

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

El ácido cítrico es un ácido orgánico muy frecuente en la naturaleza ya que es un compuesto intermedio en el ciclo de Krebs, también está presente en gran cantidad de frutas. Fue aislado por primera vez por Scheele al mezclar zumo de limón con cal y disolviendo el precipitado con ácido sulfúrico. A principios del siglo XX la obtención del ácido cítrico se hacía a partir de limones, pero a mediados del siglo ese proceso se hizo cada vez menos rentable, optándose posteriormente, cada vez más por la producción mediante fermentación de un microorganismo.

La producción de ácidos orgánicos mediante el uso de microorganismos constituye una fuerza motriz de gran importancia para el estudio de regulaciones metabólicas, lo cual permite el desarrollo de la biotecnología.

El ácido cítrico es usado principalmente en la industria de la alimentación para la elaboración de bebidas y otros productos, también como saborizante, el potenciamiento de los conservantes, retiene la carbonatación, confiere el sabor “frutal” característico, prolonga la estabilidad de la vitamina C, reduce los cambios de color, realza los aromas y tampona el medio (al ser ácido débil)

En el sector farmacéutico el ácido cítrico y sus sales se usan para la fabricación de pastillas o polvos efervescentes, también se aprovecha su efecto antioxidante, antimicrobiano y anticongelante.

Otros sectores que usan ácido cítrico son: industria cosmética, industria textil, industria agrícola e industria de detergentes (principalmente para la elaboración de detergentes biodegradables)

Se proyecta que el mercado mundial de ácido cítrico crezca con un a CAGR (tasa de crecimiento anual compuesto) de 4.5% durante los años de 2022-2027. Se espera que la amplia aplicabilidad del ácido cítrico resulte en un crecimiento superior durante el periodo de pronóstico.

El mercado global del ácido cítrico se ve impulsado por la creciente demanda en países europeos como Alemania y el Reino Unido. España e Italia. Por ejemplo, el sector de alimentos y bebidas es un sector clave en Alemania, casi el 80% de los productos agrícolas en Alemania son procesados por la industria para obtener alimentos y bebidas de alta calidad. Existe una gran demanda de ácido cítrico entre los fabricantes alemanes de alimentos y productos farmacéuticos debido a su baja

toxicidad, en comparación con otros acidulantes utilizados principalmente en las industrias farmacéutica y alimentaria. Además, el número de cervecerías en países como Reino Unido se ha duplicado en los últimos años. Los cerveceros artesanales ocasionalmente usan adiciones de ácido cítrico para envasar un poco de acidez al estilo belga witbier.

En 2020 China exportó \$604M en ácido cítrico, convirtiéndolo en el exportador número 1 de ácido cítrico en el mundo siendo los principales destinos del ácido cítrico India, Japón, México, Turquía y Rusia. China es el país que más crece en la producción de ácido cítrico.

En Bolivia la industria química no se encuentra desarrollada al punto de proveer insumos industriales como el ácido cítrico pero el sector azucarero es un área emergente donde los ingenios azucareros producen más de 17 mil toneladas año (Ministerio de desarrollo rural y tierras) siendo Tarija uno de los departamentos contribuyentes en esta producción con el ingenio azucarero de Bermejo con el 5% de esa producción.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

- Obtener ácido cítrico en solución por fermentación de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar las propiedades de la materia prima, melaza del Ingenio Azucarero de Bermejo.
- Seleccionar el proceso de obtención de ácido cítrico por fermentación de la melaza.
- Determinar las variables óptimas del proceso de obtención de ácido cítrico en solución, tomando en consideración los estudios científicos consultados.
- Determinar la concentración del producto obtenido, ácido cítrico en solución por fermentación de la melaza.
- Calcular el rendimiento del proceso experimental de obtención de ácido cítrico en solución por fermentación de la melaza.
- Determinar el costo de producción del proceso de obtención de ácido cítrico en solución.
- Comparar el rendimiento que se obtiene en ácido cítrico en solución frente al rendimiento que se obtiene en alcohol etílico usando la melaza.

1.3. JUSTIFICACIÓN

1.3.1. Justificación tecnológica

Debido a que el método de obtención de ácido cítrico por medio de la fermentación de la melaza permite obtener un alto rendimiento teóricamente en comparación de otros métodos usados, la presente investigación sirve para obtener datos del rendimiento empleando la melaza obtenida en el ingenio azucarero de Bermejo, generando así información acerca del método más adecuado junto al procedimiento más efectivo a nivel de laboratorio, contribuyendo así en el desarrollo de proyectos o futuros estudios.

1.3.2. Justificación Económica

Dado que la producción anual a nivel mundial de ácido cítrico es de más de 600 mil toneladas al año con un crecimiento anual compuesto de 7% y que Bolivia busca desarrollar la industria de la química básica (Bolivia produce, agosto 2021) por lo tanto se ve el interés gubernamental de poder tener nuestra industria química nacional, Bolivia no es productor de ácido cítrico y en la industria alimenticia es un insumo altamente requerido, la producción de melaza en cantidades significativas y su alta demanda como materia prima en otros ámbitos industriales, vuelven viable el buscar alternativas diferentes de su uso y así darle un mayor aprovechamiento económico.

1.4. DELIMITACIÓN DEL ESTUDIO

El presente estudio de investigación experimental tiene como finalidad determinar si la melaza del ingenio azucarero de Bermejo por si misma con su sola composición presenta rendimientos aceptables en la obtención de ácido cítrico en solución al ser usada como la materia prima.

Según las investigaciones de Rosas y Terán (2015), Delta Enfoque (2009) y Guadalupe, Salazar, Rodríguez, Brito, (2021), la obtención de ácido cítrico comercial se puede dividir en dos etapas que son la fermentación de la melaza para la obtención de ácido cítrico en solución y la extracción del ácido cítrico en solido de la solución, la primera etapa consiste en obtener ácido cítrico fermentando la melaza y la segunda etapa consiste en aplicar técnicas para extraer el ácido cítrico del fermentado, dado que la finalidad del estudio es determinar los rendimientos de obtención de ácido cítrico a partir de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo, el presente estudio se enfocará en obtener la mayor cantidad de ácido cítrico en solución en base a las variables optimas previamente usadas en casos de estudio similares como los de Rosas y Terán (2015), Delta Enfoque

(2009), Cuauhtémoc (2012) y Guadalupe, Salazar, Rodríguez, Brito, (2021) , sentando así una base de investigación para la continuación del proceso de obtención de ácido cítrico comercial para los futuros investigadores interesados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

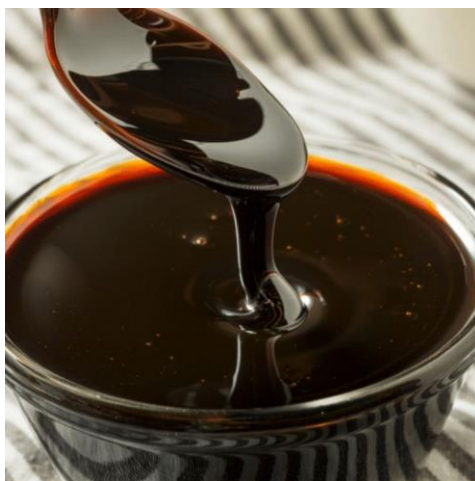
2.1. LA MELAZA

2.1.1. Definición

La denominación melaza se aplica al efluente final obtenido en el proceso de extracción del azúcar presente en el jugo de caña de azúcar.

El efluente final del proceso de extracción de azúcar es un líquido denso y viscoso del cual ya no es posible cristalizar azúcar por métodos usuales, Fajardo y Sarmiento (2007).

Figura 2-1 La melaza.



Fuente: Food Champs (2021).

2.1.2. Composición de la melaza

La melaza puede variar ligeramente dependiendo del tipo de jugo de donde se la obtuvo ya sea del jugo de caña de azúcar, jugo de la remolacha etc.

Pero en general la melaza está compuesta de agua y azúcares como también de otros nutrientes y compuestos orgánicos. Por lo general la melaza se caracteriza por tener hasta 85° Brix, un pH de entre 5 y 6, la melaza contiene otros componentes minerales, gomas y demás componentes además de la azúcar es por eso que a partir de las lecturas en °Brix no se puede suponer la concentración exacta de azúcar.

Tabla II-1 Composición de la melaza de caña de azúcar.

COMPONENTES	CONSTITUYENTES	CONTENIDO (p/p)
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63% p/p
	Azucares reductores	3-5% p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azucares)	4-8% p/p
	Agua	16%
	Grasas	0,4%
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0,74%
	Magnesio	0,35%
	Fosforo	0,08%
	Potasio	3,67%
Contenido de aminoácidos	Glicina	0,10%
	Leucina	0,01%
	Lisina	0,01%
	Treonina	0,06%
	Valina	0,02%
Contenido de Vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48,86 ppm
	Ácido Pantoténico	42,90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4,40 ppm
	Tiamina	0,88 ppm

Fuente: Fajardo y Sarmiento (2007).

2.1.3. Clasificación de la melaza

La melaza según la Asociación Americana de Control Oficial de Alimentos (AAFCO) recomienda que la clasificación de las melazas se debe hacer según su contenido en azúcar total y la humedad, considerando esos parámetros se tiene:

- **Melaza Superior Blackstrap:** Melaza de caña que contiene 23,4% de agua o menos, y 53,5% de azúcares totales.
- **Melaza de Caña Alimenticia:** Melaza compuesta por 23,5% a 26,4% de agua y 48,5% a 53,5% de azúcares totales (Castro, 1993)

Otra clasificación de las melazas toma en cuenta el porcentaje de la materia sólida en peso, usando como medida los grados Brix:

- **Melaza Blackstrap:** Melaza cuyo porcentaje de materia sólida en peso (grados Brix), diluido con igual peso en agua es de 42,5 grados Brix.
- **Melaza de caña alimenticia:** Es la melaza blackstrap diluida con agua hasta una concentración no menor de 39,75 grados Brix.
- **Melaza High Test o Jarabe Invertido:** Es el producto obtenido por la concentración de jugo clarificado, hasta un porcentaje de materia sólida en peso de 85% e invertido con ácido o con invertasa (Castro, 1993).

2.1.4. Usos de la melaza.

La melaza puede ser utilizada:

- Como alimento para animales, más del 60% de la producción mundial se destina para la alimentación de ganado como también para elaboración de compuestos para la alimentación directa de la granja.
- Como suplemento alimenticio.
- En la producción de alcohol, donde se aprovechan los azúcares de la melaza para garantizar la fermentación.
- Como abono, aporta una gran cantidad de nutrientes al suelo y también beneficios como nematostático, fuente inicial de energía para la flora benéfica del suelo, factor agregante para mejorar la estructura del suelo, aumenta la materia orgánica del suelo, fuente de energía para el sistema reticular durante momentos de estrés. (USAID-RED, 2006).

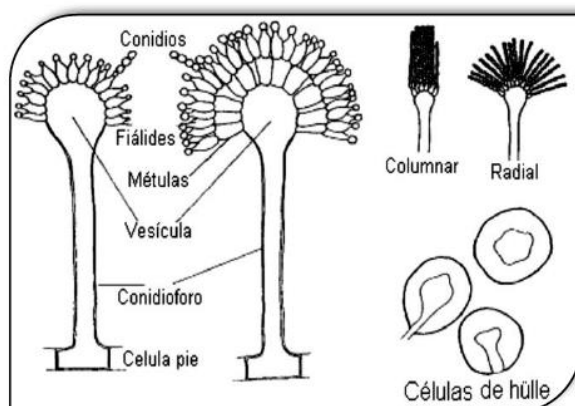
- Como un edulcorante en sustitución del azúcar.
- En la industria farmacéutica para la obtención de fármacos.
- Como componentes de salsas, jarabes dulces y helados.

2.2. EL ASPERGILLUS NIGER.

2.2.1. Descripción.

Según Duque (2008), el *Aspergillus Niger* es un hongo filamentoso del grupo Deuteromycetes o conocidos también como hongos imperfectos, su aspecto microscópico es típico y se caracteriza por unas estructuras esporíferas llamadas cabezas conidiales. Estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas.

Figura 2-2 Morfología del genero *Aspergillus*.

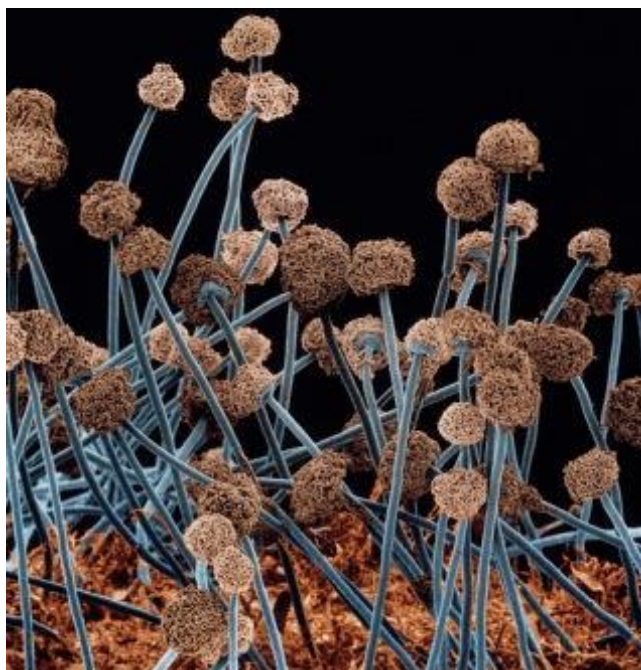


Fuente: Duque (2008).

Las características principales del *Aspergillus Niger* que lo diferencian de los demás *Aspergillus* es que produce un moho negro en vegetales comunes como la lechuga, el tomate y la acelga.

El *Aspergillus Niger* crece rápidamente en una variedad de sustratos artificiales produciendo colonias que consisten de un fieltro basal blanco o amarillo cubierto por una capa densa de conidios de color castaño oscuro a negro. Las conidioesporas de esta especie son típicamente de 900 – 1600 μm de longitud, paredes lisas y termina en vesículas globosas color café pálido de 40 – 60 μm de diámetro. (Duque, 2008).

Figura 2-3 El Aspergillus Niger.



Fuente: SciencephotoLibrary (2021).

2.2.2. Clasificación taxonómica.

Tabla II-2 Taxonomía de Aspergillus Niger.

Especie	Aspergillus Niger
Género	Aspergillus
Familia	Trichomaceae
Orden	Eurotiales
Reino	Fungi

Fuente: White (2010).

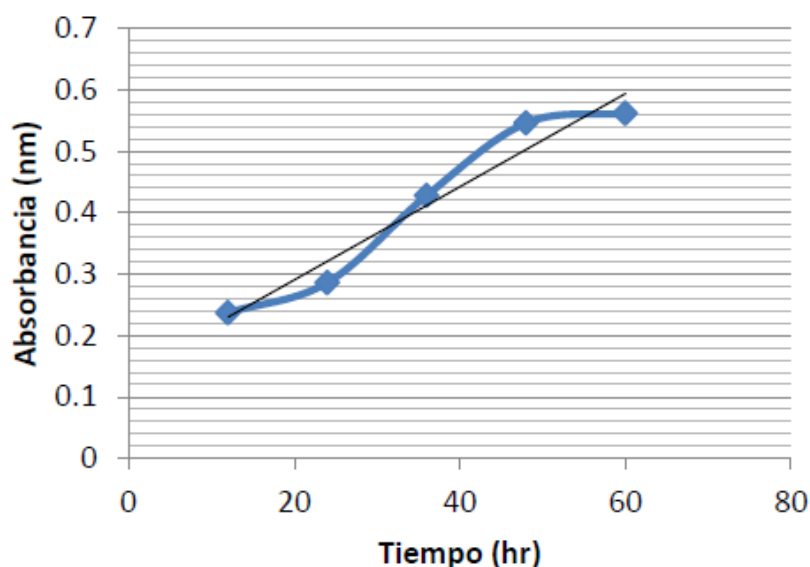
2.2.3. Aspectos nutricionales del Aspergillus Niger.

El hongo *Aspergillus Niger* es el principal productor de ácido cítrico a nivel industrial por cultivo líquido. Se ha observado que se obtiene un alto rendimiento de ácido cítrico cuando existe una alta acumulación de este en el micelio, que puede estar asociada con una alta concentración de glucosa y de oxígeno disuelto en el medio líquido. (Papagianni. 2007).

Según García, Quintero y López (2004), los aspectos nutricionales más importantes en el crecimiento del *Aspergillus Niger* en un medio líquido son la concentración, tipo de carbohidratos y el contenido de metales. Los carbohidratos deben ser simples y de fácil transportación a través de la membrana, gracias a la presencia de invertasas extracelulares asociadas a la membrana. Estas hidrolasas desdoblan la sacarosa a hexosas como la glucosa y son sumamente activas a las condiciones de fermentación. Gracias a ello el medio industrial más usado son las melazas, tanto de caña como de remolacha. Estas últimas son en ocasiones preferidas por presentar un mayor contenido de nitrógeno.

También García, Quintero y López (2004) Menciona que el fósforo juega un papel regulador importante en las reacciones metabólicas favoreciendo que el *Aspergillus Niger* en su metabolismo de los azúcares produzca mayores cantidades de ácido cítrico si el rango de fósforo permanece constante entre el 0.1 y 0.2%, tomando en cuenta que la melaza de caña común sin enriquecer con nutrientes ya tiene un aproximado de 0,08% de fósforo según Fajardo y sarmiento (2007), convierte a la melaza de caña de azúcar en un medio propicio para que el *Aspergillus Niger* metabolice sus azúcares produciendo así ácido cítrico.

Figura 2-4 Curva de crecimiento del *Aspergillus Niger*.



Fuente: Muñiz (2016).

2.2.4. Ruta metabólica del *Aspergillus Niger*

En el inicio del desarrollo del micelio productor, hay un cambio en el metabolismo de los hidratos de carbono, la mayor parte de los azúcares se metabolizan por la vía de las pentosas fosfato y el ácido cítrico se acumula, gradualmente, hasta alcanzar la concentración necesaria para inhibir a la enzima 6 fosfogluconato deshidrogenasa y entonces se activa la glucólisis, aproximadamente a las 27 horas de fermentación. Legisa y Matthey, (1988). El ácido cítrico actúa como el inhibidor de la enzima, NADP⁺ isocitrato deshidrogenasa impidiendo así la formación de ácido isocítrico y favoreciendo la acumulación de ácido cítrico ya que según Arisan-Atac y Kubicek (1996) demostraron que la producción de ácido cítrico supera ampliamente la capacidad de esta enzima para tomarlo como sustrato, por lo que el exceso de ácido cítrico es excretado fuera de la célula.

