



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE LA
MODULACIÓN DE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN CON *Aspergillus niger* A
PARTIR DE LACTOSUERO

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniero Biotecnólogo

AUTOR: YORLY DAVID CASTILLO GRANDA

TUTOR: Dr. JORGE BRAULIO AMAYA PINOS, PhD.

Cuenca - Ecuador

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Yorly David Castillo Granda con documento de identificación N° 0750011991, manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 10 de abril del 2024

Atentamente,



Yorly David Castillo Granda

0750011991

**CERTIFICADO CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Yorly David Castillo Granda con documento de identificación N° 0750011991, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Optimización de la concentración de ácido cítrico mediante la modulación de parámetros de fermentación con *Aspergillus niger* a partir de lactosuero”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero Biotecnólogo, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 10 de abril del 2024

Atentamente,



Yorly David Castillo Granda

0750011991

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Jorge Braulio Amaya Pinos con documento de identificación N° 0103444923, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE LA MODULACIÓN DE PARÁMETROS DE FERMENTACIÓN CON *Aspergillus niger* A PARTIR DE LACTOSUERO, realizado por Yorly David Castillo Granda con documento de identificación N° 0750011991, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 10 de abril del 2024

Atentamente,



Dr. Jorge Braulio Amaya Pinos, PhD.

0103444923

DEDICATORIA

Dedicado a la memoria imborrable de mi amado y admirable padre Franklin. Aunque no esté presente para disfrutar estos momentos, sé que desde allá arriba, su corazón rebosa de satisfacción y alegría por cada paso que doy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente...

A Dios por brindarme la valentía necesaria para luchar contra las adversidades y así poder cumplir una gran meta en mi vida.

A mi adorada madre Yuri y a mi leal hermano Roger. Este éxito lleva la esencia de nuestra unión y la gratitud por tenerlos en mi vida.

A mis abuelos, Lauro y Narcisa, les rindo homenaje como sólidos pilares de sabiduría y amor que han marcado mi camino.

A mis queridos tíos: Diana, Cristian, Jessica, Eduardo, Karla, Andrés y Bryan, por sus consejos, apoyo incondicional y afecto a lo largo de los años.

A mi querido amigo Andrés R., una persona excepcional con la que compartí momentos significativos e invaluable que dejaron una huella imborrable en mi vida.

Agradezco sinceramente al Ing. Jorge Amaya PhD por su valiosa guía y enseñanza durante el desarrollo de este trabajo investigativo.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ANOVA: análisis de varianza

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia

SP: suero puro

SS: suero suplementado

g: gramos

L: litros

h: horas

mm: milímetro

α -LA: α -lactoalbúmina

β -LG: β -lactoglobulina

mL: mililitro

rpm: revoluciones por minuto

t: temperatura Celsius

HE: hidrólisis enzimática

°C: grados Celsius

μ m: micrómetro

mbar: milibar

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Problema	2
1.2. Delimitación de estudio	4
1.3. Pregunta de investigación	4
1.4. Justificación	4
1.5. Objetivos	5
1.5.1. General	5
1.5.2. Específicos	5
1.6. Hipótesis	6
CAPÍTULO 2	7
2. MARCO DE REFERENCIA	7
2.1. Antecedentes	7
2.2. Lactosuero	8
2.2.1. Generalidades del Lactosuero	8
2.2.2. Tipos y composición porcentual del lactosuero	9
2.2.3. Impacto ambiental del lactosuero	10
2.3. Lactosa	10
2.3.1. Aplicación y aprovechamiento industrial de la lactosa	10
2.4. Ácido cítrico	11

2.4.1. Definición	11
2.4.2. Principales usos y aplicaciones del ácido cítrico.....	11
2.4.3. Ciclo del ácido cítrico	13
2.4.4. Producción a nivel industrial	14
2.4.5. Técnicas para detección y cuantificación de ácido cítrico	15
2.5. Fermentación	15
2.5.1. Técnicas de fermentación	15
2.6. Género <i>Aspergillus spp</i>	16
2.6.1. <i>Aspergillus niger</i>	16
2.6.2. <i>Aspergillus niger</i> como productora de ácido cítrico	17
2.6.3. Importancia de la morfología en fermentaciones.....	17
CAPITULO 3	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1. Diseño	19
3.2. Diseño experimental.....	19
3.2.1. Unidad experimental	19
3.2.2. Obtención de cepa madre de <i>Aspergillus niger</i>	20
3.2.3. Caracterización microscópica y macroscópica del hongo	20
3.2.4. Resiembra del hongo <i>Aspergillus niger</i> desde la cepa donada	21
3.2.5. Preparación del inóculo fúngico	22
3.2.6. Conteo de esporas de <i>Aspergillus niger</i>	23

3.2.7. Obtención y preparado del lactosuero	23
3.2.8. Fermentación.....	25
3.2.9. Método de Análisis	26
3.3.0. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para detección de ácido cítrico.....	27
CAPITULO 4	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1. Caracterización microscópica y macroscópica del hongo	29
4.2. Evaluación de los resultados obtenidos en la descomposición del sustrato en los diferentes tratamientos, mediante la aplicación de técnicas estadísticas para identificar la óptima producción de ácido cítrico	30
4.2.1 Producción de ácido cítrico día 1.....	30
4.2.2. Producción ácido cítrico día 2.....	32
4.2.3 Producción ácido cítrico día 5.....	33
4.2.4 Producción ácido cítrico día 6.....	35
4.2.5. Producción ácido cítrico día 7.....	36
4.3. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para detección de ácido cítrico.	38
4.4. Gráfico de series en el tiempo.	39
4.5. Discusión	40
CAPITULO 5	43
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43

5.1. Conclusiones	43
5.2. Recomendaciones	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
ANEXOS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del Krebs.....	14
Figura 2. Cepa de <i>Aspergillus niger</i> donada por el docente	20
Figura 3. Diagrama de proceso para la identificación de <i>Aspergillus sp</i>	20
Figura 4. Lavado de esporas y filtrado	22
Figura 5. Vista microscópica de la cámara de Neubauer	23
Figura 6. Pretratamiento del sustrato	25
Figura 7. Preparación de medios para la fermentación.....	26
Figura 8. Sal de citrato de sodio obtenido después de la titulación	26
Figura 9. Titulación potenciométrica del ácido cítrico	27
Figura 10. Método FTIR para detección de ácido cítrico en una muestra.....	28
Figura 11. Características microscópicas y macroscópicas	29
Figura 12. Krustal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 1	30
Figura 13. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos.	31
Figura 14. Krustal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 2	32
Figura 15. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos.	32
Figura 16. Krustal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 5.	33
Figura 17. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos.	34
Figura 18. Krustal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 6	35
Figura 19. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos	35
Figura 20. Krustal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 7	36
Figura 21. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos.	37
Figura 22. Espectros comparativos FTIR	38
Figura 23. Producción de ácido cítrico en diferentes días	39
Figura 24. Secciones de la cámara de Neubauer bajo microscopio.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición (%) del lactosuero dulce y lactosuero ácido.	9
Tabla 2. Principales aplicaciones del ácido cítrico.....	11
Tabla 3. Técnicas de fermentación con microorganismos.	15
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>Aspergillus spp.</i>	16
Tabla 5. Equipos para la resiembra <i>A. niger</i> en laboratorio.	21
Tabla 6. Equipos para lavado de esporas con <i>A. niger</i> en laboratorio.	22
Tabla 7. Equipos para hidrólisis enzimática del lactosuero en laboratorio	24
Tabla 8. Suplementos utilizados para la fermentación.	25
Tabla 9. Equipos, materiales y reactivos utilizados para cuantificar ácido cítrico.....	27
Tabla 10. Producción de ácido cítrico por acción de <i>A. niger</i> en el día 1.	31
Tabla 11. Producción de ácido cítrico por acción de <i>A. niger</i> evaluado en el día 2.....	33
Tabla 12. Producción de ácido cítrico por acción de <i>A. niger</i> evaluado en el día 5.....	34
Tabla 13. Producción de ácido cítrico por acción de <i>A. niger</i> evaluado en el día 6.....	35
Tabla 14. Producción de ácido cítrico por acción de <i>A. niger</i> evaluado en el día 7.....	37
Tabla 15. Condiciones para la optimización de la producción de ácido cítrico	40
Tabla 16. Diseño experimental aplicado al presente estudio.	55
Tabla 17. Definición de variables.....	56
Tabla 18. Concentraciones totales de ácido cítrico del día 1,2,5,6 y 7 a 25 °C.....	56
Tabla 19. Concentraciones totales de ácido cítrico del día 1,2,5,6 y 7 a 30 °C.....	57
Tabla 20. mL de NaOH titulado en las alícuotas fermentadas a 25°C del día 1,2,5,6 y 7.....	58
Tabla 21. mL de NaOH titulado en las alícuotas fermentadas a 30°C del día 1,2,5,6 y 7.....	59

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I. Conteo de esporas en cámara de Neubauer y preparación de inóculos a concentraciones de 7.8×10^5 esporas/mL.....	53
ANEXO II. Estandarización de NaOH con HCl.....	54
ANEXO III. Diseño Experimental Completamente al Azar no paramétrico.....	55
ANEXO IV. Variables de estudio para la optimización de ácido cítrico.....	56
ANEXO V. Concentraciones finales de ácido cítrico mediante titulación por triplicado.	56
ANEXO VI. Promedio de NaOH gastado en cada uno de los tratamientos sometidos a titulación por triplicado.....	58

RESUMEN

Este estudio se centra en la obtención de ácido cítrico a nivel de laboratorio mediante la fermentación utilizando el hongo filamentosos *Aspergillus niger*. Se empleó como sustrato lactosuero al cual se le adicionó un inóculo de 7.8×10^5 esporas/mL del hongo para llevar a cabo la fermentación por lotes. Para llevar a cabo este estudio, se implementó un experimento con un diseño completamente al azar (DCA) no paramétrico. Este diseño incluye un tratamiento de entrada que se relaciona con el sustrato sin suplemento y el sustrato suplementado (fosfato mono potásico y lactosa).

Además, se calcularon las variables de respuesta, como la concentración de ácido cítrico. Los resultados indican que con el tratamiento 4 con suplementos a una temperatura de 25 °C con un pH 2 se obtuvieron 17.29 g/L de ácido cítrico. Se concluye que la temperatura y un sustrato enriquecido con lactosa, carbono y sales minerales son fundamentales para la producción de ácido cítrico a nivel de laboratorio. Además, se observa que la cepa de *Aspergillus niger* produce mayores cantidades de ácido cítrico en medios con un mayor porcentaje de lactosa.

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

ABSTRACT

This study focuses on the production of citric acid at laboratory level by fermentation using the filamentous fungus *Aspergillus niger*. The substrate used was whey to which an inoculum of 7.8×10^5 spores/mL of the fungus was added to carry out the batch fermentation. To carry out this study, an experiment with a non-parametric completely randomised design (CRD) was implemented. This design includes an input treatment that relates to the unsupplemented substrate and the supplemented substrate (mono potassium phosphate and lactose).

In addition, response variables such as citric acid concentration were calculated. The results indicate that treatment 4 with supplementation at a temperature of 25 °C and pH 2 yielded 17.29 g/L citric acid. It is concluded that temperature and a substrate enriched with lactose, carbon and mineral salts are essential for citric acid production at laboratory level. Furthermore, it is observed that the *Aspergillus niger* strain produces higher amounts of citric acid in media with a higher percentage of lactose.

Keywords: *Aspergillus niger*, whey, pH, temperature, citric acid.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Durante la producción de queso, se genera un subproducto líquido conocido como lactosuero, el cual representa entre el 85% y el 90% del volumen de la leche original. Este componente retiene aproximadamente el 55% de los nutrientes originales de la leche, incluyendo proteínas, lípidos, vitaminas solubles, minerales y carbohidratos (Jesus et al., 2015).

El lactosuero es un líquido amarillo verdoso que se obtiene al elaborar queso utilizando leche como materia prima. Su calidad, composición porcentual y concentración dependen de las características de la leche utilizada y el tipo de queso elaborado. En este líquido se encuentran presentes proteínas globulares como la β -lactoglobulina (β -LG; ~50% p/p), α -lactoalbúmina (α -LA; ~20% p/p), inmunoglobulinas (IgG; ~10% p/p) y seroalbúmina (BSA; ~6% p/p) (Rivas & Chávez-Martínez, 2017).

En las últimas décadas, ha habido un creciente interés por aprovechar este residuo para la producción de biomasa y compuestos orgánicos, como lo es el ácido cítrico. El ácido cítrico se lo encuentra en la gran mayoría de frutas tipo cítricas y se lo reconoce como un ácido orgánico tricarbóxico. La fórmula molecular de este ácido orgánico es $C_6H_8O_7$ y su nombre cedido por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) es ácido 2-hidroxil, 2, 3-propanotricarbóxico. Al poseer características acidulantes y preservar el sabor original de algunos productos, conjuntamente con la consistencia, es un bioproducto que tiene alta demanda a nivel mundial (Navarro et al., 2016).

Existe una variedad de microorganismos productores de este ácido orgánico, entre ellos destacan bacterias, levaduras y mohos. Según Velásquez et. al (2010), se ha identificado que varios géneros de microorganismos tienen la capacidad de producir y acumular ácido cítrico.

Estos géneros incluyen *Aspergillus*, *Citromyces*, *Penicillium*, *Monilia*, *Candida* y *Pichia*. Sin embargo, se ha observado que las especies de *Aspergillus* negros, como *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*, son las más utilizadas en la producción de ácido cítrico. En este contexto, el presente estudio pretende usar el lactosuero como fuente de carbono para la producción de altas concentraciones de ácido cítrico, utilizando una cepa del hongo filamentoso *Aspergillus niger* en fermentación sumergida, con la finalidad de aprovechar al máximo y minimizar los efectos contaminantes producidos por este subproducto de las industrias lácteas.

