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 LA VARIACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON *Aspergillus carbonarius*"

AUTORA:

MICHELLE ELIZABETH SERRANO MUÑOZ

TUTORA:

DRA. INÉS PATRICIA MALO CEVALLOS

CUENCA - ECUADOR

2019

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Michelle Elizabeth Serrano Muñoz con documento de identificación Nº 0104646336, 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 LA VARIACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON A*spergillus 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, noviembre del 2019

……...……..

Michelle Elizabeth Serrano Muñoz

C.I.: 0104646336

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **"EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON *Aspergillus carbonarius*"**, realizado por Michelle Elizabeth Serrano Muñoz, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre del 2019

.....

Dra. Inés Patricia Malo Cevallos

C.I: 0102291044

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Michelle Elizabeth Serrano Muñoz con documento de identificación No. 0104646336, autora del trabajo de titulación: **"EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO CON A*spergillus carbonarius*"**, certifico que el contenido total del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, noviembre del 2019

……..……..

Michelle Elizabeth Serrano Muñoz

C.I.: 0104646336

DEDICATORIA

A Dios porque gracias a él abro los ojos cada mañana con vida para cumplir con la misión que el designo para mí.

A mis padres porque han sido el pilar más importante de mi vida y me han convertido en quien ahora soy, a mis hermanos porque son el motivo más grande de mi felicidad, a mi abuelita Zoila por su gran apoyo durante todos estos años para formarme como persona y profesional siendo la mejor del mundo, a mis tíos Ricardo y Asdrúbal por apoyarme, darme fuerzas y creer en mí siempre, a mi enamorado Miguel por su amor y apoyo incondicional, a mi abuelito Carlos y mi hermano Matías que desde el cielo están muy orgullosos de mí.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora la Dra. Inés Malo por su gran estima y cariño, quien a través de su conocimiento, apoyo, paciencia y dedicación guio el presente trabajo de investigación, el mismo que sé, me servirá en un futuro profesional cercano.

A mis docentes y coordinadores quienes con su conocimiento y su labor me han ayudado a alcanzar los conocimientos necesarios para un futuro profesional exitoso.

A mis amigos que han sido un motor y un gran apoyo durante todo este proceso estudiantil y de vida personal.

A Samantha Rosales por compartir sus conocimientos, por ser un gran apoyo y por su colaboración.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

FES: fermentación en estado sólido

g: gramos

L: litros

mm: milímetro

mL: mililitro

rpm: revoluciones por minuto

t: temperatura Celsius

ºC: grados Celsius

µm: micrómetro, micrón o micra

ANOVA: diseño completamente al azar

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 Planteamiento del problema 2

1.2 Antecedentes 3

1.3 Justificación 5

1.4 Objetivos 6

1.4.1 Objetivo general 6

1.4.2 Objetivos específicos 6

1.5 Hipótesis 7

2. MARCO DE REFERENCIA 8

2.1 Cáscara de naranja 8

2.1.1 Generalidades 8

2.1.2 Composición nutricional y partes aprovechables 9

2.1.3 Características fisicoquímicas 12

2.1.4 Impacto Ambiental 13

2.1.5 Aplicación y aprovechamiento en la industria 14

2.2 Ácido cítrico 15

2.2.1 Definición y propiedades 15

2.3 Bioquímica del ácido cítrico 16

2.4 Métodos de obtención y rendimiento 16

2.4.1 Antecedentes de producción 16

2.4.2 Métodos de obtención 17

2.5 Proceso fermentativo y factores influyentes 18

2.6 Métodos de detección y cuantificación de ácido cítrico 19

2.7 Producción y consumo de ácido cítrico 19

2.8 Género Aspergillus 20

2.8.1 Aspergillus carbonarius 20

2.8.2 Clasificación taxonómica de Aspergillus carbonarius 21

3. MATERIALES Y MÉTODOS 22

3.1 Procedimiento 22

3.1.1 Desarrollo de medios utilizando cáscaras de naranja y sustancias específicas como sustrato para la producción de ácido cítrico 22

3.1.2 Determinación de la capacidad de producción de ácido cítrico mediante pruebas fisicoquímicas estableciendo la aptitud de los medios utilizados 29

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 35

4.1 Análisis de los resultados de la degradación del sustrato dentro de los medios utilizados aplicando métodos estadísticos para determinar la mejor producción de ácido cítrico 35

4.1.1 Efectos de la adición de diversos nutrientes durante la fermentación en estado sólido 35

4.1.2 Producción de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico en los diferentes tratamientos 37

4.1.3 Caracterización de la cáscara de naranja 39

4.1.4 Comparación de los tratamientos y su adición de nutrientes en el sustrato para determinar la mayor concentración de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico y efectividad en el proceso de FES 43

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 48

5.1 Conclusiones 48

5.2 Recomendaciones 49

LISTA DE REFERENCIAS 51

ANEXOS 55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Composición esquemática de la naranja 9
Figura 2. Formula estructural del ácido cítrico 15
Figura 3. Cepa de *Aspergillus Carbonarius* 20
Figura 4. Cáscara de naranja lavada, desinfectada y seca 23
Figura 5. Cáscara de naranja tamizada en un tamaño de partícula de 600µm 23
Figura 6. Detector halógeno de humedad HB43-S Mettler Toledo 25
Figura 7. Cepa de Aspergillus carbonarius en Agar Rosa de Bengala 26
Figura 8. Lavado de esporas y filtrado final 27
Figura 9. Solución de urea y sacarosa 28
Figura 10. Preparación de medios para FES 29
Figura 11. Matraces debidamente suplementados conforme al diseño establecido 31
Figura 12. Proceso de fermentación de tratamientos con matraces en estufa a 32 ºC 32
Figura 13. Almacenamiento de muestras en tubos cónicos para análisis cualitativo 33
Figura 14. Medida del pH mediante un potenciómetro al inicio y al final del proceso 33
Figura 15. Sal de citrato de sodio obtenido después de la titulación 34
Figura 16. Curvas potenciométricas 35
Figura 17. Espectro obtenido de ácido cítrico comercial en polvo. 39
Figura 18. Espectros obtenidos de los diferentes bloques analizados 41
Figura 19. Prueba de Shapiro-Wilks para distribución normal de valores analizados 44
Figura 20. Prueba de ANOVA para producción de ácidos orgánicos en g/mL 44
Figura 21. Prueba de Tukey para producción y rendimiento de FES 45
Figura 22. Diagramas de caja y bigotes 46
Figura 23. Secciones de conteo del hemacitómetro vistas desde el microscopio 56
Figura 24. Muestreo del sustrato cada 24 horas para titulación en el bloque A 57
Figura 25. Muestreo del sustrato cada 24 horas para titulación en el bloque B 58
Figura 26. Muestreo del sustrato cada 24 horas para titulación en el bloque C 59
Figura 27. Muestreo del sustrato cada 24 horas para titulación en el bloque D 60
Figura 28. Sustrato titulado cada 24 horas para el bloque A 61
Figura 29. Sustrato titulado cada 24 horas para el bloque B 62
Figura 30. Sustrato titulado cada 24 horas para el bloque C 63
Figura 31. Sustrato titulado cada 24 horas para el bloque D 64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición del flavedo de la naranja 11
Tabla 2. Composición del albedo de la naranja 12
Tabla 3. Características físico químicas de la cáscara de naranja 13
Tabla 4. Composición de la cáscara de naranja 13
Tabla 5. Sustratos utilizados en la producción de ácido cítrico 17
Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Aspergillus carbonarius* 21
Tabla 7. Parámetros del porcentaje de humedad en el sustrato 24
Tabla 8. Equipos para resiembra de *Aspergillus carbonarius* 24
Tabla 9. Equipos para lavado de esporas con *Aspergillus carbonarius* 28
Tabla 10. Suplementación de medios para FES en laboratorio 30
Tabla 11. Equipos para la resiembra de *Aspergillus carbonarius* en laboratorio 34
Tabla 12. Ácidos orgánicos de FES para bloques A, B, C y D en 1 g de sustrato 38
Tabla 13. Identificación de grupos funcionales según su longitud de onda 42
Tabla 14. Resultados de la estandarización de NaOH con HCL 66

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I. Conteo de conidios y preparación de inóculos de 0.5× 106 esporas/mL 55
ANEXO II. Muestreo de la fermentación hasta alcanzar las 150 horas de incubación. 57
ANEXO III. Estandarización de NaOH 0.1 N con HCL 65
ANEXO IV. Medida del gasto de NaOH y de pH al inicio y al final de la titulación.....67
ANEXO V. Valores más altos de producción de fermentación a las 150 horas 79

RESUMEN

En la actualidad existe una elevada cantidad de agro residuos producidos por las industrias de jugos y procesamientos cítricos, los cuales son bastante desaprovechados y que aportan un alto nivel de contaminación cada año. Debido a esto, la presente investigación tiene como objeto evaluar la variación de diferentes medios en la producción de ácido cítrico mediante fermentación en estado sólido con A*spergillus carbonarius.*

El desarrollo de esta investigación empieza por la adaptación del sustrato a diferentes factores como son el porcentaje de humedad, el tamaño de partícula y la concentración del inóculo, continuando con el proceso de fermentación en estado sólido para la producción de ácido cítrico. Se plantea un diseño de bloques completamente al azar mediante el cual se evalúa los efectos de la adición de nutrientes y el tiempo para la producción de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico validando para este efecto la hipótesis alternativa. Durante el proceso de fermentación en matraces Erlenmeyer se obtuvo un máximo de 126.2 mg/g de ácido orgánico en el tratamiento adicionado con urea como fuente de nitrógeno y sacarosa como fuente de azúcar, con un pH de 2.50 a las 150 horas de incubación.

Palabras clave: ácido cítrico, *Aspergillus carbonarius*, pH, sustrato, fermentación.

ABSTRACT

Currently there is a high amount of agricultural waste produced by the juice and citrus processing industries, which are quite wasted and provide a high level of pollution every year. Due to this, the present investigation evaluates the variation of different media in the production of citric acid by solid state fermentation with *Aspergillus carbonarius*.

The development of this investigation begins with the adaptation of the substrate to different factors such as the percentage of humidity, the particle size and the concentration of the inoculum, continuing with the solid state fermentation process for the production of citric acid. ANOVA design is proposed by which the effects of the addition of nutrients and the time for the production of total organic acids expressed as citric acid are evaluated, validating in that way the alternative hypothesis for this purpose. During the fermentation process in Erlenmeyer flasks, a maximum of 126.2 mg/g of organic acid was obtained in the treatment added with urea as a source of nitrogen and sucrose as a source of sugar, with a pH of 2.50 at 150 hours of incubation.

Keywords: citric acid, *Aspergillus carbonarius*, pH, substrate, fermentation.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha permitido desarrollar diversos tipos de procesos microbianos para la producción de numerosos metabolitos y productos farmacéuticos, así mismo es una excelente alternativa en la degradación de desechos industriales y residuos contaminantes, convirtiéndolos en materias primas para la obtención de importantes productos de consumo (Elizondo & Manzanares, 2009).

El ácido cítrico es un ácido orgánico tricarboxílico, presente en la mayoría de las frutas cítricas como el limón y la naranja, su fórmula química es $C_6H_80_7$ y su nombre IUPAC es ácido 2-hidroxi-1, 2, 3-propanotricarboxílico, en su forma industrial es un polvo cristalino, blanco, inodoro y con sabor ácido fuerte (Navarro, Chong, Marroquí & Suárez, 2016). Por esta razón es un producto altamente cotizado a nivel mundial debido a sus propiedades acidulantes y preservantes que aseguran el sabor original, la apariencia natural y la consistencia de productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos (Muñoz, Sáenz, lópez, Cantú & Barajas, 2014). Este ácido es producido fundamentalmente por fermentación sumergida, fermentación de superficie y fermentación en estado sólido utilizando diversos microorganismos capaces de degradar materias primas como almidón, sacarosa y residuos agroindustriales (Núñez, 2008).

Entre los microorganismos capaces de producir y acumular ácido cítrico se encuentran las especies de los géneros Aspergillus, Citromyces, Penicillium, Monilia, Candida y Pichia, sin embargo, las especies de Aspergillus negros como *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*, son las más empleadas en este tipo de producción (Velásquez, Beltrán, Padilla & Giraldo, 2010). Tomando en cuenta lo anterior se prefiere el empleo de la familia de los Aspergillus por su resistencia y adaptación a diversas condiciones como pH, agitación, temperatura, iones metálicos,

concentración de fosfato, fuente de nitrógeno, de carbono, alcoholes y aditivos que son factores importantes en la regulación de la morfología y el proceso fermentativo (López, Zuluaga, Herrera, Ruiz & Medina, 2006).

Aspergillus carbonarius se diferencia claramente del resto debido a características morfológicas como sus conidios de gran tamaño y ornamentación equinulada, se ha observado *Aspergillus carbonarius* en frutos principalmente en uvas y productos derivados apareciendo principalmente en climas cálidos y secos (González, 2010).

La fermentación en estado sólido consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema, la velocidad de crecimiento de los microorganismos es menor que en la fermentación sumergida y su aplicación se encuentra dirigida a microorganismos -fundamentalmente hongos- que pueden desarrollarse en ambientes de baja humedad (Dustet & Izquierdo, 2004).

En esta investigación se evaluará la variación de diferentes medios en la producción de ácido cítrico mediante la cepa *Aspergillus carbonarius* utilizando cáscaras de naranja como sustrato a partir de la fermentación en estado sólido debido a que actualmente no reciben un uso apropiado en el país.

1.1 Planteamiento del problema

Hoy en día, los cítricos se están desarrollando en casi todas las regiones del mundo, su procesamiento genera anualmente toneladas de residuos, principalmente cortezas a partir de la extracción de jugo dentro de plantas industriales, por lo que el manejo de estos desechos que producen contaminación al suelo representan un problema importante dentro del ambiente (Muñoz *et al*., 2014).

Actualmente existe una gran demanda mundial en cuanto a consumo de ácido cítrico, debido a su baja toxicidad en comparación con otros acidulantes utilizados en industrias farmacéuticas y alimentarias, así como también en el procesamiento de detergentes, productos de limpieza, cosméticos y artículos de tocador. Fuera de estas otras de las perspectivas más estudiadas en la actualidad son la mejora de las cepas productoras de ácido cítrico, que se han llevado a cabo mediante mutagénesis y selección (Alvarez, 2017).

La producción mundial ha alcanzado 1.4 millones de toneladas con un crecimiento anual de 3.5 a 4.0% en la demanda con relación al consumo de ácido cítrico, y debido a esto solo los grandes productores han sobrevivido y pueden mantener su creciente demanda, por lo mismo considerar todas las formas posibles de producirlo, o de aumentar su productividad, serían de potencial interés (Rosas & Terán, 2015).

La fermentación como método para obtener ácido cítrico sigue dominando, y es por esto que, los procesos de fermentación en estado sólido [FES] se están estudiando poco a poco ya que pueden crear nuevas posibilidades para la producción de ácido cítrico a partir de residuos agroindustriales; por esta razón se realiza el estudio, cuya finalidad es comprobar el empleo de métodos que generen reducción de costos de producción de ácido cítrico usando sustratos menos costosos que favorezcan a su aplicación posterior dentro de industrias que trabajan con este y tienen interés dentro del país, y que a su vez minimicen los impactos ambientales generados por los residuos agroindustriales (López *et al*., 2006).

1.2 Antecedentes

La producción mundial de ácido cítrico se realiza por medio de la fermentación de diversas materias primas con la cepa de *Aspergillus niger* P.E.L. Es por esto que la mayor parte de investigaciones están dirigidas a mejorar la producción de ácido cítrico con la cepa antes

mencionada, así como también poner a prueba factores para un mayor rendimiento. Sin embargo y pese a la carencia de estudios que utilicen a la cepa propuesta en esta investigación, existen estudios que trabajan con la cepa de *Aspergillus niger* P.E.L. y cáscara de naranja u otros cítricos como sustrato. Dentro de estos están los estudios realizados por Kareem, Akpan, y Alebiowu (2010); Torrado, Cortés, Salgado, Max, Rodríguez, Bibbins, Converti y Domínguez (2011); e Iralapati y Kummari (2015).

En España se utiliza la cepa de *Aspergillus niger* NRRL 599 para fermentar cáscara de naranja seca utilizando FES alcanzando a las 85 horas de incubación una cantidad de ácido cítrico de 193.2 mg/g de cáscara de naranja seca, probando variables como concentración de inóculo, adición de agua, porcentaje de humedad y adición de metanol como nutriente adicional, determinando que el metanol no mejora la producción de ácido cítrico y que este puede dar buenos resultados sin necesidad de nutrientes adicionales o de tipo alcohólicos (Torrado *et al*., 2011).

En Nigeria se utiliza la cepa de *Aspergillus niger* KS-7 para fermentar cáscara de piña seca utilizando FES alcanzando valores de ácido cítrico de 60.6 g/kg de cáscara de piña seca a los cinco días de incubación, se probó la adición de metanol, glucosa, sacarosa, nitrato de amonio y fosfato de amonio como nutrientes adicionales, determinando que el metanol no ayuda en la producción de ácido cítrico al interactuar con los demás nutrientes y que por el contrario la adición de azúcares y fuentes de nitrógeno tiene grandes ventajas en el rendimiento y producción de ácido cítrico (Kareem, *et al.,* 2010).

En India se realiza un estudio que utilizó *Aspergillus niger* aislado de cáscara de cebolla junto con cáscara de mango, banano y naranja utilizando FES sometiendo a las cáscaras a tratamientos en fresco sin adición de metanol y en seco con adición de metanol, determinando que la adición de metanol favorece el proceso de fermentación con cáscaras secas de banano pero no con mango

y naranja, mientras que en el proceso de fermentación con cáscaras frescas la adición de metanol beneficia a la producción de ácido cítrico con cáscara de naranja mas no de banano y mango, los mejores resultados se obtienen tanto en los tratamientos en fresco y en seco a los cinco días de incubación con una cantidad de ácido cítrico de 5.12 g/kg de cáscara de banano en el tratamiento en seco y 21.76 g/kg de cáscara de naranja en el tratamiento en fresco (Iralapati & Kummari, 2015).

A nivel nacional existe una carencia de estudios que utilicen la cepa de *Aspergillus carbonarius* para realizar procesos de FES, fuera de esto la información con respecto a la cepa antes mencionada al igual que el proceso de FES es bastante limitada y desactualizada. Sin embargo, existen dos estudios en Colombia y en India que muestran las ventajas de trabajar con *Aspergillus carbonarius* dentro de procesos de FES. En el primer caso la investigación de Moyano (2014) utiliza *Aspergillus carbonarius* para fermentar papa cruda empleando FES como alternativa tecnológica para alimentación animal, determinando una eficiencia de este hongo para procesos de FES; mientras que en el segundo caso la investigación de Grewal y Kalra (1995) estipula que fuera de *Aspergillus niger* P.E.L. se puede trabajar con *Aspergillus carbonarius* para procesos de FES.