Según Torres (1994) en su estudio de la cinética de incorporación de azúcares permitió establecer que existen dos transportadores de glucosa, uno de alta afinidad constituido y otro de afinidad menor que se expresa cuando la concentración de carbohidratos en el medio de cultivo es alta. Ambos transportadores son inhibidos por citrato, el de baja afinidad es más insensible a esta inhibición manteniendo una actividad importante a bajo pH, mientras que la actividad del de alta afinidad se reduce significativamente. En conclusión, en las condiciones de sobreproducción de ácido cítrico (bajo pH, alta concentración de glucosa en el medio de cultivo y alta concentración de citrato intracelular) se produce el transporte de hidratos de carbono desde el exterior a través de un transportador específico. Inmediatamente después de su ingreso a la célula los hidratos de carbono son fosforilados debido a que la sacarosa se hidroliza extracelularmente, a la célula ingresa glucosa y fructuosa. Se encontró una sola enzima fosforilante de hexosas en el *Aspergillus Niger*, cuya actividad aumenta a mayores concentraciones de azúcar y es inhibida por citrato en forma no competitiva. Probablemente esta característica sea la causa de la necesidad de concentraciones altas de carbohidratos para inducir la acidogénesis, Steibock (1994).

En presencia de altas concentraciones de hidratos de carbono se presenta la piruvato carboxilasa



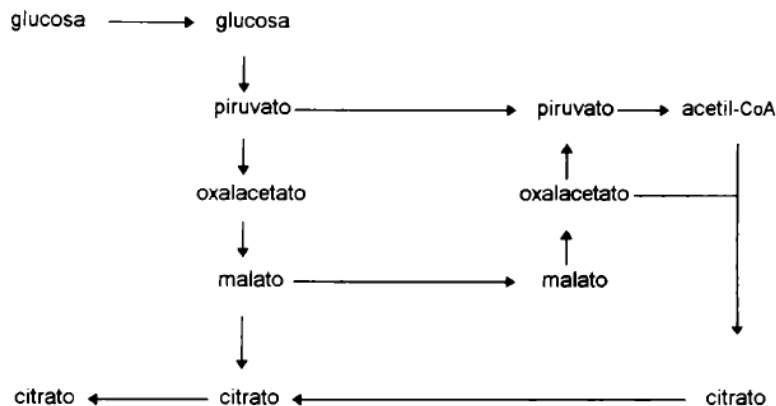
Según Jaklitsch (1991) Su función de esta enzima (piruvato carboxilasa) es derivar parte del piruvato producido durante la glucólisis transformándolo en oxalacetato, que por la acción de la enzima málico deshidrogenasa citoplasmática pasa a malato. Este malato funcionaria como

contraion del citrato producido en la mitocondria, que se transloca al citosol. El malato que ingresa a la mitocondria pasaría nuevamente a oxalacetato. Este es uno de los sustratos de la citrato sintetasa. El resto del piruvato producido en la glucolisis se convierte en acetil-CoA por efecto de la enzima piruvato deshidrogenasa.



El acetil-CoA y el oxalacetato originados en las reacciones anteriores son los sustratos de la citrato sintetiza, que es el paso que finalmente produce ácido cítrico, Steinock (1991).

Figura 2-5 Biosíntesis del ácido cítrico.



Fuente: Soria (1997).

Según Muñiz (2016), en condiciones donde la cepa de *Aspergillus Niger* ha agotado la reserva de azúcares reductores dentro de la fuente nutritiva el *Aspergillus Niger* prosigue sintetizando los hidratos presentes como los oxalatos, malatos, ácido oxálico, ácido malónico y otros mientras excreta citrato que en presencia de la solución acuosa se convierte en ácido cítrico, es por ello que el *Aspergillus Niger* es el hongo preferido en esta biosíntesis ya que como último recurso metabólico se encarga de limpiar la fuente nutritiva de los ácidos indeseables dejando prácticamente una concentración selectiva de ácido cítrico, siempre y cuando el tiempo de fermentación se extienda lo suficiente como para que el organismo agote o disminuya lo suficiente la concentración de los azúcares reductores, esto se puede apreciar cuando ya no hay una variación en el pH con el paso del tiempo.

2.2.5. Tolerancia a metales del *Aspergillus Niger*.

La presencia de los metales induce a cambios morfológicos y fisicoquímicos en las comunidades microbianas, aunque no se tiene una investigación detallada de la exacta interacción de los iones metálicos en toda la cadena metabólica del *Aspergillus Niger*, se pudo comprobar de manera experimental las concentraciones máximas que tolera antes de que su crecimiento sea inhibido, un hongo filamentoso puede considerarse altamente tolerante a un metal cuando se expone a una concentración de al menos 1 mM y el índice de tolerancia es igual o mayor que 0,8 Villalba, Cruz y Azuara (2018).

Entre los metales más comunes e influyentes en la inhibición del crecimiento del *Aspergillus Niger* que se presentan son los iones de Cd, Hg, Pb, Ag, Cu, Zn y Cr.

Se usó una concentración constante de 1 mM de AgNO_3 , CdCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CuSO_4 , HgCl_2 , $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, como fuente de metales Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb y Zn para la obtención del índice de tolerancia del *Aspergillus Niger*, se emplearon 7 días de incubación a 28°C

Tabla II-3 Índice de tolerancia del *Aspergillus Niger* a metales.

METAL	ÍNDICE DE TOLERANCIA
Cd	0,89±0,12
Hg	1,03±0,14
Pb	1,05±0,18
Ag	0,94±0,11
Cu	0,88±0,04
Zn	0,87±0,07
Cr	1,27±0,07

Fuente: Villalba, Cruz y Azuara (2018).

Cuando el *Aspergillus Niger* se expuso a una concentración de 1 Mm de cloruro de cadmio se obtuvo un índice de tolerancia de aproximadamente 0,89, este resultado es ligeramente mayor que el del *Penicilium* que tiene un índice de tolerancia de entre 0,55 y 0,62, respectivamente usando sulfato de cadmio como fuente de dicho elemento, otros autores mencionan que los

niveles de tolerancia entre especies de hongos pueden ser diferentes, debido a la variación de los mecanismos de resistencia.

En el caso del mercurio se tuvo un índice de tolerancia aproximado de 1,03 por lo que resulto altamente tolerante a este metal.

En cuestión del plomo se encuentra que el *Aspergillus Niger* es altamente tolerante al plomo, ya que su índice fue de aproximadamente 1,05.

Se observa que el *Aspergillus Niger* también es considerablemente tolerante a la plata, ya que el índice fue de un aproximado a 0,94 usando acetato de plata como fuente del elemento.

Con respecto al cobre el *Aspergillus Niger* mostró índices aproximados de tolerancia de 0,88, es decir, el hongo es altamente tolerante.

El índice de tolerancia del *Aspergillus Niger* a 1 Mm de sulfato de zinc fue de aproximadamente 0,81, por lo tanto, el hongo es altamente tolerante.

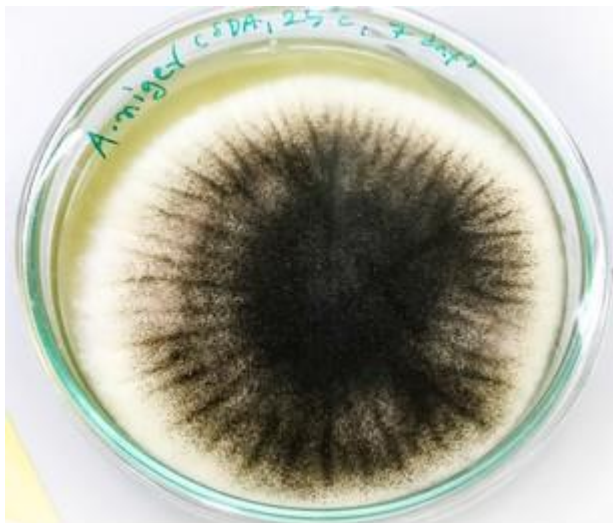
En el caso de cromo el *Aspergillus Niger* tuvo un índice aproximado de 1,27 lo cual lo califica como un hongo altamente tolerante a este elemento.

En la investigación de Villalba, Cruz y Azuara (2018), se puede observar que el *Aspergillus Niger* presente una muy considerable resistencia a la inhibición de su crecimiento por la presencia de metales, considerándose uno de los hongos más aptos para sobrevivir en ambientes con alta presencia de iones metálicos.

2.2.6. Cultivo del *Aspergillus Niger*.

El cultivo de *Aspergillus Niger* se lo hace con un periodo de incubación de 6-7 días en agar sabouraud a 35 °C en cajas Petri cuidando siempre la esterilización del ambiente en el momento de sembrado (usando un mechero encendido cerca del área de trabajo) la resiembra se lo hace con un asa con un patrón que recorra todo el nuevo medio de cultivo (Luna, Lozada y Trigos, 2010).

Figura 2-6 Crecimiento del *Aspergillus Niger*.



Fuente: Shutterstock (2024).

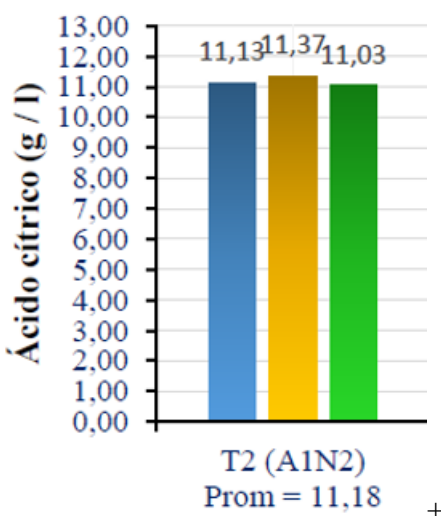
2.2.7. Producción de ácido cítrico con *Aspergillus Niger*.

Según la investigación de Velásquez, Beltran, Padilla y Giraldo (2010) los microorganismos capaces de producir ácido cítrico son especies de los géneros *Aspergillus*, *Citromyces*, *Penicillium*, *Monilia*, *Candida* y *Pichia*, aunque para la producción comercial solo se utilizan mutantes de *Aspergillus Niger*. Comparados con las cepas de *Penicillium*, los *Aspergillus* producen más ácido por unidad de tiempo, debido a que presentan baja actividad de las enzimas isocitrato deshidrogenasa y aconitasa hidratasa, y una alta actividad de citrato sintetasa. Las anteriores constituyen ventajas importantes si se toma en cuenta que además la formación de productos laterales no deseados como ácido oxálico, ácido isocítrico y ácido glucónico puede ser fácilmente suprimida en el metabolismo del *Aspergillus Niger*.

El empleo de *Candida guilliermondii*, *C. lipolytica* y *Yarrowia lipolytica* fueron usadas hasta los años '70 ya que pueden producir ácido cítrico a partir de n-alcanos derivados del petróleo, pero el encarecimiento del petróleo hizo impracticable este método de obtención usando esa fuente de carbono, si bien también estas levaduras pueden usar otras fuentes de carbono en su metabolismo excretan mezclas de ácido cítrico e isocítrico, la separación de estos dos ácidos durante la purificación es costosa y por lo tanto encarece el proceso volviéndolo inviable económicamente, Soria (1997).

El estudio de Rosas y Terán (2015) en el que se usó la melaza del Ingenio Azucarero del Norte (Ecuador) revela los siguientes resultados al emplear la melaza como medio nutritivo para el *Aspergillus Niger*.

Figura 2-7 Rendimiento de obtención de ácido cítrico en solución



Fuente: Rosas y Terán (2015).

Los rendimientos obtenidos por Rosas y Terán (2015) son similares a los que plantean otras investigaciones que también obtuvieron ácido cítrico por fermentación de la melaza con *Aspergillus Niger* como ser:

Abín e. al. (2004) Concluyeron que “La mayor producción de ácido cítrico por *A. Niger* 0-5 correspondió a un rendimiento de 10gr/L.

En su investigación Velásquez et al. (2010), “obtuvieron ácido cítrico a partir de sustrato de pulpa de plátano Dominico Hartón en estado maduro con un rendimiento de 13,5gr/L de ácido cítrico”.

Se demuestra con la investigación de Velásquez et al. (2010) que el empleo de la melaza como medio nutricional para el *Aspergillus Niger* brinda rendimientos considerables y aceptables, siendo aún la melaza un subproducto de la industria azucarera.

2.3. EL ÁCIDO CÍTRICO

2.3.1. Definición

El ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) es un acidulante ampliamente usado, inocuo con el medio ambiente. Es prácticamente inodoro, de sabor ácido no desagradable, soluble en agua, éter y etanol a temperatura ambiente.

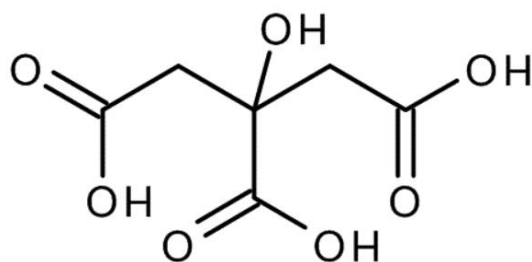
Es un sólido incoloro, translucido o blanco, que se presenta en forma de cristales, granular o polvo (ver figura 2-8). Es anhidro o contiene una molécula de agua de hidratación.

Químicamente, el ácido cítrico comparte las características de otros ácidos carboxílicos. Cuando se calienta a más de $175^\circ C$, se descompone produciendo dióxido de carbono y agua.

Figura 2-8 El ácido cítrico.



Fuente: PROQUINAT (2016).

Figura 2-9 Molécula de ácido cítrico.

Fuente: Merck (2023).

2.3.2. Características generales

Tabla II-4 Características del ácido cítrico.

Formula	C ₆ H ₈ O ₇
Peso Molecular	192,13
Apariencia	Cristales Blancos
Sabor	Sabor ácido
Olor	Prácticamente sin olor
Solubilidad (gr./100 ml a 25°C)	En agua: 162
	En etanol: 59
	En éter: 0,75
Punto de fusión	153°C

Fuente: Bristhar Laboratorios C.A. (2010).

2.2.3. Reseña histórica

En 1784, Scheedle aisló por primera vez el ácido cítrico en forma cristalina a partir del jugo de limones.

En 1860 comenzó a obtenerse el ácido cítrico de las frutas mediante el uso de sales de calcio. Este proceso tenía un rendimiento muy bajo. Eran necesarias de 30 a 40 toneladas de limones para obtener una tonelada de ácido cítrico.

Welmer indico en 1863 que algunos hongos (especies de *Penicillium*) podían producir ácido cítrico cuando se desarrollaban en soluciones azucaradas y sales inorgánicas.

Desde 1920 en adelante fueron desarrollados con éxito procesos de fermentación, en donde se utiliza generalmente cepas del hongo *Aspergillus Niger*, aunque también han sido empleadas ciertas cepas de levaduras. En 1923, los hermanos Pfizer logran obtener ácido cítrico a partir de *Aspergillus Niger* y la fermentación de azúcar, como sustrato se utilizó melazas de remolacha y se está diversificando en sustratos como sacarosa, melazas de caña y jarabe de glucosa.

2.2.4. Método de obtención del ácido cítrico.

El ácido cítrico se obtiene por un proceso de fermentación. Originalmente se obtenía por extracción física del ácido del zumo de limón. Hoy en día la producción comercial de ácido cítrico se realiza sobre todo por procesos de fermentación que utilizan dextrosa o melaza de caña de azúcar como materia prima y *Aspergillus Niger* como organismo de fermentación.

El proceso de obtención tiene varias fases como la preparación del sustrato de melaza, la fermentación aeróbica de la sacarosa por el *Aspergillus Niger*, la separación del ácido cítrico del sustrato por precipitación al añadir hidróxido de calcio para formar citrato de calcio. La eliminación de impurezas se realiza con carbón activado o resinas de intercambio iónico, se continua con la cristalización del ácido cítrico, el secado o deshidratación y el empaquetado del producto,

Según Chinchay (2017), para obtener ácido cítrico por fermentación se deben tomar 3 parámetros claves en el proceso de fermentación que son:

pH: el empleo de un pH ligeramente ácido favorece la producción de ácido cítrico, suprime la producción de ácido oxálico, reduce al mínimo el peligro de contaminaciones y facilita la esterilización.

Temperatura: La temperatura óptima para las cepas productoras de ácido cítrico se encuentra entre 30 °C y 35°C.

Aireación: La formación de ácido cítrico es un fenómeno de oxidación y, por lo tanto, el oxígeno no debe faltar nunca. Para cultivos de superficie, la circulación de aire saturado de humedad debe ser de 200 ml de aire por hora y por gramo de micelio. Para procesos a micelio sumergido se emplean 100 mg de O₂ por litro y por minuto.

A continuación, se detallan los pasos a seguir para la obtención de ácido cítrico actualmente de manera industrial según Delta Enfoque (2009):

2.2.4.1. Preparación del sustrato (melaza).

El objetivo de esta primera etapa del proceso es la purificación del jarabe. Se inicia diluyendo la melaza con agua para tener un medio menos hostil para el microorganismo ya que la alta viscosidad del medio es un impedimento para el óptimo desarrollo del microorganismo, una vez diluida la melaza se pasa por un filtro de vacío para eliminar los sólidos suspendidos y las impurezas de la melaza. Luego la melaza diluida pasa por una celda de intercambio iónico para retirar los iones del flujo. Después la melaza diluida es sometida a un proceso de pasteurización que consiste en elevar la temperatura a 105 °C durante 3 minutos y bajarla nuevamente hasta 37 °C.

2.2.4.2. Fermentación

Una vez pasteurizada la melaza diluida, es bombeada al fermentador el cual es un recipiente rígido en donde se lleva a cabo la transformación de la sacarosa en ácido cítrico por medio del *Aspergillus Niger*. El *Aspergillus Niger* es inoculado en este fermentador.

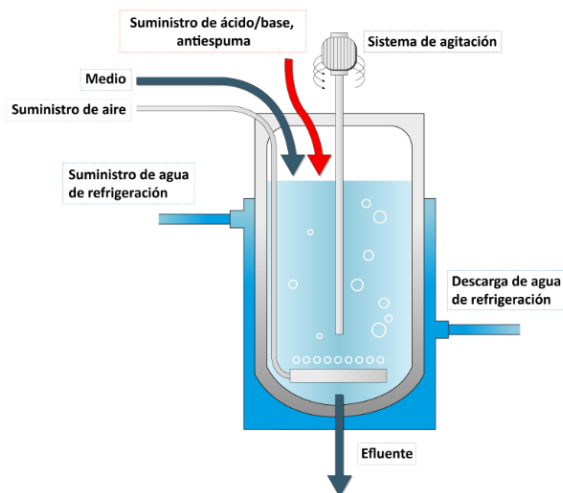
Se hace el ajuste de pH y se añaden nutrientes de ser necesario (NH_3 , sales de fermentación). El aire estéril se burbujea dentro del fermentador. Luego de la fermentación, el flujo es pasado por un filtro rotatorio al vacío para separar el micelio. La masa conformada por el micelio y el microorganismo muerto se denomina biomasa y constituye un efluente del proceso.