La investigación actual aborda la influencia de factores como la temperatura, pH y la adición de lactosa, y fosfato mono potásico sobre un sustrato de lactosuero para la producción de ácido cítrico mediante la actividad del hongo *Aspergillus niger*. Este hongo filamentoso tiene la capacidad de prosperar en medios de cultivo que contengan sacáridos y sales minerales, lo que facilita su propagación.

1.1.Problema

La problemática del excedente de suero de leche en la industria quesera de Ecuador constituye un desafío de considerable magnitud, con repercusiones significativas tanto desde una perspectiva medioambiental como socioeconómica. Según información respaldada por la Cámara de Comercio de Guayaquil (2019), de cada 100 litros de leche utilizados en la producción de queso, se obtienen 90 litros de suero de leche, un subproducto que retiene el 55% de los nutrientes presentes en la leche original. En el contexto ecuatoriano, esta industria genera una cantidad sustancial de suero de leche, aproximadamente 1.2 millones de litros al día, lo cual sería suficiente para alimentar a 120,000 personas diariamente.

A nivel global, el lactosuero, un subproducto de la industria láctea, se destina mayormente a la industrialización (70%), mientras que el 30% restante se emplea como alimento para animales o fertilizante. A pesar de la falta de datos detallados regionales, se

destaca su valor nutricional, ya que conserva el 50% de los nutrientes de la leche. En Ecuador, su desecho es común debido a altos costos de tratamiento. De las 67 industrias lácteas registradas, solo cinco han invertido entre \$6'000.000 y \$10'000.000 en maquinaria para procesar el lactosuero y diversificar su gama de productos (Granda, 2018).

Este desecho industrial es arrojado como efluente, el cual ocasiona un preocupante problema ambiental, esto se debe a que primero actúa sobre los suelos deteriorándolos de manera física y químicamente estructural. Por ende, los suelos dejan de ser productivos afectando el crecimiento de diversas especies de plantas. Por otro lado, al arrojar este líquido a diferentes cuerpos de agua, la vida acuática se ve afectada, ya que, se agota el oxígeno debido a la alta demanda de DBO (Araujo Guerra et al., 2013).

Macwan et al. (2016) destacaron que el suero de leche, un efluente orgánico altamente concentrado, plantea serias preocupaciones medioambientales si no se maneja de manera adecuada. Se estima que cada 1,000 litros de lactosuero vertidos en cuerpos de agua generan aproximadamente 35 kg de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de Demanda Química de Oxígeno (DQO). Esta carga contaminante es equiparable a las aguas residuales generadas en un día por 450 personas (Bermejo, 2010).

En Ecuador, diferencias significativas en el precio y el uso del suero de leche en comparación con la leche han generado tensiones en la industria láctea. Un acuerdo interministerial permitió la incorporación del suero en productos lácteos, lo que, según Francis Abad de la Federación de Productores Lecheros del Ecuador en Pichincha, ha beneficiado a las grandes industrias a expensas de los productores. El bajo costo del suero, que varía entre USD 0.02 y USD 0.07 por litro en comparación con los USD 0.42 por litro de la leche, ha disminuido su valor en el mercado, con ventas tan bajas como USD 0.16 debido a la baja demanda. Esto

ha llevado a preocupaciones sobre la viabilidad de los productores y posibles riesgos para la salud pública (Pinchao, 2022).

La carga orgánica predominante, compuesta por lactosa, grasas y proteínas (Prado et al., 2018), también está vinculada al aumento de la salinidad en los suelos cuando se utiliza como fertilizante. Este fenómeno, a su vez, conlleva a una reducción en el rendimiento de los cultivos agrícolas. La falta de enfoques sostenibles en su gestión lo convierte en un factor significativo de contaminación en la industria láctea.

1.2. Delimitación de estudio

El presente estudio limitó la recolección de lactosuero residual ubicado en la parroquia de Zhoray ubicada en el Noroeste de Azogues, a una altura de 2494 msnm, con coordenadas SUR 02°34'27" y OESTE 78°38'54", Cuenca-Ecuador. Es de gran importancia explicar que el estudio tiene como sustrato el lactosuero, subproducto de la elaboración de queso.

1.3. Pregunta de investigación

¿Cómo modular los parámetros de fermentación para obtener la mayor concentración de ácido cítrico?

1.4. Justificación

Este estudio se basa en el aprovechamiento de residuos agroindustriales como sustratos ricos en carbono, lo cual no solo contribuye a la reducción de la contaminación ambiental, sino que también mejora la rentabilidad de los productos biotecnológicos. Como profesionales en el campo de la biotecnología, nos enfocamos en impulsar el desarrollo sostenible y proponer soluciones innovadoras, justificando así la realización de esta investigación.

El lactosuero, a menudo descartado por la industria láctea en grandes cantidades, es una valiosa fuente de carbono que, en combinación con el hongo *Aspergillus niger*, produce metabolitos secundarios, como el citrato, que finalmente se transforma en ácido cítrico. El

enfoque principal de este proyecto es perfeccionar los parámetros necesarios para lograr una alta concentración de ácido cítrico a nivel de laboratorio, haciendo uso de técnicas de fermentación. La visión de este proyecto es permitir que la comunidad en general pueda adoptar y llevar a cabo esta metodología a nivel industrial.

Es importante destacar que el ácido cítrico desempeña un papel crucial en diversas industrias como agente acidulante y conservante, así como en la prevención de turbidez. Su versatilidad lo convierte en un componente esencial en la producción de refrescos y bebidas, añadiendo sabor y acidez. Por lo tanto, la alta demanda de ácido cítrico en Ecuador ha llevado a la importación de este producto desde varios países, lo que implica costos significativos.

La dependencia de las importaciones de ácido cítrico en el país ha suscitado un fuerte interés en la búsqueda de alternativas para establecer una producción nacional. Esta iniciativa no solo persigue satisfacer las necesidades internas, sino que también podría generar un cambio en la estructura económica del Ecuador al impulsar la creación de nuevas industrias y promover el desarrollo económico.

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Evaluar la concentración de ácido cítrico mediante la optimización de parámetros de fermentación a partir de una cepa de *Aspergillus niger* en sustratos de lactosuero para el establecimiento de una mejor producción.

1.5.2. Específicos

Identificar el hongo filamentoso *Aspergillus niger* por medio de técnicas de caracterización macroscópica y microscópica para su uso en procesos fermentativos.

Aplicar un sistema de fermentación a nivel de matraz agitado para la comparación de concentraciones del ácido bajo diferentes condiciones.

Determinar los parámetros óptimos para la mayor concentración de ácido cítrico a través del análisis estadístico de los datos experimentales estableciendo condiciones eficientes.

1.6. Hipótesis

Al optimizar los parámetros de fermentación utilizando *Aspergillus niger* y lactosuero como sustrato, se logrará una mayor concentración de ácido cítrico.

CAPÍTULO 2

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1. Antecedentes

La fabricación de ácido cítrico tiene una larga trayectoria y constituye uno de los campos más explorados en el ámbito de la biotecnología. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha investigado exhaustivamente el mecanismo responsable de la sobreproducción de este compuesto. En el ámbito industrial actual, la obtención de ácido cítrico se realiza a través de la fermentación sumergida utilizando sustratos ricos en azúcares (Alekseev et al., 2015). Por esta razón, la mayoría de los estudios y análisis revisados se centran en mejorar la producción de ácido cítrico utilizando esta cepa. Algunos de los trabajos investigativos realizados con *A. niger* lactosuero como sustrato incluyen las investigaciones de Toro et al. (2004), Leal et al. (2011) y Concha (2014).

Investigaciones centradas en la obtención de ácido cítrico por fermentación sumergida con *Aspergillus*, utilizando lactosuero como sustrato, proporcionan antecedentes valiosos para la presente tesis. En dicha investigación, se evaluaron diferentes cepas de hongos, incluyendo *A. carbonarius* NRRL 368, *Aspergillus carbonarius* NRRL 67 y *A. niger* NRRL 3, y se seleccionaron condiciones óptimas, como el uso de suero de leche desproteínizado y lactosa hidrolizada, para maximizar la producción de ácido cítrico. En la primera cepa se obtuvo una concentración máxima de 11.15 g/L, en la segunda cepa 7.58 g/L y en la última 5.77 g/L (Toro et al., 2004).

En Colombia un estudio se enfocó de manera específica en la variación del sustrato utilizando *Aspergillus niger* 765 para la fermentación de suero lácteo entero y suero hidrolizado, ambos previamente desproteínizados. Durante este proceso, se adicionaron 48 mg de $NH_4H_2PO_4$ a lo largo de ocho días de fermentación, logrando concentraciones de ácido

cítrico de 9.9 g/L y 9.6 g/L, respectivamente. El análisis concluyó que ambas condiciones generan niveles semejantes de ácido cítrico, resaltando la capacidad de esta especie para desdoblar la lactosa de manera autónoma. La diferencia más notable observada fue un aumento en la producción de biomasa en el suero hidrolizado, alcanzando 15.2 g/L, atribuido a una mayor disponibilidad de glucosa (Leal et al., 2011).

En Perú, en una investigación se establecieron como variables la fuente carbonada (suero entero y suero desproteínizado suplementados con 250 mL de caldo de adaptación) y la temperatura, variando entre 20 °C y 30 °C, para llevar a cabo la fermentación sumergida con *Aspergillus niger* en un biorreactor tipo batch. Como resultado, se logró alcanzar una concentración máxima de ácido cítrico de 3.4390 g/L en suero desproteínizado suplementado a 30 °C en un periodo de ocho días. Las condiciones iniciales incluyeron un pH de 6, aireación a 1 vvm y agitación a 300 rpm (Concha, 2014).

Además, se siguen investigando otro tipo de sustratos que cumplan con el objetivo de obtención de ácido cítrico como el bagazo de caña (Rodríguez et al., 2019; Tuquerres et al., 2019; Muñoz, 2023), cascara de papa (Fonseca, 2019; Andrade y Bastidas, 2020) duraznos (Bayona, 2019) estos constituyen ejemplos de sustratos empleados en los que se han alcanzado rendimientos satisfactorios en la producción, al mismo tiempo que se han reutilizado residuos de otros procedimientos industriales. En la mayoría de los casos, cepas de *A. niger* son empleadas para llevar a cabo esta fermentación, aunque se ha constatado que otros microorganismos de diversas especies pertenecientes a géneros como *Talaromyces*, *Eupenicillium*, *Acremonium*, *Ascochyta*, *Ustilina*, *Mucor*, *Trichoderma*, *Botrytis*, *Absidia* y *Penicillium* también tienen la capacidad de acumular ácido cítrico (Torrado et al., 2011).

2.2.Lactosuero

2.2.1. Generalidades del Lactosuero

La cantidad y composición del suero lácteo varían considerablemente debido a varios factores, como: 1) El tipo de queso (4 L/kg de queso en quesos frescos y hasta 11,3 L/kg de queso para quesos madurados); 2) El tratamiento térmico de la cuajada, que puede reducir el porcentaje de proteína del suero resultante; 3) la forma de coagulación (ácida o enzimática) y 4) el tipo de cuajo empleado (microbiano, quimosina o mezclas quimosina/pepsina), que puede contribuir al sabor amargo residual del suero lácteo debido a la inactivación incompleta de las enzimas proteolíticas (Ramírez-Navas et al., 2018).

2.2.2. Tipos y composición porcentual del lactosuero

Existen dos tipos de lactosuero, el cual uno de ellos es el dulce. Se lo obtiene a través de la coagulación enzimática de la leche, con un pH elevado y un mayor contenido de proteínas, lactosa y lípidos, pero con menos calcio y fósforo. El suero dulce se genera durante la coagulación enzimática de la leche y tiene generalmente un pH de 5.6 (López-Barreto et al., 2018).

Por otro lado, el lactosuero ácido es aquel líquido restante obtenido después de la coagulación ácida o láctica de la caseína. Tiene un pH cercano a 4,5 debido a la producción de ácido láctico y contiene un alto contenido de minerales, que constituyen más del 80% de los minerales presentes en la leche inicial (Ramírez-Navas et al., 2018).

Tabla 1. *Composición (%) del lactosuero dulce y lactosuero ácido.*

Componente	Suero dulce	Suero ácido
% agua	93-94	94-95
% materia seca	5-6	5-6
% lactosa	4.5-5	3.8-4.3
% ácido láctico	Trazas	0.8
% proteína total	0.8-1.0	0.8-1.0

% proteína de suero	0-6-0.65	0.6-0.65
% ácido cítrico	0.1	0.1
% minerales	0.5-0.7	0.5-0.7
% pH	6.2-6.4	4.6-5

Fuente: Tomado de Tsakali et al. (2010, p. 2)

2.2.3. Impacto ambiental del lactosuero

En el Ecuador se generan alrededor de 5'000.000 de litros de leche diarios, en donde una cuarta parte es destinada a la producción de quesos por las industrias, siendo así que se obtiene 1.2 millones litros de lactosuero diariamente, en donde la gran mayoría de este líquido es desechado a cuerpos de agua cercanos.

La alta necesidad biológica de oxígeno, que oscila entre 35.000 y 45.000 mg/L, y la alta necesidad química de oxígeno, que oscila entre 60.000 y 80.000 mg/L, hacen que el suero de leche sea una alta fuente de contaminación (Gómez Soto & Sánchez Toro, 2022).

2.3.Lactosa

La lactosa [4-O-β-galactopiranosil-D-glucopiranosil] de fórmula química [$C_{12}H_{22}O_{11}$], es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa y otra molécula de galactosa, mediante un enlace β [1,4]. Este disacárido es el mayor componente presente en los sólidos de la leche de vaca (Gómez Soto & Sánchez Toro, 2022).