1.3 Justificación

La presente investigación tiene como fin establecer la mejor forma de producir ácido cítrico a nivel de laboratorio tomando como sustrato cáscara de naranja, subproducto desechado por las fruterías y empresas productoras de jugos y derivados, mediante *Aspergillus carbonarius* que es una cepa poco estudiada pero cuyo potencial de síntesis se está comenzando a estudiar actualmente dentro de procesos de fermentación (Sánchez *et al*., 2004).

El conocimiento insuficiente del uso potencial de estos desechos, hace que estos sean eliminados, y no se toma en cuenta que puede llegar a generar importante aprovechamiento en varios estudios por su contenido en azúcares, fibra, y otros componentes, proporcionando así nuevos métodos de utilización de estos subproductos (Rosas & Terán, 2015).

Actualmente en Ecuador no existe producción de ácido cítrico a nivel industrial debido a la falta de tecnología y metodologías concretas de producción desarrolladas y adaptadas a las condiciones que se presentan en nuestra realidad como país, dependiendo para su uso de la importación del mismo desde China, Estados Unidos, Alemania, Colombia, Italia, Uruguay y Brasil representando esto un costo muy elevado, por lo que al realizar investigaciones de este tipo se favorece de manera significativa al país ya que se aprovechan residuos en la elaboración de productos de alto interés industrial (Álvarez, 2017).

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la variación de diferentes medios en la producción de ácido cítrico mediante fermentación en estado sólido con A*spergillus carbonarius.*

1.4.2 Objetivos específicos

- Desarrollar medios utilizando cáscaras de naranja y sustancias específicas como sustrato para la producción de ácido cítrico.
- Determinar la capacidad de producción de ácido cítrico mediante pruebas físico químicas estableciendo la aptitud de los medios utilizados.
- Analizar los resultados de la degradación del sustrato dentro de los medios utilizados aplicando métodos estadísticos para la determinación del mejor en la obtención de ácido cítrico.

1.5 Hipótesis

Si existe una variación en los medios de producción de ácido cítrico entonces se obtendrá un buen rendimiento del mismo.

CAPÍTULO 2

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1 Cáscara de naranja

2.1.1 Generalidades

La naranja es un hesperidio que consta de varios carpelos, cada uno de los cuales, contiene una pulpa, semillas y numerosas células cubiertas por un exocarpo o por una cáscara de color anaranjado cuyo interior es blanco con numerosas glándulas que contienen aceites esenciales (Gamez & León, 2014).

Weier (como se citó en López, 2014) manifiesta que el fruto que se obtiene de los cítricos se denomina hesperidio y es este el que contiene la materia carnosa entre el endocarpio y las semillas, por tanto dentro del género de la familia *Rutaceae* se encuentran: *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus*, siendo el género *Citrus* y sus especies *Citrus sinensis* O (naranja), *Citrus reticulata* B (mandarina), *Citrus aurantifolia* C (limón) y *Citrus paradisi* M (toronja) las que representan mayor importancia económica (Tenorio, 2016).

Pese a que las especies del género Citrus son de amplio uso tanto para el consumo directo como en la industria para producción de productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos la generación de residuos sólidos y líquidos afecta significativamente ya que no se da un manejo adecuado, ni se considera un valor agregado de los mismos (López, 2014). Estos residuos están compuestos principalmente de agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, minerales, aceites esenciales, flavonoides y vitaminas, presentes en diferentes cantidades que dependen de la fracción de la fruta a utilizar -jugo, cáscara, pulpa, mesocarpio-, su estado de

madurez y el sistema empleado para su procesamiento como materia prima o desecho (Gamez & León, 2014).

2.1.2 Composición nutricional y partes aprovechables

Dentro de las características nutricionales de la naranja podemos destacar su alto contenido en agua, azúcares solubles, fibra, ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas, minerales, aceites, lípidos, grupos fenólicos, carotenoides, flavonoides, sales minerales, pectina y vitaminas C, B1, B2, B3, B5, B6 y E (Gamez & León, 2014). Muchos de los nutrientes o compuestos bioactivos presentes en el cítrico tienen una proporción mayor en la cáscara que en las demás partes del fruto (López, 2014).

En la fruta de la naranja se distinguen las siguientes partes principales: el flavedo, el albedo, el endocarpio, las semillas, el eje central y septas (Espinosa, 2012). Su composición y distribución se muestra en la figura 1:

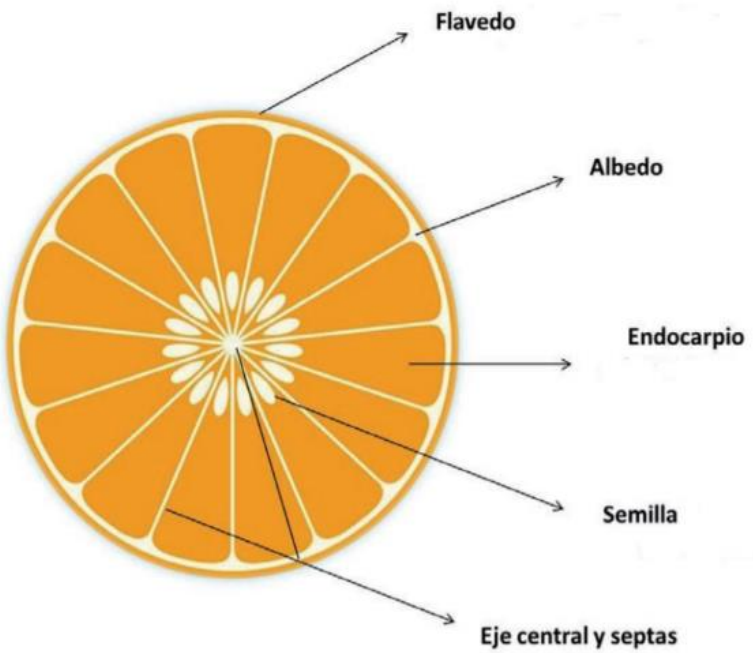


Figura 1: Composición esquemática de la naranja

Fuente: *López (2014, p.20)*

Los desechos del procesamiento de naranjas para la elaboración de jugos o derivados están formados por todos o parte de los componentes antes mencionados, es por esto que cada segmento de estos tiene una composición química distinta (Espinosa, 2012). A continuación, se detallan las partes de mayor interés según sus características fisicoquímicas o su composición química.

La capa externa de una fruta cítrica está formada por una cáscara o piel, la cual incluye dos capas principales, la interna y la externa, la capa externa incluye el flavedo cuya pigmentación depende del tipo de fruta y el albedo que forma parte de la capa interna y es incolora (Gamez & León, 2014).

El flavedo o exocarpo, constituye la envoltura externa del fruto y se caracteriza por formar una cáscara coloreada compuesta por vesículas oleosas cubiertas por una capa cérea protectora (Espinosa, 2012), esta capa de protección multilaminar llamada cutícula de estructura compleja se encuentra junto con otra capa sobre el epicarpio separada por una capa de pectina que da el color el cual depende de la presencia de pigmentos como clorofilas, carotenoides o xantofilas (Gamez & León, 2014).

Los componentes más importantes presentes en el flavedo de las naranjas son los pigmentos y aceites esenciales. Los pigmentos compuestos principalmente por carotenoides y flavonas otorgan el color amarillo o naranja de los cítricos, en tanto que los aceites esenciales son productos químicos intensamente aromáticos, no grasos, volátiles por naturaleza y livianos, compuestos por: terpenos, compuestos hidrogenados y fenólicos (López, 2014). La composición junto con la cantidad presente en la cáscara se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Composición del flavedo de la naranja

COMPUESTO	CÁSCARA (mg/kg)
Carotenoides: caroteno, xantofila y criptoxantina	30 a 300
Flavonas	0.08
Terpenos	90
Fenoles	10

Fuente: Tomado de López (2014, p. 6)

El albedo o mesocarpo es un tejido de carácter esponjoso y color blanco que se ubica por debajo del flavedo y que junto a este forma la corteza de la fruta (Espinosa, 2012), este contiene celulosa, hemicelulosa, lignina y pectinas por lo que su función es otorgar estructura al fruto, además azúcares como: glucosa, fructosa y sacarosa junto con flavonoides en baja cantidad (Roman *et al*., 2012).

El albedo de las frutas cítricas está compuesto principalmente por agua, que en estado fresco contiene de 75-80%, además cuenta con sustancias pécticas las cuales le dan una alta capacidad gelificante; dentro de los ácidos orgánicos aprovechables, en el albedo el que predomina mayoritariamente es el ácido cítrico en un 90% seguido por el ácido málico y el ácido oxálico (Espinosa, 2012). Cuando la cáscara esta seca alcanza una composición de 44% en azúcares, 33% en celulosa y 20% en sustancias pécticas, además, contiene glucósidos y ácido ascórbico en cantidad apreciable (López, 2014). La composición junto con la cantidad presente en la cáscara se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Composición del albedo de la naranja

COMPUESTO	CÁSCARA (mg/kg)
Agua	75
Azúcares	9
Celulosa y lignina	6.5
Sustancias pécticas	4
Glucósidos	3.5
Ácidos orgánicos	1.5

Fuente: Tomado de Espinosa (2012, p. 7)

El endocarpio también conocido como pulpa pueden ser de color amarillo o naranja, este consiste en sacos cerrados, membranosos y compactos de zumo en un intervalo de 10 a 14 compartimientos que pueden separarse fácilmente en segmentos individuales (López, 2014).

Las septas o vesículas son cada una de las divisiones que separan por piezas el endocarpio, las cuales están unidas a un sistema de haces basculares, en estos segmentos se encuentran compuestos como: azúcares, ácidos, minerales, y vitaminas como la vitamina C (Espinosa, 2012).

La semilla también llamada pepita, es cada uno de los cuerpos que forman parte del fruto que da origen a una nueva planta, en la naranja, la semilla tiene una forma irregular con un tamaño de medio centímetro hasta los dos cm de largo y de color blanco (Gonzáles, 2013). El eje central de los cítricos está compuesto del mismo tipo de tejido que el albedo y en algunos cítricos, como las mandarinas y sus híbridos, tiene un espacio central (Gamez & León, 2014).

2.1.3 Características fisicoquímicas

Las características físicas y químicas de un fruto cítrico están determinadas por las variedades existentes y factores externos como: suelo, temperatura y uso de fertilizantes, sin embargo, también influyen aspectos como: la variabilidad química de los compuestos bioactivos y los factores genéticos o climáticos, tal como se menciona en la tablas 3 y 4 (López, 2014).

Tabla 3: Características físico químicas de la cáscara de naranja

COMPUESTO	VALOR
% Carbohidratos	89
% Humedad	85.9
Pectina	17
Sólidos totales	7.1
% Proteína	6.16
pH	3.93
Azúcares neutrales	3.8
Lignina	3.2
% Grasa	1.55
Acidez	0.29

Fuente: Tomado de Cerón y Cardona (2011, p. 67)

Tabla 4: Composición de la cáscara de naranja

COMPUESTO	CÁSCARA g/kg
Potasio	212
Ácido ascórbico	136.5
Humedad	72.52
Carotenoides	9.9
Magnesio	22.2
Azufre	21
Fosforo	20.8
Azúcares	7.55
Sodio	3
Proteínas	1.53
Hierro	0.8
Ácido cítrico	0.29

Fuente: Adaptado de Durán (2009) citado en López (2014, p. 25)

2.1.4 Impacto Ambiental

La cáscara de la naranja al igual que la de otros cítricos constituye la principal fracción de residuos, representando alrededor del 50% del total del peso de la fruta. La composición química de los residuos de cítricos dependen de muchos factores como: la especie de cítrico, la fracción de la fruta, el estado de madurez, la procedencia geográfica y el sistema empleado para la extracción del jugo (López, 2014).

Actualmente, el jugo de naranja es una de las bebidas que más se consumen, es por esto que más de la mitad de la producción mundial de frutas cítricas corresponde a la producción de naranjas cultivadas en regiones tropicales y subtropicales. El volumen total de la fruta no está compuesto enteramente por zumo. Del 50 al 60% del peso total constituye desechos conformados por la cáscara, semillas y residuos de las membranas (Espinosa, 2012).

Estos desechos son ricos en nutrientes, sin embargo, no se les otorga ninguna importancia comercial y se destinan principalmente a funciones como: alimentación de ganado y desechos sólidos totales o quemados por su alto poder calorífico generando gran cantidad de problemas ambientales (Muñoz *et al*., 2014).

2.1.5 Aplicación y aprovechamiento en la industria

La producción de compuestos con alto valor a partir de residuos de cítricos a nivel nacional no es tan amplia, sin embargo, en varios países se están tomando medidas para el aprovechamiento de residuos agroindustriales, es así que en el estado de la Florida (EUA) ha surgido el Laboratorio de Investigación en Cítricos y Productos Subtropicales precisamente con el interés de recuperar, a partir de residuos de cítricos, productos importantes para uso en la salud humana y en alimentos (Gonzáles, 2013).

Dentro de las principales utilidades de residuos de cáscara de naranja están el compostaje, la lombricultura y la obtención de productos químicos, estos residuos en un alto porcentaje se usan para manufacturar productos como: aceites, ceras, resinas, productos pécticos, celulosa, alimento para ganado, fertilizantes, ácido acético, cítrico y láctico (López, 2014).

La industria farmacéutica aprovecha los residuos cítricos fundamentalmente para la extracción de aceites esenciales o terpenos del flavedo, pectina del albedo y obtención de flavonoides como hesperidina y naringenina (Espinosa, 2012).

Los residuos del procesamiento de naranja para la fabricación de jugos pueden ser materia prima para la extracción de distintos compuestos debido a su composición, es por eso que estos compuestos tienen una potencial aplicación industrial, por otro lado, las cortezas son ricas en azúcares fermentables como glucosa, fructosa y sucrosa lo cual es una gran alternativa en cuanto a procesos de FES u otros tipos de fermentación (Gonzáles, 2013).

2.2 Ácido cítrico

2.2.1 Definición y propiedades

El ácido cítrico es un ácido orgánico tricarboxílico, figura 2, cuya fórmula química es $C_6H_8O_7$, su nombre IUPAC es ácido 2-hidroxi-1, 2, 3-propanotricarboxílico y tiene un peso molecular de 192.12 g/mol (González, 2015). En su forma industrial es un polvo cristalino, blanco, inodoro y con sabor ácido fuerte (Navarro *et al*., 2016).

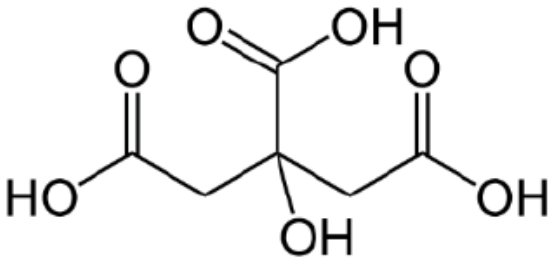


Figura 2: Formula estructural del ácido cítrico

Fuente: *Muñoz et al (2014, p.19).*

2.3 Bioquímica del ácido cítrico

El ácido cítrico es un intermediario en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) o ciclo de Krebs, es decir, el centro del metabolismo glucídico. Las funciones de este ciclo son generar energía en forma de ATP en conjunción con la fosoforilación oxidativa durante el metabolismo aeróbico de carbohidratos y crear precursores de otros ciclos biosintéticos como aminoácidos (Gonzáles, 2013).

En condiciones ambientales que promueven el desarrollo celular el ciclo funciona en estado estacionario, los intermediarios que lo constituyen se mantienen a niveles bajos sin acumulación de alguno en particular. El mantenimiento de dicho estado estacionario se efectúa mediante una regulación precisa de enzimas presentes en rutas metabólicas que alimentan el ciclo o que parten de él (Navarro *et al*., 2016).

2.4 Métodos de obtención y rendimiento

2.4.1 Antecedentes de producción

El ácido cítrico fue aislado por primera vez por Scheels Karls en 1874, en Inglaterra, a partir del jugo de limón importado de Italia. Esto llevó numerosos esfuerzos de todo el mundo para encontrar alternativas para su producción, que incluye técnicas químicas y microbianas (Muñoz *et al*., 2014).

En 1893, Wehmer observó la presencia de ácido cítrico como un subproducto de oxalato de calcio producido por *Penicillium glaucum* L. Otras investigaciones mostraron el aislamiento de dos variedades de hongos pertenecientes al género Citromyces (García, 2016).

Los hermanos alemanes Charles Pfizer y Charles Erhart, comenzaron a fabricar ácido cítrico el mismo que era utilizado por varias industrias de ese tiempo y desde 1920 en adelante fueron

desarrollados con éxito procesos de fermentación en los que se utilizaban cepas del genero *Aspergillus* (Rosas & Terán, 2015).

James Currie en 1926 descubrió que varias cepas de *Aspergillus niger* P.E.L. producían concentraciones significativas de ácido cítrico, las mismas que reducían el riesgo de contaminación, a partir de este descubrimiento la extracción tradicional desde frutos cítricos se reemplazó por procesos de fermentación, siendo sin más la opción más sustentable y la más utilizada en la actualidad (Alvarez, 2017).

2.4.2 Métodos de obtención

Existen dos métodos que son utilizados para la bioprodución de ácido cítrico y son la fermentación superficial que puede ser sólida o líquida y la fermentación sumergida, es por esto que la síntesis biológica de este ácido se puede realizar con diversos sustratos como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: Sustratos utilizados en la producción de ácido cítrico

TIPO DE FERMENTACIÓN	MATERIA PRIMA
Cultivo superficial en fase líquida	Desechos de cervecería, algarrobo, desperdicios de algodón, tubérculos y melaza
Cultivo superficial en fase sólida	Residuos agroindustriales de diversos tubérculos y frutas
Cultivo sumergido	Hidrolizados, melazas, y desechos de frutas

Fuente: Adaptado de Rosales (2019) citado en Show (2015, p. 276)

La fermentación superficial en estado o fase sólida consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre del sistema, empleando una fuente de nitrógeno y sales nutrientes, bajo ciertas condiciones de humedad, pH, aireación y temperatura además utiliza residuos agroindustriales como materia prima que funcionan como carbohidratos asimilables para la obtención de ácido cítrico (Rosales, 2019). La velocidad de

crecimiento de los microorganismos es menor que en la fermentación sumergida y su aplicación se encuentra dirigida a microorganismos -fundamentalmente hongos- que pueden desarrollarse en ambientes de baja humedad (Dustet & Izquierdo, 2004).

2.5 Proceso fermentativo y factores influyentes

Todo proceso fermentativo, independientemente de su tipo aerobio o anaerobio tiene tres etapas: preparación e inoculación, fermentación y recuperación de bioproducto (Rosales, 2019).

En el caso del ácido cítrico la elección del sustrato adecuado es muy importante en procesos de fermentación, ya que de su composición depende el rendimiento en la producción del ácido. De tal manera, el sustrato debe poseer preferentemente la característica de ser insoluble en agua, tener elevado contenido en carbohidratos y proteínas y estructura granular que posibilite la adhesión y penetración del microorganismo (Moyano, 2014).