La fermentación del *Aspergillus Niger* se la realiza en un biorreactor donde se crea un ambiente propicio para el crecimiento del hongo, en un biorreactor se debe poder controlar parámetros como el pH, agitación del medio, temperatura, aireación y también la inocuidad del medio de cultivo.

Entre sus componentes de un biorreactor más común se encuentra el aireador que suministra un caudal constante de aire desde la parte inferior del biorreactor, los dosificadores de ácido/base que comúnmente se encuentran en la parte superior del biorreactor, las espas agitadoras que giran a una velocidad constante, la mayoría de biorreactores cuentan con un intercambiador de calor en forma de serpentín en su interior como también los que usan un baño maría el cual regula su temperatura desde un termostato externo Delta Enfoque (2009) y también tienen una salida de efluentes en la parte inferior, comúnmente la obtención de ácido cítrico por fermentación se la hace en biorreactores tipo Batch esto por la finalidad de obtener máximos rendimientos aprovechando más

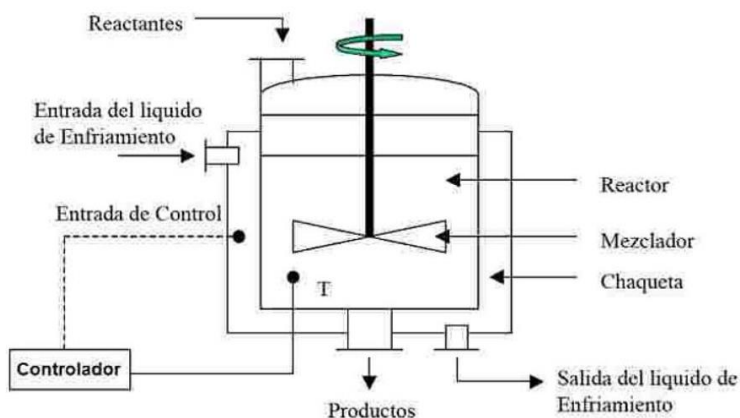
eficientemente la materia prima ya que se puede controlar mejor cuando ha terminado la fermentación Chinchay (2017).

Figura 2-10 Biorreactor



Fuente: Thomas (2024).

Figura 2-11 Esquema de un biorreactor



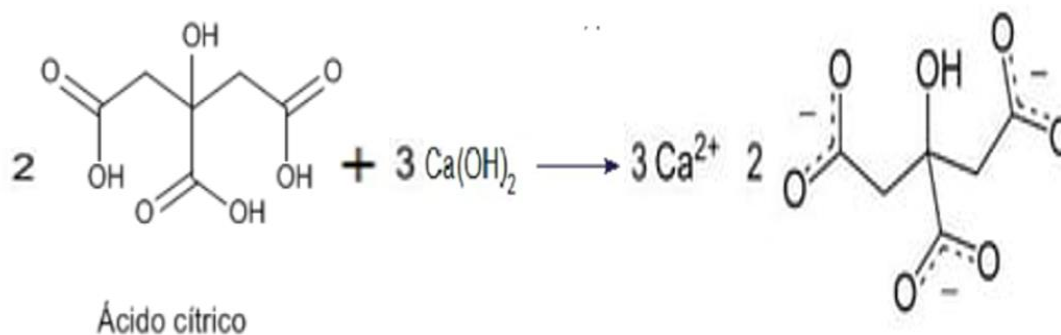
Fuente: IQR (2023).

2.2.4.3. Purificación del ácido cítrico.

El ácido cítrico debe ser separado del micelio, el microorganismo muerto, el azúcar residual, las proteínas producidas por la fermentación y otras impurezas solubles. Para lo cual se lleva a cabo el proceso denominado cal-sulfúrico, el cual se basa en tratar el fermentado con una lechada de cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) formando así citrato de calcio (Figura 2-12). Este citrato resultante es lavado y el micelio

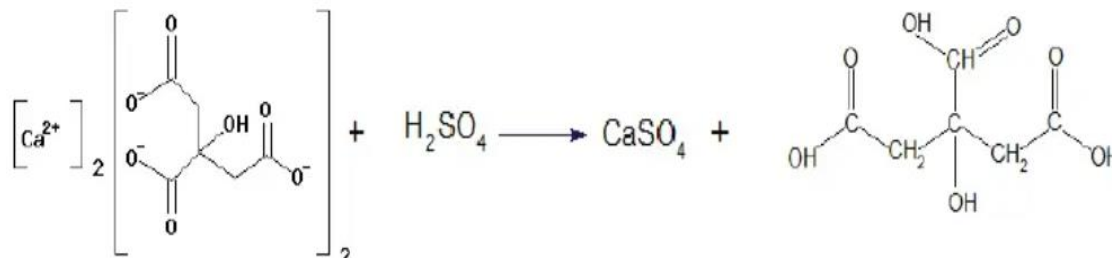
es filtrado. Posteriormente se añade ácido sulfúrico para descomponer el citrato de calcio. Por lo tanto, en este proceso se forma sulfato de calcio el cual es retirado de la solución por medio de un filtro rotatorio al vacío y se reconstituye el ácido cítrico (Figura 2-13).

Figura 2-12 Formación de citrato de calcio.



Fuente: Organic Chemistry universitatis chemia (2010).

Figura 2-13 Reconstitución del ácido cítrico.



Fuente: Organic Chemistry universitatis chemia (2010).

2.2.4.4. Celdas primarias de carbón activado

En estas celdas son removidas las impurezas solubles que producen color a la solución de Ácido Cítrico y en general sustancias orgánicas contenidas en el licor, debido que a lo largo del proceso se añaden sustancias que aumentan la cantidad de iones contenidos en la solución de ácido cítrico, antes de cristalizarlo hay que retirar estos iones (Ca^{2+} y SO_4^{2-}) para estos se usan celdas de resinas de intercambio iónico. La corriente alimenta los evaporadores de múltiples efectos donde se busca evaporar la mayor cantidad de agua para pasar al cristizador.

2.2.4.5. Cristalización

En este proceso se separan los cristales formados del líquido saturado que se denomina licor madre. Este licor se recircula a la etapa de intercambio iónico (celdas de carbón) o al tanque de tratamiento por cal. Los cristales de ácido cítrico húmedos se redisuelven y se recrystalizan al vacío. Luego pasan a la centrifuga en donde es eliminado el licor madre de los cristales formados.

2.2.4.6. Secado

Se realiza en un equipo de lecho fluidizado, que permite retirar humedad hasta cumplir con las especificaciones.

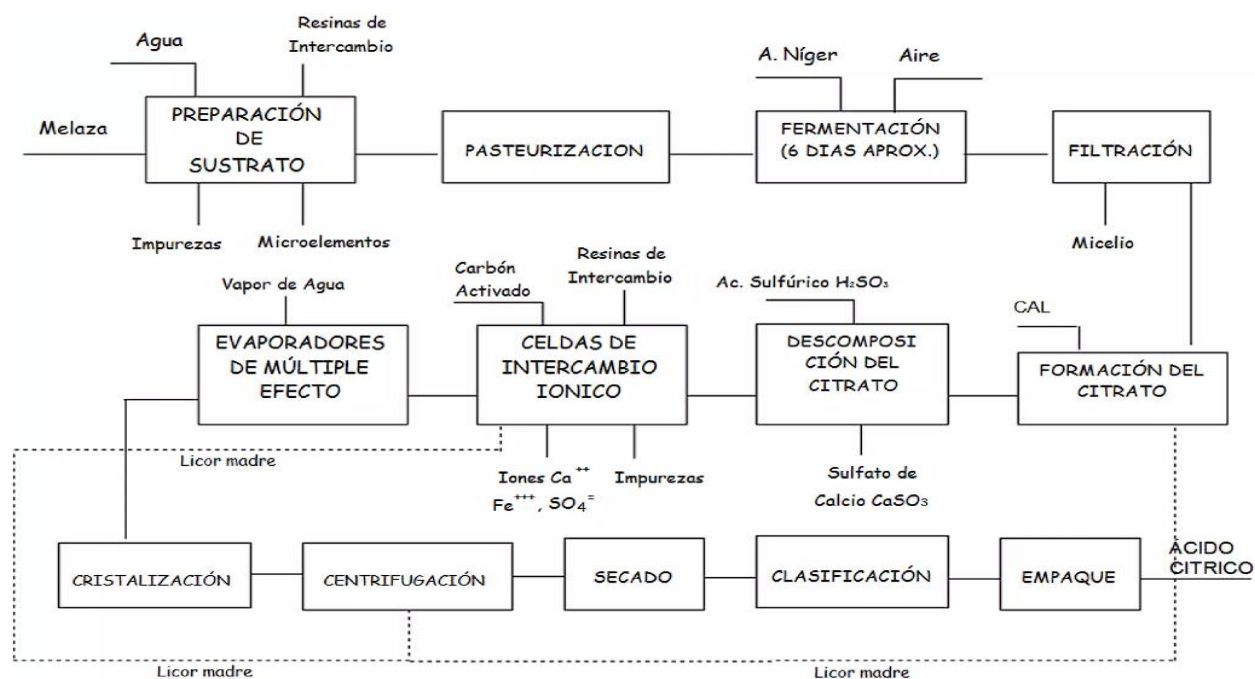
2.2.4.7. Clasificación

Estos cristales son alimentados a un clasificador con 4 mallas en el interior. Aquí se separan en tres presentaciones (Cristal, granular y granular fino). Es rechazado cualquier material fuera de los tamaños estándares, es decir, los terrones y el polvillo.

2.2.4.8. Empaque

Los tamaños anteriormente clasificados son empacados en una bolsa interior de polietileno y exterior de polipropileno.

Figura 2-14 Diagrama de bloques del proceso de obtención de ácido cítrico.



Fuente: Delta Enfoque (2009).

2.2.5. Métodos de análisis de concentración del ácido cítrico en solución,

En la determinación de la concentración de ácido cítrico en solución un método usado es el de cromatografía líquida (HPLC), si bien ofrece un resultado exacto también existe otro método más comúnmente utilizado que es el de titulación de acidez utilizado por Muñiz (2016), donde explica que para poder usarlo se debe evidenciar que la fermentación se ha detenido, esto se puede comprobar con la verificación constante del pH, si el pH ya no disminuye es porque la fermentación cítrica se ha detenido y también para este punto ya el *Aspergillus Niger* ha agotado las reservas óptimas de azúcares reductores como también las trazas de oxalatos y malonatos transformándolos en citrato que posteriormente se convierte en ácido cítrico.

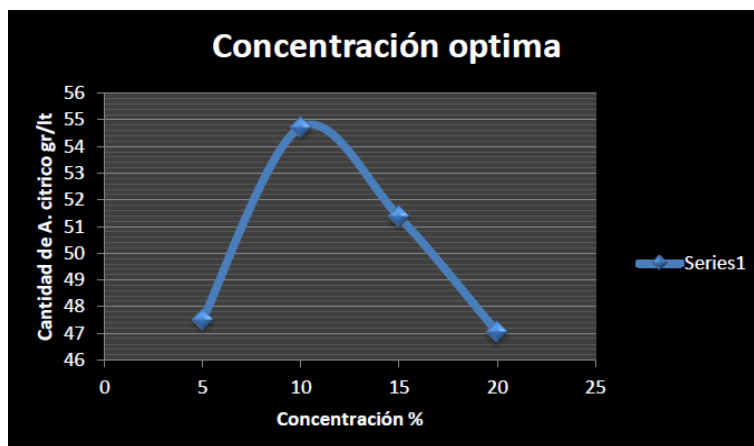
Basado en el metabolismo a favor de la producción de ácido cítrico en la fermentación Muñiz (2016) afirma que la acidez del medio es casi en su totalidad producida por el ácido cítrico, por lo tanto, emplea una titulación con hidróxido de sodio 0,1N para determinar la acidez.

La titulación se la realiza desde el pH final donde terminó la fermentación hasta el pH inicial donde inició el experimento, Muñiz (2016).

Frente al tema Muñiz (2016) también afirma que este método es de análisis fácil y rápido, pero no es tan exacto para la determinación de ácido cítrico. Solo se toma para calcular la acidez y de ahí un parámetro como lo es el peso equivalente de la molécula del ácido cítrico. Los resultados obtenidos pueden ser muy cercanos a su realidad los cuales sirven como una base experimental y podemos observar la generación de ácido en la fermentación aeróbica realizada con *Aspergillus Niger*.

A continuación, se muestra un gráfico obtenido por Muñiz (2016) en la obtención del ácido cítrico en solución usando diferentes concentraciones de melaza en el caldo de fermentación el cual fue enriquecido con azúcares reductores para obtener mayores rendimientos.

Figura 2-15 Concentración de ácido cítrico por titulación



Fuente: Muñiz (2016).

2.2.6. Principales usos

Según Bristhar Laboratorios C.A. (2010), los principales usos del ácido cítrico son:

- **Bebidas:** Saborizante y regulador de pH; incrementa la efectividad de los conservantes antimicrobianos.
- **Dulces y conservas:** Acidulante y regulador del pH para lograr una óptima gelificación,
- **Verduras Procesadas:** En combinación con ácido ascórbico, previene la oxidación,
- **Alimentos Congelados:** Ayuda a la acción de los antioxidantes; inactiva enzimas previniendo pardeamientos indeseables; inhibe el deterioro del sabor y el color.
- **Frutas y hortalizas enlatadas:** Disminuye el pH; previene la oxidación enzimática y la degradación del color, resalta el sabor.
- **Aceites y grasas:** Previene la oxidación.
- **Confitería y repostería:** Se utiliza como acidulante, resaltador de sabores y para optimizar las características de los geles.
- **Quesos pasteurizados y procesados:** En forma de sal, como emulsificante y texturizante.
- **Lácteos:** Estabilizante en cremas batidas.
- **Carnes:** Se utiliza como auxiliar del procesado y modificador de textura.

2.2.7. Costos de producción de ácido cítrico frente a otros ácidos del mercado.

El ácido cítrico obtenido por fermentación tiene un costo de producción en una manera general ronda los 1.560.111 pesos colombianos (392,58 dólares) por tonelada tomando en cuenta el costo de cada paso en una obtención industrial.

Figura 2-16 Costos de producción del ácido cítrico.

Proceso	Materia prima	Mano de obra	Costos	
			indirectos de fabricación	Total
Fermentación	\$1.168.151	\$28.726	\$363.234	\$1.560.111
Purificación	\$344.715	\$22.616	\$213.250	\$580.581
Recuperación	\$85.081	\$44.826	\$226.984	\$356.891
Totales	\$1.597.947	\$96.168	\$803.468	\$2.497.583

Fuente: Lemos y Rodríguez (2016).

En la obtención del ácido fosfórico a partir de la roca fosfatada se tiene un costo de producción de 281.88 dólares por tonelada.

Figura 2-17 Costo de producción del ácido fosfórico.

1.1	Costos de fabricación		\$ 373921
1.1.1	Costo directo de fabricación	\$ 4137162	
a.	Costo de materia prima	3889013	
b.	Costo de mano de obra	70200	
c.	Costo de supervisión e ingeniería	10530	
d.	Costo de mantenimiento	128784	
f.	Costo de auxiliares y servicios	19317	
g.	Costo de suministros de operación	19317	
1.1.2	Costos indirectos de fabricación	\$ 42822	
a.	Carga a planillas	14742	
b.	Gastos de laboratorio	14040	
c.	Gastos generales de planta	14040	
1.1.3	Costos fijos de fabricación	\$ 1674192	
a.	Depreciación	1287839	
b.	Impuestos	257568	
c.	Seguros	128784	
1.2	Gastos generales		\$ 202356
1.1.2	Gastos V.A.I	\$ 202356	
COSTO TOTAL DE FABRICACIÓN			\$ 6 056 532
TOTAL DE UNIDADES PRODUCIDAS POR AÑO		30000	toneladas
COSTO UNITARIO DEL PRODUCTO		281.88	\$ / ton

Fuente: Mendoza y Vega (2015).

En la obtención de ácido succínico por fermentación el costo aproximado es de 33200 pesos mexicanos (1861,26 dólares) por tonelada.

Figura 2-18 Costo de producción del ácido succínico.

Producción ($\text{kg}\cdot\text{a}^{-1}$)	10.012.482
Costo de producción (kg^{-1})	\$ 33.20
Costo neto de producción (kg^{-1})	\$ 31.86
Precio de venta (kg^{-1})	\$ 2.50
Inversión de capital	\$ 176,182,506
Costos operativos (a^{-1})	\$ 332,385,617
Ganancias operacionales (a^{-1})	\$ 25,728,000
Margen bruto	-1191.9%
ROI	-166.5%
VPN (tasa de descuento 7.0%)	-\$ 3,091,731,000

Fuente: Zuluaga y Vargas (2018).

Podemos evidenciar que el ácido cítrico tiene un costo de producción similar al del ácido fosfórico, pero también se ve que existen ácidos como el ácido succínico que pueden tener precios muchos más altos de producción.

2.4. LA FERMENTACIÓN.

2.4.1. Definición

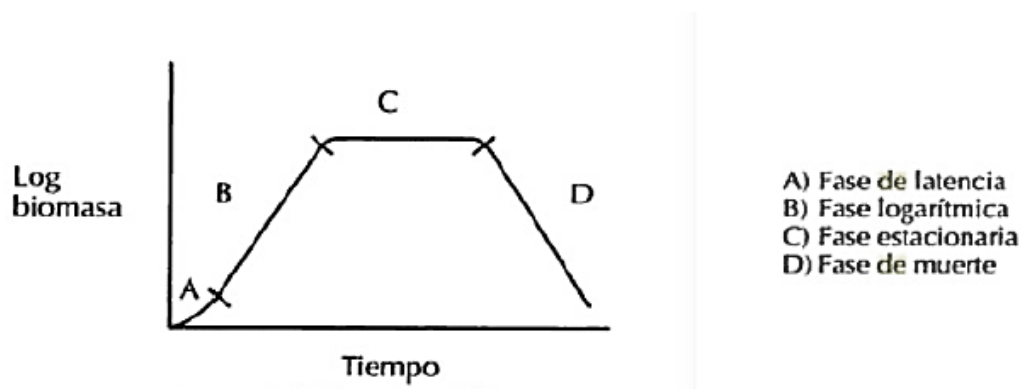
La fermentación es un proceso metabólico de las levaduras y de varias bacterias que transforman compuestos químicos orgánicos en otras sustancias más simples como ácido cítrico, etanol, ácido láctico, ácido butírico, etc.