Es el mayor componente presente en el lactosuero, y posee propiedades como un gran edulcorante, baja higroscopicidad, alta solubilidad en agua y es de gran aporte nutritivo. Además, es usada como: excipiente farmacéutico, en leches maternizadas, en la industria alimenticia para soporte de sopas, y en la industria química como la creación de espumas de poliuretano (Ramírez-Navas, 2015).

2.3.1. Aplicación y aprovechamiento industrial de la lactosa

El uso de la lactosa del suero como sustrato para la fermentación microbiana industrial puede transformar un contaminante potencial en un producto de valor añadido y esta perspectiva merece un estudio intensivo. La eliminación económica del suero se ha convertido en un problema mundial para la industria láctea. La lactosa, un disacárido utilizable por muchas cepas microbianas, es el principal contribuyente a la DBO y la DQO del suero (Meng et al., 2020).

2.4. Ácido cítrico

2.4.1. Definición

El ácido cítrico es considerado como un ácido natural, no obstante, es posible generar este compuesto de forma artificial en el laboratorio. Se trata de un ácido orgánico que está presente en la mayoría de frutas cítricas, así como en el sistema óseo, sistema muscular y sistema circulatorio de animales (Muñoz-Villa et al., 2014).

Según García y Tovar (2022), el ácido cítrico, es un ácido débil que en su forma pura es soluble en agua y no presenta color alguno, siendo su fórmula química 2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxílico [$C_6H_8O_7H_2O$].

A nivel y producción industrial en la industria, el ácido cítrico adopta la forma de un polvo cristalino de tonalidad blanca, careciendo de un aroma discernible y exhibiendo un sabor notablemente ácido (Navarro et al., 2016).

2.4.2. Principales usos y aplicaciones del ácido cítrico

Tabla 2. Principales aplicaciones del ácido cítrico.

Bebidas	Ofrece acidez y realza los sabores de frutas y bayas, mejorando la eficacia de los conservantes antimicrobianos. Su empleo también se extiende al ajuste del pH con el fin de garantizar una acidez uniforme.
----------------	---

Jaleas, conservas y mermeladas	Ofrece acidez y permite la regulación del pH.
Dulces	Ofrece acidez, reduciendo la inversión de la sacarosa, y contribuye a la formación de un color oscuro en caramelos duros. Además, desempeña el papel de acidulante.
Fruta congelada	Reduce el pH con el objetivo de desactivar las enzimas oxidativas y preserva el ácido ascórbico al inactivar trazas de metales.
Productos lácteos	Actúa como emulsionante en la confección de helados y quesos procesados, desempeña un papel como agente acidificante en múltiples productos de queso, y cumple la función de antioxidante.
Grasas y aceites	Actúa como sinergista de otros antioxidantes, desempeñando la función de secuestrador.
Farmacia	Se utiliza como agente efervescente en la elaboración de polvos y comprimidos, especialmente en combinación con bicarbonatos. Facilita la rápida disolución de los ingredientes activos. Además, desempeña un papel como acidulante en formulaciones astringentes suaves y actúa como anticoagulante.
Cosméticos y artículos de tocador	Regulación del pH, función antioxidante actuando como un quelante metálico de litio y desempeño como agente buffer.
Aplicaciones industriales	Captador de iones metálicos, sustancia neutralizante y agente buffer.
Limpieza de metales	Elimina los depósitos de óxidos metálicos presentes en la superficie de metales ferrosos y no ferrosos mediante un proceso de limpieza que

	abarca la preparación y operación específica de los óxidos de hierro y cobre.
Otros	En aplicaciones diversas, textiles, reactivos fotográficos, hormigón, compuestos para galvanoplastia, limpieza de tabaco, chapado en botellas, tratamiento de pisos, cemento, moldes, curtido de yeso, materiales refractarios, impresión, adhesivos, fabricación de papel, polímeros, procesamiento de metales, residuos, entre otros.

Fuente: Tomado de Muñoz et al. (2014).

El ácido cítrico se presenta como un desinfectante altamente eficaz e inofensivo contra varios virus, incluido el norovirus humano. Por ejemplo, cuando se incorpora a partículas con características similares a las del norovirus, el citrato se une de manera precisa en el bolsillo de unión de los antígenos del grupo sanguíneo histo, que desempeñan un papel crucial en la conexión a los ligandos del huésped. Este proceso no solo previene la transmisión de dichos virus, sino que también reduce los síntomas en individuos que ya han contraído el norovirus (Koromyslova et al., 2015).

Debido a su efectividad como quelante de metales, el ácido cítrico se emplea extensamente en la limpieza de sitios industriales, incluidos aquellos contaminados con radionúclidos, así como suelos con metales pesados. La fracción cítrica facilita la eliminación de metales y mejora la desorción de compuestos orgánicos hidrofóbicos en el suelo. Investigaciones en China revelan que al combinar el ácido cítrico con biosurfactantes ramnolípidos, se logra una remediación ambiental sin precedentes en el suelo, superando otros métodos y promoviendo la restauración ecológica post-remediación (Ciriminna et al., 2017).

2.4.3. Ciclo del ácido cítrico

El ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico es fundamental en la oxidación de azúcares y acetatos a dióxido de carbono y agua, liberando energía en forma de ATP para

funciones fisiológicas (Verhoff & Bauweleers, 2014). Además, la síntesis de ácido cítrico [figura 1] ocurre al unir oxalacetato, un compuesto de cuatro carbonos, con acetil-CoA, que contribuye con dos carbonos, mediante la acción catalítica de la enzima citrato sintasa (Sanagustín, 2014). En condiciones favorables para el desarrollo celular, el ciclo de Krebs opera de manera constante, manteniendo bajos niveles de intermediarios para evitar acumulaciones que podrían resultar en un uso ineficiente de nutrientes. La estabilidad de este estado se logra mediante una precisa regulación de enzimas asociadas a las vías metabólicas conectadas al ciclo, controlando tanto la síntesis de proteínas como la actividad enzimática (Muñoz-Villa et al., 2014).

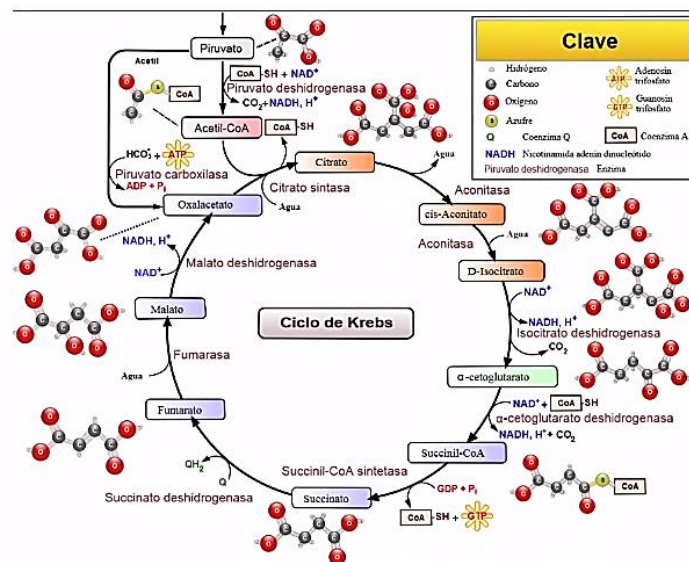


Figura 1. Ciclo del Krebs. Fuente: Tomado de Sanagustín (2014).

2.4.4. Producción a nivel industrial

Aunque el ácido cítrico puede ser fabricado en grandes cantidades a través de métodos de síntesis química, los costos involucrados en este proceso son considerablemente más altos en comparación con la producción mediante fermentación microbiana. En la actualidad, la técnica principal utilizada a nivel industrial para la producción de ácido cítrico implica la fermentación sumergida con la participación del hongo *Aspergillus niger* (Guerra et al., 2019).

2.4.5. Técnicas para detección y cuantificación de ácido cítrico

La detección del ácido cítrico se puede hacer de manera química al incorporar tres gotas de indicador verde de bromocresol en 10 mL de la muestra recolectada (Bakhiet & Al-Mokhtar, 2015). La evaluación cuantitativa de la producción de ácido cítrico puede llevarse a cabo utilizando diversas técnicas analíticas. Estas incluyen métodos como la espectrofotometría, la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida (HPLC), la resonancia magnética nuclear y el método clásico de titulación. Estos enfoques ofrecen diversas opciones para determinar con precisión la concentración de ácido cítrico en una muestra, brindando flexibilidad en la elección del método más adecuado para las necesidades específicas del análisis (Álvarez, 2017).

2.5. Fermentación

Existen tres técnicas distintas para llevar a cabo los procesos de fermentación con *A. niger*: fermentación sumergida (SmF), superficial (SF) y en estado sólido (SSF).

2.5.1. Técnicas de fermentación

Tabla 3. *Técnicas de fermentación con microorganismos.*

Fermentación sumergida	Es una técnica utilizada comúnmente y genera altos rendimientos de ácido cítrico. Se basa en el uso de dos tipos de fermentadores, el convencional con agitación y el de columna de aire. Este último brinda mayores ventajas por el precio, tamaño y funcionamiento.
Fermentación de superficie	Esta técnica requiere menos esfuerzo en la operación e instalación, y tiene costos de energía menores, aunque se necesita mayor mano de obra. Es importante proporcionar una circulación de aire eficaz en las diferentes cámaras de fermentación para tener el control de la temperatura y

humedad. Además, se debe tener condiciones asépticas, en especial los primeros días que germinan las esporas.

Fermentación en estado sólido Es una técnica que implica el crecimiento de microorganismos en partículas sólidas sin agua libre en el sistema. La velocidad de crecimiento es menor en comparación con la fermentación sumergida. Es un método que tiene ciertas limitaciones, por ello se aplican hongos en mayor preferencia.

Nota: Tomado de Navarro et al. (2016).

2.6. Género *Aspergillus spp*

El sacerdote italiano Pier Antonio Micheli, acuñó el término "*Aspergillus*" por primera vez en 1729, por lo que, este hecho se le reconoce como el punto de partida de la ciencia de la micología. La elección de este nombre se basó en las semejanzas entre un aspersor de agua bendita y la estructura asexual del hongo que posee esporas. El género *Aspergillus* se ubica en la división de hongos tipo "*Ascomycota*" englobando variedades de hongos filamentosos llamados como mohos (Wong et al., 2022).

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Aspergillus spp*.

Reino:	<i>Mycetae</i>
División:	<i>Ascomycota</i>
Subdivisión:	<i>Pezizomycotina</i>
Clase:	<i>Euascomycetes</i>
Orden:	<i>Eurotiales</i>
Familia:	<i>Aspergillaceae</i>
Género:	<i>Aspergillus</i>

Nota: Tomado de Padilla (2019).

2.6.1. *Aspergillus niger*

Como parte integral de diversas comunidades, el papel que desempeña *A. niger* en el ciclo global del carbono es de gran relevancia. Este organismo, presente en el suelo, cuenta con una amplia variedad de enzimas, tanto oxidativas como hidrolíticas, que juegan un papel fundamental en la dinámica del carbono a nivel mundial. Estas enzimas también están involucradas en la descomposición de la vegetación lignocelulosa (Scott, 2006).

El *Aspergillus niger* destaca por su capacidad para producir una amplia gama de productos comerciales, entre ellos ácidos, proteínas, enzimas y fármacos. Esto se debe a su maquinaria de fusión altamente adaptable. Este moho es conocido por su capacidad para secretar una variedad de enzimas y otras moléculas industriales importantes, además de su capacidad para producir ácido cítrico, lo que lo convierte en un generador productivo de compuestos que generan interés en varias industrias (García y Tovar, 2022).

2.6.2. *Aspergillus niger* como productora de ácido cítrico

La capacidad natural de *Aspergillus niger* para secretar ácidos orgánicos y enzimas le ha llevado a convertirse en un organismo industrial establecido y actualmente es la principal fuente mundial de ácido cítrico. La especie pertenece al grupo conocido como *Aspergilli*, que incluye más de 300 especies (Upton et al., 2020).

En la actualidad, cifras recientes indican que se generan más de 350,000 toneladas de ácido cítrico al año, y esta producción es realizada a través de procesos de fermentación. Resulta interesante observar que *A. niger* continúa siendo prácticamente el único organismo empleado para este propósito, a pesar de que se han realizado numerosas investigaciones con el objetivo de identificar otros microorganismos o cepas (Kubicek et al., 1985).

2.6.3. Importancia de la morfología en fermentaciones

El control de la morfología del micelio en las fermentaciones es a menudo un requisito previo para la aplicación industrial. En algunos procesos, se requieren micelios libres para

aumentar la productividad, como en la producción de penicilina a partir de *Penicillium chrysogenum*. Mientras que en otros procesos se requieren pellets o células inmovilizadas según informes sobre ácidos itacónico y cítrico, algunas enzimas fúngicas, como la poligalacturonidasa o la α -glucosidasa, o biotransformaciones de esteroides (Papagianni & Matthey, 2006).

CAPITULO 3

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño

El diseño utilizado para esta investigación es de tipo experimental, debido a que se desea demostrar que la modulación de parámetros de fermentación, específicamente el pH y temperatura, tienen una alta influencia en cuanto a optimizar la concentración de ácido cítrico en un sustrato fermentado, que en este caso es el lactosuero, mediante la ayuda de nuestro microorganismo protagonista *Aspergillus niger*.

Se considera que la investigación se clasifica como un diseño experimental puro longitudinal, debido a que, se busca establecer un control estricto sobre las variables independientes, permitiendo la observación de sus efectos directos en la variable dependiente, que es la concentración de ácido cítrico. La utilización de *A. niger* como microorganismo en el proceso de fermentación contribuye a garantizar la reproducibilidad y consistencia de los resultados, consolidando así la validez interna de la investigación.

El estudio se organiza en tres fases, las cuales incluyen el proceso de aislamiento de la cepa fúngica, la fermentación del lactosuero con diversos tratamientos, y la posterior identificación de los parámetros óptimos para la mayor concentración de ácido cítrico.