Un factor decisivo en cuanto a la fermentación en estado sólido es el contenido de humedad del sustrato ya que un alto contenido en humedad provoca descensos de la porosidad y difusión del oxígeno, aumentando el riesgo de contaminación bacteriana y formación de micelio aéreo; complementariamente una actividad reducida de agua puede producir esporulación del microorganismo (Navarro *et al*., 2016). Generalmente el contenido inicial de humedad del sustrato oscila entre el 30 y el 75%, sin embargo, durante el proceso se ocasionan reducciones de este nivel debidas a pérdidas por evaporación o actividad metabólica de los microorganismos. Por esto es necesaria la adición de agua estéril al sistema a diferentes intervalos (Muñoz *et al*., 2014).

Dos factores de vital importancia son la aireación y agitación ya que estos permiten la transferencia de masa tanto a nivel interparticular como intraparticular, permitiendo con esto la difusión de gases y la transferencia de oxígeno al sistema, es por esto, que para lograr tales condiciones el sustrato debe representar al menos un 30% del volumen total de la masa de

fermentación, siendo indispensable efectuar agitaciones constantes con el fin de permitir la eliminación del CO_2 formado y la renovación del aire en los espacios intersticiales (Moyano, 2014).

En el caso del microrganismo a elección, dentro de la fermentación en estado sólido los hongos son los microorganismos más utilizados, esto debido a que de forma natural crecen sobre materiales sólidos, por lo cual para preparar el inóculo a utilizarse en el proceso de fermentación se parte de la esporulación del hongo y su lavado para obtener una suspensión de esporas que será añadida al sustrato; finalmente, el ácido cítrico puede ser recuperado mediante precipitación o extracción (Alvarez, 2017).

2.6 Métodos de detección y cuantificación de ácido cítrico

La detección de ácido cítrico se puede realizar empleando un indicador ácido – base como verde de bromocresol o fenolftaleína, mientras que para cuantificación se puede realizar espectrofotometría, cromatografía de gases o líquida y titulación (Rosales, 2019).

2.7 Producción y consumo de ácido cítrico

Actualmente existe una gran demanda mundial en cuanto a consumo de ácido cítrico debido a su baja toxicidad en comparación con otros acidulantes utilizados en industrias farmacéuticas y alimentarias, así como también en el procesamiento de detergentes, productos de limpieza, cosméticos y artículos de tocador (Alvarez, 2017).

La producción mundial ha alcanzado 1.4 millones de toneladas y existe un crecimiento anual de 3.5 a 4.0% en la demanda con relación al consumo de ácido cítrico. En el Ecuador el principal proveedor es China, pero también se registran importaciones de Colombia, Uruguay y Estados Unidos (Rosas & Terán, 2015).

2.8 Género Aspergillus

Gonzales (como se citó en (Rosales, 2019) afirma que Aspergillus es un hongo mitospórico que se caracteriza por presentar hifas especiales llamadas conidióforos donde se sitúan las estructuras productoras de esporas asexuales o conidios; su clasificación se basa en características morfológicas macro y microscópicas.

2.8.1 Aspergillus carbonarius

El hongo *Aspergillus carbonarius* que se muestra en la figura 3, fue descrito por primera vez por Georger Barnier según lo afirma Ward (como se citó en Rosales, 2019). Siendo este uno de los miembros más distintivos de las especies de la sección *Nigri* el cual se ha aislado de uvas, pasas, vino y también de granos de café.

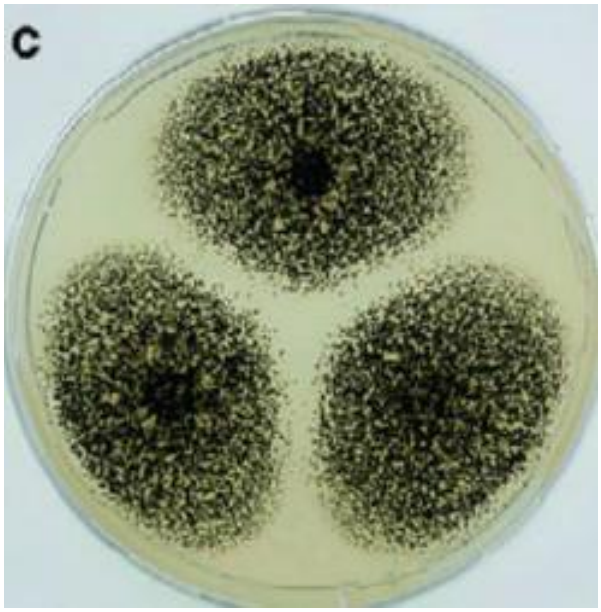


Figura 3: Cepa de Aspergillus Carbonarius

Fuente: *Simões et al, (2013, p.5)*

2.8.2 Clasificación taxonómica de Aspergillus carbonarius

Acorde al sistema del Catálogo de la Vida (como se citó en Rosales, 2019), el hongo *Aspergillus carbonarius* presenta una taxonomía descrita en la tabla 6:

Tabla 6: Clasificación taxonómica de Aspergillus carbonarius

NOMBRE VÁLIDO	***Aspergillus carbonarius***
Reino	Fungi
Filo	*Ascomycota*
Clase	*Eurotiomycetes*
Orden	*Eurotiales*
Familia	*Trichocomaceae*
Género	*Aspergillus*
Subgénero	*Circumdati*
Sección	*Nigri*
Especie	*Aspergillus carbonarius*

Fuente: Adaptado de Rosales (2019) citado en Catálogo de la vida (2017)

CAPÍTULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de titulación de tipo investigativo-experimental busca dar a conocer el efecto en la variación de diferentes medios para la producción de ácido cítrico mediante fermentación en estado sólido con *Aspergillus carbonarius* mediante un diseño experimental puro, en donde se someterá a la cepa de estudio a la adición de diferentes sustancias, creando así una relación entre las variables dependiente e independiente para lograr alcanzar de esta manera una máxima optimización en el proceso de fermentación.

La investigación se divide en tres etapas de desarrollo que comprenden: el desarrollo de medios con cáscaras de naranja y sustancias específicas, la determinación de la capacidad de producción mediante pruebas físico químicas y el análisis de los resultados de la degradación del sustrato dentro de los medios utilizados durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Todo el proceso de desarrollo investigativo aplicable se realizó en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, sede Cuenca.

3.1 Procedimiento

3.1.1 Desarrollo de medios utilizando cáscaras de naranja y sustancias específicas como sustrato para la producción de ácido cítrico

3.1.1.1 Toma de la muestra vegetal

Se tomó la muestra a partir de cáscara de naranja, la cual pasó por un proceso de lavado, desinfección y secado, figura 4, junto con un proceso de tamizaje que fraccione el sustrato a un

tamaño de partícula de 600 μm, según lo recomendado en el estudio de Torrado et al. (2011) y como se muestra en la figura 5, para uso posterior en el proceso de fermentación en estado sólido.

Figura 4: Cáscara de naranja lavada, desinfectada y seca
Fuente: Autor

Figura 5: Cáscara de naranja tamizada en un tamaño de partícula de 600µm
Fuente: Autor

3.1.1.2 Determinación del porcentaje de humedad óptimo para el proceso de FES y esterilización

Para el proceso de fermentación en estado sólido fue indispensable que el sustrato mantenga un adecuado porcentaje de humedad para evitar la degradación, tanto en la esterilización como en el proceso de FES. Es por esto que se realizaron diferentes pruebas en la adición de agua al sustrato, para determinar las mejores condiciones de humedad a fin de prevenir un excedente y a su vez un déficit de la misma. Se comienza colocando 5 g de sustrato en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se adicionó de 1 a 10 mL de agua. Seguidamente se amplió la cantidad a 25 g y 30 g de sustrato en el matraz de 250 mL y se adicionó un nivel de 10 a 100 mL de agua. Las cantidades probadas y seleccionadas se muestran en la tabla 7:

Tabla 7: Parámetros para la determinación del porcentaje de humedad en el sustrato

CANTIDAD DE SUSTRATO EN GRAMOS	CANTIDAD DE AGUA TOTAL ADICIONADA EN mL	% DE HUMEDAD INICIAL	% DE HUMEDAD AL ESTERILIZAR	% DE HUMEDAD FINAL
5 g	7.5 mL	9.65%	23.66%	72.17%
25 g	25 mL	10.57%	46.85%	63.27%
30 g	48 mL	23.66%	53.44%	72.86%

Fuente: Autor

Finalmente, para esta investigación se tomaron las siguientes referencias: una cantidad de sustrato de 30 g hidratada con 48 mL de agua, dejando libres 2 mL que fueron completados con los enriquecimientos que tuvo cada sustrato en sus respectivos bloques con un total de fase líquida adicionada de 50 mL; en donde el porcentaje de humedad inicial del sustrato fue de 23.66%, seguido a esto, antes de la esterilización se adicionó 29.26 mL de agua destilada y se procedió a realizar un proceso de autoclavado dejando una humedad de 53. 44% luego de este proceso, para finalizar y previo al proceso de adición de enriquecimientos y fermentación se adicionó el agua restante hasta completar los 48 mL alcanzando un porcentaje de humedad de 72.86% tal como lo recomienda el estudio de Torrado *et al*. (2011).

Para determinar el porcentaje de humedad del sustrato se utilizó un detector halógeno de humedad HB43-S marca Mettler Toledo como se muestra en la figura 6 y se tomó la humedad del sustrato al inicio, al adicionar el agua previo a la esterilización y al momento previo al proceso de fermentación.

Figura 6: Detector halógeno de humedad HB43-S
Mettler Toledo
Fuente: Autor

3.1.1.3 Resiembra del hongo Aspergillus carbonarius desde una cepa madre preexistente

El hongo *Aspergillus carbonarius* se obtuvo desde una cepa madre pre-existente utilizada en el estudio de (Rosales, 2019) para fermentación sumergida de lacto suero; es por esto que siguiendo la metodología del trabajo de investigación antes citado, se resembró la cepa utilizando los equipos, materiales y reactivos mencionados en la tabla 8, en un medio Agar Rosa de Bengala dejándola en incubación a 32 °C hasta alcanzar un alto y poblado desarrollo de colonias negras como se muestra en la figura 7, y resembrándola cada 15 días para mantener su estado y alcanzar condiciones favorables para el proceso de fermentación en estado sólido.

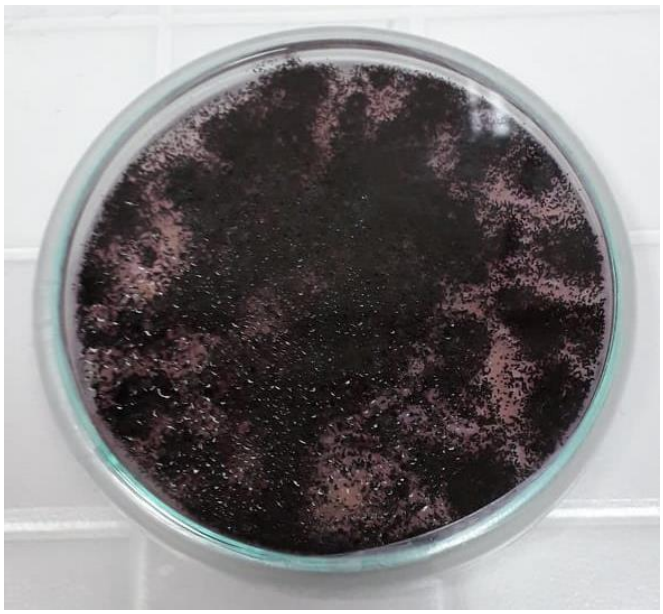


Figura 7: Cepa de Aspergillus carbonarius en Agar Rosa de Bengala
Fuente: Autor

Tabla 8: Equipos, materiales y reactivos utilizados para la resiembra de A. carbonarius en laboratorio

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Cabina de flujo laminar	Luna de reloj	Agar Rosa de Bengala
Autoclave	Espátula	Agua destilada
	Probeta	Alcohol 96%
	Matraz Erlenmeyer	
	Varilla	
	Cajas Petri	
	Mecheros	
	Asa de inoculación	
	Parafilm	

Fuente: Autor

3.1.1.4 Preparación del inóculo fúngico

Para realizar el lavado de esporas previo a la preparación del inóculo fúngico a ser utilizado en la FES se traspasó la cepa de *Aspergillus carbonarius* de la caja Petri a un matraz Erlenmeyer de 250 mL para facilitar el lavado.

El inóculo fue obtenido mediante un lavado de esporas realizado a partir de la cepa de *Aspergillus carbonarius* cultivada en matraces Erlenmeyer de 250 mL con agar Rosa de Bengala por siete días, la suspensión del mismo se preparó lavando el cultivo cinco veces con 10 mL de suero fisiológico agitando el matraz vigorosamente para remover el mayor número de esporas posibles como se muestra en la figura 8. Seguido a esto se filtró la suspensión a través de una gasa estéril para retener hifas o partes del cultivo desprendidas durante el proceso de agitación, tal como lo realizado en la tesis de Rosales (2019), utilizando los equipos, materiales y reactivos mencionados en la tabla 9.

Una vez obtenido el filtrado se procedió a realizar un conteo de esporas en la cámara de Neubauer [ver Anexo I] para conseguir un inóculo de 10 mL con una concentración de 0.5×10^{6} esporas/mL así como lo recomendado en el estudio de Torrado *et al*. (2011).

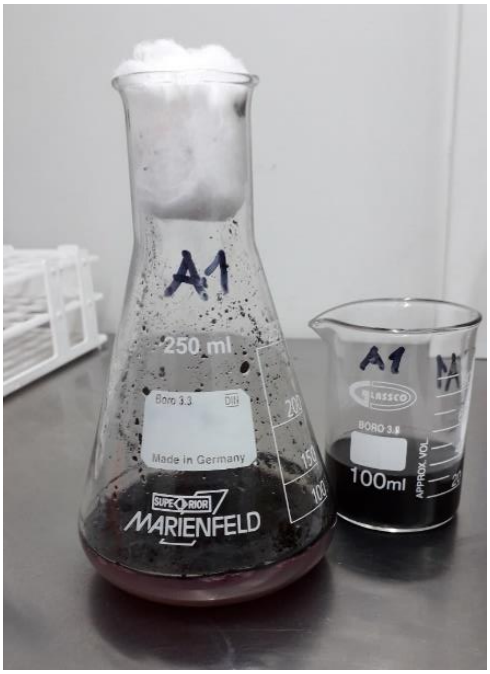


Figura 8: Lavado de esporas y filtrado final
Fuente: Autor

Tabla 9: Equipos, materiales y reactivos utilizados para lavado de esporas con A. carbonarius en laboratorio

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Cabina de flujo laminar	Matraz Erlenmeyer	Agar Rosa de Bengala
Autoclave	Varilla	Agua destilada
	Cajas Petri	Alcohol 96%
	Mecheros	
	Asa de inoculación	
	Parafilm	
	Algodón	
	Papel de aluminio	
	Encendedor	

Fuente: Autor

3.1.1.5 Preparación de diferentes medios suplementados para FES

Previo al proceso de fermentación y luego de obtener el inóculo fúngico se procede a preparar las soluciones con las que se suplementa cada medio, siendo estas: una solución de urea como fuente de nitrógeno y una solución de sacarosa como fuente de azúcares, tal como lo muestra la figura 9.

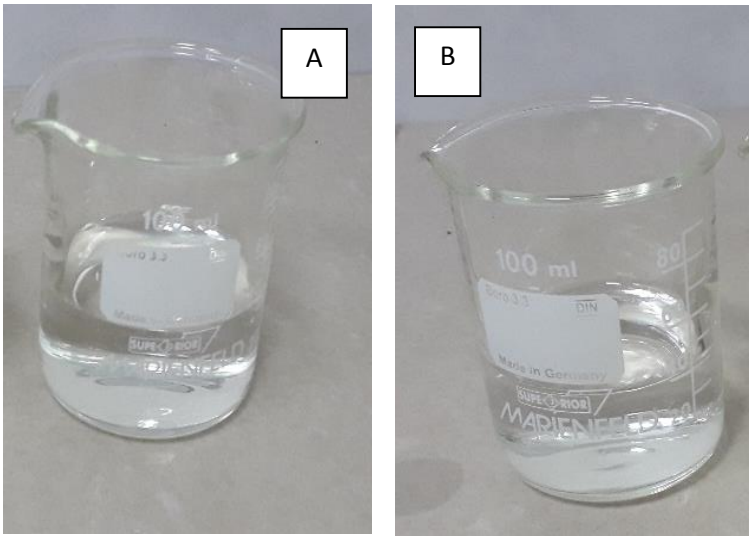


Figura 9: a) Solución de urea. b) Solución de sacarosa
Fuente: Autor

3.1.2 Determinación de la capacidad de producción de ácido cítrico mediante pruebas fisicoquímicas estableciendo la aptitud de los medios utilizados

3.1.2.1 Proceso de FES en matraces Erlenmeyer

Una vez esterilizado el sustrato, preparados los medios de suplementación, la adición de nutrientes y el inóculo fúngico, se prepararon los matraces para la fermentación como se muestra en la figura 10, teniendo especial cuidado de que todo el proceso se realice de manera aséptica. Es por esto que se desarrolló todo el proceso de preparación de medios en una cabina de flujo laminar previamente desinfectada con amonio cuaternario y luz UV.