La fermentación se define desde un punto de vista bioquímico también se considera como el proceso de generación de energía en el que los compuestos orgánicos actúan tanto como donadores como aceptores terminales de electrones. (Shirai y Malpica, 2013)

2.4.2. Curvas de crecimiento de un microorganismo

En el año 2003, Hernández describe una curva que caracteriza el comportamiento del crecimiento de un microorganismo a lo largo del tiempo. En la figura 2-19 se muestra las diferentes fases de crecimiento de un microorganismo.

Figura 2-19 La curva de crecimiento de un microorganismo.



Fuente: Hernández. A. (2003).

2.4.2.1. La fase de latencia

La fase de latencia se presenta después de la inoculación, en esta etapa se presenta la adaptación de los microorganismos al nuevo medio y sus condiciones ambientales y nutricionales por lo tanto no existe aumento en el número de los microorganismos ya que la energía disponible se emplea en crear las enzimas necesarias para sobrevivir en nuevo ambiente, En caso de que en la fase inoculación se haya dado después de la fase logarítmica del microorganismo, la fase de latencia puede ser muy breve o prácticamente inexistente

2.4.2.2. La fase exponencial o logarítmica

En esta etapa es donde los microorganismos empiezan a multiplicarse a gran velocidad y su crecimiento puede ser cuantificado por las células que se producen en una unidad de tiempo (Levaduras o bacterias), también se puede observar el aumento de biomasa por unidad de tiempo (para hongos filamentosos), la velocidad de crecimiento permanece constante siempre y cuando el sustrato se presente en exceso. La fase exponencial continua hasta que:

- Los nutrientes se agotan.
- Las condiciones ambientales indispensables para la célula se modifican.
- La célula produce metabolitos tóxicos u otros que inhiben su reproducción.

Si una de estas situaciones se presenta, la fase exponencial termina.

2.4.2.3. La fase estacionaria

En esta fase la velocidad de crecimiento de las células es igual a su velocidad de muerte, esto es debido al agotamiento de los nutrientes, cambio del medio o a la acumulación de productos tóxicos.

2.4.2.4. La fase de muerte

La fase de muerte inicia cuando los nutrientes que están en el medio ya no son suficientes para que el microorganismo pueda seguir su reproducción o también esta fase puede producirse por la formación de sustancias tóxicas.

2.4.3. Tipos de fermentación.

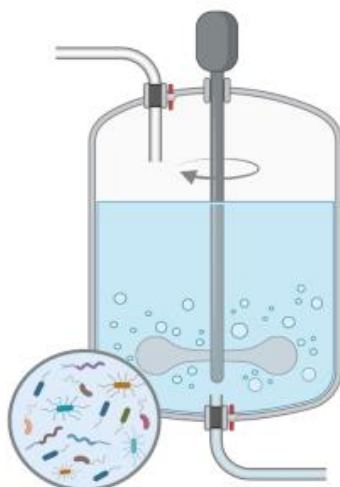
Existen principalmente tres tipos de fermentación comúnmente utilizados y son:

2.4.3.1. Fermentación sumergida.

Consiste en el cultivo de un microorganismo en un tanque profundo rico en los nutrientes que ese microorganismo en particular requiere.

La fermentación sumergida es la técnica normalmente empleada para la producción de ácido cítrico ya que presenta ventajas como el alto rendimiento, la elevada productividad y el bajo costo en mano de obra. Existen 2 tipos de fermentadores empleados: el fermentador convencional con agitación y el fermentador de columna de aire, aunque el último es el más usado debido a las ventajas en el precio, tamaño y funcionamiento. (Vandenberghe et al., 1999).

Figura 2-20 Tanque de fermentación sumergida.



Fuente: Hernández, Díaz, Meléndez, Romero, Martínez y López (2024).

2.4.3.2. Fermentación de superficie.

El cultivo se realiza en bandejas poco profundas con medio de cultivo líquido, el hongo se desarrolla sobre la superficie y el ácido cítrico se acumula en el medio. El medio con ácido se puede retirar por salidas laterales y también agregar medio fresco sin perturbar la capa de micelio, la principal limitación de este método en cuanto a rendimientos es que el contacto con el oxígeno solo se hace en un plano, limitando así el metabolismo más eficiente de *Aspergillus Niger*00, Soria (1997).

Este método requiere menos esfuerzo en el funcionamiento e instalación y los costos de energía son inferiores, aunque es necesaria más mano de obra. A las cámaras de fermentación se les proporciona una circulación de aire eficaz para controlar la temperatura y la humedad, deben estar en condiciones asépticas principalmente durante los primeros dos días cuando las esporas germinan (Vandenbergh et al., 1999).

Figura 2-21 Tanque de fermentación de superficie,



Fuente: Hernández, Díaz, Meléndez, Romero, Martínez y López (2024).

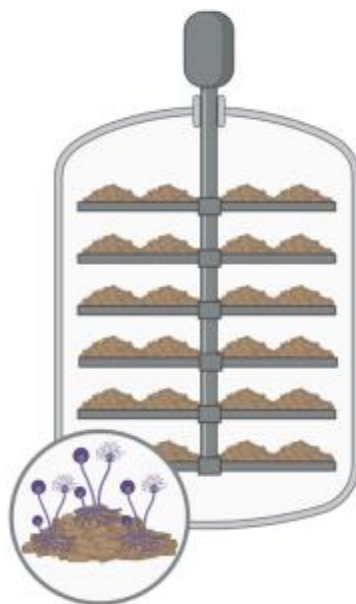
2.4.3.3. Fermentación en estado sólido.

Consiste en el crecimiento de microorganismos sobre partículas sólidas en ausencia de agua libre en el sistema. La extracción de calor metabólico puede convertirse en un problema serio cuando se trabaja a escala de producción, la velocidad de crecimiento del microorganismo es menor que en la fermentación sumergida y su aplicación se encuentra limitada a microorganismos que pueden desarrollarse en ambientes de baja humedad (Mendoza y Kulich, 2004).

Este método de producción no se utiliza a gran escala ya que por la naturaleza del sustrato puede ser difícil impedir la inhibición por la traza de metales presentes por lo tanto se deben agregar

amilasas lo cual aumenta significativamente los costos de producción, es por eso que este método se lo utiliza solamente en aquellos sitios donde se necesitan satisfacer demandas reducidas en sistemas económicos relativamente aislados. Soria (1997).

Figura 2-22 Tanque de fermentación en estado sólido,



Fuente: Hernández, Díaz, Meléndez, Romero, Martínez y López (2024).

2.4.4. Obtención de ácido cítrico por fermentación.

El ácido cítrico es un producto obtenido fundamentalmente por fermentación sumergida por ser la más efectiva para este proceso utilizando diversos microorganismos capaces de degradar materias primas como almidón, sacarosa y residuos agro-industriales como bagazo, melaza, suero de leche y otros, Rivada, (2008).

Para obtener mayores rendimientos con el objetivo de obtener la mayor cantidad de ácido cítrico se le añaden nutrientes a la melaza y metales traza que ayudan en la fermentación, los límites máximos de concentración de los mismos son los siguientes:

Tabla II-5 Concentración máxima de nutrientes y metales traza.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (mg/L)
Nitrógeno	2500
Potasio	150
Sodio	150
Magnesio	1100
Cobre	0,24
Zinc	1,50
Hierro	0,10
Fosforo	2000

Fuente: Rivada (2008).

Estos nutrientes y metales traza se añaden a la melaza en formas de NH_4Cl , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y NaCl , Rivada (2008).

Cationes como ser el Mn^{2+} Son inhibidores en la fermentación cítrica por lo tanto su concentración es preferible que sea nula. Soria (1997).

Los niveles de azúcares para una fermentación óptima se sitúan en los 100g/L, pero las melazas de caña no alcanzan estas concentraciones por lo tanto es necesario que sean aditivos en el caldo de fermentación. Soria (1997).

Para que proceso de producción de ácido cítrico se realice de manera adecuada se debe controlar las condiciones y variables de operación, para la sección de fermentación, las variables a tener en cuenta son temperatura constante y 1 atmósfera de presión. La fermentación del hongo *Aspergillus Niger* se da aun pH de 5,8, a una temperatura óptima de 35 °C, durante cinco días. (Guadalupe, Salazar, Rodríguez, Brito, 2021).

Según la investigación de Rosas y Terán (2015), sobre la obtención de ácido cítrico con melaza del Ingenio Azucarero del Norte (Ecuador), los rendimientos óptimos obtenidos con la fermentación de la melaza por el *Aspergillus Niger* fueron con un tiempo de fermentación de 6 días usando una proporción de 3 litros de melaza por cada 7 litros de agua, se diluye la melaza con el fin de obtener un medio de fermentación menos abrasivo para el desarrollo del *Aspergillus Niger*.

En la investigación de Cuauhtémoc (2012) donde comparo el rendimiento de obtención de ácido cítrico por fomentación de la melaza con *Aspergillus Niger* en México concluyo que el pH más adecuado para un mayor rendimiento en esa melaza fue de pH=5 con una temperatura constante de 30 °C con una cantidad de aproximadamente 8 – 10 gramos de *Aspergillus Niger* por cada 10 litros de melaza diluida con *Aspergillus Niger*.

Por la bibliografía recopilada se puede confirmar que el tipo de melaza, composición y su origen es un factor importante en la obtención de ácido cítrico ya que de ello depende que variables serán las más óptimas en su proceso de fermentación, Las dos variables más importantes en este proceso como señala Rosas y Terán (2015) son la temperatura y el pH manteniendo la presión constante a 1 atm, también señala que la proporción óptima de dilución de la melaza es de 3 litros de melaza por cada 7 litros de agua, la cantidad añadida de cultivo de *Aspergillus Niger* según Cuauhtémoc (2012) es entre 8 – 10 gramos por cada 10 litros de melaza diluida.

2.5.5. Pretratamiento de la melaza antes de la fermentación

Para conseguir una melaza óptima que pueda albergar y permitir el desarrollo de un microorganismo debe pasar por una serie de acondicionamientos previos.

2.5.5.1. Dilución.

La alta concentración de los azúcares y sales en la melaza producen una alta presión osmótica lo convierte en un ambiente hostil para el desarrollo de los microorganismos y por lo tanto no puede actuar un proceso de fermentación, además la melaza presenta una alta viscosidad lo que la vuelve poco práctica al trabajar con ella, es por eso que se diluye la melaza hasta que tengan alrededor de 29° grados Brix para su uso en la obtención de ácido cítrico. (L. Jeri, 2015).

2.5.5.2. Esterilización.

Debido al tratamiento que reciben las melazas durante el proceso de cristalización, y por la naturaleza misma de la caña, este sustrato puede contener varias formas de contaminación bacteriana como ser la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* la cual polimeriza las moléculas de sacarosa en *dextranos* no fermentables. (S. Garzón, 2009). También el metabolismo de las demás bacterias existentes implica la disminución en la actividad de *Saccaromyces cerevisiae* y por lo tanto la disminución en el rendimiento de alcohol a partir del sustrato, así como también, la generación de características indeseables en el producto final, es por esta razón que se aplica un método de tratamiento como es la esterilización que tiene como objetivo la destrucción completa

de la vida microbiana incluyendo las esporas bacterianas usando un incremento de temperatura. (L. Jeri, 2015).

Según Rosas y Terán (2015), se logra una esterilización efectiva con la melaza llevándola a una temperatura de ebullición y manteniéndola alrededor de unos 10 – 15 minutos.

2.5. ELABORACIÓN GENERAL DEL PROCESO DE OBTENCIÓN

Para la selección del proceso se tomarán en cuenta las tecnologías actuales y disponibles para la obtención del ácido cítrico, los métodos a considerar serán:

- **Extracción de frutas cítricas:** Este método se logra a partir de una extracción física del ácido cítrico que se encuentra en el zumo de limón, presenta subproductos como ser las semillas y cascaras.
- **Síntesis química:** Se logra la obtención de ácido cítrico con la adición nucleofílica de HCN para la formación de ácido dicloroacetonico, tratando luego con KCN y con una hidrolisis, se tienen subproductos como amoniaco.
- **Fermentación:** Se emplean microorganismos que producen ácido cítrico en su metabolismo de la sacarosa presente en la melaza, producen biomasa como subproducto.

Se procede a formar la matriz de decisión:

Tabla II-6 Matriz de selección para las tecnologías analizadas.

FACTOR DE DECISIÓN	VALOR PONDERADO	PUNTUACIÓN ASIGNADA		
		EXTRACCIÓN DE FRUTAS CÍTRICAS	SÍNTESIS QUÍMICA	FERMENTACIÓN
Materia Prima	25	4	1	4
Capacidad de producción	25	3	2	4
Subproductos	20	2	1	4
Insumos	5	4	1	3
Tecnología Local	25	3	1	3

FACTOR DE DECISIÓN	VALOR PONDERADO	PUNTUACIÓN ASIGNADA		
		EXTRACCIÓN DE FRUTAS CÍTRICAS	SÍNTESIS QUÍMICA	FERMENTACIÓN
Puntuación Total	100			

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla II-7 Valoración de la escala para la matriz de selección.

VALORACIÓN DE LA ESCALA	
1	Malo
2	Regular
3	Bueno
4	Excelente

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla II-8 Puntajes de la matriz de selección.

FACTOR DE DECISIÓN	EXTRACCIÓN DE FRUTAS CÍTRICAS	SÍNTESIS QUÍMICA	FERMENTACIÓN
Materia Prima	100	25	100
Capacidad de producción	75	50	100
Subproductos	40	20	100
Insumos	20	5	75
Tecnología Local	75	25	75
Puntuación Total	310	125	450

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Visualizando los resultados podemos concluir que el método más factible para la obtención de ácido cítrico con un mayor rendimiento es mediante la fermentación de la melaza.

Se seleccionará una fermentación sumergida ya que según Vandenberghe et al. (1999) es el tipo de fermentación donde mayores rendimientos se obtienen a la hora de obtener ácido cítrico por fermentación de la melaza con *Aspergillus Niger*.

En base al método seleccionado en este proyecto de investigación aplicada se consultó varias fuentes bibliográficas acerca de la obtención de ácido cítrico mediante el uso de microorganismos. Según Papagianni (2007) señala que el *Aspergillus Niger* es el microorganismo con el que se obtienen mejores rendimientos de producción de ácido cítrico a partir de la melaza.

Se elige este microorganismo para la fermentación de la melaza debido a sus altos rendimientos en comparación con otros microorganismos.

Tomando en cuenta las investigaciones de Chinchay (2017), Guadalupe, Salazar, Rodríguez, Brito (2021) y de Rosas y Terán (2015) las variables más importantes a considerar en la fermentación de la melaza con *Aspergillus Niger* son la temperatura y el pH donde los mayores rendimientos se dieron en temperaturas de 30 y 35 °C y pH de 5 y 5,8, los autores difirieron en la combinación de estos valores por el tipo de melaza que tenían, es por eso que para esta investigación se elegirán sus variables más importantes junto con sus valores donde se obtuvieron mejores rendimientos de cada autor y se buscará la combinación donde la fermentación de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo con *Aspergillus Niger* obtenga el mayor rendimiento al obtener ácido cítrico en solución.

La investigación de Rosas y Terán (2015), señala que se obtuvieron los rendimientos máximos en 6 días de fermentación usando una proporción constante de 3 litros de melaza por cada 7 litros de agua y una aireación también constante de 4 litros de aire por minuto.

Cuauhtémoc (2012) obtuvo su rendimiento máximo de obtención de ácido cítrico por fermentación de melaza con un pH de 5 a una temperatura de 30 °C usando una cantidad constante de 8 gramos de *Aspergillus Niger* por cada 10 litros de melaza diluida.

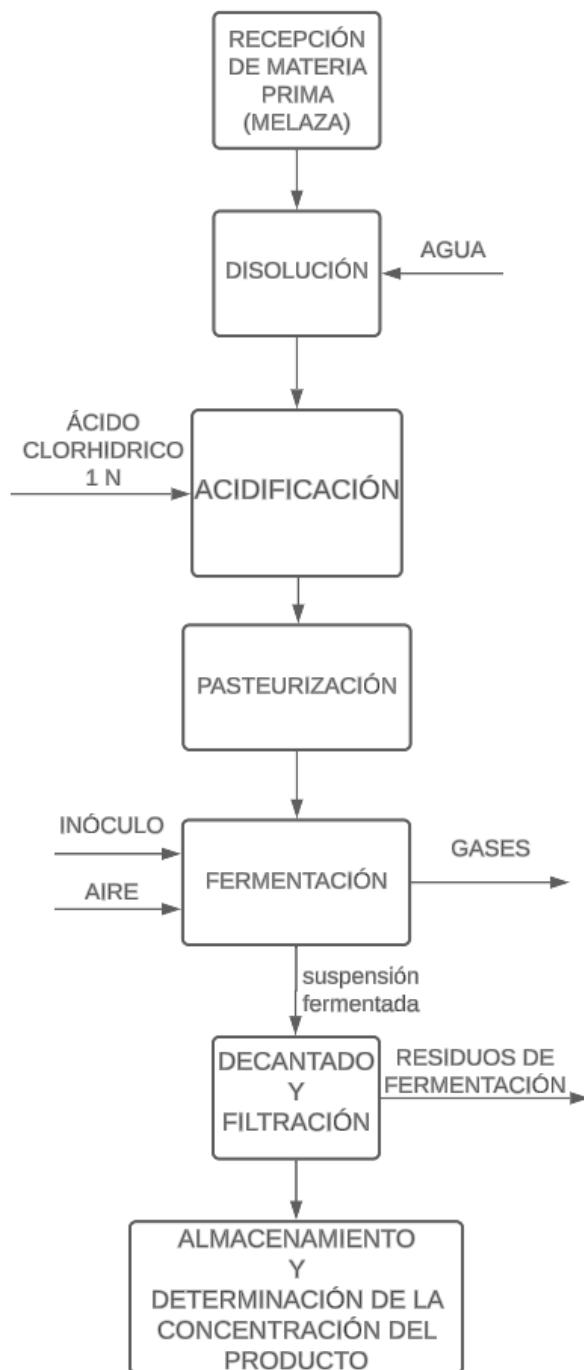
Las investigaciones señaladas anteriormente se usarán como precedentes para obtener el mayor rendimiento en la obtención de ácido cítrico por fermentación de melaza del ingenio azucarero de Bermejo por lo tanto se usarán sus variables y valores con los cuales se obtuvieron mayores rendimientos.