Estas fases se llevaron a cabo en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, ubicados en la sede de Cuenca, Campus El Vecino.

3.2. Diseño experimental

3.2.1. Unidad experimental

Se usó 200ml de lactosuero el cual fue inoculado con una densidad de 7.8×10^5 esporas/mL aproximadamente.

3.2.2. Obtención de cepa madre de *Aspergillus niger*

Se obtuvo una cepa del hongo protagonista de nuestro estudio, *Aspergillus niger*. Fue donado por parte del Dr. Ernesto Delgado, docente de planta del Área Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana en la ciudad de Cuenca, campus- El Vecino.



Figura 2. Cepa de *Aspergillus niger* donada por el docente. Fuente: Autor.

3.2.3. Caracterización microscópica y macroscópica del hongo

La identificación de las especies fúngicas se llevó a cabo mediante la observación de características macroscópicas y microscópicas de los cultivos aislados. La evaluación macroscópica se realizó a simple vista, focalizándose en el color y la forma de crecimiento de los micelios como lo sugiere el estudio de Luna (2010) e Hidalgo (2022) . Por otro lado, las características microscópicas para identificar el hongo se basaron en la investigación de Salazar & Rua (2012), siguiendo la metodología del proceso para identificación de *A. niger* planteada por Ramírez (2023). Estos detalles fueron fundamentales para determinar el género y la sección del espécimen examinado.

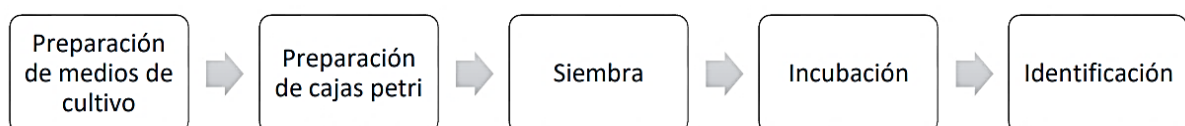


Figura 3. Diagrama de proceso para la identificación de *Aspergillus* sp. Fuente: Ramírez, (2023).

3.2.4. Resiembra del hongo *Aspergillus niger* desde la cepa donada

Se decide hacer una resiembra para obtener nuevos cultivos, con un mayor índice de viabilidad. Para ello se utilizó la metodología de siembra planteada por Concha (2014). Se sembraron con un asa de inoculación, colocando una pequeña muestra en 6 cajas Petri con agar Sabouraud, incubándose por 7 días a 35°C, obteniendo cultivos macroscópica mente semejantes a la figura 2.

Después de concluir las nuevas siembras con el objetivo de obtener cultivos puros en un lapso de 7 días, se llevó a cabo la identificación mediante la observación morfológica, siguiendo las pautas establecidas por la NOM-111-SSA1 (1994).

Tabla 5. Equipos, materiales y reactivos utilizados para la resiembra *A. niger* en laboratorio.

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Cabina de flujo laminar	Luna de reloj	Agar Sabouraud
Autoclave	Espátula	Agua destilada
	Matraz Erlenmeyer	Alcohol al 96%
	Probeta	
	Hornilla	
	Mechero	
	Cajas Petri	
	Asa de inoculación	
	Parafilm	
	Varilla	
	Fosforera	
	Papel Aluminio	
	Algodón	

Fuente: Autor

3.2.5. Preparación del inóculo fúngico

Con el fin de llevar a cabo el lavado de esporas como paso previo a la preparación del inóculo fúngico destinado a la fermentación sumergida (SmF), se transfirió dos cepas maduras de *A. niger* desde la caja Petri a un matraz Erlenmeyer de 250 mL para facilitar el proceso de lavado.

El inóculo fue generado mediante el lavado de esporas procedentes de la cepa de *A. niger* resembrada en las cajas Petri con agar Sabouraud durante siete días anteriormente. La suspensión del inóculo se preparó mediante cinco lavados del cultivo con 10 mL de suero fisiológico, agitando el matraz de manera enérgica para desprender la mayor cantidad posible de esporas, como se ilustra en la figura 4.

Según la metodología aplicada por Rosales (2019) la suspensión fue filtrada mediante una gasa estéril con el objetivo de retener hifas o fragmentos del cultivo que pudieron desprenderse durante el proceso de agitación. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando los equipos, materiales y reactivos detallados en la tabla 6.



Figura 4. Lavado de esporas y filtrado. Fuente: Autor.

Tabla 6. Equipos, materiales y reactivos utilizados para lavado de esporas con *A. niger* en laboratorio.

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Cabina de flujo laminar	Matraz Erlenmeyer	Suero fisiológico

Autoclave	Mechero Alcohol	Alcohol al 96%
	Asa de Digralsky	
	Fosforera	
	Pinzas	
	Embudo	
	Vaso de precipitación	

Fuente: Autor

3.2.6. Conteo de esporas de *Aspergillus niger*

Una vez completado el filtrado final, se procedió a realizar un conteo de esporas en la cámara de Neubauer (véase Anexo I). Se siguió las recomendaciones establecidas en el estudio de Concha (2014) para en este estudio obtener inóculos de 1 mL con una concentración de 7.8×10^5 esporas/mL, por lo que se se extrajo 1 mL de la suspensión y fue coloreada con Lactofenol para colocarse en la cámara de Neubauer. Se realizó el conteo en cuatro cuadrantes, como se ilustra en la figura 5, asegurándose de evitar contar las estructuras ubicadas sobre las líneas de referencia.

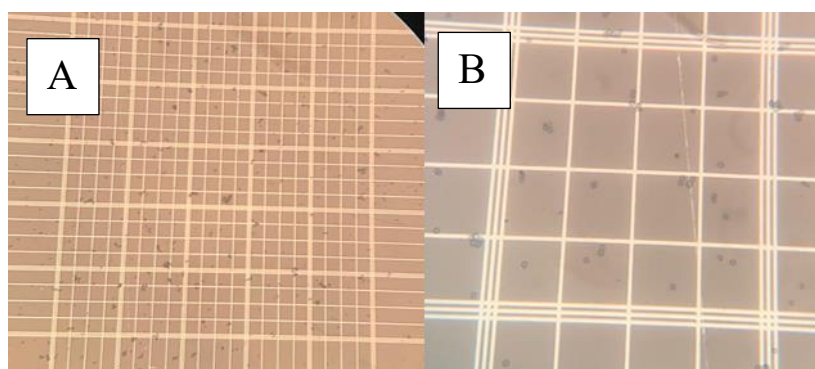


Figura 5. Vista microscópica de la cámara de Neubauer. A) Observación en lente de 10X. B) Observación en lente de 40X.

Fuente: Autor

3.2.7. Obtención y preparado del lactosuero

El lactosuero utilizado en el experimento, se recolectó de un microemprendimiento dedicado a la fabricación de quesos artesanales en la Parroquia de Zhoray- Azogues. Las muestras se recolectaron en un envase estéril de aproximadamente 5L y transportadas a los

laboratorios de Ciencias de la Vida en la Universidad Politécnica Salesiana Campus el Vecino. Fueron puestos en la nevera a los 1°C, manteniéndose refrigeradas para cuando se necesite utilizarlas durante el experimento.

El lactosuero que se utilizó fue pretratado mediante filtración, desnatado, pasteurizado a 72°C por 15 segundos y refrigerado a temperaturas por debajo de los 6°C acorde a lo sugerido por Muset & Castells (2017).

Se llevó a cabo una hidrólisis enzimática en cada uno de los tratamientos utilizando tabletas de Lactosintol comercial, donde cada una contiene 90 mg de enzima lactasa. Se disolvieron 6 tabletas en 18 mL de agua destilada para lograr una concentración de 30 mg/mL de lactasa. Luego con un potenciómetro se nivela a un pH de 6.5 todos los tratamientos para ejecutar una hidrólisis enzimática del 99.99%, para ello se añadió a cada uno de los tratamientos 1 mL de la dilución llevándose durante una hora en una incubadora con agitación a 100 rpm con una temperatura de 40°C. Posteriormente, todos los tratamientos a fermentar se esterilizaron mediante autoclave a 1 atmósfera, a 120 °C durante 20 minutos. Una vez alcanzada la temperatura ambiente, en los dos bloques de fermentación A y B se ajustaron los tratamientos a un pH de 2, 3 y 4, siguiendo las especificaciones del diseño experimental previamente establecido [ver ANEXO III].

Tabla 7. Equipos, materiales y reactivos utilizados para hidrólisis enzimática del lactosuero en laboratorio

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Incubadora con agitación	Mortero	Enzima lactasa comercial
Autoclave	Probeta	Agua destilada
Cabina de flujo laminar	Vaso de precipitación	Hidróxido de sodio
Equipo de filtrado vacío	Pipeta	Ácido sulfúrico
	Papel Filtro	

Medidor multiparamétrico	Matraces Erlenmeyer
METTLER TOLEDO	Film
SevenMulti	Cinta

Fuente: Autor

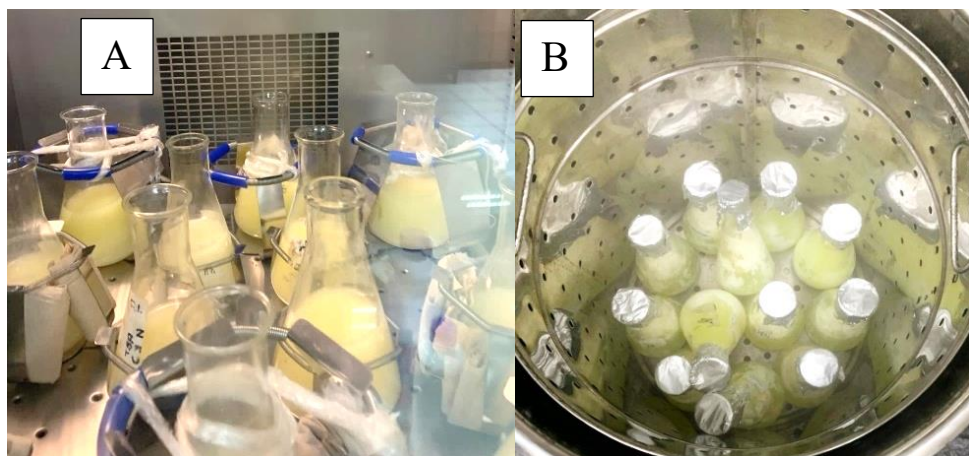


Figura 6. Pretratamiento del sustrato. A) HE durante 1 hora en incubadora con agitación a 100 rpm. B) Esterilización de los tratamientos. Fuente: Autor

3.2.8. Fermentación

El lactosuero fue sometido a un proceso de autoclave a una presión de 1 atmósfera y a una temperatura de 120 °C durante un lapso de 20 minutos. Luego, se procedió a la adición de los suplementos detallados en la tabla 8. En cada matraz se dispusieron tapones compuestos por algodón y aluminio, con el objetivo de facilitar la circulación de aire esencial para la fermentación aerobia, al mismo tiempo que se prevenía la posibilidad de contaminación. El proceso fermentativo fue ejecutado utilizando un conjunto de 9 matraces suplementados y 9 sin suplementar, inicialmente a una temperatura de 25 °C; posteriormente, se replicó el procedimiento a 30 °C. Cabe destacar que el pH de cada matraz fue predefinido en el diseño experimental [ANEXO III]. Este proceso se llevó a cabo en una incubadora con agitación a 200 rpm durante un periodo de 168 horas según lo planteado por Ramírez (2023).

Tabla 8. Suplementos utilizados para la fermentación.

Compuesto	Sin Suplemento	Con Suplemento
-----------	----------------	----------------

Lactosa	-	20 g
Fosfato mono potásico	-	1.5 g
Total	0	21,5 g

Fuente: Autor.

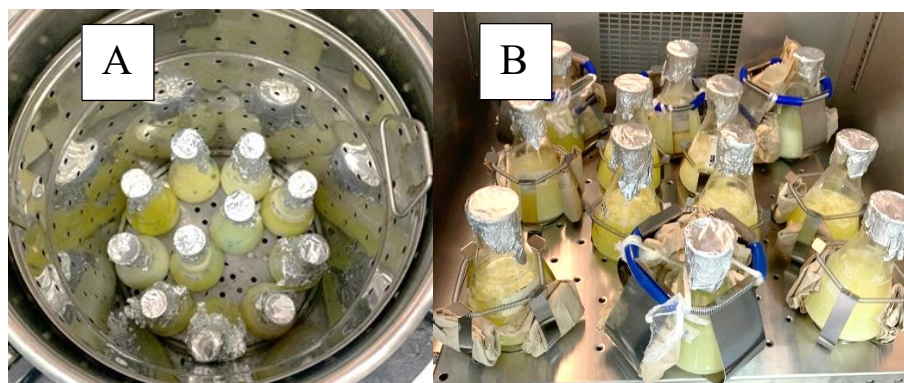


Figura 7. Preparación de medios para la fermentación. A) Autoclave con muestras luego de la HE. B) Acondicionamiento de muestras en incubadora con agitación. Fuente: Autor.

3.2.9. Método de Análisis

Se llevó a cabo un monitoreo continuo durante 168 horas, tomando muestras de los tratamientos el día 1, 2, 5, 6, 7, con el objetivo de supervisar la producción de ácidos orgánicos, expresados principalmente como ácido cítrico. Para cuantificar esta producción, se utilizó la técnica de titulación potenciométrica empleando una solución estandarizada de NaOH 0.1 N [ver ANEXO II]. A través de cálculos estequiométricos basados en la reacción representada en la figura 8, se determinó la concentración final de ácido.

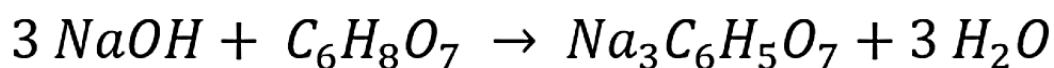


Figura 8. Sal de citrato de sodio obtenido después de la titulación. Fuente: Tomado de Rosales (2019, p.50).