Figura 10: Preparación de medios para FES
Fuente: Autor

Se prepararon los medios en matraces Erlenmeyer de 250 mL en cuatro bloques: A, B, C, y D como se muestra en la figura 11, los mismos que se desarrollaron por triplicado y se suplementaron como se muestra en la tabla 10:

Tabla 10: Suplementación de medios para FES en laboratorio

BLOQUE	SUPLEMENTACIÓN	CANTIDAD
A	Cáscara de naranja	30 g
	Inóculo	2 mL
	Agua estéril	3 mL
B	Cáscara de naranja	30 g
	Inóculo	2 mL
	Urea	1 mL
	Agua estéril	2 mL
C	Cáscara de naranja	30 g
	Inóculo	2 mL
	Sacarosa	2 mL
	Agua estéril	1 mL
D	Cáscara de naranja	30 g
	Inóculo	2 mL
	Urea	1 mL
	Sacarosa	2 mL
	Agua estéril	_

Fuente: Autor

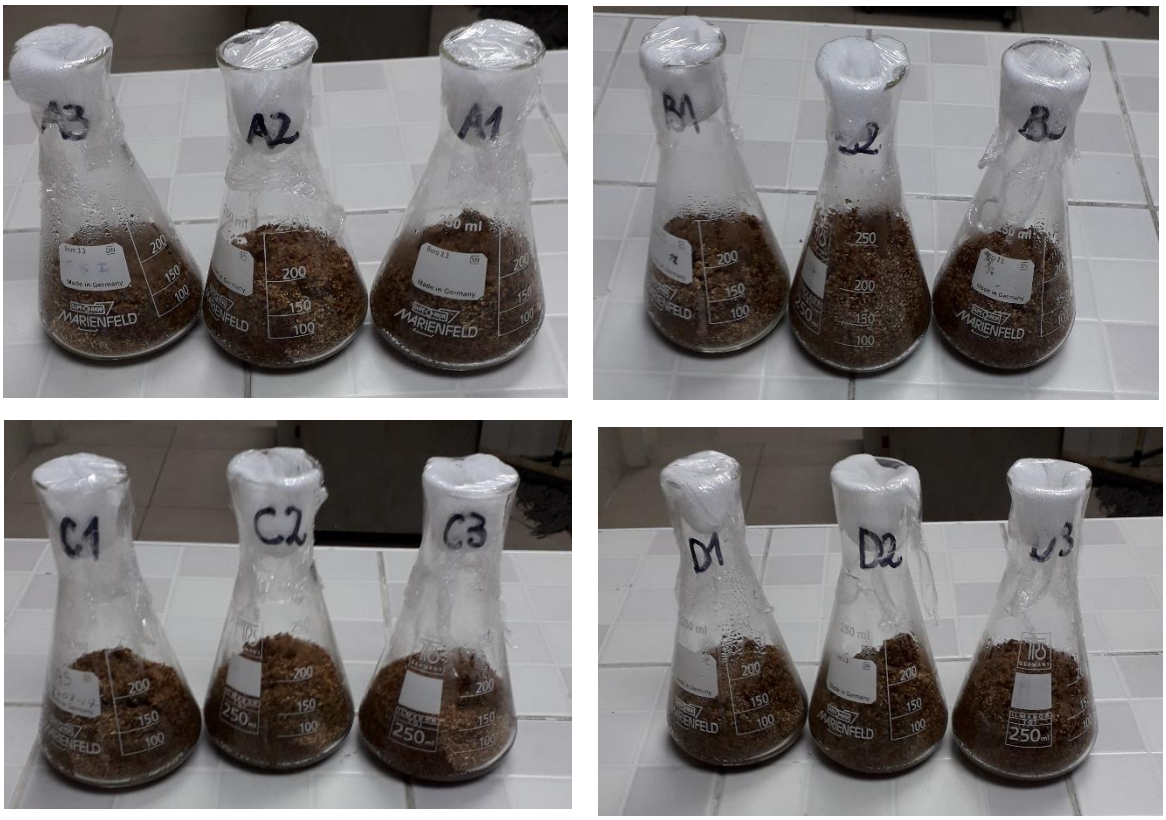


Figura 11: Matraces debidamente suplementados conforme al diseño establecido.
Fuente: Autor

3.1.2.2 Incubación

Luego de la suplementación y preparación de los medios se realizó el proceso de incubación, el cual se llevó a cabo en una estufa SNB400 marca Memmert a 32 °C durante 150 horas tal como se muestra en la figura 12, con periodos de aireación y agitación de 24 horas cada uno, hasta completar el tiempo de incubación, todo el proceso se realizó en una cabina de de flujo laminar previamente desinfectada con amonio cuaternario y luz UV.

Figura 12: Proceso de fermentación de los diferentes tratamientos con matraces en la estufa a 32 ºC.
Fuente: Autor

3.1.2.3 Muestreo y titulación

Para el muestreo se tomó 1 g de sustrato de cada matraz y se lo disolvió en 29 mL de agua destilada cada 24 horas hasta completar un proceso de incubación de 150 horas [ver Anexo II], seguidamente se procedió a tomar el total de 1 μL de la solución de sustrato con agua destilada entre cada repetición de los bloques A, B, C, y D realizados por triplicado, en un tubo cónico cada 24 horas y se almacenaron en refrigeración para análisis cualitativo en equipo FTIR is10 marca Thermo Scientific como se muestra en la figura 13.

Figura 13: Almacenamiento de muestras diluidas en tubos cónicos para análisis cualitativo.
Fuente: Autor

Una vez realizado este proceso se tituló el sustrato diluido en agua, con una solución estandarizada de NaOH [ver Anexo III] en donde se determinó el gasto de NaOH para la titulación y las medidas del pH con un potenciómetro marca Mettler Toledo como se muestra en la figura 14, al inicio y al final de la titulación [ver Anexo IV], todo el procedimiento se realizó por triplicado.

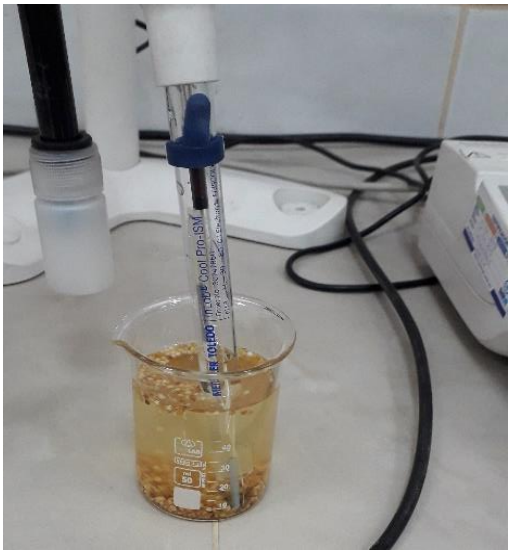


Figura 14: Medida del pH mediante un potenciómetro marca Mettler Toledo al inicio y al final del proceso.
Fuente: Autor

3.1.2.4 Método de análisis

Se realizó un seguimiento durante 150 horas tomando muestras de sustrato cada 24 horas, monitoreando la producción de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico. Para cuantificar se empleó la técnica de titulación potenciométrica con una solución estandarizada de NaOH, con lo cual se determinó la concentración final de ácido mediante cálculos estequiométricos basados en la reacción presente en la figura 15.

$$3\,NaOH + \ C_6H_8O_7 \ \rightarrow \ Na_3C_6H_5O_7 + 3\,H_2O$$

Figura 15: Sal de citrato de sodio obtenido después de la titulación.
Fuente: *Rosales (2019, p.50)*

Se preparó la muestra para titulación con 1 g de sustrato en un vaso de precipitación de 100 mL sobre un agitador magnético y se adicionó 29 mL de agua destilada junto con dos gotas de fenolftaleína como indicador para proceder con la titulación, utilizando para este proceso los equipos, materiales y reactivos que muestran en la tabla 11. Se adicionó gota a gota la solución estandarizada de NaOH 0.1 N monitoreando el pH hasta alcanzar un rango de 8 y registrando el volumen gastado de NaOH durante el proceso.

Tabla 11: Equipos, materiales y reactivos utilizados para la resiembra de A. carbonarius en laboratorio

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Cabina de flujo laminar	Vasos de precipitación	NaOH 0.1 N
Agitador magnético	Bureta	Agua destilada
Potenciómetro METTLER TOLEDO SevenMulti	Agitador magnético calentador	Fenolftaleína
	Varilla	

Fuente: Autor

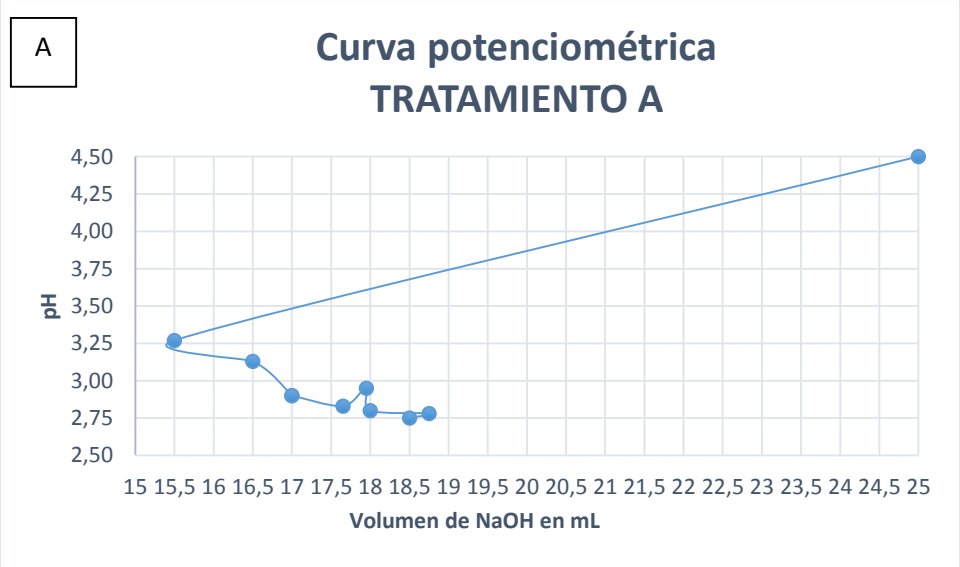
CAPÍTULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

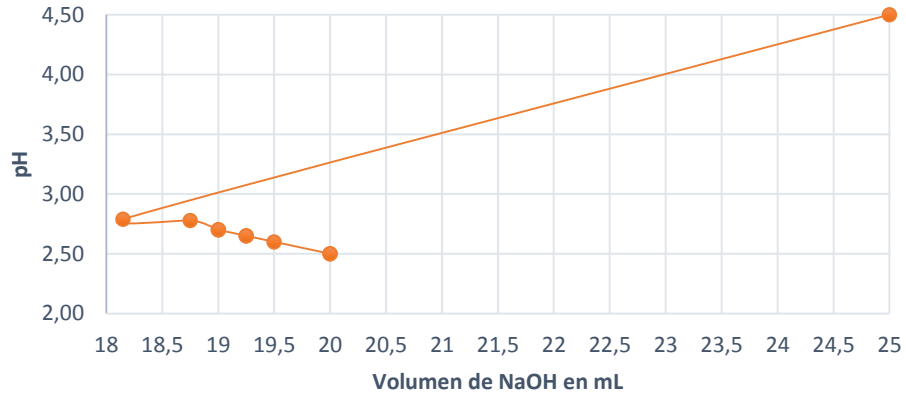
4.1 Análisis de los resultados de la degradación del sustrato dentro de los medios utilizados aplicando métodos estadísticos para determinar la mejor producción de ácido cítrico

4.1.1 Efectos de la adición de diversos nutrientes durante la fermentación en estado sólido

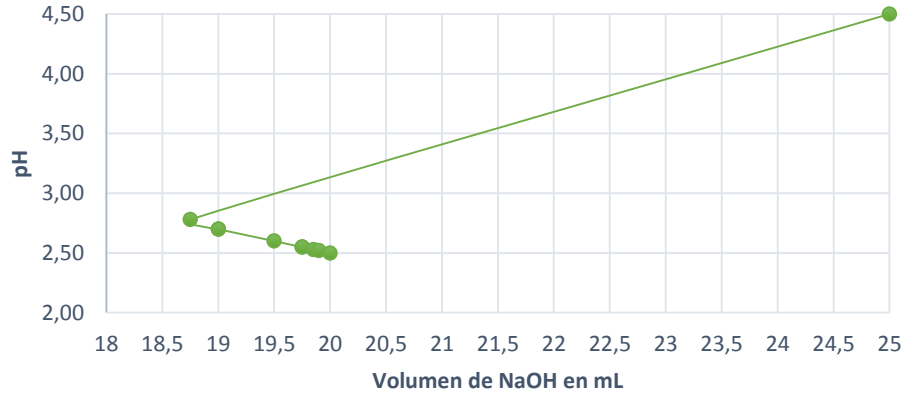
Durante el proceso de fermentación en estado sólido, la adición de nutrientes en los diferentes tratamientos fue de gran ayuda en cuanto al mejoramiento de la producción de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico. Es por esto que se realizó una curva potenciométrica para los cuatro tratamientos realizados, con el fin de mostrar el incremento de acidez durante el tiempo de fermentación desde el inicio del tratamiento hasta la mejor producción alcanzada en 150 horas de fermentación tal como se muestra en el Anexo V, y la figura 16.



B


Curva potenciométrica
TRATAMIENTO B
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
pH
18 18,5 19 19,5 20 20,5 21 21,5 22 22,5 23 23,5 24 24,5 25
Volumen de NaOH en mL

C


Curva potenciométrica
TRATAMIENTO C
4,50
4,00
3,50
3,00
2,50
2,00
pH
18 18,5 19 19,5 20 20,5 21 21,5 22 22,5 23 23,5 24 24,5 25
Volumen de NaOH en mL

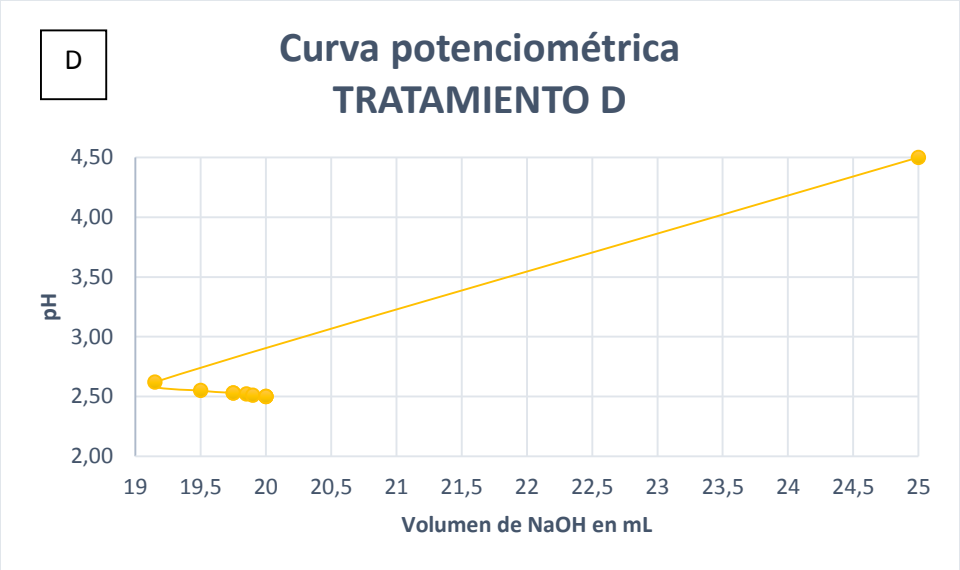


Figura 16: Curvas potenciométricas: a) Tratamiento A, b) Tratamiento B, c) Tratamiento C, d) Tratamiento D.
Fuente: Autor

En las gráficas de curvas potenciométricas se observa que durante el proceso de fermentación desde el inicio hasta alcanzar las 150 horas de fermentación en los cuatro tratamientos se logra un aumento notable en la acidez del medio ya que se comenzó con un pH de 4.50 y al llegar al punto máximo de fermentación se logró reducir el mismo a un pH de 2.50, lo cual muestra un resultado positivo en los tratamientos realizados ya que el pH del ácido cítrico es de 2.2 según se indica en la hoja de seguridad de ANDESIA (2009) para ácido cítrico, demostrando con este hecho que se generó un rendimiento eficiente del sustrato frente a la adición de diferentes nutrientes en el proceso de FES.

4.1.2 Producción de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico en los diferentes tratamientos

Una vez realizado el proceso de fermentación y alcanzadas las 150 horas en donde los tratamientos alcanzaron mayor rendimiento y producción de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico, se procede a demostrar que existe un proceso de acidificación notorio desde el

inicio del tratamiento hasta su punto de mayor rendimiento mismo que se expresa en g/mL por cada gramo de sustrato en los bloques A, B, C y D, que puede observarse en la tabla 12.

Tabla 12: Ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico a manera de resultado del proceso de FES para los bloques A, B, C y D en 1 g de sustrato.

TIEMPO	A	B	C	D
0 HORAS	0.0061	0.0076	0.0052	0.0050
24 HORAS	0.0107	0.0126	0.0120	0.0109
48 HORAS	0.0245	0.0232	0.0249	0.0267
72 HORAS	0.0370	0.0449	0.0502	0.0533
85 HORAS	0.0772	0.0760	0.0807	0.0822
150 HORAS	0.1116	0.1230	0.1244	0.1262

Fuente: Autor

Como se observa en la tabla antes mencionada, se alcanza una cantidad de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico diferente en cada tratamiento. En el caso del tratamiento A se alcanza un total de 0.116 g/mL siendo este el valor más bajo debido a que no contenía ningún nutriente adicionado al sustrato. Seguidamente para el tratamiento B se logra un total de 0.1230 g/mL, valor mayor que el primero debido a que contenía urea como nutriente adicionado al sustrato mismo que aporto una fuente de nitrógeno adicional al medio. Continuando con el tratamiento C se muestra un total de 0.1244 g/mL, el cual es mayor que el primero y el segundo debido a que contenía sacarosa como nutriente adicionado al sustrato que aportó una fuente de azúcares adicionales al medio, finalmente en el tratamiento D existe un total de 0.1262 g/mL siendo este el mayor de todos los tratamientos debido a que contenía urea y sacarosa como nutrientes adicionados al sustrato que aportaron una fuente de nitrógeno y azúcares adicionales al medio, demostrando así que la suplementación del sustrato utilizado es de vital importancia al momento de aplicar procesos de fermentación para mejorar la eficacia de producción y obtener así mejores resultados, tal como se menciona en el estudio de Moyano (2014) el cual adiciona diferentes suplementos en

un sustrato a base de papa, alcanzando mejores resultados en el medio suplementado en lugar del medio sin suplementar.

4.1.3 Caracterización de la cáscara de naranja

Para caracterizar la composición estructural de la cáscara de naranja durante el proceso de fermentación en estado sólido y los nutrientes adicionados, se utilizó un espectrofotómetro FT-IR is10 marca Thermo Scientific en donde se realizó un espectro base con ácido cítrico comercial tal como lo muestra la figura 17, para contrastarlo con los espectros de las diferentes muestras de la fermentación.

