015). Production of hydrocarbons by *Aspergillus carbonarius* ITEM 5010. [Producción de hidrocarburos por *Aspergillus carbonarius* ITEM 5010]. *Fungal Biology*, 119(4), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.01.001>
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. [Nuevas perspectivas para la producción y

aplicación del ácido cítrico]. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 141–149.

Recuperado a partir de <https://bit.ly/2EI5nkg>

Soria, M. A. (1997). *Producción de ácido cítrico y desarrollo morfológico en miembros del género Aspergillus*. Universidad de Buenos Aires. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2G5dxVc>

Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, Registro Oficial Edición Especial N° 387 AM 097-A § (2015). Quito, Ecuador. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2Sz17q1>

Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología*. (9na.). Buenos Aires: Médica Panamericana. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2CCPitM>

Uribe, L., María, M., Valencia, S., Uriel, J., Monzón, H., Eduardo, J., ... Suescún, P. (2008). Bebida fermentada de suero de queso fresco inoculada con *Lactobacillus casei*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 61(1), 4409–4421. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2LiUwgW>

Urtasun, N., Hirsch, D. B., Baieli, M. F., Miranda, M. V., & Cascone, O. (2018). Valorización del suero de queso: un desafío para la cromatografía a escala industrial. *Revista Farmacéutica*, 160(1), 47–61. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2SKNCnu>

Valencia, E., & Ramírez, M. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Redalyc*, 16(73), 27–31. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2A7CHx7>

Ward, J. (2018, agosto 27). *Aspergillus carbonarius*. Recuperado 22 de diciembre de 2018, a

partir de <https://bit.ly/2AjSk4z>

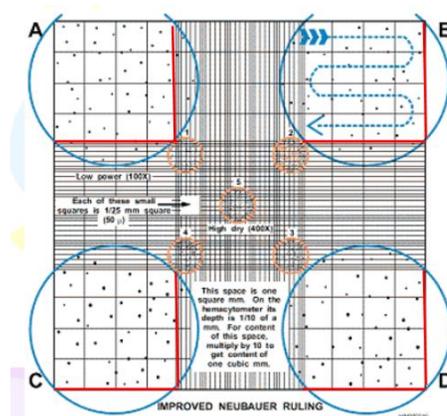
Zhang, K., Su, Y., & Cai, L. (2013). An Optimized Protocol of Single Spore Isolation for Fungi. [Protocolo optimizado de aislamiento de esporas únicas para hongos]. *Cryptogamie, Mycologie*, 34(4). <https://doi.org/10.7872/crym.v34.iss4.2013.349>

ANEXOS

ANEXO I. Conteo de conidios en cámara de Neubauer y preparación de los inóculos a concentraciones de 2×10^7 esporas/mL.

La metodología utilizada se adaptó de Gilchrist et al. (2005) y Naga (2014).

- 1) Se realiza el lavado de esporas con 10 mL de suero fisiológico y se filtra con gasa estéril.
- 2) Con una micropipeta absorber una gota de la suspensión de esporas, ubicarla en el centro de una de las cámaras de conteo. Colocar el cubreobjetos evitando la formación de burbujas o el derrame de la gota fuera del campo de conteo. Dejar reposar entre 1 a 2 minutos para que los conidios se sedimenten en la base del área de conteo.
- 3) En el caso de hongos que poseen esporas grandes se hace el conteo en las secciones A, B, C, D y E como se muestra en la figura. No se deben contar los conidios que tocan las líneas derecha e inferior de cada sección.



- 4) El conteo se realiza como mínimo 6 veces y se saca un promedio.
- 5) Una vez obtenido el número de conidios se aplica la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ esporas/mL} = \frac{N^{\circ} \text{ total de esporas} \times 10\ 000}{\text{Número de secciones} * \text{dilución}}$$

- 6) Para preparar la concentración específica de 2×10^7 esporas/mL se empleó la siguiente fórmula:

$$C1 V1 = C2 V2$$

Donde:

C1 = Concentración inicial (conocida en el conteo)

V1 = Volumen inicial (establecido arbitrariamente al preparar el inóculo)

C2 = Concentración final deseada (según el estudio a realizar)

V2 = Volumen final (desconocido)

ANEXO II. Estandarización de NaOH 0.01 N con ftalato de potasio.