Se extrajeron alícuotas de 10 mL de cada uno de los tratamientos, las cuales fueron posteriormente sometidas a centrifugación en tubos Falcon de 15 mL a una velocidad de 2500 rpm durante un periodo de 20 minutos. Se tomó de cada tubo una cantidad de 3 mL del sobrenadante, y cada 1 mL fue diluido con 9 mL de agua para la titulación por triplicado según las recomendaciones de Concha (2014), con NaOH 0.1 N estandarizado previamente [ver

ANEXO III]. La titulación se ejecutó añadiendo la base de manera gradual y removiendo la dilución con una pila magnética, controlando el pH hasta alcanzar niveles alcalinos de 8.3, mientras se registraba el volumen total de hidróxido de sodio gastado [véase ANEXO VI], según lo establecido por la Norma Mexicana de 1978.

Tabla 9. Equipos, materiales y reactivos utilizados para cuantificar ácido cítrico.

EQUIPOS	MATERIALES	REACTIVOS
Centrífuga	Micropipeta	Agua destilada
Medidor multiparamétrico	Tubos Falcon	NaOH 0.1 N
METTLER TOLEDO	Mechero	Fenolftaleína
SevenMulti	Pila magnética	Alcohol
Agitador magnético	Bureta	
Equipo para titulación	Vaso de precipitación	

Fuente: Autor.



Figura 9. Titulación potenciométrica del ácido cítrico. Fuente: Autor.

3.3.0. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para detección de ácido cítrico.

En el análisis FTIR, se añadió un estándar de ácido cítrico específico a la biblioteca del software OMNIC [figura 10A], ya que no se disponía de un estándar puro en la biblioteca existente, pues solo incluía derivados de dicho ácido. Tras incorporar un estándar sólido con

una pureza del 99.95%, se contrastó con una muestra del tratamiento 4 [figura 10B] ya que, previamente había mostrado una mayor concentración de ácido cítrico.

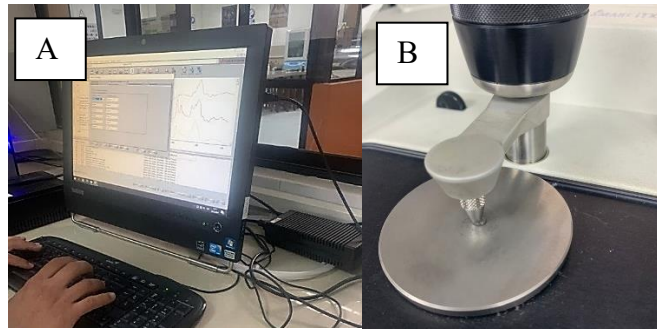


Figura 10. A) Adición del nuevo estándar al software OMNIC. B) Corrida de la muestra del tratamiento 4 (pH 2, 25 °C, día 7 y suplementado) para detección de ácido cítrico.

CAPITULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización microscópica y macroscópica del hongo

Se llevó a cabo un estudio micro y macro, en el cual se examinó la morfología de los conidióforos, a partir de tejido micelial teñido con azul de lactofenol

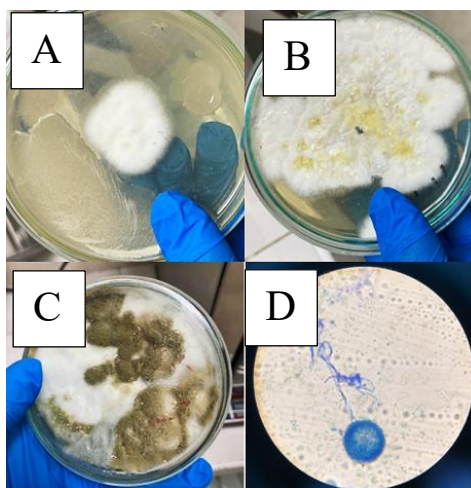


Figura 11. Características microscópicas y macroscópicas. A) Adverso de la colonia. B) Colonia en el día 4. C) Colonia madura a los 7 días. D) Conidiales de *Aspergillus niger*. Fuente: Autor.

Las colonias de *A. niger* obtenidas por resiembra cumplieron con las características presentadas por Salazar & Rua (2012), puesto que, en primera instancia las colonias tuvieron una apariencia blanco grisácea (11A) que en poco tiempo se tornó con pigmentos amarillentos (11B). Pronto, la colonia se cubrió de puntos de color oscuro que corresponden a las cabezas conidiales (11C). Estas cabezas presentan tonalidad café oscuro, dispuestas en dos filas con métulas y fiálides de color marrón oscuro que abarcan toda la vesícula. Los conidióforos fueron notables por su longitud, con una superficie lisa y oscura (11D).

Después de llevar a cabo las observaciones pertinentes, se llegó a la conclusión de que las características del espécimen estudiado concuerdan con la especie *Aspergillus niger*.

4.2. Evaluación de los resultados obtenidos en la descomposición del sustrato en los diferentes tratamientos, mediante la aplicación de técnicas estadísticas para identificar la óptima producción de ácido cítrico

Por consiguiente, se analizó estadísticamente las concentraciones de ácido cítrico obtenidas en los 12 tratamientos (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T9, T10, T11, T12) durante los días 1, 2, 5, 6 y 7, cada uno de ellos con sus respectivos parámetros de pH y temperatura según lo planteado en el diseño experimental [véase ANEXO III]. En el presente estudio se trata de una estadística no paramétrica dado que no se asume que los datos siguen una distribución normal, por ello se utilizó la Prueba de Kruskal-Wallis que es útil cuando los datos no cumplen con los supuestos de normalidad necesarios para realizar un análisis de varianza. Por otro lado, el PCM-método de HOLM fue ejecutado para ordenar los p-values de menor a mayor y luego comparar cada p-value con un umbral ajustado basado en el número de comparaciones realizadas.

4.2.1 Producción de ácido cítrico día 1

Prueba de Kruskal-Wallis

```
Kruskal-Wallis rank sum test
```

```
data: y and tto  
Kruskal-Wallis chi-squared = 34.312, df = 11, p-value = 0.0003216
```

Figura 12. Prueba de Kruskal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 1. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

PCM – método de Holm

Valores p ajustados mediante el método de Holm

	Rangos medios	Grupos
t1	34.67	a
t10	31.83	ab
t4	29.50	ab
t11	25.00	ab
t7	23.83	ab
t5	20.17	ab
t12	15.33	ab
t6	15.33	ab
t8	11.33	ab
t2	8.00	ab
t9	4.00	b
t3	3.00	b

Los tratamientos con una letra común no difieren significativamente al 5 %

Figura 13. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

Los rangos para la producción de ácido cítrico para el t1 fue 34,67 g/L, entre t10 y t2 la producción fue entre 31,83 y 8,00 g/L, mientras que el t3 tuvo la producción más baja 3,00 g/L. En este contexto, las condiciones experimentales suero sin suplemento + 25 °C + pH 2 lograron los mejores resultados, mismos que fueron evaluados en día 1 de la fermentación [tabla 10].

Tabla 10. *Producción de ácido cítrico por acción de A. niger en el día 1.*

Tratamientos	Media	Rangos medios	Grupos
t1	9.645	34.67	a
t10	9.365	31.83	ab
t4	9.220	29.50	ab
t11	7.345	25.00	ab
t7	7.200	23.83	ab
t5	6.765	20.17	ab
t12	4.750	15.33	ab
t6	4.750	15.33	ab
t8	4.175	11.33	ab
t2	3.450	8.00	ab

t9	2.445	4.00	b
t3	1.715	3.00	b

Nota: Se puede observar en los resultados de la Tabla 10 que en t1 (a) no muestra una diferencia significativa mayor al 5%, mientras que t10-t2 (ab) conjuntamente con t9 y t3 (b) si existe una diferencia significativa con respecto al resto de tratamientos. **Fuente:** Autor

4.2.2. Producción ácido cítrico día 2

Prueba de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis rank sum test

```
data: y and tto
Kruskal-Wallis chi-squared = 34.313, df = 11, p-value = 0.0003214
```

Figura 14. Prueba de Kruskal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 2. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

PCM – método de Holm

Valores p ajustados mediante el método de Holm

	Rangos medios	Grupos
t4	34.00	a
t10	33.00	a
t11	27.33	ab
t7	26.50	ab
t1	24.17	ab
t12	19.83	ab
t5	17.17	ab
t6	13.50	ab
t8	11.50	ab
t2	7.83	ab
t9	5.17	ab
t3	2.00	b

Los tratamientos con una letra común no difieren significativamente al 5 %

Figura 15. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

Los rangos para la producción de ácido cítrico para el t4 y t10 fueron 34,00 y 33,00 g/L, respectivamente, entre t11 y t9 la producción fue entre 27,33 y 5,17g/L, mientras que el t3 tuvo la producción más baja 2,00 g/L. En este contexto, las condiciones experimentales a) suero con suplemento + 25 °C + pH 2 y b) suero con suplemento + 30 °C + pH 2 lograron los mejores resultados, mismos que fueron evaluados en día 2 de la fermentación [tabla 11].

Tabla 11. Producción de ácido cítrico por acción de *A. niger* evaluado en el día 2.

Tratamientos	Media	Rangos medios	Grupos
t4	9.070	34.00	a
t10	8.355	33.00	a
t11	6.625	27.33	ab
t7	6.620	26.50	ab
t1	6.475	24.17	ab
t12	5.615	19.83	ab
t5	5.325	17.17	ab
t6	3.885	13.50	ab
t8	3.740	11.50	ab
t2	2.730	7.83	ab
t9	2.300	5.17	ab
t3	1.435	2.00	b

Nota: Se puede observar en los resultados de la Tabla 11 que en t4 y t10 (a) no muestra una diferencia significativa mayor al 5%, mientras que t11-t9 (ab) conjuntamente con t3 (b) si existe una diferencia significativa con respecto al resto de tratamientos. **Fuente:** Autor.

4.2.3 Producción ácido cítrico día 5

Prueba de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis rank sum test

```
data: y and tto
Kruskal-Wallis chi-squared = 34.046, df = 11, p-value = 0.0003555
```

Figura 16. Prueba de Kruskal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 5. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

PCM – método de Holm

Valores p ajustados mediante el método de Holm

	Rangos medios	Grupos
t4	34.33	a
t10	32.50	a
t1	29.17	ab
t11	25.83	ab
t12	22.33	ab
t5	20.83	ab
t7	16.50	ab
t6	14.50	ab
t2	10.00	ab
t9	7.17	ab
t8	6.00	ab
t3	2.83	b

Los tratamientos con una letra común no difieren significativamente al 5 %

Figura 17. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos. Fuente: Captura tomada del programa RStudio.

Los rangos para la producción de ácido cítrico para el t4 y t10 fueron 34,33 y 32,50 g/L, respectivamente, entre t1 y t8 la producción fue entre 29,17 y 6,00 g/L, mientras que el t3 tuvo la producción más baja 2,83 g/L. En este contexto, las condiciones experimentales a) suero con suplemento + 25 °C + pH 2 y b) suero con suplemento + 30 °C + pH 2 lograron los mejores resultados, mismos que fueron evaluados en día 5 de la fermentación [tabla 12].

Tabla 12. Producción de ácido cítrico por acción de *A. niger* evaluado en el día 5.

Tratamientos	Media	Rangos medios	Grupos
t4	8.64	34.33	a
t10	8.06	32.50	a
t1	7.63	29.17	ab
t11	5.76	25.83	ab
t12	5.18	22.33	ab
t5	4.92	20.83	ab
t7	3.59	16.50	ab
t6	3.45	14.50	ab
t2	2.30	10.00	ab

t9	1.72	7.17	ab
t8	1.58	6.00	ab
t3	0.71	2.83	b

Nota: Se puede observar en los resultados de la Tabla 12 que en t4 y t10 (a) no muestra una diferencia significativa mayor al 5%, mientras que t1-t8 (ab) conjuntamente con t3 (b) si existe una diferencia significativa con respecto al resto de tratamientos. **Fuente:** Autor.

4.2.4 Producción ácido cítrico día 6

Prueba de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis rank sum test

```
data: y and tto
Kruskal-Wallis chi-squared = 33.239, df = 11, p-value = 0.0004812
```

Figura 18. Prueba de Kruskal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 6. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

PCM – método de Holm

Valores p ajustados mediante el método de Holm

	Rangos medios	Grupos
t4	35.00	a
t10	32.00	ab
t1	29.00	abc
t7	23.83	abc
t11	21.83	abc
t12	19.50	abc
t6	18.00	abc
t5	16.83	abc
t2	11.00	abc
t3	7.50	abc
t8	5.50	bc
t9	2.00	c

Los tratamientos con una letra común no difieren significativamente al 5 %

Figura 19. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

Los rangos para la producción de ácido cítrico para el t4 fue 35,00 g/L, entre t10 y t3 la producción fue entre 32,00 y 7,50 g/L, mientras que el t9 tuvo la producción más baja 2 g/L. En este contexto, las condiciones experimentales suero con suplemento + 25 °C + pH 2 lograron los mejores resultados, mismos que fueron evaluados en día 6 de la fermentación [tabla 13].

Tabla 13. *Producción de ácido cítrico por acción de A. niger evaluado en el día 6.*

Tratamientos	Media	Rangos medios	Grupos
t4	8.93	35.00	a
t10	7.92	32.00	ab
t1	7.34	29.00	abc
t7	5.61	23.83	abc
t11	5.32	21.83	abc
t12	5.07	19.50	abc
t6	4.66	18.00	abc
t5	4.61	16.83	abc
t2	2.04	11.00	abc
t3	1.29	7.50	abc
t8	1.15	5.50	b
t9	0.28	2.00	c

Nota: Se puede observar en los resultados de la Tabla 13 que en t4 (a) no muestra una diferencia significativa mayor al 5%, mientras que t10 (ab), t1-t3 (abc), t8 (b) conjuntamente con t9 (c) si existe una diferencia significativa con respecto al resto de tratamientos. **Fuente:** Autor.