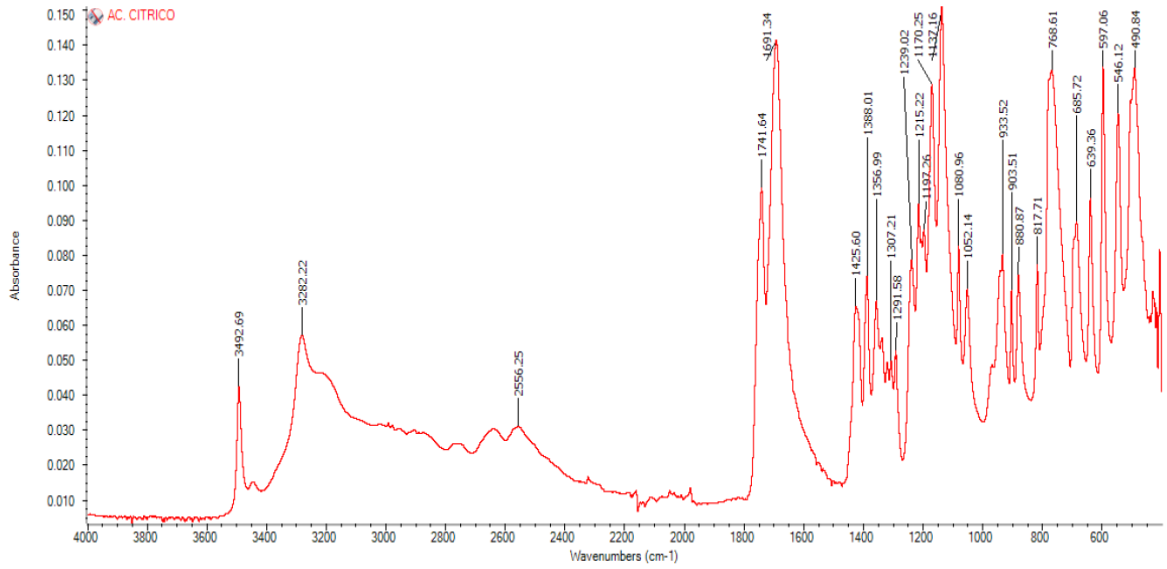
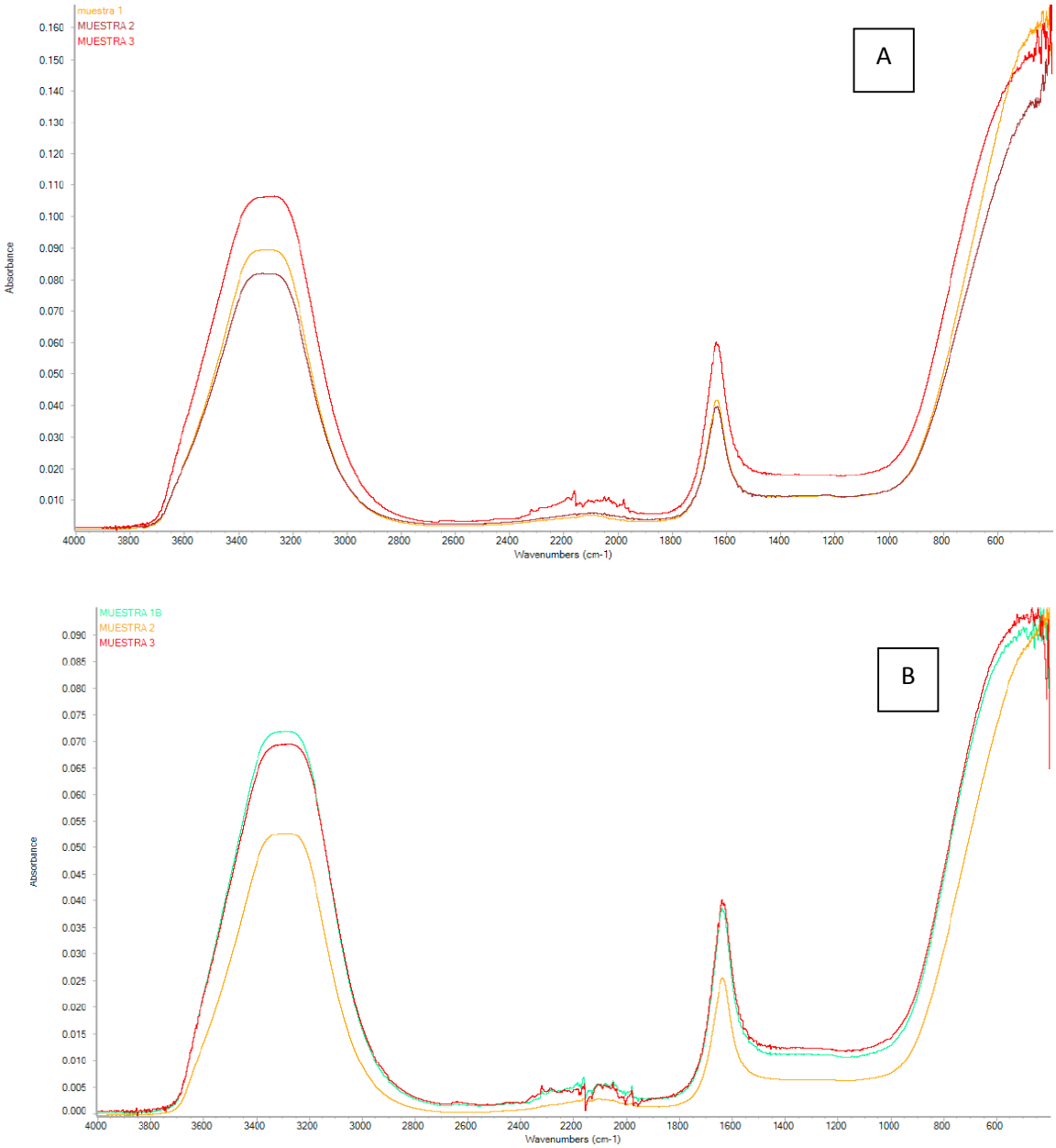


Figura 17: Espectro obtenido de ácido cítrico comercial en polvo.
Fuente: Captura tomada del espectrofotómetro FT-IR is10

En la caracterización de la muestra de ácido cítrico comercial que se muestra en la figura 17, se observa diferentes picos que manifiestan grupos funcionales activos presentes también en las muestras de los bloques A, B, C y D, expuestos en la figura 18. El espectro infrarrojo demostrado en la tabla 13 detalla los diferentes picos presentes en la muestra original y en los bloques estudiados, mismos que integran grupos hidroxilo (O-H), grupos carboxilos (C-O-O-H), enlaces simples y dobles enlaces.



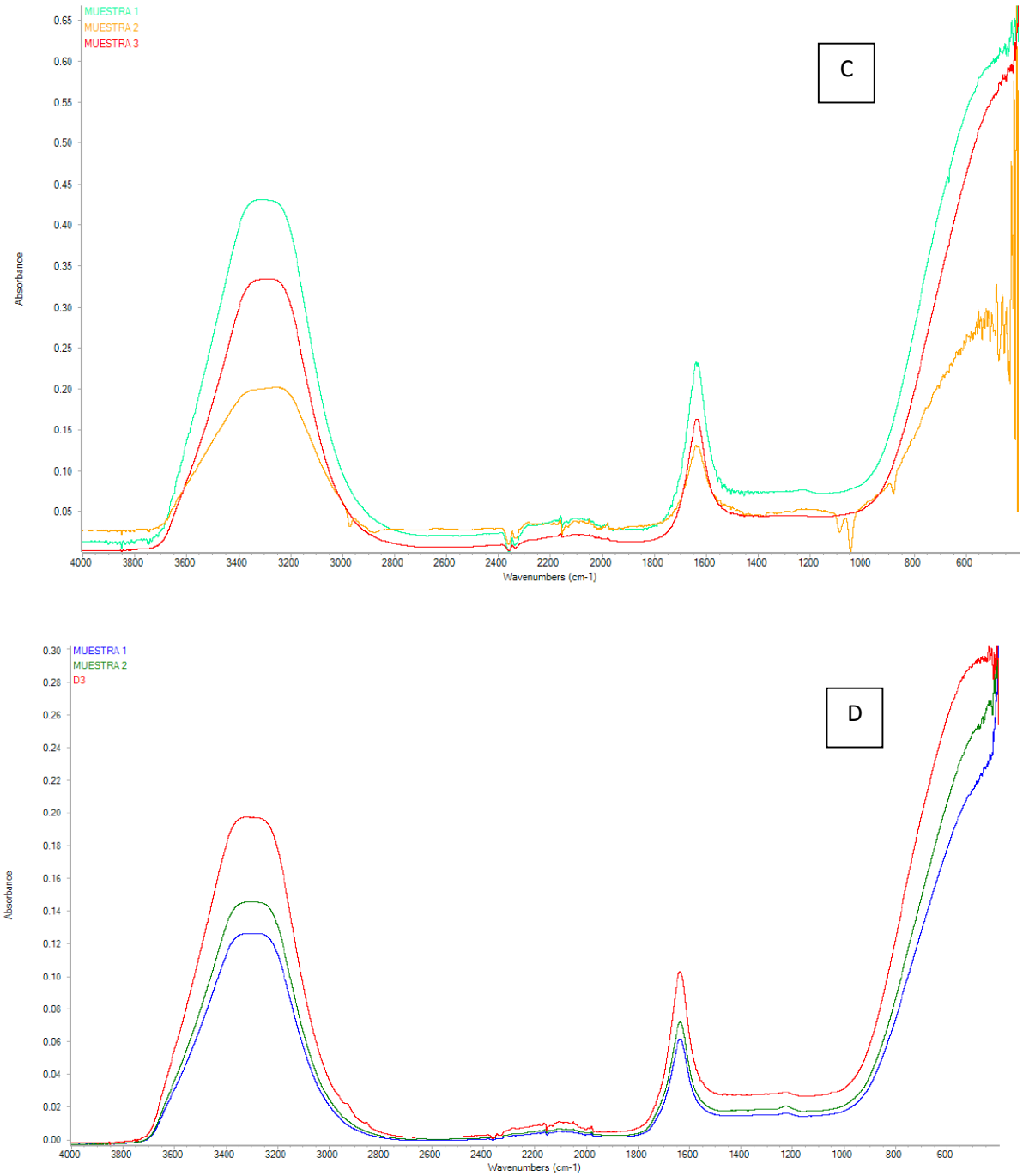


Figura 18: Espectros obtenidos de los diferentes bloques analizados: a) Tratamiento A, b) Tratamiento B, c) Tratamiento C, d) Tratamiento D.
Fuente: Captura tomada del espectrofotómetro FT-IR is10

Tabla 13: Identificación de grupos funcionales según su longitud de onda

PATRÓN	LONGITUD DE ONDA cm^{-1}	GRUPO FUNCIONAL
ÁCIDO CÍTRICO COMERCIAL	3492.69	Dímero
	3282.22	Alcohol polimérico
	2556.25	Puente intramolecular: carbonilo
	1741.64	Ácido carboxílico
	1691.34	Ácido carboxílico
	1425.60	Alcano
	1388.01	Aldehído
	1356.99	Éster
	1307.21	Éster
	1291.58	Éster
BLOQUE A: SIN SUPLEMENTO	3312.29	Alcohol polimérico
	3288.56	Alcohol polimérico
	3267.65	Alcohol polimérico
	1637.10	Aldehído
	1633.30	Aldehído
BLOQUE B: SUPLEMENTADO CON ÚREA	3313.91	Alcohol polimérico
	3284.90	Alcohol polimérico
	3279.27	Alcohol polimérico
	2161.92	Tiocianato aromático
	2049.69	Diazo
	1979.94	Isotiocianato alifático
	1636.93	Aldehído
BLOQUE C: SUPLEMENTADO CON SACAROSA	3316.80	Alcohol polimérico
	3283.13	Alcohol polimérico
	3262.89	Alcohol polimérico
	2954.98	Grupo CH_3
	2348.41	Ácido carboxílico
	1639.21	Aldehído
BLOQUE D: SUPLEMENTADO CON ÚREA Y SACAROSA	3313.89	Alcohol polimérico
	3309.74	Alcohol polimérico
	2049.69	Diazo
	1636.51	Aldehído

Fuente: Autor

Los espectros realizados tanto en el ácido cítrico comercial como en los tratamientos con cáscara de naranja fueron un adicional en este trabajo de investigación, su finalidad fue determinar cualitativamente la presencia de grupos carboxilos e hidroxilos que presenta el ácido cítrico comercial para compararlos con los tratamientos estudiados, ayudando esto a respaldar a las curvas potenciométricas en la presencia de ácido orgánicos expresados como ácido cítrico. Así en el estudio realizado por Criollo y Cueva (2016) se analizan compuestos similares a los tratamientos propuestos en esta investigación los cuales respaldan la presencia de azúcares, grupos hidroxilos y carboxilos, además de la importancia en el uso de sustratos con fuentes altas en azúcares o suplementos de los mismos para mejorar el rendimiento y producción de ácidos de interés durante el proceso de FES.

4.1.4 Comparación de los tratamientos y su adición de nutrientes en el sustrato para determinar la mayor concentración de ácidos orgánicos expresados como ácido cítrico y efectividad en el proceso de FES

En esta sección se procederá a comparar la efectividad de la adición de nutrientes al sustrato en los diferentes tratamientos realizados en los bloques A, B, C y D en el mayor rendimiento alcanzado según tiempo y nivel de acidificación para evaluar cuál es el mejor.

Para hacer la comparación se realizó un diseño completamente al azar (ANOVA) en donde se tomó un factor de entrada que fue el tiempo en donde se alcanzó una mayor producción el cual cuenta con seis niveles que son: horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 85 horas y 150 horas; con una variable de salida que es el contenido en g/mL de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico, considerando para cada uno de los tratamientos las mejores condiciones en donde se ha producido el mayor rendimiento. Se utilizó un nivel de confianza del 95% y se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho= El contenido en g/mL de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico es igual en todos los tratamientos.

Hi= El contenido en g/mL de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico es diferente en todos los tratamientos.

Para poder validar el ANOVA, se elaboró una prueba de Shapiro-Wilks en el programa InfoStat/L que se puede observar en la figura19 para determinar si existe una distribución normal de los valores analizados.

Shapiro-Wilks (modificado)

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO g/mL de AC	24	0.00	2.9E-03	0.93	0.2590

Figura 19: Prueba de Shapiro-Wilks para determinación de la distribución normal de los valores analizados

Fuente: *Captura tomada del programa InfoStat/L*

Según lo expuesto en la tabla anterior el valor de p es mayor al nivel de significancia quedando demostrada la normalidad de los valores, para proceder con la prueba ANOVA, la cual se muestra en la figura 20.

Análisis de la varianza

Variable	N	R^2	R^2 Aj	CV
g/mL de AC	24	1.00	0.99	7.40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.04	8	0.01	394.11	<0.0001
HORAS	0.04	5	0.01	628.51	<0.0001
TRATAMIENTO	1.3E-04	3	4.4E-05	3.45	0.0438
Error	1.9E-04	15	1.3E-05		
Total	0.04	23			

Figura 20: Prueba de ANOVA para la comparación de producción de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico en g/mL.

Fuente: *Captura tomada del programa InfoStat/L*

A través de los resultados expuestos en la figura 20 se pudo determinar que siendo el valor de p menor a 0.05 existen diferencias altamente significativas, con lo cual se rechaza a la hipótesis nula (Ho) y se acepta en consecuencia a la hipótesis alternativa (Hi), en la cual se determina que existe diferencia en la cantidad de g/mL de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico. Tomando esto en cuenta se realizó una prueba de Tukey que se muestra en la figura 21, para determinar donde existió una mayor producción y un mejor rendimiento.

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00818

Error: 0.0000 gl: 15

HORAS	Medias	n	E.E.				
0	0.01	4	1.8E-03	A			
24	0.01	4	1.8E-03	A			
48	0.02	4	1.8E-03		B		
72	0.05	4	1.8E-03			C	
85	0.08	4	1.8E-03				D
150	0.12	4	1.8E-03				E

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.00593

Error: 0.0000 gl: 15

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.		
A	0.04	6	1.5E-03	A	
B	0.05	6	1.5E-03	A	B
C	0.05	6	1.5E-03	A	B
D	0.05	6	1.5E-03		B

Figura 21: Prueba de Tukey para determinar la mayor producción y rendimiento de FES.

Fuente: *Captura tomada del programa InfoStat/L*

Con esta prueba se corrobora que el mayor rendimiento se alcanzó a las 150 horas de fermentación, mostrando además que no hubo una producción significativa a las 24 horas pero que incremento luego de las 48 horas hasta alcanzar su máximo rendimiento a las 150 horas, además para los tratamientos A y D hubo una mayor variación debido a que el tratamiento A no tenía ningún nutriente adicionado por lo cual alcanzó el menor rendimiento que fue de 0.116 g/mL, mientras que el tratamiento D alcanzó el valor más alto que fue de 0.1262 g/mL debido a que contenía las dos fuentes de nutrientes utilizadas ayudando esto a mejorar significativamente la producción de ácido orgánicos totales expresados como ácido cítrico.

Para demostrar esto se realizó un diagrama de caja y bigotes para los tratamientos en los bloques A, B, C y D y las horas de producción, que se muestra en la figura 22, respaldando con este lo anterior y demostrando que se alcanzó un nivel de producción y rendimiento más altos en el bloque D a las 150 horas de fermentación.

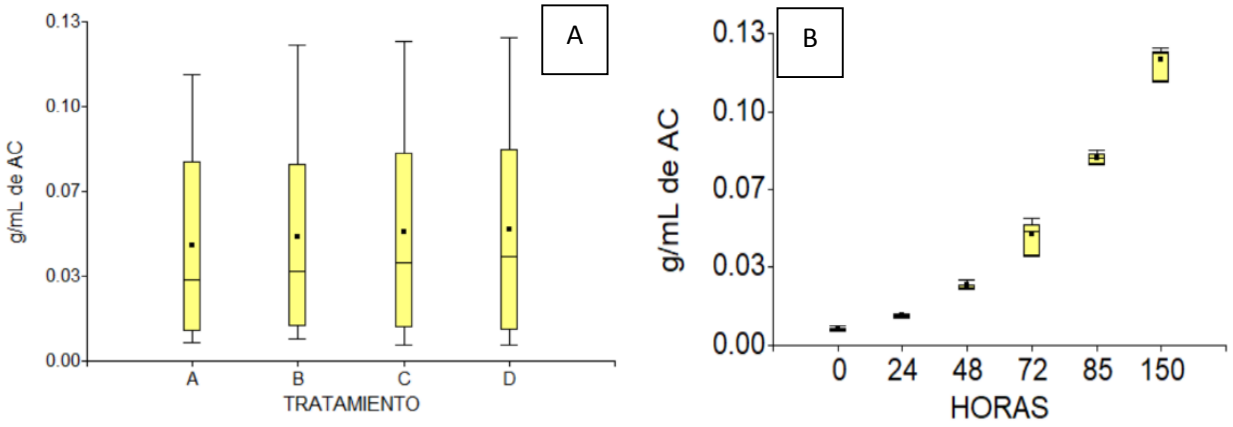


Figura 22: Diagramas de caja y bigotes: a) Tratamientos, b) Horas.
Fuente: Captura tomada del programa InfoStat/L

En base a los estudios de Torrado *et al*. (2011) se observa que este alcanza una cantidad de ácido cítrico de 193.2 mg/g a las 85 horas de incubación mientras que en el presente trabajo de investigación se alcanza un nivel de 126.2 mg/g de ácido orgánico a las 150 horas de fermentación, sin embargo en este estudio se utiliza únicamente 5 g de sustrato durante todo el experimento lo cual luego de ser comprobado en laboratorio no es del todo factible debido a que en una cantidad de sustrato tan pequeña no hay forma de que la acidez se incremente en valores tan altos y no es posible tomar muestras para corroborar el hecho antes mencionado. Por otra parte, el porcentaje de humedad y el tamaño de partícula del sustrato son muy importantes en el desarrollo de la fermentación y en el alcance de resultados favorables, por lo que en este hecho el uso de valores similares aseguró un resultado bastante alto de producción pese a las diferencias en la cantidad de sustrato utilizado.

Las investigaciones realizadas por (Kareem, *et al*., 2010); Moyano (2014) y Criollo & Cueva (2016) incluyen adición de nutrientes a los diferentes sustratos que utilizan con la finalidad de demostrar la importancia de estos para el mejor rendimiento del medio, es por esto que en la presente investigación se decidió utilizar urea como fuente de nitrógeno y sacarosa como fuente de azúcares, mostrando de tal manera que la adición de estos mejoró considerablemente el rendimiento en la producción de los medios suplementados frente al tratamiento que no lo fue.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Debido a los altos niveles de contaminación existentes en la actualidad, la necesidad de encontrar alternativas para la reutilización de residuos es de vital importancia, es por esto que en el presente trabajo de investigación se planteó la utilización de una cepa nativa de *Aspergillus carbonarius* para la producción de ácido cítrico mediante fermentación en estado sólido con cáscaras de naranja como sustrato, el cual es generado en altas cantidades como residuo en las diferentes industrias del país.