La solución de NaOH 0,01N se estandariza con el patrón primario ftalato ácido de potasio siguiendo la metodología adaptada de N. Hernández, López y Reyes (2017) y Palencia y Ruiz (s. f.) :

1. Pesar una cantidad exactamente medida de ftalato de potasio comprendida entre 0.1 y 0.2 gramos previamente secado durante dos horas a 110 °C y disolverla en 75 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 2 gotas de fenolftaleína.

3. Colocar la solución preparada de hidróxido de sodio en una bureta de 25 mL y proceder a la titulación hasta la aparición del color rosado característico de la fenolftaleína durante 30 segundos o monitorear a través de potenciometría hasta alcanzar un pH de 8.3.

5. Realizar por triplicado este procedimiento registrando los tres volúmenes gastados de NaOH para continuar con los cálculos aplicando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{m}{PE * V}$$

Donde:

m: es el peso del ftalato de potasio en gramos

PE: es el peso equivalente del patrón primario

V: es el volumen de Hidróxido de sodio gastado en litros

N: es la normalidad de Hidróxido de sodio en equivalentes por litro.

Seguido este procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados en este trabajo de investigación:

N° repetición	Peso del Ftalato de potasio (g)	Volumen gastado de NaOH (mL)	Volumen gastado de NaOH (L)	Normalidad del NaOH (eq/L)
1	0.1089	46.50	0.04650	0.011
2	0.1008	45.50	0.04550	0.010
3	0.1050	43	0.0430	0.011
			Promedio	0.010

ANEXO III. Cálculo del título de Fehling.

El procedimiento para el cálculo del título de Fehling se basó en la metodología usada por Concha (2014).

1. Se prepara una solución de glucosa al 5 x 1000 y se coloca en una bureta
2. En un matraz Erlenmeyer se agregan 10 mL de Fehling A, 10 mL de Fehling B y 25 mL de agua destilada
3. El licor de Fehling preparado se somete a calor hasta ebullición constante.
4. A partir de la ebullición se deja caer gota a gota la solución de glucosa hasta que se evidencia el viraje del color azul a amarillo y finalmente a rojo ladrillo o pardo.
5. Se anota el volumen gastado de la solución de glucosa y se aplica en la siguiente fórmula:

$$\text{Título de Fehling} = \frac{\text{Gasto de azúcar reductor} \times 5}{1000}$$

ANEXO IV. Promedio de los resultados de la fermentación en biorreactor.

HORAS	MUESTRA	pH	NaOH gastado				Ácido cítrico (g/L)	Peso antes (g)	Peso después (g)	Biomasa (g/mL)	Suero gastado	Azúcares totales (g/L)
0	SD; pH 7; 31° C	7	1.4	mL	0.0014	L	0.00	0.2141	0.2263	0.004	1	50.00
24		6.4	2.7	mL	0.0027	L	0.54	0.2286	0.3025	0.022	1.2	41.67
48		6	4.65	mL	0.00465	L	1.17	0.2151	0.3335	0.036	2	25.00
72		5.3	5.25	mL	0.00525	L	1.36	0.2659	0.5855	0.096	2.2	22.73
96		4.8	6.1	mL	0.0061	L	1.63	0.2501	0.6032	0.106	3.5	14.29
120		4.5	6.6	mL	0.0066	L	1.79	0.2235	0.5641	0.102	4.6	10.87
144		4	8	mL	0.008	L	2.24	0.2333	0.7032	0.141	5.1	9.80
168		2.9	10	mL	0.01	L	2.88	0.1787	0.5624	0.115	6.3	7.94
192		2.5	11.2	mL	0.0112	L	3.27	0.225	0.6233	0.120	6.8	7.35
216		2.2	12.5	mL	0.0125	L	3.68	0.195	0.6022	0.122	7.5	6.67
240		1.9	13.8	mL	0.0138	L	4.10	0.3119	0.7113	0.120	8.5	5.88