4.2.5. Producción ácido cítrico día 7

Prueba de Kruskal-Wallis

```
Kruskal-Wallis rank sum test
```

```
data: y and tto
```

```
Kruskal-Wallis chi-squared = 34.352, df = 11, p-value = 0.0003168
```

Figura 20. Prueba de Kruskal-Wallis para concentraciones de ácido cítrico obtenidas el día 7. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

PCM – método de Holm

Valores p ajustados mediante el método de Holm

	Rangos medios	Grupos
t4	34.17	a
t10	31.50	ab
t1	30.33	abc
t11	24.67	abc
t7	24.00	abc
t5	20.17	abc
t12	17.17	abc
t6	14.00	abc
t2	11.00	abc
t3	8.00	abc
t8	5.00	bc
t9	2.00	c

Los tratamientos con una letra común no difieren significativamente al 5 %

Figura 21. Valores p ajustados con el método de Holm en los tratamientos. **Fuente:** Captura tomada del programa RStudio.

Los rangos para la producción de ácido cítrico para el t4 fue 34,17 g/L, entre t10 y t8 la producción fue entre 31,50 y 5,00 g/L, mientras que el t9 tuvo la producción más baja 2 g/L. En este contexto, las condiciones experimentales suero con suplemento + 25 °C + pH 2 lograron los mejores resultados, mismos que fueron evaluados en día 7 de la fermentación [tabla 14].

Tabla 14. *Producción de ácido cítrico por acción de A. niger evaluado en el día 7.*

Tratamientos	Media	Rangos medios	Grupos
t4	12.39	34.17	a
t10	7.49	31.50	ab
t1	7.43	30.33	abc
t11	5.25	24.67	abc
t7	5.38	24.00	abc
t5	5.03	20.17	abc
t12	4.80	17.17	abc
t6	3.40	14.00	abc
t2	2.04	11.00	abc
t3	1.63	8.00	abc

t8	1.23	5.00	bc
t9	0.34	2.00	c

Nota: Se puede observar en los resultados de la Tabla 14 que en t4 (a) no muestra una diferencia significativa mayor al 5%, mientras que t10 (ab), t1-t3 (abc), t8 (bc) conjuntamente con t9 (c) si existe una diferencia significativa con respecto al resto de tratamientos. **Fuente:** Autor.

4.3. Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR) para detección de ácido cítrico.

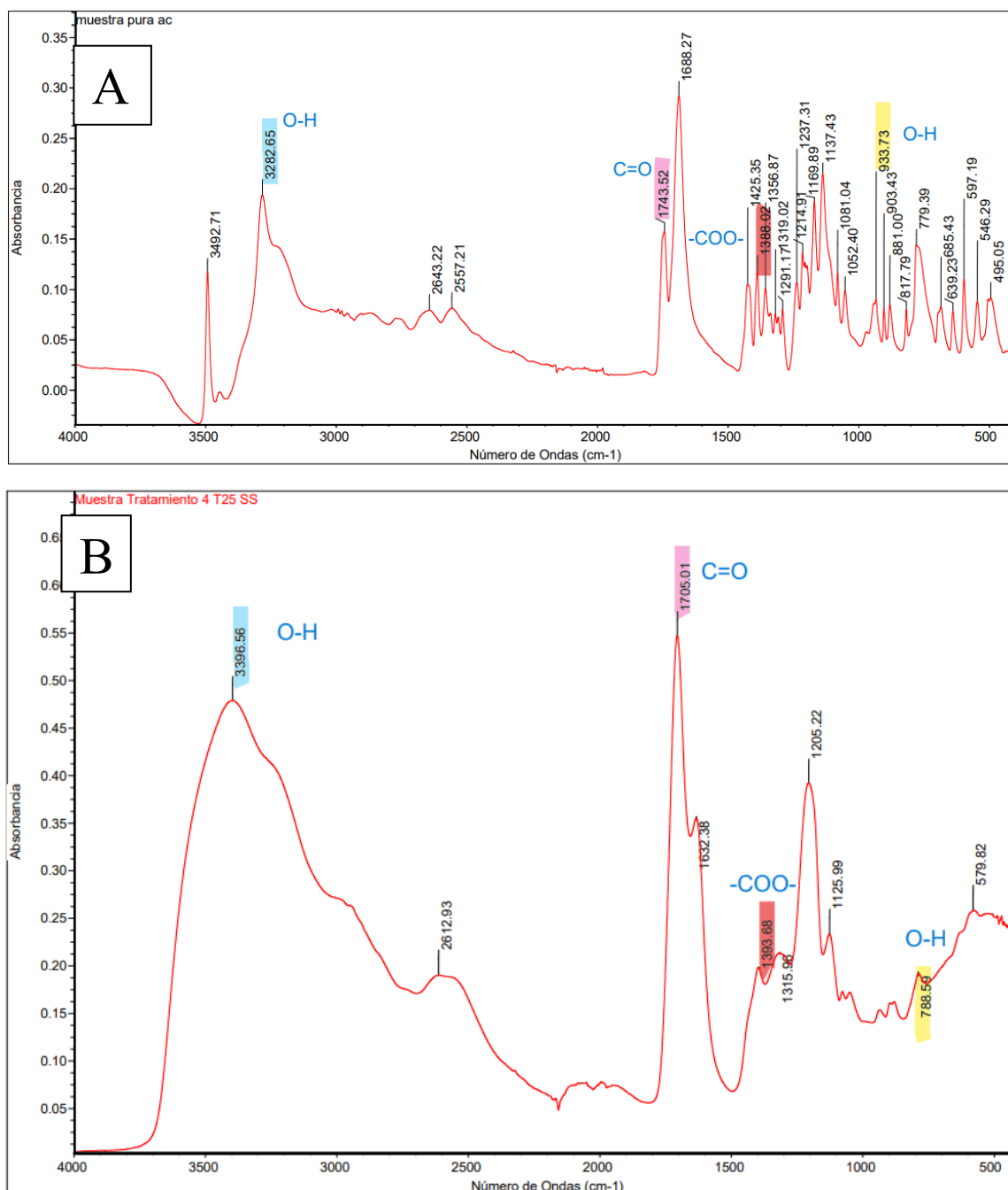


Figura 22. Espectros comparativos FTIR de A) Espectro del ácido cítrico (99.95%) estándar. B) Muestra del tratamiento 4 (suplementado a un pH de 4 y una temperatura de 25°C) **Fuente:** Captura tomada del software OMNIC.

En la figura 22A se observa el espectro IR del ácido cítrico, donde se pueden identificar claramente las bandas asociadas a los grupos funcionales predominantes presentes en la muestra. Las bandas 933.73 y 1388.02 cm^{-1} corresponden a los enlaces O-H y $-\text{COO}-$. En el pico 1743.52 cm^{-1} se presenta el enlace C=O del ácido carboxílico, y un enlace O-H a 3282.65 cm^{-1} . Por otro lado, en la figura 22B se puede ver que la muestra también presenta dentro del rango el grupo O-H a 3396.56 cm^{-1} y el grupo C=O a 1705.01 cm^{-1} . Las bandas 788.59 y 1393.68 cm^{-1} pertenecen a los enlaces O-H y $-\text{COO}-$, respectivamente.

4.4. Gráfico de series en el tiempo.

En la figura 23 se observó el promedio de producción del ácido cítrico por acción de *A. niger*, en los diferentes días evaluados, el día 7 logró el mayor porcentaje de producción de ácido cítrico para los tratamientos tto 4, tto 10 y tto 1, conformados por SCS + $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 2, SCS + $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 2 y SSS + $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 2, respectivamente. En el tto 4 se obtuvieron $17,29$ g/L, mientras que, en el tto 10 y tto 1 se obtuvieron $7,49$ y $7,43$ g/L, respectivamente.

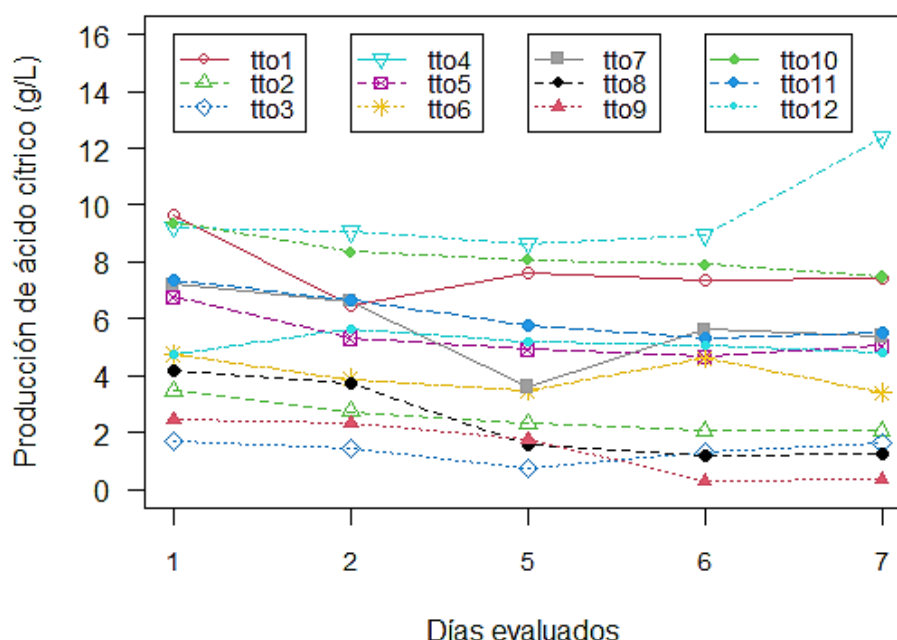


Figura 23. Producción de ácido cítrico por acción de *Aspergillus niger* evaluado en diferentes días. tto1: SSS + $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 2, tto2: SSS + $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 3, tto3: SSS + $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 4, tto4: SCS + $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 2, tto5: SCS + $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 3, tto6: SCS + $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 4, tto7: SSS + $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 2, tto8: SSS + $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 3, tto9: SSS + $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 4, tto10: SCS + $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 2, tto11: SCS + $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 3, tto12: SCS + $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ + pH 4. SSS: sustrato sin suplemento, SCS: sustrato con suplemento. Los resultados son expresados como promedio del porcentaje de producción de ácido cítrico, $n = 3$. Fuente: Autor.

Para optimizar el proceso de producción de ácido cítrico mediante fermentación en estado líquida, se consideraron los valores de los parámetros de temperatura y pH antes mencionados para diseñar un nuevo proceso fermentativo, las nuevas condiciones fueron establecidas mediante el software estadístico Statgraphics Centurion XV [tabla 15].

Tabla 15. Condiciones exploratorias para la optimización de la producción de ácido cítrico mediante fermentación en estado líquido por acción de *Aspergillus niger*.

Tratamientos	Temperatura	pH
1	27.5	2.5
2	27.5	3.03904
3	30.1952	2.5
4	30	2
5	30	3
6	24.8048	2.5
7	27.5	1.96096
8	25	3
9	27.5	2.5
10	25	2

Nota: Parámetros de fermentación líquida con sus valores correspondientes para la optimización de ácido cítrico utilizando lactosuero suplementado como sustrato y *A. niger* como organismo productor del ácido. **Fuente:** Autor.

4.5. Discusión

En el presente estudio, se logra generar una cantidad significativa de ácido cítrico empleando lactosuero como sustrato de carbono mediante el proceso de fermentación en matraces con agitación. Cuando se introducen los inóculos de *A. niger* en cada tratamiento, se

observa una disminución gradual del pH durante los 7 días de fermentación. Este cambio en el pH sugiere la generación de ácido cítrico en cada uno de los tratamientos.

Diversos factores inciden en la producción de ácido cítrico mediante fermentación, como la composición nutricional del medio, insuficiencia de manganeso, acción secuestrante de iones metálicos, la presencia de nitrato de amonio, la aireación, tipo y concentración de azúcares, y parámetros ambientales. Además, el tiempo óptimo de incubación para alcanzar la máxima producción de ácido cítrico varía según el organismo y las condiciones específicas de la fermentación (Ramesh & Kalaiselvam, 2011). Sin embargo, la prolongación adicional del período de incubación no ofrece mayor producción de ácido cítrico, lo cual podría atribuirse a la viabilidad y edad del hongo empleado, conjuntamente con el agotamiento del contenido de azúcar en el medio de cultivo (Arzumanov et al., 2000).

La temperatura es crucial para la producción de ácido cítrico; se prefieren 25-30°C para el cultivo de *Aspergillus niger*. La temperatura óptima es 30°C, pero superarla reduce la síntesis del ácido, posiblemente debido a la desnaturalización de la enzima citrato sintasa, acumulación de subproductos ácidos y represión enzimática, inhibiendo el desarrollo del cultivo (Panda & Majumdar, 1984).

Estos resultados son significativamente mayores al compararlos con investigaciones anteriores, como la de Ramírez (2023), que alcanzó una concentración máxima de ácido cítrico de 0.37 g/L, y la de Toro et al. (2004) que registró un máximo de 5.77 g/L de ácido.

Ambos autores señalan que la baja concentración de ácido cítrico se atribuye a las dificultades que los mohos del género *Aspergillus niger* enfrentan para asimilar la lactosa durante la fermentación. Para lograr una mayor concentración de ácido cítrico, sugieren realizar la hidrólisis del lactosuero, la cual, en este estudio, se llevó a cabo con el objetivo de descomponer la lactosa en monosacáridos (glucosa y galactosa). Por lo tanto, está confirmado

que, al realizar la hidrólisis enzimática en este estudio, condujo a una mayor producción de ácido cítrico en comparación con los estudios de estos investigadores.