Tabla II-9 Parámetros y valores óptimos

PARÁMETRO	VALOR ÓPTIMO
Temperatura	30 y 35 °C
pH	5 y 5,8
Tiempo de fermentación	6 días
Aireación	4 L/min (constante)
Proporción de dilución de melaza	3 L de melaza por cada 7 L de agua
Cantidad de <i>Aspergillus Niger</i>	8 gramos de cultivo (constante)

Fuente: Elaboración propia (2024).

Figura 2-23 Diagrama de flujo para la obtención de ácido cítrico en solución.



Fuente: Elaboración propia (2023).

Tabla II-10 Parámetros usados en cada fase.

FASE	PARÁMETROS	
RECEPCIÓN DE MATERIA PRIMA	Almacenamiento	
	Bidones de 20 L	
DILUCIÓN	Agua	Melaza
	7 litros	3 litros
ACIDIFICACIÓN	pH (menor)	pH (mayor)
	5	5,8
PASTEURIZACIÓN	Tiempo total de calentamiento hasta ebullición	Temperatura
	40 min	105 °C
FERMENTACIÓN	Tiempo	Temperaturas
	6 días	30 y 35°C
	Aireación	pH
	4 L/min	5 y 5,8
	Volumen	Cantidad de Cultivo
	10 Litros	8 gramos
FILTRACIÓN	Filtrado	
	Filtrado cada 10 L (por cada experimento)	
ALMACENAMIENTO	Almacenado	
	Bidones de 10L	

Fuente: Elaboración propia (2024).

2.5.1. Análisis de resultados

Se usará el diseño factorial para el análisis de datos experimentales de esta investigación ya que como explica Montgomery (2007), muchos experimentos involucran el estudio de efectos de dos o más factores; el diseño de experimentos factorial de dos niveles (2^k) es el más eficiente para este tipo de casos ya que en un diseño factorial, consiste en una prueba completa de experimentos en la

cual todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores son tenidas en cuenta como también los niveles ya sean altos y bajos o dos valores que se consideran óptimos de los factores.

Los diseños factoriales de dos niveles (2^k) son los más utilizados y eficientes en experimentos con dos o más factores ya que permite conocer con una alta asertividad su influencia de estos en la variable respuesta lo cual es importante en una investigación científica. (Fernández, 2020).

Para el análisis de los datos experimentales de esta investigación se tomarán 2 niveles que se consideran óptimos de cada factor (pH y temperatura) y con el desarrollo factorial se buscare si son significativos y con qué combinación se puede conseguir mayor rendimiento en la obtención de ácido cítrico en solución por la fermentación de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo.

CAPÍTULO III
DESCRIPCIÓN DEL PROCESO
EXPERIMENTAL

CAPÍTULO III

3. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO EXPERIMENTAL

3.1. INTRODUCCIÓN

En este capítulo se describirá el proceso experimental de la obtención de ácido cítrico en solución por fermentación de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo como también se especificarán los equipos, materiales y reactivos utilizados.

3.2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS DE LABORATORIO.

Los equipos empleados en la parte experimental fueron los siguientes:

- balanza Analítica
- refractómetro
- pH-metro
- termostato
- bomba de agua
- filtro de agua
- biorreactor
- aireador
- cocina
- incubadora
- calentador Eléctrico
- frigorífico
- autoclave
- microscopio

En la realización de la parte experimental se utilizaron los siguientes materiales:

Tabla III-1 Descripción del material utilizado.

Material	Tipo	Capacidad/tamaño	Cantidad
Probeta	Vidrio boro silicato	100 ml	1
Vidrio reloj	Vidrio Pírex	Mediano	4

Material	Tipo	Capacidad/tamaño	Cantidad
Caja Petri	Vidrio boro silicato	Mediana	8
Varilla	Vidrio pírrex	Mediana	1
Termómetro	Vidrio	0 a 100 °C	1
Embudo	Plástico	Mediano	1
Cucharon	Madera	Grande	1
Cacerola	Aluminio	17 L	1
Espátula	Metálico	Pequeña	1
Vasos precipitados	Vidrio boro silicato	250, 800, 1000 ml	3
Matraz Erlenmeyer	Vidrio boro silicato	50, 250 ml	2
Asa	Metálico-Madera	Pequeña	1
Piseta	Plástico	Mediana	1
Jarras	Plástico	1 y 2,5 L	2

Fuente: Elaboración propia (2023).

Los reactivos utilizados en la obtención del ácido cítrico en solución fueron:

- agua destilada
- alcohol Etílico al 98%
- cepa de *Aspergillus Niger*
- agua de mesa
- ácido clorhídrico 1 N
- melaza
- peptona
- glucosa
- agar Raka-Ray

3.3. DISEÑO FACTORIAL

3.3.1. Construcción del diseño factorial 2^k.

En la selección de las variables independientes usadas en el diseño factorial, para este tipo de estudio se pueden considerar el tiempo, el pH, la temperatura, azúcares reductores, biomasa, los grados Brix, etc. sin embargo por la naturaleza, complejidad de toma de muestra, o su relevancia

como también según los estudios similares a este caso, se toman como más representativos, útiles y relativamente accesibles de controlar a los parámetros de pH y temperatura, a continuación se presenta una justificación de cada parámetro que pudo ser considerado como una variable independiente junto a su justificación del porque no se lo tomo en cuenta para este estudio en específico.

Tabla III-2 Justificación de parámetros no tomados como variables independientes.

PARÁMETRO	JUSTIFICACIÓN
Azucares reductores	No se consideró la variación de los azucares reductores de la melaza en este estudio porque la finalidad del mismo es encontrar que tan viable es la melaza del Ingenio Azucarero de Bermejo por su naturaleza a la hora de ser el principal nutriente del <i>Aspergillus Niger</i> en la obtención de ácido cítrico en solución.
Biomasa	No se tomó en cuenta como variable independiente porque no se encuentra de manera homogénea en el caldo de fermentación, imposibilitando la toma de una muestra representativa del mismo y de no ser así es un dato impreciso de cómo evoluciona la fermentación.
Tiempo de fermentación	Por la naturaleza de este estudio en donde se plantea que la fermentación debe proseguir hasta que los nutrientes ya sean insuficientes para el <i>Aspergillus Niger</i> para que el mismo digiera los oxalatos y malatos en solución, el tiempo de fermentación debe ser una variable fija, que por pruebas preliminares se encontró que las condiciones antes dichas se cumplen en el día 6 de fermentación.

PARÁMETRO	JUSTIFICACIÓN
Grados Brix	<p>Los grados Brix si bien nos pueden informar de la cantidad de azúcares que están siendo consumidos por el <i>Aspergillus Niger</i> a lo largo del tiempo, es un dato indirecto de la presencia del ácido cítrico en el fermentado, es por ello que no se lo considero como una variable independiente.</p>
Cantidad de <i>Aspergillus Niger</i>	<p>La razón por la que no se lo considero como una variable independiente es porque los estudios de Rosas y Terán (2015), Guadalupe, Salazar, Rodríguez, Brito, (2021) y Cuauhtémoc (2012), definieron como una constante adecuada que exista entre 8 y 10 gramos de <i>Aspergillus Niger</i> por cada 10 L de fermentado ya que es una cantidad adecuada para el desarrollo inicial cuando la melaza es el nutriente principal, de existir mayor cantidad se observó que se metabolizan los azúcares reductores pero se forma mucha mayor biomasa que ácido cítrico y por esta razón el equilibrio que plantean los autores es una cantidad adecuada que fue corroborada en sus estudios donde del <i>Aspergillus Niger</i> metaboliza los azúcares reductores y formando una considerable cantidad de ácido cítrico antes que biomasa.</p> <p>Al ser una concentración definida para la obtención de resultados óptimos, no se tomó este parámetro como una variable independiente.</p>

PARÁMETRO	JUSTIFICACIÓN
Concentración de melaza	<p>La concentración de la melaza fue estandarizada en anteriores estudios como por ejemplo el de Cuauhtémoc (2012), donde se encuentra que para un desarrollo óptimo del <i>Aspergillus Niger</i> los azúcares reductores del fermentado deben ser de entre 30 y 40 g/L y para conseguir esas concentraciones la melaza es diluida con agua hasta una concentración de 0.33 gr/L esto se obtiene al diluir 3 Litros de melaza con 7 Litros de agua.</p> <p>Por lo tanto como es una concentración definida para que se optima, no se consideró este parámetro como una variable independiente.</p>

Fuente: Elaboración propia (2024).

El poder sacar como mínimo una muestra cada día para controlar el avance de la fermentación fue una consideración indispensable a la hora de elegir las variables independientes.

En contraparte las variables que si se tomaron como variables independientes como el pH y temperatura tienen aspectos importantes a tomar en cuenta como ser:

- pH: El pH del medio de fermentación es un factor esencial para el desarrollo del microorganismo, en estudios como el de Rosas y Terán (2015) y Cuauhtémoc (2012) se encontraron que los dos valores de pH donde se obtuvieron mayores cantidades de ácido cítrico en sus respectivos estudios son 5 y 5,8 por lo tanto para saber con qué pH responde con mayor rendimiento la melaza del ingenio azucarero de Bermejo, se la considera como una variable independiente además que tratándose del pH si se pueden tomar muestras diarias y representativas del medio de fermentación, el descenso del pH es un indicativo directo de la formación de ácido cítrico en la fermentación.
- Temperatura: Es un influyente característico en cada fermentación, en su variación respecto al *Aspergillus Niger* puede inducir en la mayor obtención de ácido cítrico o de mayor

formación de biomasa, en estudios precedentes se observa que la naturaleza de la propia melaza influye para que un cambio de temperatura induzca un comportamiento u otro, por ejemplo en el estudio de Rosas y Terán (2015), una temperatura propicia se la considera a 30°C pero Guadalupe, Salazar, Rodríguez, Brito, (2021) concentraron que con su melaza el rendimiento más óptimo se encuentran en temperaturas de 35°C, es por ello que se ve la necesidad de tomar a la temperatura como una variable independiente para encontrar con que temperaturas se favorece la formación de ácido cítrico por encima de la biomasa usando la melaza del ingenio azucarero de Bermejo.

Se construye el modelo con el uso de dos niveles por cada factor empleado, siendo los factores el pH y la temperatura y sus niveles los valores óptimos obtenidos en investigaciones similares con otro tipo de melaza como lo son los de Rosas y Terán (2015), Guadalupe, Salazar, Rodríguez, Brito, (2021) y Cuauhtémoc (2012).

El modelo del experimento será: 2^2

El número de experiencias será: $2^2 = 4$

Por el tiempo de fermentación a considerar como también con el objetivo de obtener resultados significativos y validos se consideran 2 réplicas por cada experiencia.

El número de experimentos totales será: $2^2 \times 2 = 8$ experimentos.

A continuación, se muestran los factores escogidos y el dominio experimental en la tabla III-3

Tabla III-3 Factores y dominio experimental

Factores	Dominio experimental	
	Nivel (-)	Nivel (+)
A: pH	5	5,8
B: Temperatura	30	35

Fuente: Elaboración propia (2023).

Para conocer la influencia de los factores se los hace variar entre los extremos de su dominio experimental: Entre el nivel -1 y +1. Se debe hacer la variación con cada posible combinación de

los valores de los demás factores, el diseño factorial completo 2^2 se puede contemplar en la tabla III-4.

Tabla III-4 Matriz de experimentos.

N°	Matriz de experimentos		Plan de experimentos		
	A	B	pH	Temperatura	Respuesta
1	-1	-1	5,8	35	Y1
2	+1	-1	5	35	Y2
3	-1	+1	5,8	30	Y3
4	+1	+1	5	30	Y4
5	-1	-1	5,8	35	Y5
6	+1	-1	5	35	Y6
7	-1	+1	5,8	30	Y7
8	+1	+1	5	30	Y8

Fuente: Elaboración propia (2023).

Donde:

Variable respuesta

YI = Concentración en gr/L

3.4. CONSTRUCCIÓN DEL BIORREACTOR

Se construyó el equipo de fermentación de tal forma de que puedan funcionar 2 biorreactores en simultaneo e ininterrumpidamente con una temperatura y aireación regularizada.

Figura 3-1 Vista frontal del equipó de fermentación,



Fuente: Elaboración propia (2023).

Figura 3-2 Vista desde arriba del equipó de fermentación,



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.4.1. Biorreactores

Para los biorreactores se usaron tápers transparentes de 12 L, se usó un volumen superior al de la disolución a fermentar por la precaución que el burbujeo de aire eleve espuma y líquido, los

biorreactores cuentan con dos mangueras de inyección de aire ambas con la capacidad de introducir 4 L/min de aire de tal forma que si la manguera principal sufriera un taponamiento con sólidos como la biomasa, se pueda disponer inmediatamente de la otra manguera aireadora impidiendo así la interrupción de la fermentación aeróbica, también cuenta con dos mangueras de salida de aire y espuma en caso de un exceso de presión dentro del biorreactor, esto con el fin de evitar que se deba parar la fermentación por un exceso de espuma o biomasa dentro del biorreactor y se implementó un orificio con tapa para sacar diariamente muestras del fermentado.

Figura 3-3 Biorreactor



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.4.2. Aireadores

Cada aireador tiene dos salidas de aire con la capacidad de suministrar 4 L/min de aire en cada salida, el aire se conduce con dos mangueras desde las dos salidas del aireador hacia el biorreactor, cada biorreactor tiene su aireador individual.

Figura 3-4 Aireador

Fuente: SOBO (2023).

3.4.3. Filtro de aire

este aire debe tener la menor cantidad de solidos con el fin de no contaminar el interior de los biorreactores por ello se encuentran aislados dentro de un táper de sellado hermético con dos esponjas en la parte superior que filtran el aire que ingresa a los aireadores

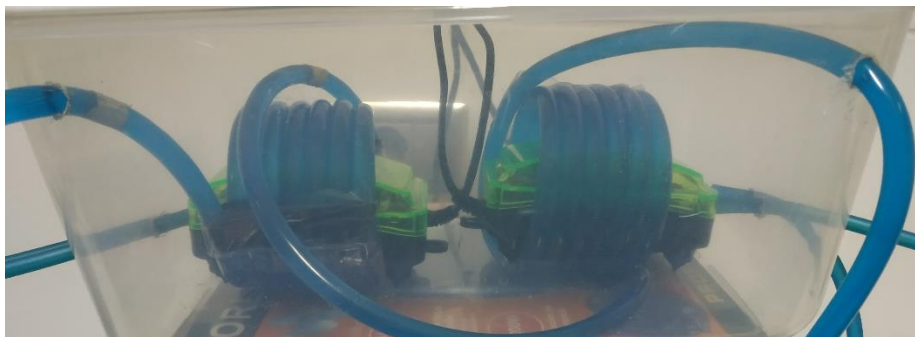
Figura 3-5 Aireadores dentro del filtro de aire.

Fuente: Elaboración propia (2023).

3.4.4. Enfriadores

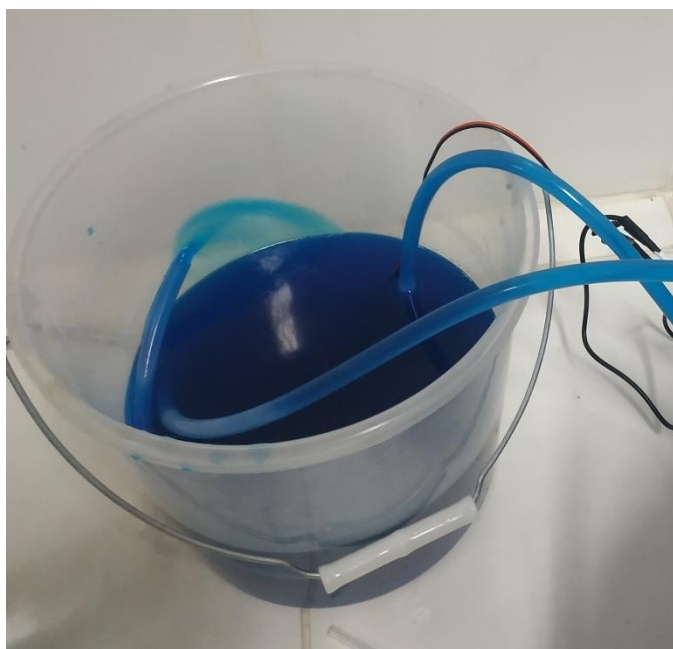
cada aireador está dentro de su propia manguera en forma de bobina por donde circula agua a temperatura ambiente, esta agua es recirculada por una bomba hidráulica que opera externamente del filtro, se vio conveniente pigmentar el agua esto con el fin de facilitar la absorción del calor y también su disipación fuera del filtro.

Figura 3-6 Serpentina con refrigerante envolviendo los aireadores.



Fuente: Elaboración propia (2023).

Figura 3-7 Bomba sumergida.



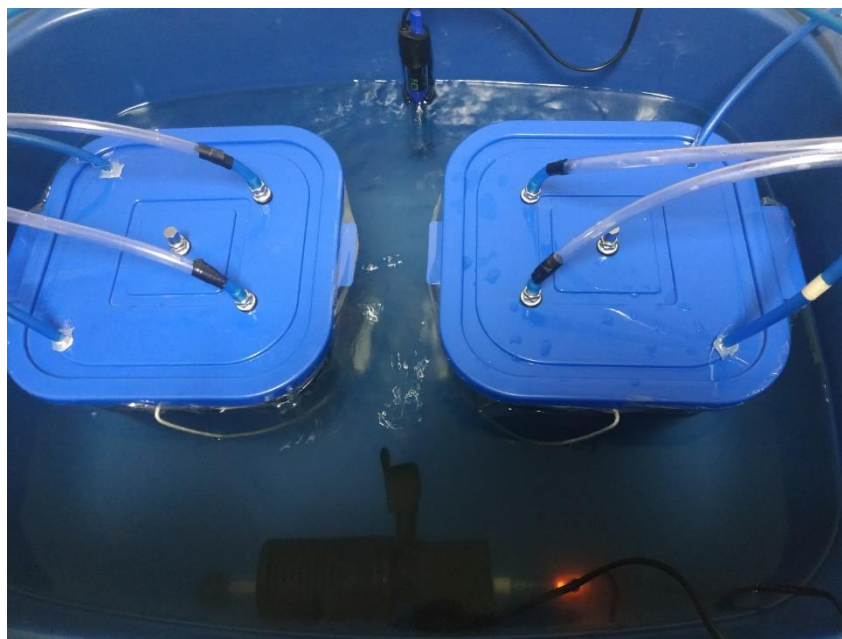
Fuente: Elaboración propia (2023).