Una vez realizada la investigación y cumpliendo con los objetivos estipulados en la misma, se concluye lo siguiente:

- La cepa de *Aspergillus carbonarius* posee una capacidad muy elevada para la degradación de cáscara de naranja que fue el sustrato elegido en esta investigación, permitiendo que los medios enriquecidos establezcan un porcentaje satisfactorio de ácidos orgánicos totales.
- Las condiciones que favorecieron la síntesis de ácido orgánico fueron un porcentaje de humedad de 72.86 %, un tamaño de partícula de 600 μm y una concentración de inoculo de 0.5×10^{6} esporas/mL.
- La fermentación en estado sólido mostró un resultado bastante satisfactorio en cuanto al proceso de fermentación, así como también en su interacción entre el sustrato y el microorganismo utilizado.

- Consecuentemente la cepa de *Aspergillus carbonarius* produjo 126.2 mg/g de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico a las 150 horas de fermentación logrando un pH de 2.50 que fue bastante cercano al del ácido cítrico comercial.

En base al análisis estadístico desarrollado se acepta la hipótesis alternativa la cual plantea que el contenido en g/mL de ácidos orgánicos totales expresados como ácido cítrico es diferente en todos los tratamientos, lo que hace visible la variable con mayor significancia que fueron los nutrientes adicionados al sustrato, mostrando así que el microorganismo empleado tuvo mayor facilidad para metabolizar el medio suplementado con la fuente de nitrógeno y azúcares adicionales.

En cuanto al factor ambiental la fermentación en estado sólido demostró ser un método bastante efectivo en la degradación de residuos que no son aprovechados y que generan altos niveles de contaminación, mostrando una degradación efectiva del sustrato en 150 horas logrando un nivel de acidez bastante alto que favoreció el desarrollo de la investigación.

5.2 Recomendaciones

En cuanto a la cepa de *Aspergillus carbonarius* es necesaria una identificación molecular, para poder caracterizar mejor la cepa y determinar una clave taxonomía más específica.

Con respecto a la metodología empleada se sugiere emplear técnicas más específicas para la cuantificación de ácido cítrico que ayuden a minimizar el tiempo de análisis y que permitan resultados más exactos de la presencia de los ácidos de interés.

Se recomienda profundizar un poco más en procesos de purificación de ácido cítrico mediante técnicas de innovación que involucren recursos y medios accesibles económicamente generando nuevas fuentes de investigación.

Se sugiere finalmente continuar con procesos de fermentación ya sea en estado sólido o sumergido con diferentes residuos producidos por diversas industrias del país con el fin de promover la reutilización de recursos, el control de la contaminación ambiental y la generación de nuevas plazas de trabajo y desarrollo profesional aprovechando los recursos del país.

LISTA DE REFERENCIAS

Alvarez, J. (2017). Evaluación de la funcionalidad de producción de ácido cítrico usando cepas de *Aspergillus niger* identificadas molecularmente (tesis de pregrado). Universidad San Fransisco de Quito, Quito, Ecuador. Recuperado de: https://bit.ly/33dnA0H

Andesia Ecuador. C.A. [ANDESIA]. (2009). Hoja de seguridad del ácido cítrico. Recuperado de http://iio.ens.uabc.mx/hojas-seguridad/ACIDO CITRICO. Recuperado de: https://bit.ly/35qNZtq

Arroyo, R, & León, R. (2014). Densidad de carga y método de extracción en el rendimiento y calidad de aceite esencial de los flaveados de dos variedades de naranja (Citrus Sinensis) (tesis de pregrado). Universidad Nacional del Santa, Nuevo Chimbote, Perú. Recuperada de: https://bit.ly/2QMvtYE

Ballardo, C. (2016). Valorización de residuos sólidos orgánicos como sustrato para el crecimiento de *Bacillus Thuringiensis* mediante fermentación en estado sólido: aplicación a la fracción orgánica de residuos municipales para la producción de compost con efecto biopesticida (tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. España. Recuperado de: https://bit.ly/37Ix08a

Catálogo de la Vida. (2017). Detalles de la especie: *Aspergillus carbonarius* (Bainier) Thom 1916. Recuperado de https://bit.ly/2SitgCc

Cerón, I & Cardona, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. *Ingeniería y Ciencia. 7*(13). 65.86. Recuperado de https://bit.ly/35z8VPh

Criollo, T & Cueva, M. (2016). Cuantificación de glucosa, fructosa y sacarosa en muestras de pulpa y jugo de uvilla (physallis peruviana), tomate de árbol (solanum betaceum) y manzana (pyrus malus) por espectroscopia infrarroja por transformadas de fourier (FTIR) (tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador. Recuperado de: https://bit.ly/2KNJ3qE

Dustet, J & Izquierdo, E. (2004). Aplicación de balances de masa y energía al proceso de fermentación en estado sólido de bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus niger*. *Biotecnologia Aplicada*, *21*(2), 85–91. doi: 10.1023/A:1023232002312

Elizondo, B & Manzanares, R. (2009). Obtención de ácido cítrico por medio de fermentación sumergida a partir de *Aspergillus niger* ATCC 16404 utilizando suero de leche como medio de cultivo de fermentación (tesis de pregrado). Universidad de el Salvador, San Salvador, El Salvador. Recuperado de: https://bit.ly/2XIiuZc

Espinosa, C. (2012). Estudio de las opciones de reutilización energética o material de cáscaras de naranja (tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador. Recuperado de: https://bit.ly/2OeJL2o

García, G. (2016). Presencia de hongos del género *Penicillium* en los ambientes ambulatorios de dos centros de salud de la región Loreto (tesis de pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos, Perú. Recuperado: https://bit.ly/37C1LLJ

Gilchrist, L., Fuentes, G., Martínez, C. & López, R. (2005). Enfermedades de trigo y cebada. México, D.F.: CIMMYT. Recuperado de: https://bit.ly/2KM8JnG

Gonzáles, D. (2013). Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales: una aproximación desde la nutrición animal (tesis de pregrado). Coorporación Universitaria Lasallista, Caldas, Antioquia. Recuperado de: https://bit.ly/37zfYZV

González, Á. (2015). Estudio de viabilidad de una planta de producción de ácido cítrico por fermentación. doi: 10.3109/10253890.2013.840579

González, A. (2010). Diagnóstico y control de especies *Aspergillus* productoras de ocratoxina A (tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. Recuperado de: https://bit.ly/33id7RE

Grewal, H & Kalra, K. (1995). Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*, *13*(2), 209–234. doi: 10.1016/0734-9750(95)00002-8

Iralapati, V & Kummari, S. (2015). Production of citric acid from different fruit peels using *Aspergillus niger*. *International Journal of Scientific Engineering and Research*, *3*(5), 1–3. Recuperado de https://bit.ly/2KRw8Eh

Kareem, S., Akpan, I. & Alebiowu, O. (2010). Production of citric acid by Aspergillus niger using pineapple waste. *Malaysian Journal of Microbiology*, *6*(2), 161–165. Recuperado de: https://bit.ly/2XGTodm

López, C., Zuluaga, A., Herrera, S., Ruíz, A. & Medina, V. (2006). Producción de ácido cítricos con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. *Dyna*, *73*(150), 39–57. doi: 10.1016/S0022-5347(05)67875-5

López, V. (2014). Fortificación de cáscara de naranja (C. sinensis var Valencia) por impregnación con miel (Tesis de maestría). Universidad veracruzana, Veracruz, México. Recuperado de: https://bit.ly/2qG1KG5

Medina, J. (2014). Optimización de variables en un biorreactor para la síntesis de ácido cítrico empleando melaza como sustrato (tesis de pregrado). Universidad Autónoma Metropolitana, Azcapotzalco, México. Recuperado de: https://bit.ly/2sbi6Xz

Moyano, M. (2014). Fermentacion en estado solido (FES) de la papa (*Solanum tuberrosum*), como alternativa tecnológica para la alimentación (tesis de pregrado). Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD), Tunja, Colombia. Recuperado de: https://bit.ly/37zhqvl

Muñoz, A., Sáenz, A., López, L., Cantú, L., y Barajas, L. (2014). Ácido Cítrico: Compuesto Interesante. *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*, *6*(12), 1-23. doi: org/10.1385/ABAB:91-93:1-9:297

Núñez, F. (2008). Planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de remolacha (tesis de pregrado). Universidad de Cádiz, Andalucía, España. Recuperado de: https://bit.ly/2qxjHXu

Pastrana, L. (1996). Fundamentos de la fermentación en estado sólido y aplicación a la industria alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria. 1*(3). 4-12. doi: 10.1080/11358129609487556

Patakfalvi, R. (2011). Estandarización de una disolución de HCl y de NaOH. Recuperado de: https://bit.ly/37z8NRy

Pérez, O., Chong, N., Rodríguez, K., y 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 de: https://bit.ly/37sSk1j

Raju, N. (2014). La cuantificación de las células bacterianas o esporas de hongos mediante el uso de cámara de Neubauer. Recuperado de: https://bit.ly/2OfZ0rN

Roman, A., García, J., y Hernandez, J. (2012). Industralización de la Cáscara de naranja (tesis pregrado). Universidad Áutonoma Metropolitana, Iztapalapa, México. Recuperado de: https://bit.ly/33if68y

Rosales, S. (2019). 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 (tesis pregrado) Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador. Recuperado de: https://bit.ly/37xVkcx

Rosas, M, & Terán, D. (2015). Obtención de ácido cítrico a partir de melaza o cachaza, mediante fermentación utilizando cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16888 (tesis de pregrado). Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador. Recuperado de: https://bit.ly/2s6gM8i

Sánchez, Ó., Ortiz, M., y Betancourt, A. (2004). Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus spp*. *Revista colombiana de Biotecnología.* Recuperado de https://bit.ly/33cBTmh

Sánchez, V. (1999). Producción de proteasas fúngicas por fermentación en estado sólido para su aplicación en la industria de alimentos (tesis de maestría). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Recuperado de: https://bit.ly/2XF0SO6

Simões, M., Santos, C., y Lima, N. (2013). Structural Diversity of *Aspergillus* (Section *Nigri*) Spores. Microscopy and Microanalysis, 19(5), 1151-1158. doi: 10.1017/s1431927613001712

Soria, M. (1997). Producción de ácido cítrico y desarrollo morfológico en miembros del género *Aspergillus* (tesis de pregrado). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. Recuperado de: https://bit.ly/2qFpEkU

Soccol, C., Vandenberghe, L., Rodrigues, C., Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food, Technology and Biotechnology. 44*(2). 141-149. Recuperado de: https://bit.ly/2XMwl0W

Tenorio, M. (2016). Flavonoids extracted from orange peelings tangelo (*Citrus reticulata x Citrus paradisi*) and their application as a natural antioxidant in sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) vegetable oil. *Scientia Agropecuaria, 7,* 419–431. doi: org/10.17268/sci.agropecu.2016.04.07

Torrado, A., Cortés, S., Salgado, J., Max, B., Rodríguez, N., Bibbins, B., Converti, A., y Domínguez, J. (2011). Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, *42*, 394–409. doi: 10.1590/S1517-83822011000100049

Troya, C, & Vaca, L. (2014). Protocolo para la reproducción de cepas nativas de *Trichoderma spp*. en laboratorios artesanales. Recuperado de: https://bit.ly/2OiDGCi

Velásquez, J., Beltrán, D., Padilla, L., y Gildardo, G. (2010). Obtención de ácido cítrico por fermentación con *Aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico hartón (*musa aab simmonds*) maduro. *Revista Tumbaga*, *5*, 135–147. Recuperado de: https://bit.ly/2OeHDI6

Villanueva, L., & Rodríguez, C. (2011). Manual de prácticas de laboratorio de química analítica. Recuperado de https://bit.ly/35qRnEE

Wei, H., Wen-jian, L., Hai-quan, Y., y Ji-hong, C. (2016). Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. *43.* 2-3. doi: 10.1007/s00253-018-9491-6

Weyda, I., Lübeck, M., Ahring, B., y Lübeck, P. (2014). Point mutation of the xylose reductase (XR) gene reduces xylitol accumulation and increases citric acid production in *Aspergillus carbonarius. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. *41*. 733-739. doi: 10.1007/s10295-014-1415-6.

ANEXOS

ANEXO I. Conteo de conidios en cámara de Neubauer y preparación de los inóculos a una concentración de 0.5×10^{6} esporas/mL

La metodología utilizada se adaptó de Raju (2014) y Saavedra et al. (2010).

1. Realizar un lavado de esporas con 10 mL de suero fisiológico y se filtra este con una gasa estéril con el fin de eliminar hifas y partículas grandes del lavado.
2. Absorber una gota de suspensión de esporas con una micropipeta y colocarla en el centro del hematocitómetro o en los extremos del mismo, seguido a esto colocar el cubreobjetos evitando la formación de burbujas y la salida de la gota por cualquiera de los campos de conteo.
3. Dejar reposar entre 1 a 2 minutos una vez la gota este dentro de la cámara para que los conidios se sedimenten en la base de conteo.
4. En el caso de hongos con esporas pequeñas se realiza el conteo de las secciones numeradas mientras que si las esporas son grandes se realiza el conteo de los sectores A, B, C y D como se muestra en las figuras. No se deben contar los conidos que tocan las líneas derecha e inferior en cada sección.

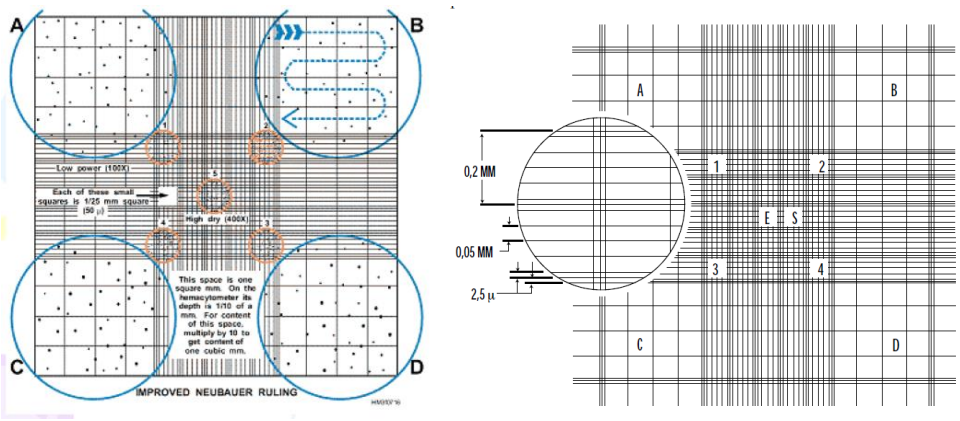


Figura 23: Secciones de conteo del hemacitómetro vistas desde el microscopio
Fuente: Autor

5. El conteo se realiza mínimo seis veces en cada sector y se saca un promedio.
6. Una vez obtenido el número de conidios completo se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{N° de esporas/ mL} = \frac{N°\ total\ de\ esporas \times 10000}{N°\ de\ secciones \times dilución}$$

7. Para preparar la concentración especifica de 0.5×10^6 esporas/mL se emplea la siguiente fórmula:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

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. Muestreo del proceso de fermentación en estado sólido hasta alcanzar las 150 horas de incubación

1. Para el muestreo se toma 1 g de sustrato en un vaso de precipitación de 100 mL y se colocan 29 mL de agua destilada en cada repetición de los bloques A, B, C, y D realizados por triplicado cada 24 horas hasta completar un proceso de incubación de 150 horas como se muestra en las Figuras 21, 22, 23 y 24

Figura 24: Muestreo del sustrato cada 24 horas para el proceso de titulación en el bloque A: a) Matraz A1, b) Matraz A2, c) Matraz A3
Fuente: Autor

Figura 25: Muestreo del sustrato cada 24 horas para el proceso de titulación en el bloque B: a) Matraz B1, b) Matraz B2, c) Matraz B3
Fuente: Autor

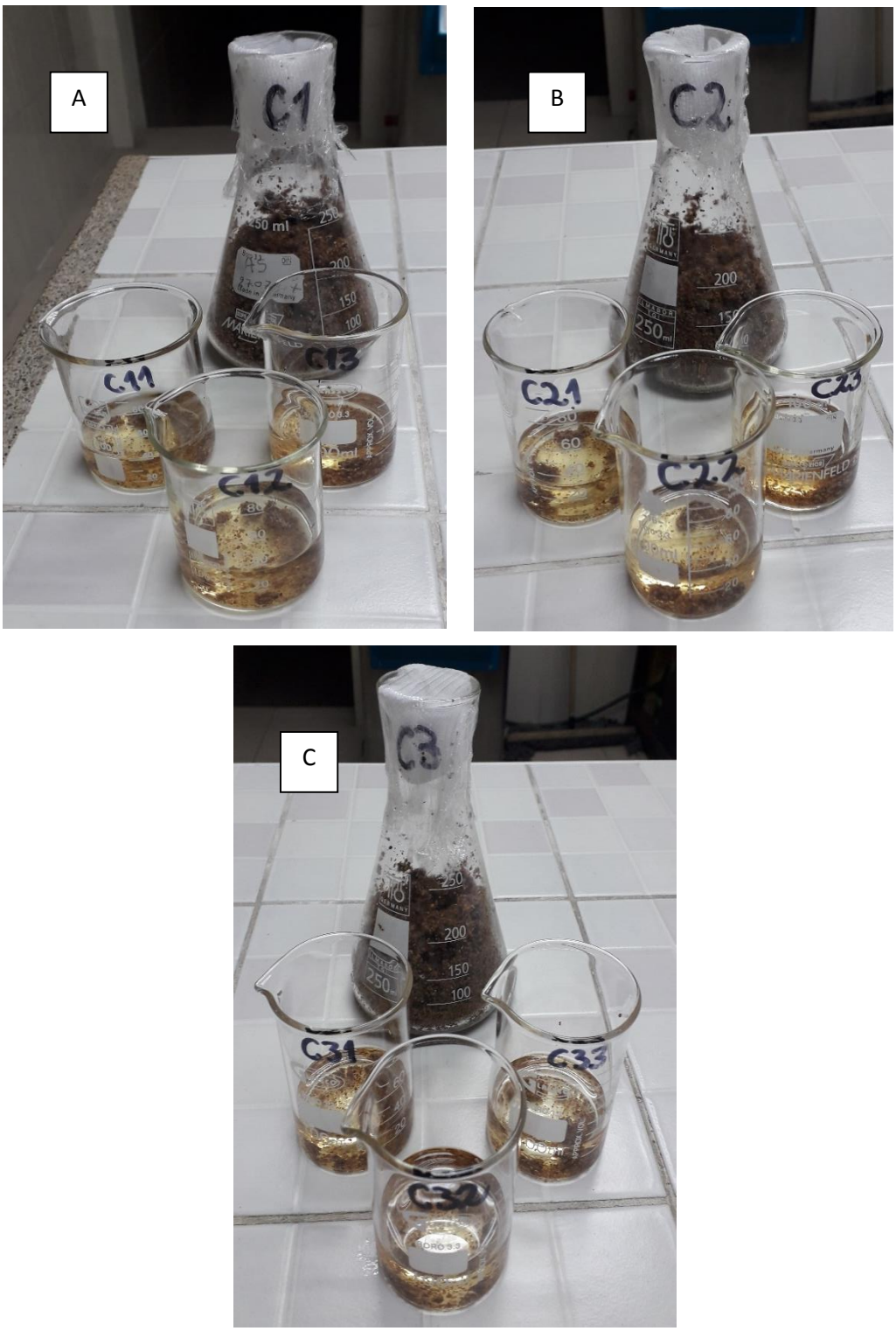


Figura 26: Muestreo del sustrato cada 24 horas para el proceso de titulación en el bloque C: a) Matraz C1, b) Matraz C2, c) Matraz C3
Fuente: Autor