La confirmación de la presencia de ácido cítrico en la muestra del tratamiento 4 del día 7 a través del análisis FTIR destaca su detección exitosa. Investigaciones anteriores, como las de Stuart (2004), han identificado los grupos funcionales principales, evidenciando la existencia de un ácido carboxílico en la muestra examinada del presente estudio.

A pesar de los rangos específicos proporcionados por López (2018) para la identificación del ácido cítrico al 1.5%, se observa que las bandas presentes fuera de 3300 y 2500 cm^{-1} pueden ser resultado de tensiones vibracionales del grupo OH debido a la captación de moléculas de agua. Además, la complejidad de la muestra, que contiene múltiples componentes como lactosa y azúcares, puede influir en el entorno químico y afectar la posición del pico asociado al grupo OH.

CAPITULO 5

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Dada la creciente problemática de la contaminación en la actualidad, la búsqueda de alternativas para la reutilización de residuos se vuelve de vital importancia. En este trabajo de investigación, se propuso emplear una cepa nativa de *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico mediante fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. Este último se produce en grandes cantidades como residuo en diversas industrias queseras del país.

Tras llevar a cabo los procedimientos necesarios para cumplir con los objetivos establecidos y analizar detenidamente los resultados obtenidos, se presentan a continuación las conclusiones obtenidas.

Las cepas obtenidas a través de la resiembra de una cepa madre, fueron identificadas mediante características macroscópicas y microscópicas, correspondiendo netamente a la especie *Aspergillus niger*.

Tras el análisis estadístico de los resultados, se corrobora la hipótesis alterna que sostiene que la variación de parámetros como el pH y la temperatura, en un sustrato de lactosuero, ejercen una influencia significativa en la optimización de ácido cítrico por parte de *A. niger*. Además, durante el proceso se determinaron condiciones óptimas para maximizar la producción de ácido cítrico, las cuales incluyen la utilización de un sustrato suplementado con lactosa y fosfato mono potásico, manteniendo un pH de 2 y una temperatura de 25°C. por lo que, se destacó el tratamiento suplementado 4 exhibiendo la concentración total más elevada, alcanzando 17.29 g/L de ácido cítrico en el día 7.

Los resultados obtenidos en este estudio refuerzan la idea de que la fermentación sumergida a nivel de matraz agitado, especialmente cuando se utiliza lactosuero como sustrato

rico en azúcares y con la participación de la cepa *Aspergillus niger*, constituye la metodología principal para lograr una producción eficiente de ácido cítrico.

5.2. Recomendaciones

Caracterizar la cepa en estudio mediante métodos moleculares es esencial para comprender su identidad genética y sus características únicas. La aplicación de técnicas moleculares permitirá analizar patrones genéticos, identificar marcadores específicos y evaluar la diversidad genómica de la cepa, facilitando la identificación de genes relevantes para la producción de ácidos.

En el contexto de fermentaciones llevadas a cabo en matraces, se torna imperativo considerar variables como la aireación, dada su relevancia determinante en la formación de pellet y en la producción de ácido cítrico.

Investigar los metabolitos durante la fermentación es crucial para comprender las vías metabólicas y productos derivados, especialmente en el contexto de la optimización de la producción de ácido cítrico en medio de lactosuero con *A. niger*. Estos estudios proporcionarán información clave para identificar y cuantificar metabolitos relevantes, evaluando su impacto en la calidad del ácido cítrico. Además, la caracterización precisa de los metabolitos ayudará a ajustar las condiciones de cultivo, mejorando así la eficiencia del proceso y la producción de ácido cítrico.

Para futuras investigaciones, sería beneficioso realizar estudios de viabilidad económica asociados con la producción a gran escala de ácido cítrico utilizando lactosuero como sustrato. Esto proporcionaría información crucial para evaluar la aplicabilidad industrial de los resultados obtenidos.

Se propone, en última instancia, avanzar con procedimientos de fermentación, ya sea en condiciones sumergidas, de superficie o sólidas, utilizando diversos desechos generados por

distintas industrias nacionales. Esto con la finalidad de fomentar la reutilización de recursos, gestionar de manera efectiva la contaminación ambiental y crear nuevas oportunidades laborales y de desarrollo profesional, aprovechando así los recursos disponibles en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, B. J., y Bastidas, R. M. (2020). *Evaluación del suero de leche y cáscara de papa variedad Diacol Capiro para la obtención de Ácido Cítrico mediante fermentación sumergida utilizando Aspergillus niger*. *Nuevas perspectivas en Ingeniería de Procesos*, 38.
- Alekseev, K. V., Dubina, M. V., & Komov, V. P. (2015). *Metabolic characteristics of citric acid synthesis by the fungus Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(9), 857-865. <https://doi.org/10.1134/S0003683815090021>
- Álvarez Santana, J. S. (2017). *Evaluación de la funcionalidad de producción de ácido cítrico usando cepas de Aspergillus niger identificadas molecularmente*. [bachelorThesis, Quito: USFQ, 2017]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/6627>
- Araujo Guerra, Á. V., Monsalve Castro, L. M., & Quintero Tovar, A. L. (2013). *Aprovechamiento del lactosuero como fuente de energía nutricional para minimizar el problema de contaminación ambiental*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2), 55. <https://doi.org/10.22490/21456453.992>
- Arzumanov, T. E., Shishkanova, N. V., & Finogenova, T. V. (2000). *Biosynthesis of citric acid by Yarrowia lipolytica repeat-batch culture on ethanol*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 525-529. <https://doi.org/10.1007/s002530051651>
- Bayona Solano, J. E. (2019). *Estudio de las variables de operación de un biorreactor para mejorar la producción de ácido cítrico por vía fermentativa de Aspergillus niger utilizando como sustrato duraznos (Prunus pérsica) cultivados en la provincia de Pamplona, Norte De Santander* [Trabajo de Grado Pregrado, Universidad de Pamplona] Repositorio Hulago, Universidad de Pamplona. Recuperado a partir de <https://bit.ly/3Sf8Trk>

- Bermejo, N. M. (2010). *Efectos de diferentes niveles de harina de quinua en la elaboración de una bebida proteica de lactosuero*. 91. Recuperado a partir de <https://bit.ly/3SmrCkK>
- Cámara de Comercio de Guayaquil. (2019). *Informe de Posición Estratégica, N.º 321*. Departamento de Investigación y Proyectos. Recuperado de <https://bit.ly/3tVQHc8>
- Ciriminna, R., Meneguzzo, F., Delisi, R., & Pagliaro, M. (2017). *Citric acid: Emerging applications of key biotechnology industrial product*. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0251-y>
- Concha Garcias, W. (2014). *Producción Biológica de Ácido Cítrico a Partir de Lactosuero de Residuo Quesero Entero y Deproteinizado Utilizando una Cepa Fungal de Aspergillus Niger Sp. En Cultivo Sumergido*. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/4319>
- Fonseca Balseca, L. B. (2019). *Caracterización del proceso fermentativo de Aspergillus niger PEL Van Tieghem utilizando como sustrato cáscara de papa (Solanum tuberosum L.) para el enriquecimiento proteico*. (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Carrera de Ingeniería Bioquímica).
- Gallego Albiach, V., & Pérez Igualada, L. M. (2021). *Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/169378>
- García, E. A., y Tovar, B. R. (2022). *Aspergillus niger y la producción de ácido cítrico*. *Biotecnología*, 75.
- Gómez Soto, J. A., & Sánchez Toro, Ó. J. (2022). *Producción de galactooligosacáridos: Alternativa para el aprovechamiento del lactosuero*. Una revisión. *Ingeniería y Desarrollo*, 37(01), 129-158. <https://doi.org/10.14482/inde.37.1.637>

- Granda, A. (2018, diciembre 2). *Cinco de 67 industrias lecheras procesan el lactosuero*. El Telégrafo. Recuperado a partir de <https://bit.ly/2zNVz3Z>
- Hidalgo, A. V. (2022). *Caracterización biológica del hongo Aspergillus sp y su impacto en la salud*. La Universidad, 507-526.
- Jesus, C.-S. A. D., Ruth, V.-G. E., Daniel, S.-F. R., & Sharma, A. (2015). *Biotechnological Alternatives for the Utilization of Dairy Industry Waste Products*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6(3), Article 3. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63022>
- Koromyslova, A. D., White, P. A., & Hansman, G. S. (2015). *Treatment of norovirus particles with citrate*. *Virology*, 485, 199-204. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.07.009>
- Kubicek, C. P., Röhr, M., & Rehm, H. J. (1985). Citric Acid Fermentation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 3(4), 331-373. <https://doi.org/10.3109/07388558509150788>
- Leal, D., Pico, Y., Castro, J., Guerra, J., & Castro, G. (2011). *PRODUCCION DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE SUERO LÁCTEO ENTERO E HIDROLIZADO CON Aspergillus niger, POR VÍA FERMENTATIVA*. *Alimentos Hoy*, 19(19), 32.
- López-Barreto, R. E., Becerra-Jiménez, M. L., & Borrás-Sandoval, L. M. (2018). *Caracterización físico-química y microbiológica del lactosuero del queso Paipa*. *Ciencia y Agricultura*, 15(2), Article 2. <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.n2.2018.8565>
- López-Díaz, A. S., Ríos-Corripio, M. A., Ramírez-Corona, N., López-Malo, A., & Palou, E. (2018). *Efecto de la radiación ultravioleta de onda corta sobre algunas propiedades de películas comestibles elaboradas con jugo de granada y quitosano*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17(1), 63-73.
- Luna, Mauricio, Lozada, Yasmín, & Trigos, Ángel. (2010). *Aislamiento de cepas de Aspergillus niger, productoras de ocratoxina A, en café verde (Coffea arábica) almacenado*. *Revista mexicana de micología*, 32, 63-68. Recuperado en 10 de abril de

2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802010000200008&lng=es&tlng=es.

Macwan, S. R., Dabhi, B. K., Parmar, S. C., y Aparnathi, K. D. (2016). *Suero y su utilización*. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 5(8), 134–155. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.508.016

Meng, W., Zhang, Y., Cao, M., Zhang, W., Lü, C., Yang, C., Gao, C., Xu, P., & Ma, C. (2020). *Efficient 2,3-butanediol production from whey powder using metabolically engineered Klebsiella oxytoca*. Microbial Cell Factories, 19(1), 162. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01420-2>

Muñoz-Villa, A., Sáenz-Galindo, A., & López-López, L. (2014). *Ácido Cítrico: Compuesto Interesante Citric Acid: Interesting Compound*. 12.

Muñoz Fuérez, S. E. (2023). *Obtención de ácido cítrico a partir de residuos de la agroindustria (Bagazo de Caña) por acción del microorganismo Aspergillus niger* [Tesis de pregrado, Universidad Técnica del Norte]. Recuperado a partir de <https://bit.ly/3QBPbVu>

Muset, G., & Castells, M. (2017). *Valorización del lactosuero*. (Primera ed). San Martín: Transferencia Tecnológica.

Navarro, O. P., Chong, N. L., & Marroquí, K. R. R. (2016). *OPORTUNIDADES DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR VÍA FERMENTATIVA A PARTIR DE SUSTRATOS AZUCARADOS EN CUBA*. 43(2).

Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994. *Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. Diario Oficial. México. 4 p.

Papagianni, M., & Matthey, M. (2006). *Morphological development of Aspergillus niger in submerged citric acid fermentation as a function of the spore inoculum level. Application of neural network and cluster analysis for characterization of mycelial morphology*. Microbial Cell Factories, 5(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-3>

- Pinchao, J. (2022, mayo 4). *Productores esperan que nuevo ministro de Agricultura no se alinee con exportadores.* El Comercio. <https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/productores-nuevo-ministro-agricultura-exportadores.html>
- Prado, P., Luis Rodriguez Flores, J., y Edgar, R. (2018). *Remoción de DQO y DBO del lactosuero ácido mediante una celda de electrocoagulación.* Universidad Nacional Del Centro Del Perú. <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/5168>
- Ramesh, T., & Kalaiselvam, M. (2011). *An Experimental Study on Citric Acid Production by Aspergillus niger Using Gelidiella acerosa as a Substrate.* Indian Journal of Microbiology, 51(3), 289-293. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0066-9>
- Ramírez Moya, G. G. (2023). *Obtención de ácido cítrico por fermentación sumergida, a partir de lactosuero, usando Aspergillus niger* [bachelorThesis]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/14042>
- Ramírez-Navas, J. S. (2015). *Diseño de procesos en Industria Láctea: Transformación de lactosuero.* Investigación aplicada a la Ingeniería de Procesos, 53-62.
- Ramírez-Navas, J. S., Solís-Carvajal, C. A., & Pasos, C. A. V. (2018). *Tecnología de membranas: Obtención de proteínas de lactosuero.* Entre Ciencia e Ingeniería, 12(24), Article 24. <https://doi.org/10.31908/19098367.3815>
- Rivas, I. K. R., & Chávez-Martínez, A. (2017). *Efecto Del Ultrasonido Aplicado Al Suero De Leche Previo Al Calentamiento En La Elaboración De Requesón.* Interciencia, 42(12), 828-833.
- Rodríguez, L. E. G., Sánchez, A. P., y Zayas, L. M. Z. (2019). *Rentabilidad económica y análisis de sensibilidad de una planta de producción de ácido cítrico a partir de bagazo de caña de azúcar.* Revista de Ciencia y Tecnología, 31(1), 80-88.