3.4.5. Baño María

El baño maría se estableció dentro de un bañador de 50 litros con agua capaz albergar a los dos biorreactores en simultaneo, se regularizo la temperatura usando un termostato de 200 W de potencia, se tiene también un termostato provisional de 50 W que se activará automáticamente en un cambio brusco de temperatura, se usó una bomba hidráulica con filtro de esponja para generar

turbulencia dentro del bañador con el fin de homogenizar rápidamente los cambios de temperatura bruscos que se puedan producir a la vez que se aseguraba poder mantener limpia el agua dentro del bañador gracias al filtro y así reducir lo más posible los contaminantes circundantes a los biorreactores haciendo posible la constante reutilización del agua en el baño maría.

Figura 3-8 Biorreactores sumergidos en el baño maría.



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.4.6. Interruptores

Se agrupó el suministro de energía eléctrica al biorreactor en su conjunto bajo el dominio de tres interruptores que son:

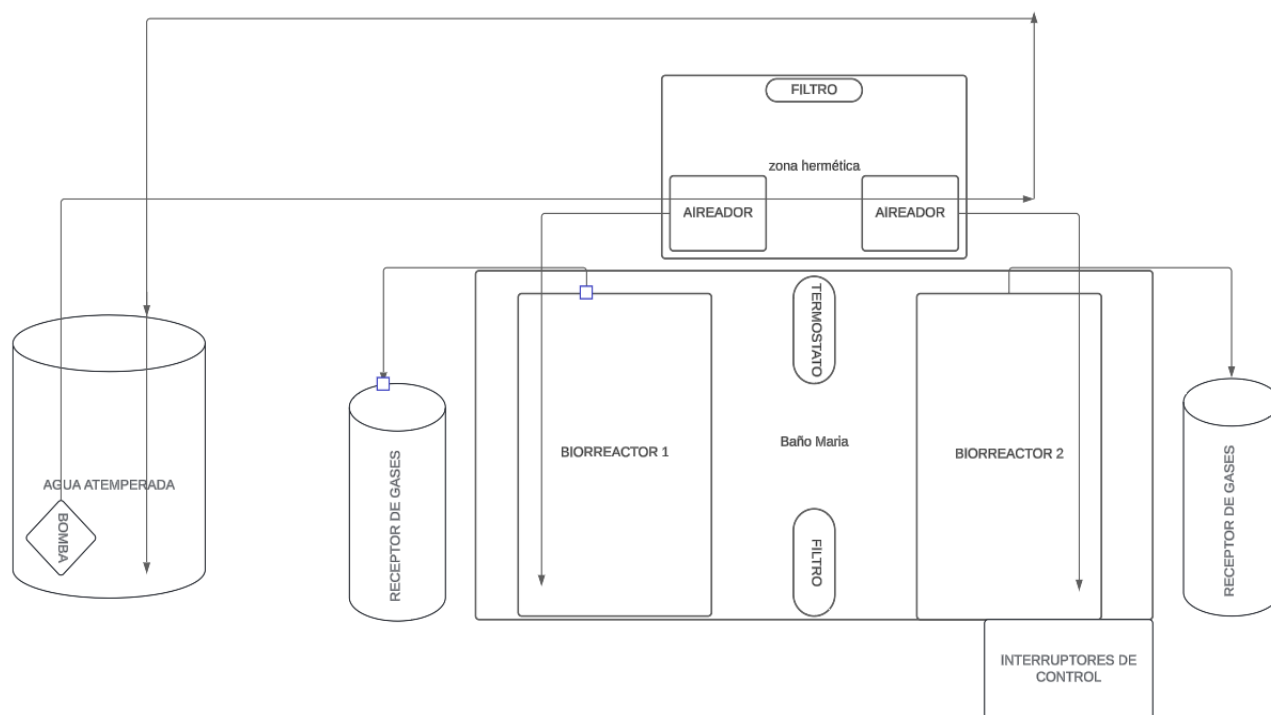
- Interruptor A: Controla el suministro de energía eléctrica hacia el sistema de enfriamiento a la vez que enciende los dos aireadores.
- Interruptor Central (B): Permite encender o apagar solo la bomba hidráulica del sistema de enfriamiento, esto permite parar el sistema de enfriamiento sin detener los aireadores y así hacer un cambio del agua refrigerante por si experimenta una subida de temperatura mayor a la temperatura ambiente.
- Interruptor C: Controla el suministro de energía eléctrica tanto al filtro de agua y al termostato que controlan el baño maría.

Figura 3-9 Interruptores



Fuente: Elaboración propia (2023).

Figura 3-10 Esquema del biorreactor



Fuente: Elaboración propia (2024).

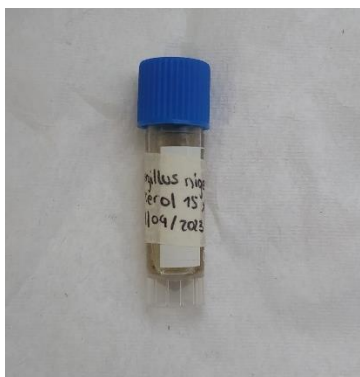
3.5. Cultivo del *Aspergillus Niger*

El cultivo del *Aspergillus Niger* se realizó en el laboratorio de Microbiología.

3.5.1. Almacenamiento del *Aspergillus Niger*

La cepa de *Aspergillus Niger* fue proporcionada por la Universidad Mayor de San Simón (UMSS) en dos viales conservados en caldo Sabouraud con glicerol al 15% y fue almacenada a -20 °C por recomendación del proveedor.

Figura 3-11 Cepa de *Aspergillus Niger* recibida de la UMSS.



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.5.2. Extracción de un volumen de trabajo desde un vial con *Aspergillus Niger*

Se atempero gradualmente uno de los viales con *Aspergillus Niger* hasta la temperatura ambiente, posteriormente se tomó una fracción de volumen usando una pipeta para después depositarlo en otro vial para empezar desde allí con el sembrado, se volvió a guardar de nuevo el vial original con el *Aspergillus Niger* a -20 °C.

3.5.3. Preparación del medio de cultivo

Para elaborar el medio de cultivo se usó la siguiente composición:

- 80 ml de agua destilada
- 6,992 gr de Agar Raka-Ray
- 0,4 gr de peptona
- 3,2 gr de glucosa

La mezcla se homogeniza en un matraz Erlenmeyer de 250 ml para posteriormente ser calentada hasta su punto de ebullición y ser vertido en 4 cajas Petri esterilizadas donde se solidificará.

Figura 3-12 Calentamiento del caldo de cultivo.

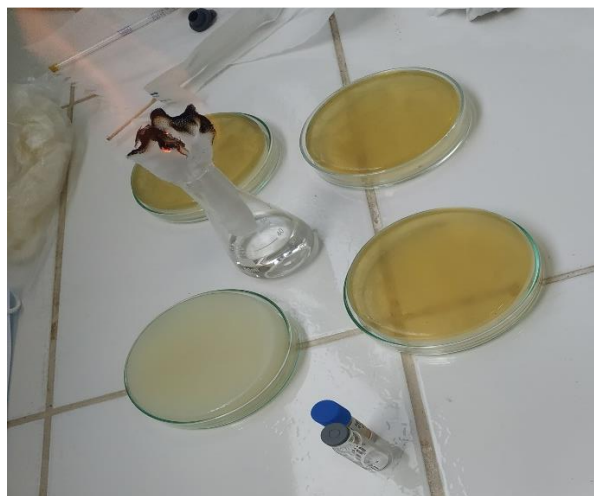


Fuente: Elaboración propia (2023).

3.5.4. Sembrado del *Aspergillus Niger*

En el vial con *Aspergillus Niger* que tiene el volumen de trabajo que se aisló anteriormente se sumergió un hisopo estéril que se empleó para el sembrado del *Aspergillus Niger* en las cajas Petri usando un estriado en ángulo recto, una vez cultivada la cepa se llevaron las cajas Petri a una incubadora a 35 °C.

Figura 3-13 Proceso de sembrado del *Aspergillus Niger*.

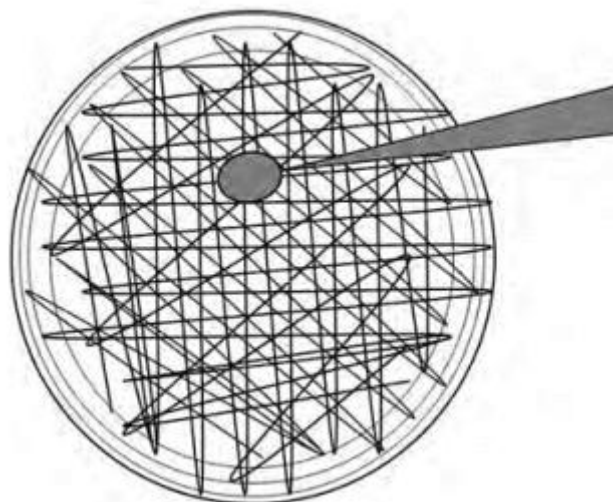


Fuente: Elaboración propia (2023).

3.5.5. Método de inoculación utilizado en el cultivo.

Se empleó un hisopo estéril para extraer parte del *Aspergillus Niger* del vial, a continuación, cerca de la flama que produce un ambiente estéril se procede con el estriado usando la técnica de siembra masiva, se repite el procedimiento anterior hasta conseguir abarcar toda la superficie posible del medio de cultivo (incluidos los bordes).

Figura 3-14 Técnica de siembra masiva.



Fuente: Dirección de bromatología de Neuquen. (2021).

Figura 3-15 *Aspergillus Niger* visto desde el microscopio.

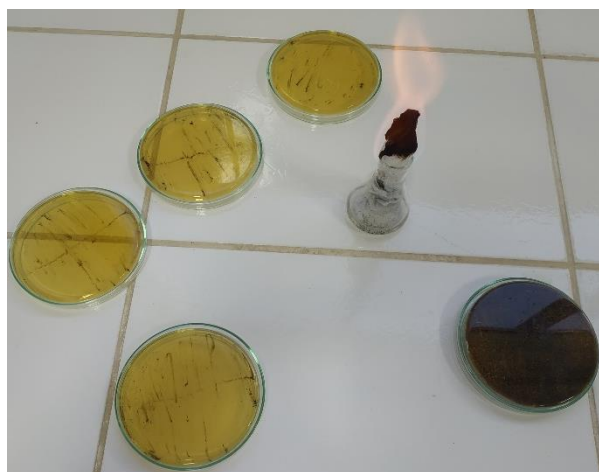


Fuente: Elaboración propia (2023).

3.5.6. Repique del *Aspergillus Niger*

Para el repique se utilizaron los cultivos que se produjeron en las cajas Petri anteriores y se usó un asa para recolectar y repicar el cultivo en otras cajas Petri nuevas con la misma composición del caldo de cultivo que se usó en la siembra y se las volvieron a introducir a la incubadora a 35 °C, usando la técnica de siembra masiva.

Figura 3-16 Repique del *Aspergillus Niger*.



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.6. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA DE LA MELAZA CON CEPAS DE ASPERGILLUS NIGER.

3.6.1. Recepción de la materia prima: Melaza de Caña.

La materia prima utilizada en el presente estudio es la melaza de caña procedente del ingenio azucarero de Bermejo, localidad de Bermejo perteneciente a la provincia Aniceto Arce del departamento de Tarija.

Con una ubicación geográfica de:

Latitud: -22.702959

Longitud: -64.292095

Figura 3-17 Ubicación geográfica de la procedencia de la materia prima.



Fuente: Elaboración propia (2023).

La materia prima fue almacenada en bidones de 2 litros con tapa y almacenada en las instalaciones del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho. Los bidones fueron dispuestos en un ambiente seco y con poca incidencia a la luz solar.

3.6.2. Caracterización de la melaza

La melaza del ingenio azucarero de Bermejo ya fue caracterizada y los resultados de los análisis de laboratorio obtenidos se encuentran en el Anexo 1, algunos parámetros más relevantes son:

Tabla III-5 Parámetros de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo.

PARÁMETRO	TÉCNICA O MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	RESULTADO
Azúcares reductores	NB 38033:06	%	16,98
Azúcares totales	NB 38033:06	%	65,61
Fosforo	SM 4500-PD	Mg P/100g	82,1
Nitrógeno Total	SM 4500-Norg B	g/100g	0,39

Fuente: CEANID (2021).

Según Cuauhtémoc (2012) en su investigación define que una concentración óptima de azúcares reductores es de entre 30 y 40 gr/L, logrando esta concentración al usar una melaza con 81,5 grados Brix y diluirla hasta tener 29 grados Brix usando 970 ml de melaza en 7 litros de medio de fermentación obteniendo así solo un 13,86% de melaza en el medio, cabe mencionar que Cuauhtémoc (2012) usó nutrientes como ser $K_4Fe(CN)_6$, KH_2PO_4 , NH_4Cl y el $MgSO_4$ que ayudaron a favorecer su rendimiento, en este presente caso de estudio se usará la melaza sin fortificar para comprobar su viabilidad por si misma a la hora de obtener ácido cítrico en solución, es por eso que se basaremos en un caso de estudio similar en este aspecto como lo es el de Rosas y Terán (2015) en donde se ratifica que los grados Brix para trabajar en fermentación cítrica sumergida es a 29 grados Brix pero que también se aumenta la cantidad de melaza al punto de tener 33,33% de melaza en el medio de fermentación, para que los grados Brix óptimos se consigan a esta concentración se debe aumentar el volumen de melaza utilizada al punto de tener 3L de melaza por cada 7 litros de agua empleados.

Para fines del presente estudio el parámetro de grados Brix iniciales de la melaza se tomaron en el momento de la fermentación con el fin de tener datos exactos en el momento de los experimentos.

Analizar los grados Brix de la melaza es elemental pues nos indica la concentración de sacarosa en la misma, siendo la sacarosa importante en la fermentación ya que su hidrolisis produce glucosa que es el sustrato selectivo del *Aspergillus Niger*, Soria (1997).

El análisis de los grados Brix se lo realizó empleando un refractómetro proporcionado por el laboratorio de operaciones unitarias UAJMS.

Figura 3-18 Refractómetro



Fuente: Elaboración Propia (2023).

Figura 3-19 Grados Brix de la melaza.



Fuente: Elaboración Propia (2023).

Por el análisis del refractómetro se observó que se tiene un aproximado de 73,2 grados Brix al momento de empezar los experimentos con la melaza del ingenio azucarero de Bermejo.

Se hizo el análisis de los grados Brix para corroborar que los azúcares no hayan sufrido ya una fermentación anterior, se corrobora que por el análisis de laboratorio CEANID y el análisis

efectuado en el momento de los experimentos con el refractómetro que la melaza no sufrió ya una fermentación previa y que los azúcares totales siguen prácticamente intactos para empezar la futura fermentación.

3.6.3. Dilución de la melaza.

El objetivo de la disolución de la melaza es la lograr una concentración óptima tanto en los azúcares reductores presentes como también mermar la de reducir la viscosidad del medio para que no sea un medio abrasivo para la cepa de *Aspergillus Niger*

Según Soria (1997) si bien la concentración alta de glucosa favorece la obtención de ácido cítrico a concentraciones mayores a 50 gr/L la inhiben ya que se produce una alta presión osmótica en la célula del *Aspergillus Niger* impidiendo su desarrollo, Cuauhtémoc (2012) explica que para una fermentación sumergida con los nutrientes requeridos para la rápida adaptación del microorganismo se pueden partir de concentraciones de azúcares reductores de entre 30 y 40 gr/L, pero nuestro caso de estudio es similar al de Rosas y Terán (2015) donde se busca usar los propios nutrientes de la melaza para observar su viabilidad a la hora de obtener ácido cítrico con sus propios minerales que ya posee, para este tipo de fermentaciones cítricas sumergidas se emplea una proporción mayor de melaza en agua que la que usa Cuauhtémoc en su investigación, es por eso que Rosas y Terán usan 3 Litros de melaza por cada 7 litros de agua empleados, de esa manera se consigue obtener tener 29 grados Brix en el medio de fermentación considerándose así una concentración de 29gr de azúcares reductores por litro. Si bien no se llega a los 30 gr/L de azúcares reductores como mínimo recomendado por Cuauhtémoc se tiene mayor presencia de los propios minerales de la melaza actuando como nutrientes, con esta concentración se evita tener un medio abrasivo y de esa manera permitir crecer al microorganismo usando solo los recursos que la melaza le proporciona a la vez que se consigue una concentración idónea de azúcares reductores.

Por los fundamentos presentados se usó una relación de 3 litros de melaza por cada 7 litros de agua para así tener un total de 10 litros de medio que se emplearan en la fermentación, la melaza diluida tiene una densidad de 1,17 Kg/L aproximadamente

Se varió primero 3 litros de melaza en una cubeta de un volumen superior a 10 L, posteriormente se agregaron 7 litros de agua desionizada, posteriormente se procede a mezclar con una varilla de vidrio hasta tener una solución homogénea.

Tabla III-6 Concentración de la melaza.

CANTIDAD		Concentración de la melaza en la solución a ser fermentada
Peso de 3 L de melaza	3500 gr	350 g/L
Volumen total	10 Litros	

Fuente: Elaboración Propia (2024).

Figura 3-20 Dilución de la melaza con agua.

Fuente: Elaboración propia (2023).

3.6.4. Pasteurización de la melaza diluida

Para reducir la carga microbiana existente en el agua y la melaza diluida se llevó a un proceso de pasteurización donde se calentó la melaza diluida hasta su punto de ebullición para posteriormente enfriarlo en un baño maría hasta los 37 °C para ser vertida en el biorreactor.

Para realizar la pasteurización se separaron dos volúmenes de 5 L con la finalidad de conseguir el punto de ebullición en menor tiempo, la dilución de melaza se vertió en dos ollas de acero inoxidable, una vez alcanzado el punto de ebullición se deja la melaza en este estado en un tiempo de 10 minutos ya que según Rosas y Terán (2015) es el tiempo requerido para esterilizar completamente la melaza diluida en las proporciones dadas de 3 L de melaza por cada 7 L de agua, una vez transcurrido el tiempo se procede a unir los volúmenes en uno solo de 10 L se cubre la parte superior con nailon para evitar contacto con el exterior y evitar contaminantes luego se procede a enfriar la disolución de melaza con un baño maría con agua a temperatura ambiente de 25 °C en donde se esperó que la temperatura como mínimo descienda hasta los 37°C ya que a esta

temperatura es segura de manipular como también según Cuauhtémoc (2012) es la temperatura máxima que puede resistir el *Aspergillus Niger*.

Figura 3-21 Pasteurización de la melaza.



Fuente: Elaboración propia (2023).

Figura 3-22 Enfriamiento de la melaza en baño maría.