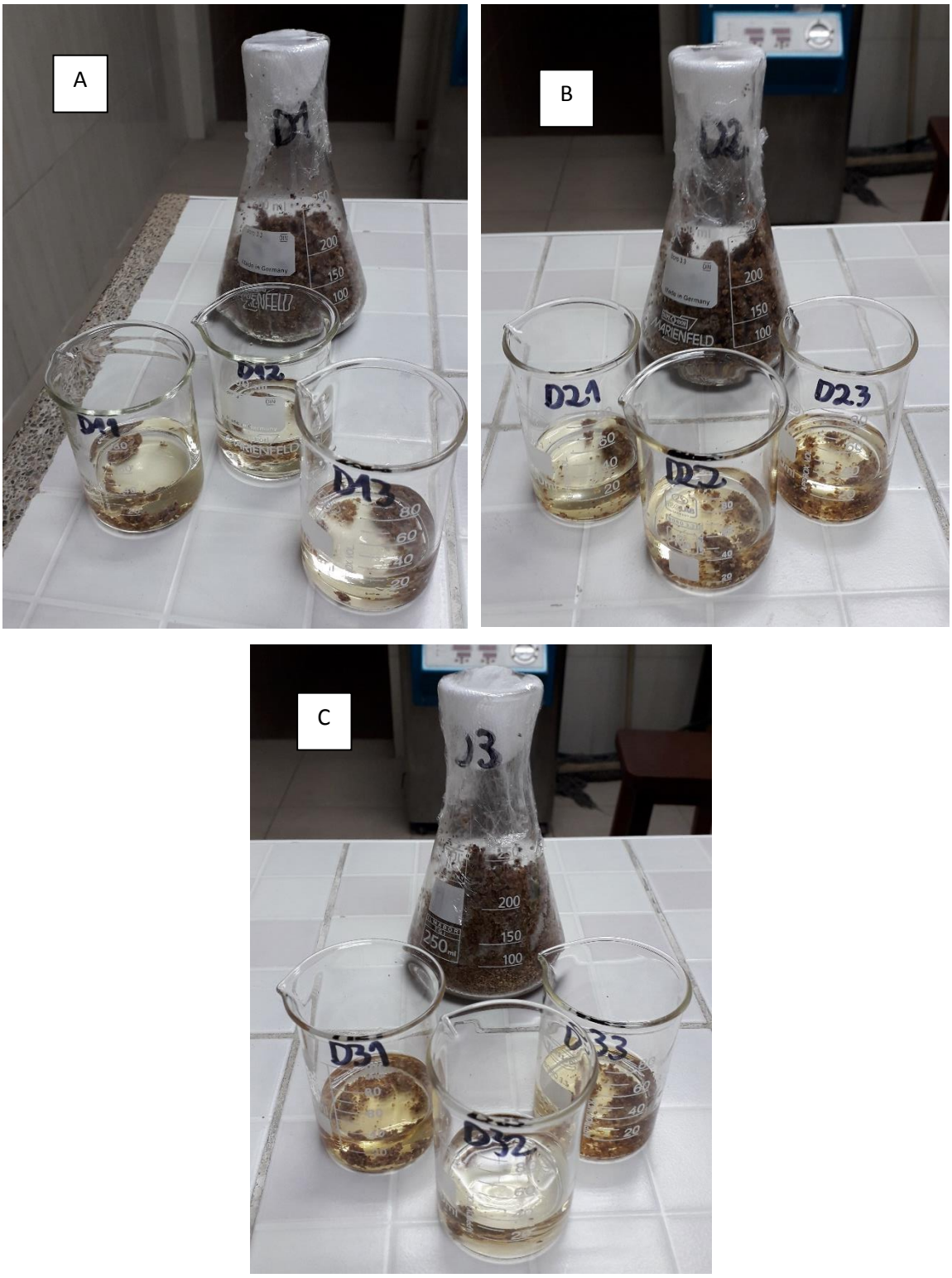


Figura 27: Muestreo del sustrato cada 24 horas para el proceso de titulación en el bloque D: a) Matraz D1, b) Matraz D2, c) Matraz D3
Fuente: Autor

2. Una vez realizado el muestreo se procede a titular agregando a la suspensión anterior dos gotas de fenolftaleína como indicador hasta que se produzca el cambio de color como se muestra en las Figuras 25, 26, 27 y 28.

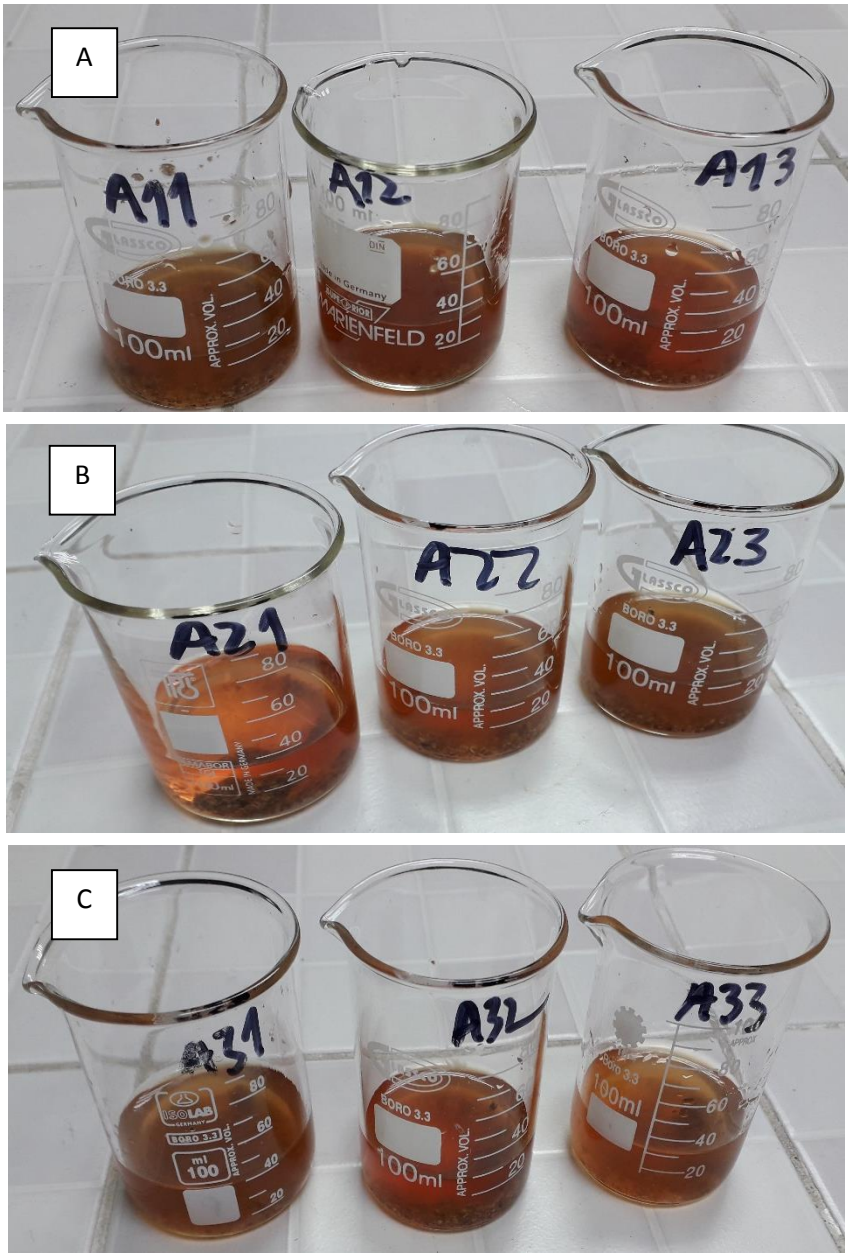


Figura 28: Sustrato titulado cada 24 horas para el bloque A: a) Muestras tituladas del matraz A1, b) Muestras tituladas del matraz A2, c) Muestras tituladas del matraz A3
Fuente: Autor

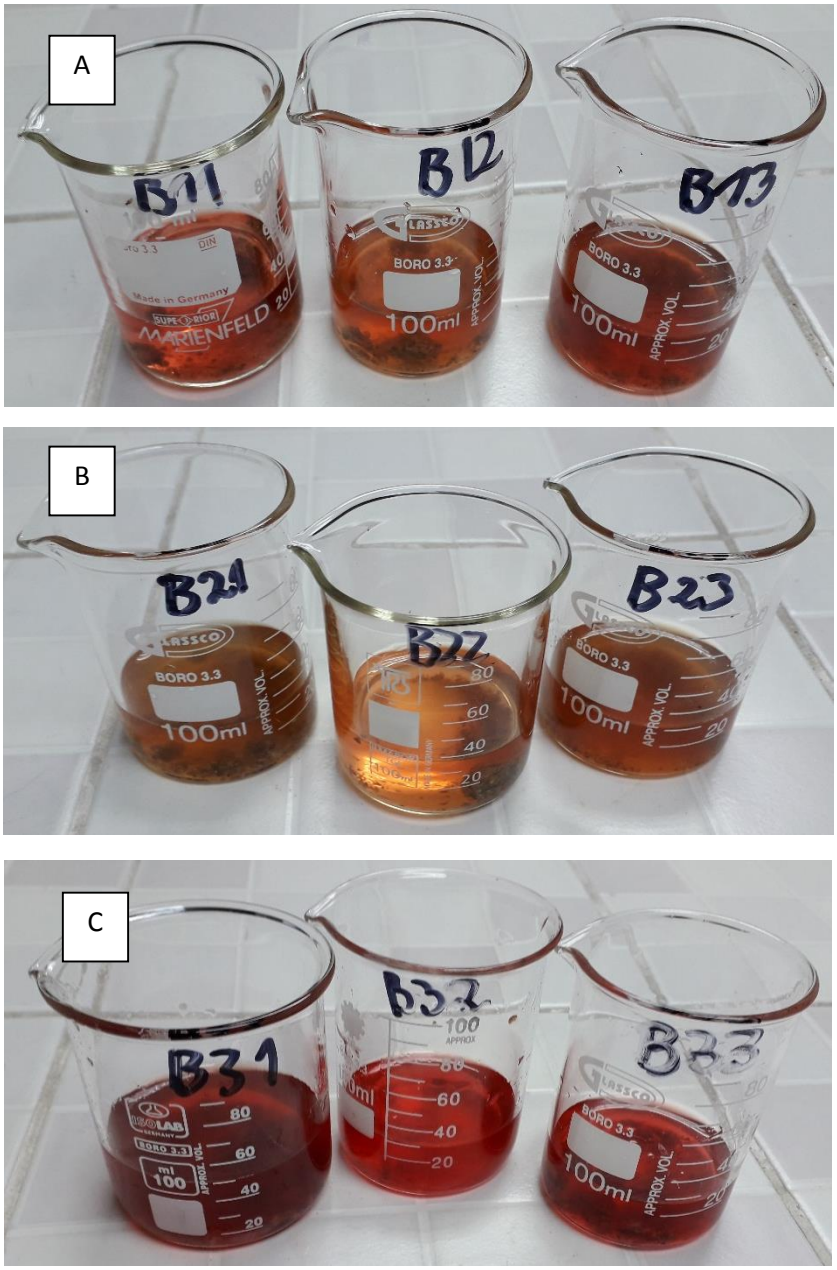


Figura 29: Sustrato titulado cada 24 horas para el bloque B: a) Muestras tituladas del matraz B1, b) Muestras tituladas del matraz B2, c) Muestras tituladas del matraz B3
Fuente: Autor

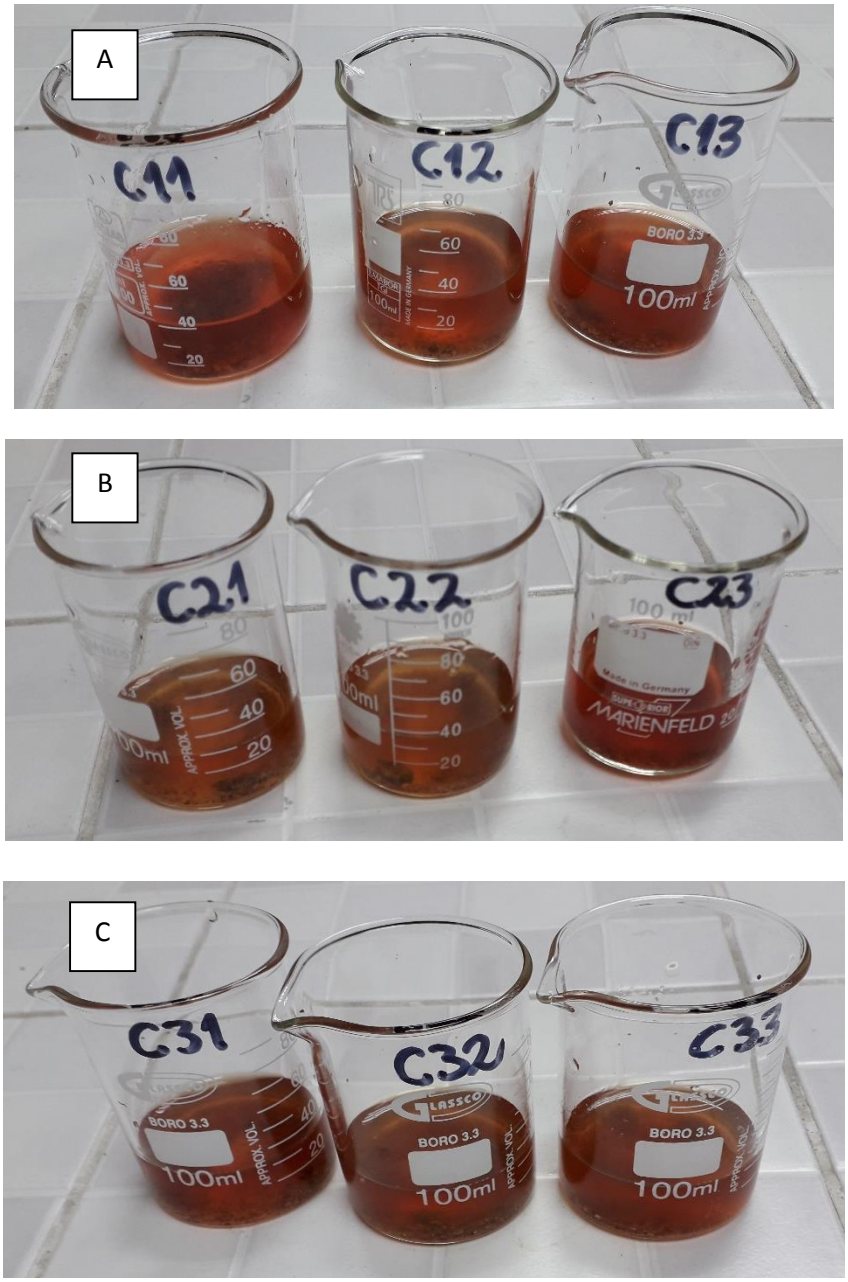


Figura 30: Sustrato titulado cada 24 horas para el bloque C: a) Muestras tituladas del matraz C1, b) Muestras tituladas del matraz C2, c) Muestras tituladas del matraz C3

Fuente: Autor

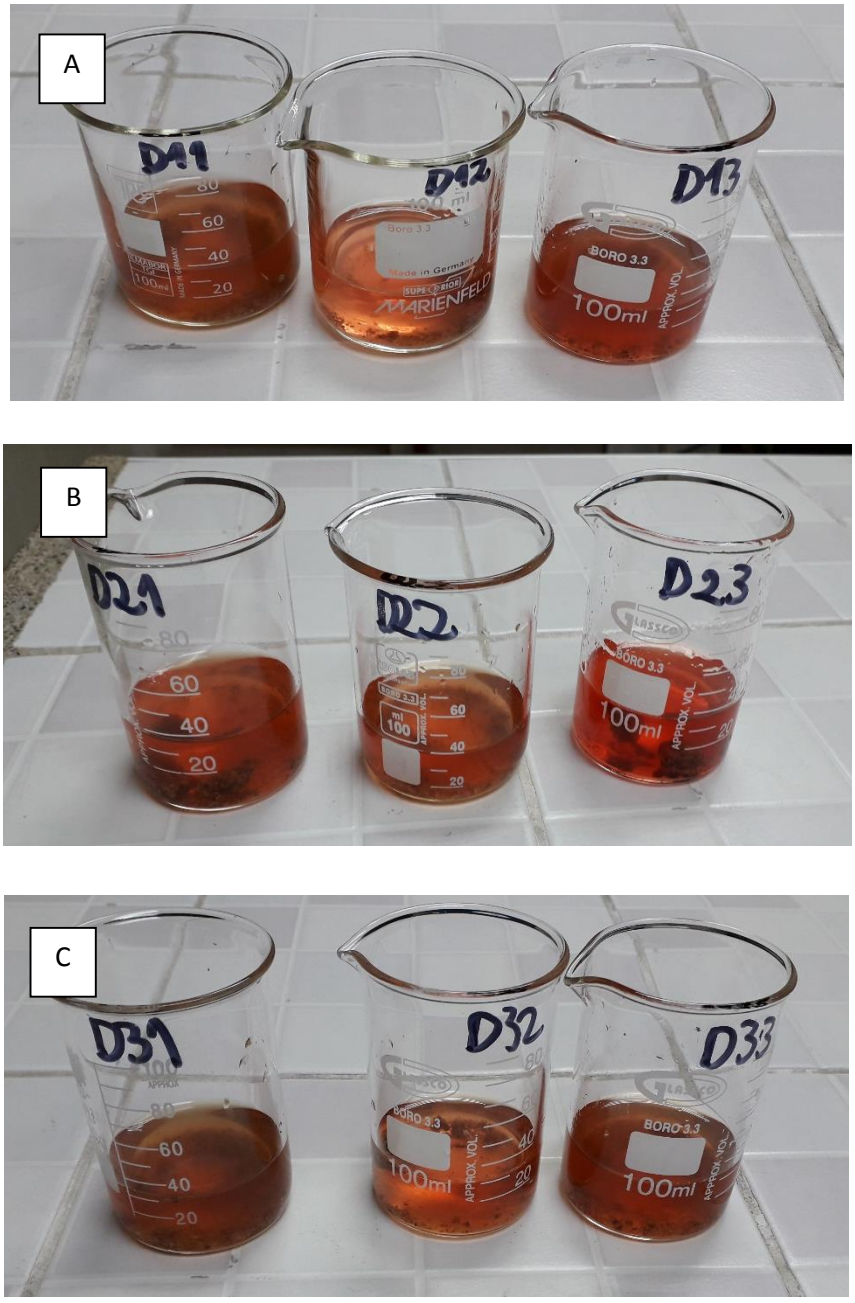


Figura 31: Sustrato titulado cada 24 horas para el bloque D: a) Muestras tituladas del matraz D1, b) Muestras tituladas del matraz D2, c) Muestras tituladas del matraz D3
Fuente: Autor

ANEXO III. Estandarización de NaOH 0.1 N con HCL

La solución de NaOH 0.1 N se estandariza con el patrón primario HCL siguiendo una metodología adaptada de Villanueva & Rodríguez (2011) y Patakfalvi (2011).