- Rosales Mitte, S. del P. (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** [bachelorThesis]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/17124>
- Salazar, C. L., & Rua, Á. L. (2012). *Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos*. *Hechos Microbiológicos*, 3(2), Article 2. <https://doi.org/10.17533/udea.hm.18741>
- Stuart, B. H. (2004). *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inglaterra.
- Toro, Ó. J. S., Buriticá, M. C. O., & Garcés, A. L. B. (2004). *Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus* spp.*
- Torrado, A. M., Cortés, S., Manuel Salgado, J., Max, B., Rodríguez, N., Bibbins, B. P., Converti, A., & Manuel Domínguez, J. (2011). *Citric Acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation*. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42(1), 394–409. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100049>
- Tsakali, E., Petrotos, K., D'Alessandro, A., & Goulas, P. (2010, junio 1). *A review on whey composition and the methods used for its utilization for food and pharmaceutical products*. 6th International Conference on Simulation and Modelling in the Food and Bio-Industry 2010, FOODSIM 2010.
- Tuquerres Curipallo, H., Cerda Mejía, G., Tenemasa, V., Diéguez Santana, K., Carrera Sánchez, K., y Pérez Martínez, A. (2020). *Diseño del proceso para la obtención de ácido cítrico a partir del bagazo de caña disponible en Pastaza, Ecuador*. *Centro Azúcar*, 47(2), 86-96.

- Upton, D. J., McQueen-Mason, S. J., & Wood, A. J. (2020). *In silico evolution of Aspergillus niger organic acid production suggests strategies for switching acid output*. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01678-z>
- Velásquez, J. (2010). *Obtención de ácido cítrico por fermentación con Aspergillus niger utilizando sustrato de plátano dominico hartón (musa aab simmonds) maduro*. *Revista Tumbaga*, 1(5), Article 5. <https://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/61>
- Verhoff, F. H., & Bauweleers, H. (2014). *Citric Acid*. En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (pp. 1-11). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a07_103.pub3
- Zara, J., Yegres, F., Vargas, N., Cubillan, L., Navas, P., & Márquez-Riquel, M. (2017). *Empleo de la Espectroscopia Infrarroja (FT-IR-ATR) como herramienta para la Caracterización del bagazo de caña proveniente de la Sierra Falconiana*. *Química Viva*, 16(3), 17-24.

ANEXOS

ANEXO I. Conteo de esporas en cámara de Neubauer y preparación de inóculos a concentraciones de 7.8×10^5 esporas/mL.

La metodología utilizada se adaptó de (Gallego & Pérez, 2021).

1. Se toma 10 mL de suero fisiológico para lavar las esporas y se filtran con gasa estéril sobre un embudo.
2. Con una micropipeta se absorbe 1 mL de suspensión y se diluye con 9 mL de agua destilada. Se añade una o dos gotas de lactofenol a la dilución para teñir las esporas.
3. Se absorbe con micropipeta 10 uL y se coloca en la cámara de Neubauer evitando que se derrame fuera del campo de conteo o formen burbujas.
4. Se deja reposar mínimo 1 minuto para que las esporas se sedimenten sobre la base de conteo.
5. Cuando se trata de hongos con esporas pequeñas, se lleva a cabo el conteo en las secciones numeradas como se muestra en la figura 25. En el caso de esporas grandes, el conteo se realiza en los sectores A, B, C y D. Es importante destacar que no se deben contabilizar los conidios que estén en contacto con las líneas derecha e inferior en cada sección.

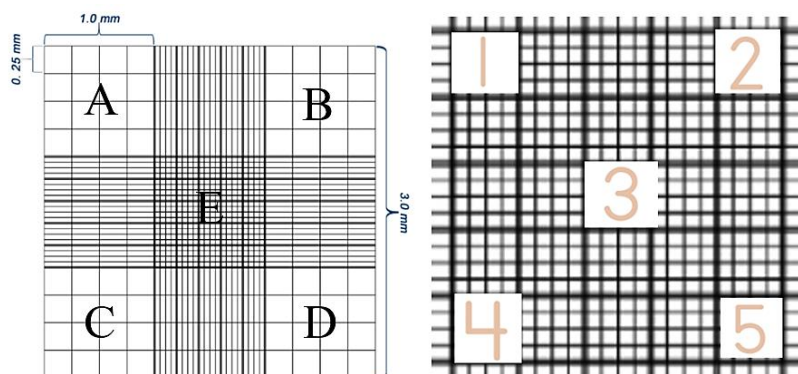


Figura 24. Secciones de la cámara de Neubauer bajo microscopio. Fuente: Autor.

6. El conteo se hace seis veces como mínimo en cada cuadrante para luego sacar un promedio.

7. Al tener el número de esporas completo se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad} = \frac{N^{\circ} \text{ de células contadas}}{\text{Superficie de conteo (mm}^2\text{)} \times \text{Profundidad (mm)} \times \text{Dilución}}$$

Donde:

Superficie de conteo= 0.04 mm² (1 cuadrado mediano de 1 mm² cada uno)

Profundidad de la cámara= 0.1mm

ANEXO II. Estandarización de NaOH con HCl.

La solución de NaOH 0.1 N se estandariza utilizando HCl como patrón primario, siguiendo un método adaptado de Villanueva & Rodríguez (2011) y Patakfalvi (2011). El proceso implica los siguientes pasos:

1. Preparar la solución de HCl, para la cual se deben conocer el porcentaje de pureza, la densidad y el peso molecular, ya que actuará como el patrón primario para la estandarización de NaOH.
2. Calcular la cantidad de HCl a utilizar mediante la fórmula de densidad, despejando el volumen y realizando los cálculos con los valores conocidos, como se indica en la fórmula:

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

3. Después de determinar la cantidad necesaria de HCl, se procede a aforar y verter la solución en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, al cual se le añaden dos gotas de fenolftaleína. Posteriormente, se prepara la solución de NaOH disolviendo 4 g en 1 L de agua destilada. Una vez lista, se coloca en una bureta de 25 mL y se realiza la titulación hasta que aparezca el característico color fucsia de la fenolftaleína, manteniéndolo durante 30 a 60 segundos o, en el caso de la medición potenciométrica, hasta alcanzar un pH de 8. Este proceso se repite en tres ocasiones, registrando los

volúmenes de NaOH utilizados, para luego aplicar la fórmula correspondiente en los cálculos:

$$N = \frac{\text{mol de HCl}}{\text{mol de NaOH}} \quad N = \frac{0.005}{0.05} = 0.1 N$$

Donde:

$$\text{mol de HCL} = 0.05 \text{ L} \times 0.1 \text{ N} = 0.005 \text{ mol de HCL}$$

$$\text{mol de NaOH} = 50\text{mL} \div 1000 = 0.05 \text{ mol de NaOH}$$

N= Normalidad del NaOH en equivalente por litro

ANEXO III. Diseño Experimental Completamente al Azar no paramétrico.

Tabla 16. *Diseño experimental aplicado al presente estudio.*

TRATAMIENTOS	SUSTRATO	BLOQUE	SALIDA		
	Lactosuero		Repeticiones		
			1	2	3
T1	A	1	p1t1	p1t1.1	p1t1.2
T2	A	1	p2t1	p2t1.1	p2t1.2
T3	A	1	p3t1	p3t1.1	p3t1.2
T4	B	1	p1t1	p1t1.1	p1t1.2
T5	B	1	p2t1	p2t1.1	p2t1.2
T6	B	1	p3t1	p3t1.1	p3t1.2
T7	A	2	p1t2	p1t2.1	p1t2.2

T8	A	2	p2t2	p2t2.1	p2t2.2
T9	A	2	p3t2	p3t2.1	p3t2.2
T10	B	2	p1t2	p1t2.1	p1t2.2
T11	B	2	p2t2	p2t2.1	p2t2.2
T12	B	2	p3t2	p3t2.1	p3t2.2

Fuente: Autor.

ANEXO IV. Variables de estudio para la optimización de ácido cítrico.

Tabla 17. Definición de variables.

SSS= Lactosuero con suplemento	p= pH	p1= pH 2
		p2= pH 3
		p3= pH 4
SCS= Lactosuero sin suplemento	t= Temperatura	t1= 25°C
		t2= 30°C

Fuente: Autor.

ANEXO V. Concentraciones finales de ácido cítrico mediante titulación por triplicado.

Tabla 18. Concentraciones totales de ácido cítrico del día 1,2,5,6 y 7 mediante fermentación a 25 °C en los tratamientos del experimento.

Repetición 1	1	2	5	6	7
ssst1p1	9.79	6.62	7.78	7.20	7.20
ssst1p2	3.45	2.59	2.30	2.07	2.01
ssst1p3	2.88	1.72	0.57	1.44	1.55
scst1p1	9.22	8.92	8.06	8.64	17.29

scst1p2	6.91	5.47	4.89	4.61	5.18
scst1p3	4.61	4.03	3.45	6.34	3.17
Repetición 2	1	2	5	6	7
ssst1p1.1	9.5	6.33	7.49	7.49	7.66
ssst1p2.1	3.45	2.87	2.30	2.01	2.07
ssst1p3.1	0.55	1.15	0.86	1.15	1.72
scst1p1.1	9.22	9.22	9.22	9.22	7.49
scst1p2.1	6.62	5.18	4.95	4.72	4.89
scst1p3.1	4.89	3.74	3.45	2.88	3.63
Repetición 3	1	2	5	6	7
ssst1p1.2	9.65	6.48	7.64	7.35	7.43
ssst1p2.2	3.45	2.73	2.30	2.04	2.04
ssst1p3.2	1.72	1.44	0.72	1.30	1.64
scst1p1.2	9.22	5.33	8.64	8.93	12.39
scst1p2.2	6.77	9.07	4.92	4.67	5.64
scst1p3.2	4.75	3.89	3.45	4.61	3.40

Fuente: Autor.

Tabla 19. Concentraciones totales de ácido cítrico del día 1,2,5,6 y 7 mediante fermentación a 30 °C en los tratamientos del experimento.

Repetición 1	1	2	5	6	7
ssst2p1	6.91	6.62	3.45	5.76	5.18
ssst2p2	3.74	3.74	1.44	1.15	1.15
ssst2p3	2.3	2.59	2.88	0.28	0.28
scst2p1	9.51	9.51	8.35	8.06	7.49
scst2p2	7.20	6.34	5.47	4.89	5.18

scst2p3	4.89	5.76	5.47	5.53	4.89
Repetición 2	1	2	5	6	7
ssst2p1.1	7.49	6.62	3.74	5.47	5.59
ssst2p2.1	4.61	3.74	1.72	1.15	1.32
ssst2p3.1	2.59	2.01	0.57	0.28	0.40
scst2p1.1	9.22	7.20	7.78	7.78	7.49
scst2p2.1	7.49	6.91	6.05	5.76	5.87
scst2p3.1	4.61	5.47	4.89	4.61	4.72
Repetición 3	1	2	5	6	7
ssst2p1.2	7.20	6.62	3.60	5.62	3.40
ssst2p2.2	4.18	3.74	1.58	1.15	5.39
ssst2p3.2	2.45	2.30	1.73	0.28	1.24
scst2p1.2	9.37	8.36	8.07	7.92	0.34
scst2p2.2	7.35	6.63	5.76	5.33	7.49
scst2p3.2	4.75	5.62	5.18	5.07	5.53

Fuente: Autor.

ANEXO VI. Promedio de NaOH gastado en cada uno de los tratamientos sometidos a titulación por triplicado.

Tabla 20. mL de NaOH titulado en las alícuotas fermentadas a 25 °C del día 1,2,5,6 y 7.

Repetición 1	1	2	5	6	7
ssst1p1	1.7	1.15	1.35	1.25	1.25
ssst1p2	0.6	0.45	0.4	0.36	0.35
ssst1p3	0.5	0.3	0.1	0.25	0.27
scst1p1	1.6	1.55	1.4	1.5	3.0
scst1p2	1.2	0.95	0.85	0.8	0.9
scst1p3	0.8	0.7	0.6	1.1	0.55

Repetición 2	1	2	5	6	7
ssst1p1.1	1.65	1.1	1.3	1.3	1.33
ssst1p2.1	0.6	0.5	0.4	0.35	0.36
ssst1p3.1	0.55	0.2	0.15	0.2	0.3
scst1p1.1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.3
scst1p2.1	1.15	0.9	0.86	0.82	0.85
scst1p3.1	0.85	0.65	0.6	0.5	0.63
Repetición 3	1	2	5	6	7
ssst1p1.2	1.67	1.12	1.3	1.32	1.27
ssst1p2.2	0.6	0.47	0.35	0.4	0.35
ssst1p3.2	0.29	0.25	0.28	0.12	0.22
scst1p1.2	1.6	0.92	2.15	1.5	1.55
scst1p2.2	1.17	1.57	0.97	0.85	0.81
scst1p3.2	0.82	0.67	0.59	0.6	0.8

Fuente: Autor.

Tabla 21. mL de NaOH titulado en las alícuotas fermentadas a 30 °C del día 1,2,5,6 y 7.

Repetición 1	1	2	5	6	7
ssst2p1	1.2	1.15	0.6	1.0	0.9
ssst2p2	0.65	0.65	0.25	0.20	0.20
ssst2p3	0.4	0.45	0.5	0.05	0.05
scst2p1	1.65	1.65	1.45	1.4	1.3
scst2p2	1.25	1.1	0.95	0.85	0.9
scst2p3	0.85	1.0	0.95	0.96	0.85
Repetición 2	1	2	5	6	7
ssst2p1.1	1.3	1.15	0.65	0.95	0.97

ssst2p2.1	0.8	0.65	0.30	0.20	0.23
ssst2p3.1	0.45	0.35	0.1	0.05	0.07
scst2p1.1	1.6	1.25	1.35	1.35	1.3
scst2p2.1	1.3	1.2	1.05	1.0	1.02
scst2p3.1	0.8	0.95	0.85	0.8	0.82
Repetición 3	1	2	5	6	7
ssst2p1.2	1.25	1.15	0.93	0.62	0.88
ssst2p2.2	0.72	0.65	0.21	0.27	0.2
ssst2p3.2	0.42	0.4	0.05	0.3	0.04
scst2p1.2	1.62	1.45	1.3	1.4	1.37
scst2p2.2	1.27	1.15	0.96	1.0	0.92
scst2p3.2	0.82	0.97	0.83	0.9	0.88

Fuente: Autor.