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.6.5. Ajuste de pH en la disolución

La acidificación se realiza con el objetivo de conseguir hidronio en la solución que es una condición propicia para el desarrollo de la cepa de *Aspergillus Niger*, según estudios como los de Rosas y Terán (2015) se consiguieron rendimientos óptimos con un pH de 5 pero también las investigaciones de Rivada (2008) afirman que el máximo rendimiento se obtiene a un pH de 5,8, este último autor baso su investigación en examinar el comportamiento de la melaza con su pH natural (pH = 5,8) que presenta a una disolución de 3L de melaza por cada 7L de agua y encontró que es un pH idóneo y óptimo para que *Aspergillus Niger* se desarrolle en la melaza que empleo (España), es por ello que en base a estos autores y a otras investigaciones ya previamente citados se replicara el mismo acondicionamiento en cuanto al pH para examinar el comportamiento de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo en relación de otras melaza que también se les aplico la misma observación.

El ajuste de pH se realizó con ácido clorhídrico en los experimentos que se empleó un pH de 5 al inicio, en los experimentos que tienen un pH de 5,8 no es necesario un acidificante ya que la disolución de esta melaza en las proporciones utilizadas presenta un pH de 5,8, se corrobora con el pH-metro que se tienen los pH requeridos.

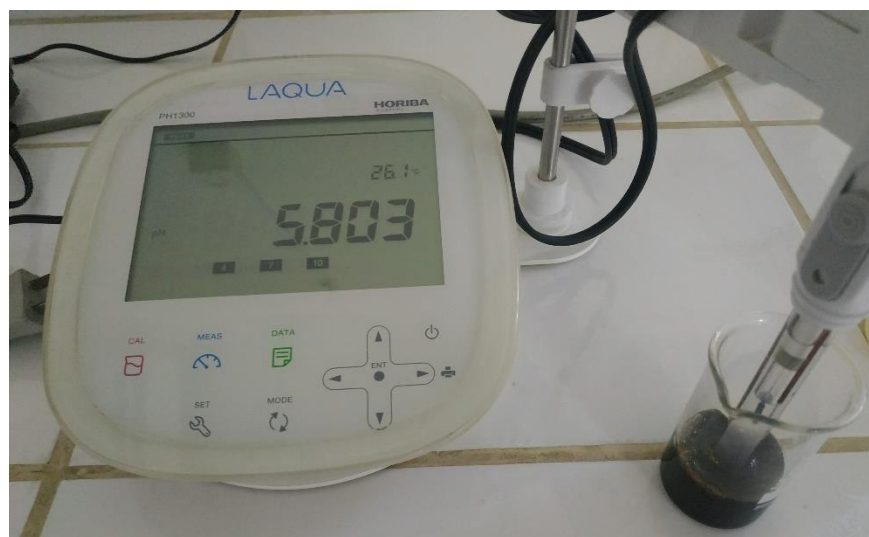
Se empleó un pH -metro digital LAQUA con un electrodo modelo 9615S-10D con el cual se podía verificar en tiempo real la variación de pH mediante la adición del ácido clorhídrico y una constante leve agitación hasta conseguir el pH de 5.

Figura 3-23 Ajuste de pH en la melaza.



Fuente: Elaboración propia (2023).

Figura 3-24 pH de la melaza diluida sin acidificar.



Fuente: Elaboración propia (2023).

Como se mencionaba anteriormente, la melaza diluida a las proporciones ya descritas presenta un pH ideal y por lo tanto para los experimentos que requieren ser realizados con un pH de 5,8 en el medio ya no necesitan acidificarse para ajustar el pH, esta es una de las razones también importantes por las que se emplean las proporciones utilizadas de melaza y agua para crear el medio de fermentación,

3.6.6. Proceso de fermentación

En este paso se tomaron en consideración hacer pruebas preliminares para corroborar que el tiempo de fermentación adecuado es de 6 días como lo sugiere la bibliografía ya que para poder usar el método de titulación para determinar la acidez del fermentado y asociarla al ácido cítrico uno de los requisitos es que la fermentación haya llegado a su finalidad ya que es solo en este punto donde el *Aspergillus Niger* metaboliza los productos intermedios que produce como los oxalatos y malonatos y los convierte en ácido cítrico dejando así un fermentado con la concentración selectiva de *Aspergillus Niger* según. Soria (1997).

Figura 3-25 Biorreactor usado en la prueba preliminar de fermentación



Fuente: Elaboración propia (2023).

El biorreactor usado en las pruebas preliminares ya contaba con lo más esencial para poder efectuar las primeras pruebas de fermentación y se empezaron las pruebas con un pH de 5,8 y una temperatura de 28°C, se eligió esa temperatura ya que según Villalba, Cruz y Azuara (2018) explica que es la temperatura más segura para tratar el desarrollo del *Aspergillus Niger* y como el objetivo era encontrar el máximo tiempo que dura la fermentación del *Aspergillus Niger* se vio conveniente el uso de esa temperatura para esta prueba preliminar y ver si el tiempo de fermentación según la bibliografía también era el más adecuado para la melaza de ingenio azucarero de Bermejo.

El factor importante a tomar en cuenta el cual revela si la fermentación se ha detenido es el pH, si el pH ya no sufre variación decreciente es porque el *Aspergillus Niger* ha agotado la reserva de nutrientes y la formación de ácido cítrico se detiene, Villalba, Cruz y Azuara (2018).

Según la bibliografía previamente ya expuesta, para la prueba preliminar de la determinación de tiempo de fermentación se usaron los siguientes parámetros:

Tabla III-7 Parámetros utilizados en la prueba preliminar

PARÁMETROS	VALOR
Temperatura	28 °C
Aireación	4 L/min
Volúmenes de disolución	3 litros de melaza en 7 litros de agua
Cantidad de medio de cultivo	8 gr

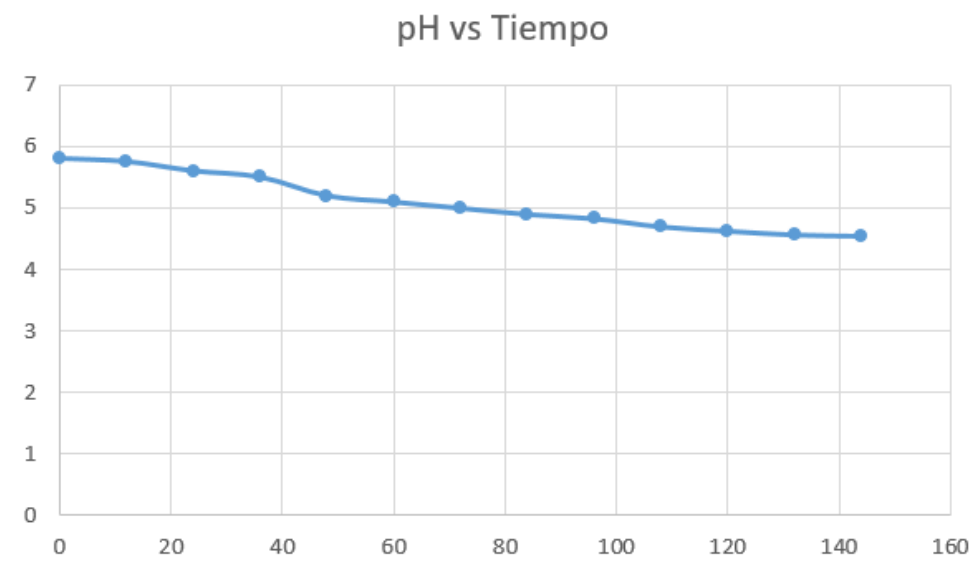
Fuente: Elaboración propia (2023).

Los resultados obtenidos del pH en las pruebas preliminares fueron los siguientes:

Tabla III-8 Resultado de pH vs tiempo en pruebas preliminares.

Tiempo (horas)	pH
0	5,8
12	5,75
24	5,6
36	5,5
48	5,2
60	5,1
72	5
84	4,9
96	4,83
108	4,7
120	4,63
132	4,57
144	4,55

Fuente: Elaboración propia (2023).

Figura 3-26 Gráfica pH vs Tiempo en prueba preliminar

Fuente: Elaboración propia (2023).

Como se puede observar tanto en la tabla como el grafico anterior el pH detiene su decrecimiento en el día 6 y los resultados contrastan con la teoría según Rosas y Terán (2015) que la fermentación de la melaza con *Aspergillus Niger* termina a los 6 días bajo las condiciones previamente ya aplicadas como aireación, volúmenes de disolución, cantidad de cultivo.

Por lo tanto, se selecciona este tiempo de fermentación, posteriormente se descubrió que una temperatura a 30 °C maximizaba la obtención de ácido cítrico como presentaba en su trabajo Rosas y Terán (2015), es por ello que se decidió cambiar el nivel mínimo de la temperatura del diseño factorial a una temperatura de 30°C, dichos resultados usando esa temperatura se presentan en el capítulo siguiente donde se evidencia que efectivamente los rendimientos fueron mejores.

Con el tiempo de fermentación ya corroborado y contrastado con otros estudios similares como el de Rosas y Terán (2015) se expresa a continuación las variables fijas e independientes que fueron seleccionadas bajo un respaldo bibliográfico ya expresado a finales del capítulo 2.

Tabla III-9 Variables independientes y dependientes en la fermentación.

PARÁMETRO	VALORES	TIPO DE VARIABLE
Temperatura	30 y 35°C	Variable independiente
Aireación	4 L/min	Variable fija
Tiempo de fermentación	6 días	Variable fija
Volúmenes de disolución	3L de melaza con 7L de agua	Variable fija
pH	5 y 5,8	Variable independiente
Cantidad de cultivo	8gr	Variable fija

Fuente: Elaboración propia (2023).

Para empezar el proceso de fermentación se verifico con un termómetro que efectivamente el medio de fermentación se encuentre en la temperatura correspondiente al experimento como también se verifica que la temperatura del baño maría también se encuentre a esa temperatura a continuación se vierte los 8gr de cultivo de *Aspergillus Niger* dentro del reactor con el medio de fermentación, con el uso de un asa con el cual se rasga para desprender el medio de cultivo de la caja Petri, en este paso se usaron medidas de bioseguridad como el uso de lentes de seguridad, guantes de látex y barbijo ya que el *Aspergillus Niger* presenta un grado de toxicidad considerable a una exposición prolongada.

Figura 3-27 Vertido de la cepa de *Aspergillus Niger* en el biorreactor.

Fuente: Elaboración propia (2023).

Una vez que el *Aspergillus Niger* se encuentra en el biorreactor se procede a cerrarlo y llevarlo dentro del baño maría, una vez encendido los aireadores y comprobado el burbujeo de aire dentro del biorreactor se considera que la fermentación ha comenzado.

Para controlar el proceso de fermentación se desenrosca la válvula del centro del biorreactor por donde se puede introducir una pequeña manguera con una jeringa de donde se saca diariamente una muestra representativa del fermentado, se evalúan el pH y los grados Brix, un descenso en el pH indica la formación de ácido cítrico y un descenso en los grados Brix indica un descenso en la concentración de sacarosa lo cual corrobora que se está produciendo una fermentación cítrica Soria (1997). Cuando se cumplen los 6 días de fermentación, se detiene la aireación.

Figura 3-28 Boquilla de toma de muestras.



Fuente: Elaboración propia (2023).

Figura 3-29 Proceso de fermentado de la melaza

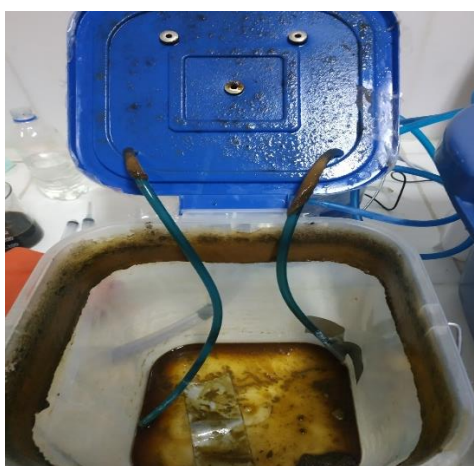


Fuente: Elaboración propia (2023).

3.6.7. Decantado del fermentado

Una vez finalizado el tiempo de fermentación se retiró el fermentador del baño maría y se dejó reposar durante 30 minutos para que se precipiten los sólidos generados, posteriormente se emplea una manguera para extraer por un efecto sifón el fermentado clarificado a un balde cuidando que no se extraigan los precipitados de biomasa que están en el fondo.

Figura 3-30 Biorreactor después de su vaciado.



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.6.8. Filtración de la disolución fermentada

Este proceso se realizó con el objetivo de separar los posibles sólidos que hayan sido arrastrados en el proceso de la decantación como también los que ya se encontraban en la superficie del fermentado.

Para este paso se usó un colador en donde se retiene la biomasa, esta biomasa junto con la biomasa que quedó en el fondo del biorreactor y la que está adherida a sus paredes se la hace secar en un recipiente en un ambiente sin turbulencias para evitar su mezcla con impurezas, una vez secada la biomasa se la pesa para obtener la cantidad generada de la misma en este proceso de fermentación.

Figura 3-31 Filtrado del fermentado.



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.6.9. Inactivación del *Aspergillus Niger*

En una cacerola de acero inoxidable se vertió la disolución fermentada para calentarla a una temperatura de 60 °C con la finalidad de detener la fermentación cítrica e inactivar cualquier otro microorganismo presente que pueda continuar con la fermentación de la disolución.

Según Cuauhtémoc (2012) basta con subir la temperatura a 60 °C del fermentado para protegerla de futuros derramamientos de la misma, siempre y cuando se almacene en un recipiente sellado y aislado de la luz solar.

Figura 3-32 Calentamiento del fermentado.



Fuente: Elaboración propia (2023).

3.6.10. Almacenamiento del ácido cítrico en solución

Se siguieron las recomendaciones de Cuauhtémoc (2012) y el ácido cítrico en solución se almacenó en bidones blancos con tapa de 10 litros en un lugar fresco fuera de la incidencia de los rayos solares.

Figura 3-33 Almacenamiento del ácido cítrico en solución.



Fuente: Elaboración propia (2023).

Al ser la obtención de ácido cítrico en solución un producto intermedio en el proceso de obtención de ácido cítrico, el análisis más relevante e importante del producto obtenido es la determinación de ácido cítrico en el fermentado obtenido ya que el paso siguiente del proceso es una precipitación en forma de citrato volviendo al medio un subproducto de descarte según Cuauhtémoc (2012), es por eso que para este estudio la caracterización del producto obtenido se centrará específicamente en la determinación de la concentración de ácido cítrico obtenido en el fermentado, la cual se detalla en los capítulos siguientes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LA MATERIA PRIMA

Los parámetros fisicoquímicos de la melaza de caña de IABSA fueron determinados por el Centro de Análisis Investigación y Desarrollo (CEANID), los resultados se pueden visualizar en la tabla IV-1.

Tabla IV-1 Análisis fisicoquímicos de la melaza de caña de IABSA.

PARÁMETRO	UNIDAD	RESULTADO
Acidez (Como Ac. Tartárico)	%	0,56
Azúcares reductores	%	16,98
Azúcares totales	%	66,61
Ceniza	%	9,44
Fosforo	Mg P/100 g	82,1
Humedad	%	0,39
Materia Seca	%	18,66
Nitrógeno total	g/100 g	0,39
pH (20 °C)		6.4
Proteína total	%	2,42
Sólidos solubles	°Brix	78

Fuente: CEANID (2021).

A continuación, se hará una breve interpretación y análisis de los parámetros:

- Acidez (como Ac. Tartárico):** Su acidez de la melaza es producida prácticamente solo por el ácido Tartárico según Rivada, (2008), en este análisis se puede observar que se encuentra en una muy pequeña concentración (0,56%) lo que nos expresa que no se practicó una previa fermentación acida en la melaza considerándose así propicia para el desenvolvimiento del *Aspergillus Niger* ya que el ácido tartárico por su baja concentración no le afectará en su etapa de adaptación las primeras horas dentro del biorreactor

- **Azúcares reductores:** Es uno de los parámetros más importantes a considerar en la melaza para este estudio ya que nos indica la cantidad de azúcares asimilables inmediatamente por el *Aspergillus Niger* como la glucosa, la concentración de azúcares reductores no es tan alta en esta melaza en comparación con la melaza con la que se trabajó en la investigación de Rosas y Terán (2015), pero no es una concentración relativamente baja ya que según Rivada, (2008), se obtuvieron óptimos rendimientos con una melaza con una concentración de azúcares reductores de 15%.
- **Azúcares totales:** Es otro parámetro fundamental a considerar ya que si bien el *Aspergillus Niger* metaboliza selectivamente la glucosa también se pueden hidrolizar la sacarosa y metabolizar otros azúcares presentes, este parámetro nos indica cuanto es la fuente potencial de nutrientes que tiene la melaza para el *Aspergillus Niger*, Rosas y Teran (2015), Rivada, (2008) y Cuauhtémoc (2012) trabajaron en sus investigaciones con melazas que tenían una concentración de azúcares totales de entre 50 %y 73%, ratificando así que la melaza del ingenio azucarero de Bermejo tiene similares características en este aspecto con las melazas donde mayor rendimientos se obtuvieron en investigaciones similares.
- **Ceniza:** La ceniza es un porcentaje de impureza en la melaza, para esta melaza en particular se observa una significativa cantidad es por ello que se buscó primero tener la melaza en reposo un periodo de 7 días con la finalidad de que precipiten la mayor cantidad de las mismas y así evitar en lo posible que entren en el biorreactor.
- **Fosforo:** El fosforo juega un papel regulador importante en las reacciones metabólicas favoreciendo que el *Aspergillus Niger* en su metabolismo de los azúcares produzca mayores cantidades de ácido cítrico si el rango de fosforo permanece constante entre el 0.1 y 0.2%, Fajardo y Sarmiento (2007), haciendo las conversiones se tiene que la melaza del ingenio azucarero de Bermejo tiene una cantidad de 0,0821% de fosforo, considerándose así una muy buena concentración de fosforo para una melaza que no tiene aditivos nutritivos.
- **Humedad:** La baja cantidad de humedad en esta melaza es buena ya que impide el desarrollo de microorganismos durante el tiempo que la melaza ha sido almacenada antes de llegar al laboratorio.
- **Materia seca:** Como la ceniza, la materia seca también significa para este caso de estudio una cantidad de impurezas por lo tanto ya que en esta melaza se presenta una considerable cantidad, también se busca precipitarlas con el reposo de la melaza antes de emplearla.