1. Preparar la solución de HCL del cual se deberá conocer el % de pureza, la densidad y el peso molecular, ya que esta servirá como patrón primario para la estandarización de NaOH.
2. Se realiza el cálculo de la cantidad de HCL que va a ser utilizado mediante la fórmula de la densidad en donde se despeja el volumen y se realiza el cálculo con los valores ya conocidos como se muestra en la fórmula:

$$\rho = \frac{m}{V} \qquad V = \frac{m}{\rho}$$

3. Una vez determinado el valor de HCL a utilizarse se procede a aforar el mismo y colocarlo en matraz erlenmeyer de 250 mL con dos gotas de fenolftaleína.
4. Preparar la solución de NaOH a partir de 4 g y 1 L de agua destilada, una vez obtenida la solución colocarla en una bureta de 25 mL y proceder a la titulación hasta la aparición de color fucsia característico de la fenolftaleína durante 30 a 60 segundos o mediante potenciometría hasta alcanzar un pH de 8.
5. Realizar este procedimiento por triplicado registrando los volúmenes gastados de NaOH para continuar con los cálculos aplicando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{mol\ de\ HCL}{mol\ de\ NaOH} \qquad N = \frac{0{,}005}{0{,}05} = 0{,}1\ N$$

Donde:

mol de HCL= 0.05 L × 0.1 N = 0.005 mol de HCL

mol de NaOH= 50mL ÷ 1000 = 0.05 mol de NaOH

N= Normalidad del NaOH en equivalente por litro

Seguido este procedimiento se obtuvieron los siguientes resultados en este trabajo de investigación, mismo que se detallan en la tabla 14:

Tabla 14: Resultados de la estandarización de NaOH con HCL

N° de repetición	**Volumen gastado de NaOH en mL**	**Volumen gastado de NaOH en L**	**Normalidad del NaOH en (Eq/L)**
1	45.95	0.046	0.108
2	46.95	0.047	0.106
3	47.95	0.048	0.104
		Promedio	0.106

Fuente: Autor

ANEXO IV. Medida del gasto de NaOH y de pH al inicio y al final de la titulación desde el punto de inicio hasta alcanzar las 150 horas de incubación

TITULACIONES			VOLUMEN DE NAOH GASTADO EN mL	MEDIDA DE pH INICIAL	MEDIDA DE pH AL AGREGAR NaOH	TRANSFROMACIÓN DEL VOLUMEN DE NaOH
			Rango: 0.50 - 1.50	**Rango: 4.50 - 4.25**	**Rango: 7.90 - 8.30**	**mL a L**
BLOQUE A	A1	**A11**	0.50	4.20	7.91	0.0005
		A12	0.75	4.30	8.00	0.0008
		A13	1.00	4.40	8.15	0.0010
	A2	**A21**	1.05	4.41	8.17	0.0011
		A22	1.45	4.45	8.28	0.0015
		A23	1.40	4.43	8.25	0.0014
	A3	**A31**	0.58	4.28	7.96	0.0006
		A32	1.35	4.44	8.23	0.0014
		A33	0.55	4.25	7.95	0.0006
BLOQUE B	B1	**B11**	0.76	4.31	8.02	0.0008
		B12	0.78	4.33	8.05	0.0008
		B13	1.00	4.40	8.15	0.0010
	B2	**B21**	0.98	4.39	8.09	0.0010
		B22	1.32	4.43	8.20	0.0013
		B23	1.47	4.46	8.29	0.0015
	B3	**B31**	1.45	4.45	8.28	0.0015
		B32	1.50	4.50	8.30	0.0015
		B33	1.49	4.48	8.30	0.0015
BLOQUE C	C1	**C11**	1.45	4.45	8.28	0.0015
		C12	0.78	4.34	8.05	0.0008
		C13	0.76	4.32	8.02	0.0008
	C2	**C21**	0.58	4.27	7.96	0.0006
		C22	0.62	4.29	7.98	0.0006
		C23	0.77	4.32	8.03	0.0008

	C3	**C31**	0.75	4.30	8.00	0.0008
		C32	0.60	4.28	7.97	0.0006
		C33	0.62	4.27	7.98	0.0006
BLOQUE D	D1	**D11**	0.75	4.30	1.00	0.0008
		D12	0.78	4.33	8.05	0.0008
		D13	0.79	4.35	8.06	0.0008
	D2	**D21**	0.76	4.32	8.02	0.00076
		D22	0.80	4.36	8.10	0.00080
		D23	0.82	4.37	8.12	0.00082
	D3	**D31**	0.80	4.36	8.10	0.0008
		D32	0.76	4.32	8.02	0.0008
		D33	0.79	4.35	8.06	0.0008
VOLUMEN DE SUSTRATO EN RELACIÓN AL TIEMPO			**30g**	**TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA**		**INICIO**

TITULACIONES			VOLUMEN DE NAOH GASTADO EN mL	MEDIDA DE pH INICIAL	MEDIDA DE pH AL AGREGAR NaOH	TRANSFROMACIÓN DEL VOLUMEN DE NaOH
			Rango: 1.50 - 2.50	**Rango: 4.25 - 4.00**	**Rango: 7.90 - 8.30**	**mL a L**
BLOQUE A	A1	**A11**	1.65	4.05	7.98	0.0017
		A12	1.70	4.10	8.15	0.0017
		A13	1.75	4.12	8.19	0.0018
	A2	**A21**	1.60	4.25	8.22	0.0016
		A22	1.65	4.22	8.25	0.0017
		A23	1.55	4.12	8.10	0.0016
	A3	**A31**	1.75	4.23	8.24	0.0018
		A32	1.74	4.15	8.08	0.0017
		A33	1.65	4.05	8.00	0.0017
BLOQUE B	B1	**B11**	1.70	4.25	8.23	0.0017
		B12	2.00	4.24	8.27	0.0020
		B13	1.70	4.20	8.13	0.0017
	B2	**B21**	2.05	4.15	8.04	0.0021
		B22	2.00	4.12	8.15	0.0020
		B23	2.15	4.12	8.16	0.0022
	B3	**B31**	2.2	4.15	8.17	0.0022
		B32	2.00	4.16	8.18	0.0020
		B33	1.90	4.12	8.15	0.0019
BLOQUE C	C1	**C11**	1.50	4.20	8.17	0.0015
		C12	1.60	4.21	8.20	0.0016
		C13	1.50	4.25	8.30	0.0015
	C2	**C21**	2.00	4.15	8.20	0.0020
		C22	2.25	4.05	8.02	0.0023
		C23	2.50	4.23	8.25	0.0025
	C3	**C31**	1.50	4.25	8.27	0.0015
		C32	1.75	4.20	8.15	0.0018

		C33	1.60	4.23	8.21	0.0016
BLOQUE D	D1	**D11**	1.70	4.03	7.99	0.0017
		D12	1.50	4.05	8.02	0.0015
		D13	1.75	4.08	8.15	0.0018
	D2	**D21**	1.70	4.07	7.95	0.0017
		D22	1.75	4.00	7.92	0.0018
		D23	1.80	4.05	8.01	0.0018
	D3	**D31**	1.85	4.02	8.05	0.0019
		D32	1.75	4.00	7,95	0.0018
		D33	1.70	4.04	8.02	0.0017
VOLUMEN DE SUSTRATO EN RELACIÓN AL TIEMPO			**25g**	**TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA**		**24 Horas**

TITULACIONES			VOLUMEN DE NAOH GASTADO EN mL	MEDIDA DE pH INICIAL	MEDIDA DE pH AL AGREGAR NaOH	TRANSFROMACIÓN DEL VOLUMEN DE NaOH
			Rango: 2.50 - 5.00	**Rango: 4.00 - 3.75**	**Rango: 7.90 - 8.30**	**mL a L**
BLOQUE A	A1	**A11**	2.50	4.00	8.30	0.0025
		A12	5.00	3.98	8.27	0.0050
		A13	5.00	3.90	8.20	0.0050
	A2	**A21**	2.75	3.85	8.15	0.0028
		A22	3.90	3.70	7.96	0.0039
		A23	5.00	3.75	8.02	0.0050
	A3	**A31**	2.50	4.00	8.30	0.0025
		A32	2.75	3.95	8.23	0.0028
		A33	5.00	3.80	8.15	0.0050
BLOQUE B	B1	**B11**	3.80	3.99	8.30	0.0038
		B12	4.05	3.90	8.20	0.0041
		B13	3.30	3.90	8.22	0.0033
	B2	**B21**	4.25	3.86	8.17	0.0043
		B22	5.00	3.80	8.08	0.0050
		B23	3.55	3.83	8.10	0.0036
	B3	**B31**	2.50	3.80	8.08	0.0025
		B32	3.15	3.76	8.06	0.0032
		B33	3.05	3.75	8.04	0.0031
BLOQUE C	C1	**C11**	3.90	4.00	8.30	0.0039
		C12	3.75	3.98	8.25	0.0038
		C13	4.50	3.99	8.28	0.0045
	C2	**C21**	4.10	3.97	8.30	0.0041
		C22	3.25	3.90	8.20	0.0033
		C23	3.30	3.92	8.23	0.0033
	C3	**C31**	4.25	3.93	8.22	0.0043
		C32	5.00	3.92	8.20	0.0050

		C33	4.90	4.00	8.30	0.0049
BLOQUE D	D1	**D11**	4.70	3.75	8.15	0.0047
		D12	5.00	3.87	8.20	0.0050
		D13	4.90	3.75	8.10	0.0049
	D2	**D21**	3.15	3.87	8.19	0.0032
		D22	3.95	3.90	8.24	0.0040
		D23	3.25	3.75	8.15	0.0033
	D3	**D31**	3.50	3.77	8.17	0.0035
		D32	4.25	3.76	8.20	0.0043
		D33	5.00	3.78	8.22	0.0050
VOLUMEN DE SUSTRATO EN RELACIÓN AL TIEMPO			**20g**	**TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA**		**48 Horas**

TITULACIONES			VOLUMEN DE NAOH GASTADO EN mL	MEDIDA DE pH INICIAL	MEDIDA DE pH AL AGREGAR NaOH	TRANSFROMACIÓN DEL VOLUMEN DE NaOH
			Rango: 5.00 - 10.00	**Rango: 3.75 - 3.50**	**Rango: 7.90 - 8.30**	**mL a L**
BLOQUE A	A1	**A11**	5.50	3.60	8.02	0.0055
		A12	6.15	3.52	8.27	0.0062
		A13	5.75	3.55	8.25	0.0058
	A2	**A21**	5.55	3.61	8.05	0.0056
		A22	6.00	3.64	8.07	0.0060
		A23	5.75	3.53	8.22	0.0058
	A3	**A31**	5.75	3.50	8.30	0.0058
		A32	6.00	3.62	8.08	0.0060
		A33	5.50	3.64	8.08	0.0055
BLOQUE B	B1	**B11**	5.75	3.50	8.30	0.0058
		B12	7.00	3.61	8.06	0.0070
		B13	6.25	3.66	8.10	0.0063
	B2	**B21**	5.20	3.72	7.94	0.0052
		B22	5.55	3.73	7.95	0.0056
		B23	7.55	3.60	8.03	0.0076
	B3	**B31**	8.25	3.61	8.05	0.0083
		B32	9.00	3.65	8.08	0.0090
		B33	8.60	3.75	7.90	0.0086
BLOQUE C	C1	**C11**	9.00	3.74	7.92	0.0090
		C12	10.00	3.64	8.09	0.0100
		C13	8.00	3.50	8.30	0.0080
	C2	**C21**	7.00	3.60	8.06	0.0070
		C22	6.25	3.72	7.94	0.0063
		C23	6.50	3.69	8.15	0.0065

	C3	**C31**	7.25	3.55	8.22	0.0073
		C32	8.25	3.53	8.21	0.0083
		C33	9.65	3.59	8.04	0.0097
BLOQUE D	D1	**D11**	10.00	3.70	7.95	0.0100
		D12	8.00	3.72	7.92	0.0080
		D13	7.50	3.75	7.90	0.0075
	D2	**D21**	6.75	3.69	8.15	0.0068
		D22	8.50	3.72	7.92	0.0085
		D23	9.00	3.74	7.94	0.0090
	D3	**D31**	7.50	3.68	8.12	0.0075
		D32	8.45	3.73	7.95	0.0085
		D33	9.75	3.75	7.90	0.0098
VOLUMEN DE SUSTRATO EN RELACIÓN AL TIEMPO			**15g**	**TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA**		**72 Horas**

TITULACIONES			VOLUMEN DE NAOH GASTADO EN mL	MEDIDA DE pH INICIAL	MEDIDA DE pH AL AGREGAR NaOH	TRANSFROMACIÓN DEL VOLUMEN DE NaOH
			Rango: 10.00 - 15.00	**Rango: 3.50 - 3.25**	**Rango: 7.90 - 8.30**	**mL a L**
BLOQUE A	A1	**A11**	10.55	3.48	8.08	0.0106
		A12	10.10	3.40	8.10	0.0101
		A13	10.25	3.45	8.12	0.0103
	A2	**A21**	12.00	3.30	8.05	0.0120
		A22	11.50	3.40	8.10	0.0115
		A23	13.00	3.50	7.92	0.0130
	A3	**A31**	15.00	3.25	8.30	0.0150
		A32	14.00	3.20	8.20	0.0140
		A33	12.05	3.33	8.08	0.0121
BLOQUE B	B1	**B11**	13.75	3.45	7.95	0.0138
		B12	10.50	3.47	7.97	0.0105
		B13	12.25	3.35	8.09	0.0123
	B2	**B21**	10.50	3.48	8.15	0.0105
		B22	11.25	3.43	8.17	0.0113
		B23	12.50	3.35	8.09	0.0125
	B3	**B31**	13.25	3.45	8.15	0.0133
		B32	10.50	3.46	8.17	0.0105
		B33	12.25	3.36	8.08	0.0123
BLOQUE C	C1	**C11**	10.90	3.49	7.92	0.0109
		C12	11.50	3.45	7.95	0.0115
		C13	12.45	3.35	8.10	0.0125
	C2	**C21**	12.00	3.30	8.05	0.0120
		C22	15.00	3.25	8.30	0.0150

		C23	13.95	3.16	8.18	0.0140
	C3	**C31**	10.00	3.50	7.90	0.0100
		C32	12.50	3.38	8.07	0.0125
		C33	14.50	3.27	8.28	0.0145
BLOQUE D	D1	**D11**	10.00	3.50	7.90	0.0100
		D12	11.50	3.44	8.15	0.0115
		D13	12.00	3.30	8.17	0.0120
	D2	**D21**	13.50	3.15	7.95	0.0135
		D22	14.75	3.25	8.30	0.0148
		D23	15.00	3.27	8.29	0.0150
	D3	**D31**	11.45	3.4	8.10	0.0115
		D32	13.5	3.27	8.28	0.0135
		D33	15.00	3.25	8.3	0.0150
VOLUMEN DE SUSTRATO EN RELACIÓN AL TIEMPO			**10g**	**TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA**		**85 Horas**

TITULACIONES			VOLUMEN DE NAOH GASTADO EN mL	MEDIDA DE pH INICIAL	MEDIDA DE pH AL AGREGAR NaOH	TRANSFROMACIÓN DEL VOLUMEN DE NaOH
			Rango: 15.00 - 20.00	**Rango: 3.25 - 2.50**	**Rango: 7.90 - 8.30**	**mL a L**
BLOQUE A	A1	**A11**	16.50	3.13	7.95	0.0165
		A12	17.00	2.90	8.00	0.0170
		A13	15.50	3.27	7.90	0.0155
	A2	**A21**	18.00	2.80	8.10	0.0180
		A22	18.50	2.75	8.15	0.0185
		A23	17.00	2.90	8.00	0.0170
	A3	**A31**	17.65	2.83	8.07	0.0177
		A32	18.75	2.78	8.08	0.0188
		A33	17.95	2.95	8.09	0.0180
BLOQUE B	B1	**B11**	19.00	2.70	8.20	0.0190
		B12	19.25	2.65	8.22	0.0193
		B13	19.50	2.60	8.25	0.0195
	B2	**B21**	20.00	2.50	8.30	0.0200
		B22	18.15	2.79	8.13	0.0182
		B23	19.25	2.65	8.27	0.0193
	B3	**B31**	19.00	2.70	8.20	0.0190
		B32	18.75	2.78	8.15	0.0188
		B33	20.00	2.50	8.30	0.0200
BLOQUE C	C1	**C11**	19.00	2.70	8.20	0.0190
		C12	19.75	2.55	8.27	0.0198
		C13	20.00	2.50	8.30	0.0200
	C2	**C21**	19.00	2.70	8.20	0.0190
		C22	18.75	2.78	8.15	0.0188

		C23	19.90	2.52	8.29	0.0199
	C3	**C31**	19.50	2.60	8.25	0.0195
		C32	19.75	2.55	8.27	0.0198
		C33	19.85	2.53	8.28	0.0199
BLOQUE D	D1	**D11**	19.15	2.62	8.20	0.0192
		D12	20.00	2.50	8.30	0.0200
		D13	19.75	2.53	8.28	0.0198
	D2	**D21**	19.50	2.55	8.25	0.0195
		D22	19.75	2.53	8.29	0.0198
		D23	20.00	2.50	8.30	0.0200
	D3	**D31**	19.90	2.51	8.29	0.0199
		D32	20.00	2.50	8.30	0.0200
		D33	19.85	2.52	8.28	0.0199
VOLUMEN DE SUSTRATO EN RELACIÓN AL TIEMPO			**5g**	**TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA**		**150 Horas**

ANEXO V. Valores de los puntos máximos de producción de fermentación a las 150 horas

TRATAMIENTO	VOLUMEN FINAL DE NaOH	pH
INICIO	25	4.50
A 150 HORAS	15.50	3.27
	16.50	3.13
	17.00	2.90
	17.00	2.90
	17.65	2.83
	17.95	2.95
	18.00	2.80
	18.50	2.78
	18.75	2.75
B 150 HORAS	18.15	2.79
	18.75	2.78
	19.00	2.70
	19.00	2.70
	19.25	2.65
	19.25	2.65
	19.50	2.60
	20.00	2.50
	20.00	2.50
C 150 HORAS	18.75	2.78
	19.00	2.70

	19.00	2.70
	19.50	2.60
	19.75	2.55
	19.75	2.55
	19.85	2.53
	19.90	2.52
	20.00	2.50
D 150 HORAS	19.15	2.62
	19.50	2.55
	19.75	2.53
	19.75	2.53
	19.85	2.52
	19.90	2.51
	20.00	2.50
	20.00	2.50
	20.00	2.50

Fuente: Autor