- **Nitrógeno total:** El nitrógeno actúa como un nutriente elemental para el *Aspergillus Niger*, considerándose tener como una cantidad mínima de 1,55 mg de N/gr de melaza para que el *Aspergillus Niger* se desarrolle adecuadamente las primeras horas, Cuauhtémoc (2012), se observa que en esta melaza se tiene una alta concentración de nitrógeno por lo tanto se considera propicia para que el *Aspergillus Niger* se adapte más rápido.
- **pH (20°C):** El pH es un indicativo si es que se está formando una fermentación ya anteriormente en la melaza, considerándose un pH ideal en la melaza el de 6, Fajardo y Sarmiento (2007), En esta melaza se observa un pH de 6,4 que indicaría que no hay una fermentación acida anterior, por lo tanto, es un parámetro que está dentro de lo normal.
- **Proteína total:** La cantidad de proteína expresa la cantidad de nutrientes efectivos asimilables en el medio, si bien no existen registros bibliográficos de una concentración adecuada de proteína para el *Aspergillus Niger* ya que el mismo tiene una preferencia metabólica con la glucosa, se presenta que esta melaza tiene una cantidad relativamente baja haciendo énfasis que su principal concentración de nutrientes se encuentra en los disacáridos y monosacáridos.
- **Sólidos solubles:** Los sólidos solubles expresados en grados Brix son una forma de cuantificar la cantidad de sacarosa existente en el medio, en esta melaza se observa una alta concentración de sacarosa que al ser un disacárido se disocia en monosacáridos como la glucosa que es la fuente nutritiva predilecta para el *Aspergillus Niger*, por lo tanto, se considera a esta melaza como óptima para el proceso de fermentación por su elevada concentración de nutriente como la sacarosa.

La concentración de otros parámetros en la melaza como la de los metales como ser magnesio, hierro, potasio, cobre, etc. Son relevantes para tener una mayor información sobre la melaza ya que hay ciertos metales que tienen un efecto inhibitor en la fermentación, para el presente estudio no se realizaron estudios cuantitativos para dichos metales por el encarecimiento económico del mismo como también el limitante tecnológico de no contar con los equipos necesarios en el Laboratorio de Operaciones Unitarias (LOU – UAJMS) para determinar la concentración de dichos parámetros.

4.2. ENSAYOS DE OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTACIÓN DE LA MELAZA DE IABSA.

Se realizaron 8 ensayos de obtención de ácido cítrico con los parámetros propuestos en el diseño factorial, correspondiente a 2 réplicas.

Se fermentó la melaza a temperaturas de 30 y 35°C, con pH de 5 y 5,8 durante 5 días empleando 1 medio de cultivo por cada 5 litros de melaza diluida en cada ensayo. Se extrajeron pequeñas muestras a lo largo de la fermentación para evaluar el comportamiento de los grados Brix y del pH dentro del biorreactor.

Experimento 1: pH 5,8 y Temperatura 30°C

Experimento 2: pH 5,8 y Temperatura 35°C

Experimento 3: pH 5 y Temperatura 35°C

Experimento 4: pH 5 y Temperatura 30°C

4.2.1. Registro de las curvas de fermentación

En la tabla IV-2 se registran los datos que se tomaron durante el proceso de fermentación.

Tabla IV-2 Datos de grados Brix del proceso de fermentación.

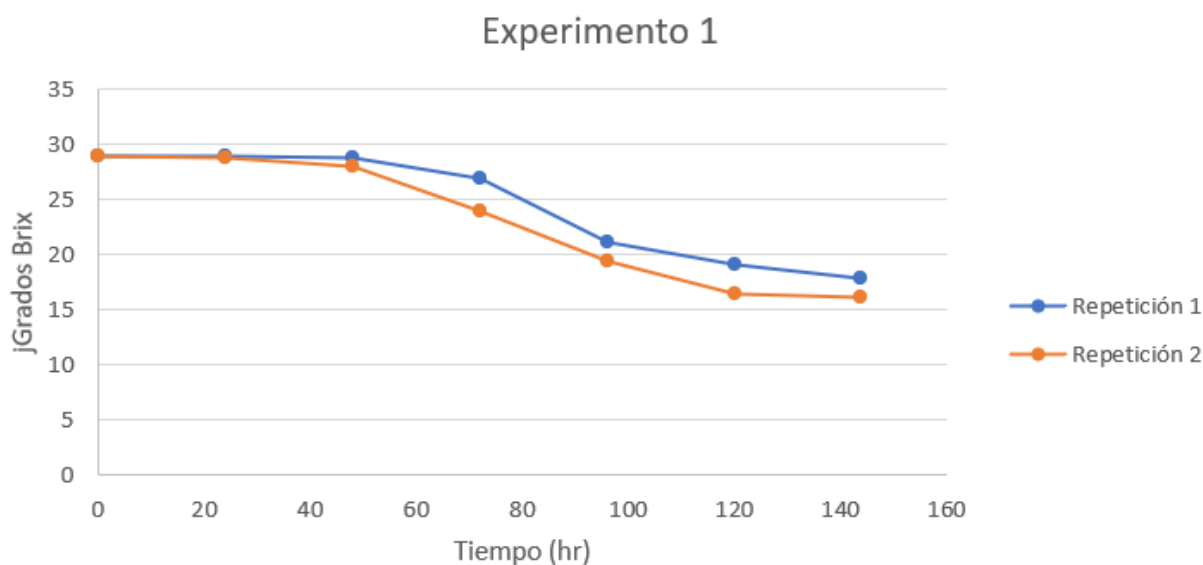
	Replica 1							Replica 2						
	Brix inicial	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 Hrs	120 hrs	144 hrs	Brix Inicial	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs	144 hrs
Experimento 1	29	28,9	28,8	27	21,1	19,1	17,9	29	28,8	28,1	24	19,5	16,5	16,2
Experimento 2	29	28	27,9	26	22	17,9	16	29	28,9	26,2	25	21,7	18,3	16
Experimento 3	31	30,5	24,3	20,9	19,1	18,5	16,8	30	29	25,1	19,7	19	18,4	16

	Replica 1							Replica 2						
Experimento 4	29	28,2	23	21,7	19	18,3	17,2	29	26	23	21,1	18	17,2	16,5

Fuente: Elaboración Propia (2023).

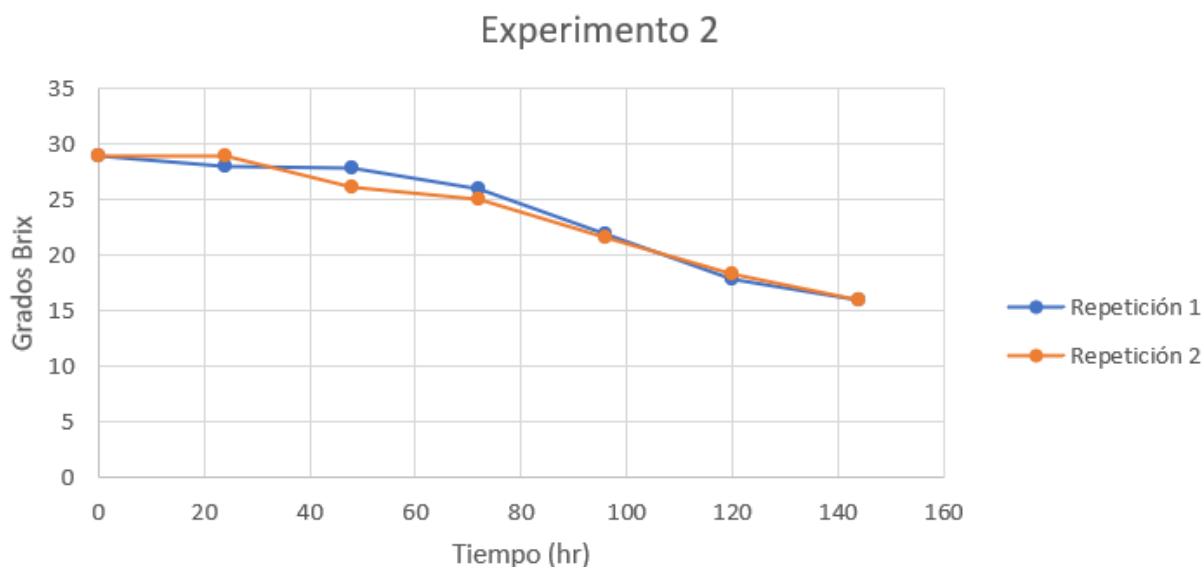
En la tabla anterior podemos evidenciar el decrecimiento de los grados Brix a lo largo del tiempo en la fermentación lo que nos indica que efectivamente hubo un hidrolizarse de la sacarosa presente en la melaza y el metabolismo de los monosacáridos como la glucosa por el *Aspergillus Niger*, se puede observar también algo muy importante que es el punto donde la sacarosa ya no puede ser hidrolizada y por lo tanto se va deteniendo la fermentación, este suceso ocurre cuando los grados Brix decrecen hasta un valor aproximado de 16

Figura 4-1 Curva de fermentación Grados Brix vs Tiempo, experimento 1.



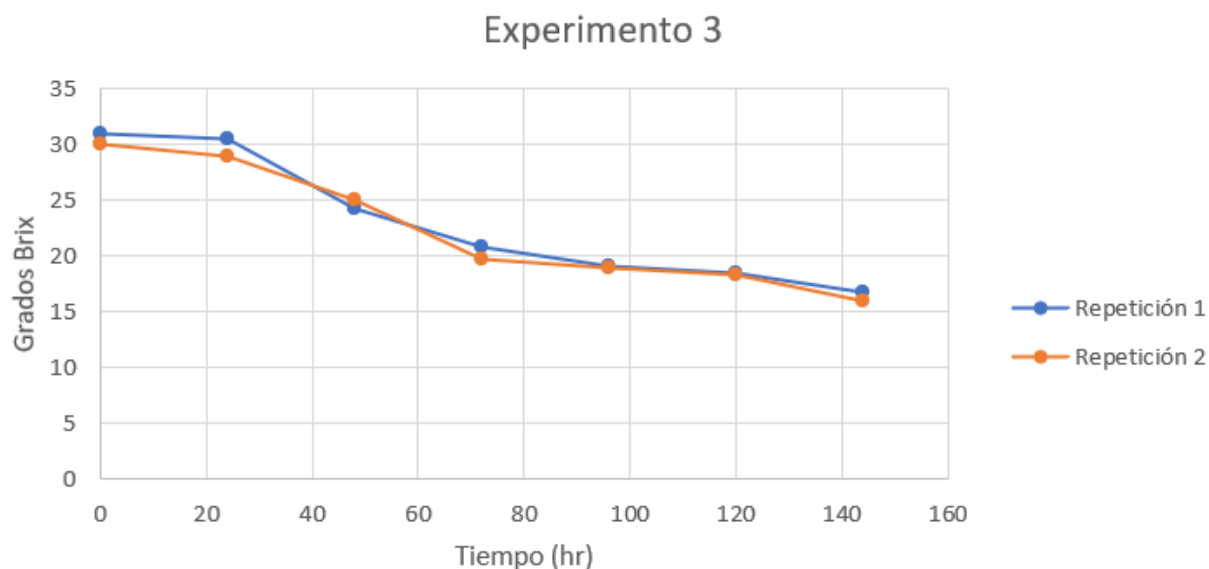
Fuente: Elaboración Propia (2023).

En los grados Brix del experimento 1 se puede observar que el crecimiento exponencial del *Aspergillus Niger* se manifiesta aproximadamente cuando los grados Brix tienen un valor de 24 y se experimenta la fase de muerte cuando los grados Brix llegan a un valor de entre 16 y 18.

Figura 4-2 Curva de fermentación Grados Brix vs Tiempo, experimento 2

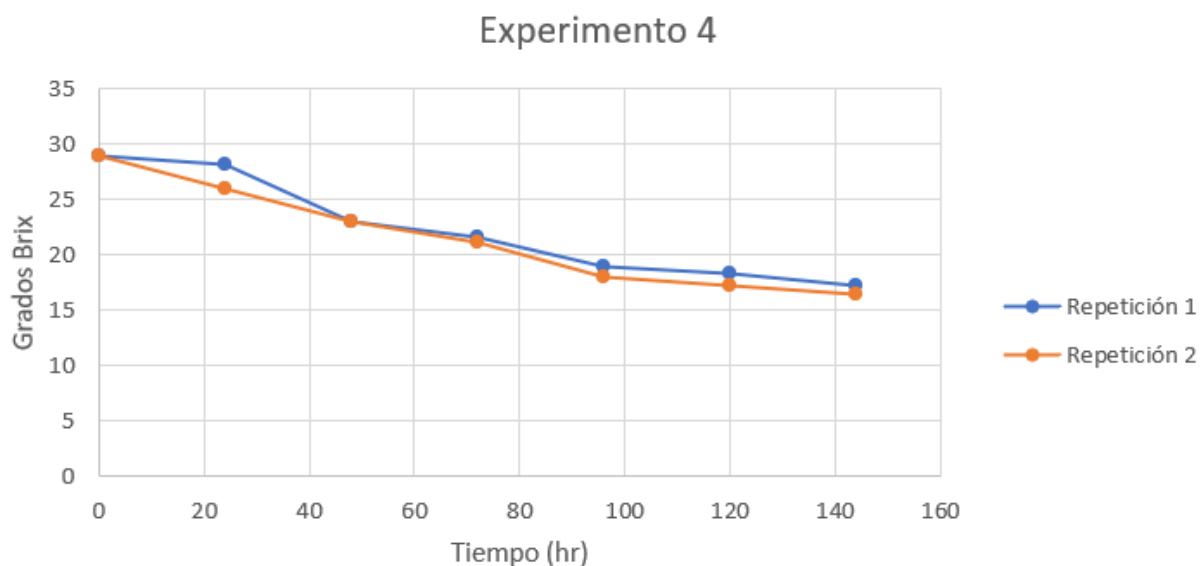
Fuente: Elaboración Propia (2023).

En los Grados Brix del experimento 2 se observa que la fase exponencial de crecimiento de *Aspergillus Niger* empieza aproximadamente a los 28 °Brix y culmina aproximadamente a los 16 °Brix, lo significativo de este experimento es que se observa a una fase estacionaria que recién se estaba formando es por ello que se considera que talvez en este caso particular los grados Brix hubieran descendido aún más pero que no se estaba favoreciendo la formación de más ácido cítrico, sino que se estaba favoreciendo la formación de biomasa.

Figura 4-3 Curva de fermentación Grados Brix vs Tiempo, experimento 3

Fuente: Elaboración Propia (2023).

En los grados Brix del experimento 3 lo más significativo es que se observa al *Aspergillus Niger* adaptarse más rápido al medio empezando su fase exponencial de crecimiento cuando los grados Brix son de 28 aproximadamente pero también se evidencia que termina abruptamente cuando se tiene 20 °Brix y luego se tienen un considerable tiempo de una fase estacionaria sin cambios significativos hasta el final, se interpreta entonces que en la fase exponencial es en donde se obtiene la mayor concentración de ácido cítrico como dice Cuauhtémoc (2012) en su estudio, una vez se llega a la parte estacionaria el *Aspergillus Niger* empieza a metabolizar los oxalatos y malatos enfocándose en la producción tanto de ácido cítrico como también de biomasa.

Figura 4-4 Curva de fermentación Grados Brix vs Tiempo, experimento 4

Fuente: Elaboración Propia (2023).

En los grados Brix del experimento 4 se observa que no se produce una fase exponencial muy abrupta sino más bien se evidencia que el metabolismo del *Aspergillus Niger* fue lento y en cierta forma constante, en este experimento se observa que se favoreció la producción de biomasa ya que como se observara en los resultados posteriores no se obtuvieron cantidades de ácido cítrico comparables a los de los demás experimentos, pero que se llegó al final al mismo valor de °Brix lo cual indica que el *Aspergillus Niger* si metabolizo una comparable cantidad de glucosa producto del hidrolisis de la sacarosa pero que produjo en gran parte biomasa.

4.2.2. pH en la disolución fermentada

En la tabla IV-3 se registran los datos que se tomaron durante el proceso de fermentación.

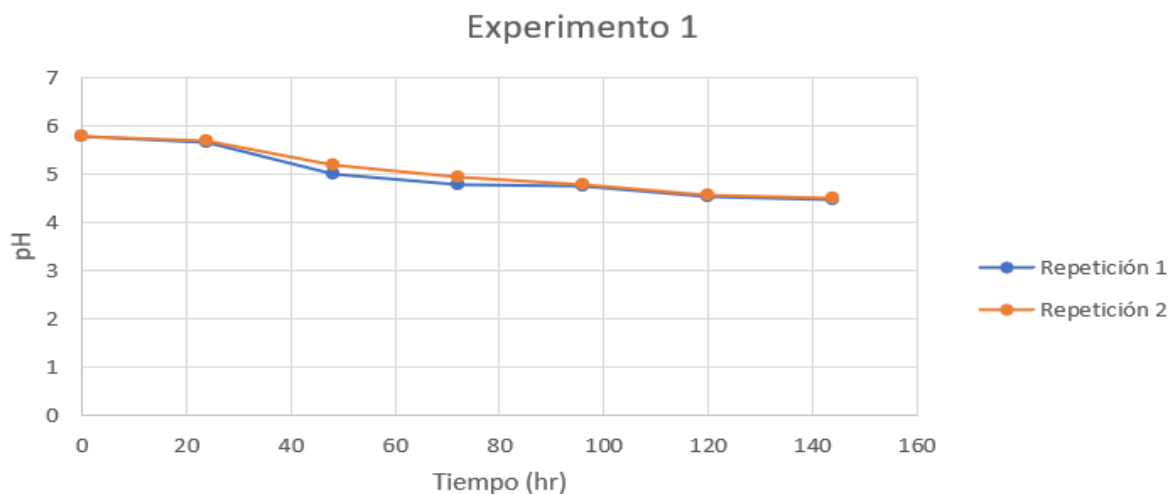
Tabla IV-3 Datos de pH del proceso de fermentación.

	Replica 1							Replica 2						
	pH Inicial	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 Hrs	120 hrs	144 hrs	pH Inicial	24 hrs	48 hrs	72 hrs	96 hrs	120 hrs	144 hrs
Experimento 1	5,8	5,67	5	4,8	4,77	4,55	4,48	5,8	5,7	5,2	4,95	4,78	4,56	4,51
Experimento 2	5,8	5,72	5	4,84	4,72	4,6	4,49	5,8	5,73	5,3	4,9	4,75	4,63	4,55
Experimento 3	5	4,96	4,9	4,87	4,84	4,8	4,76	5	4,98	4,97	4,96	4,93	4,9	4,81
Experimento 4	5	4,98	4,96	4,93	4,92	4,91	4,9	5	4,99	4,94	4,9	4,83	4,75	4,7

Fuente: Elaboración Propia (2023).

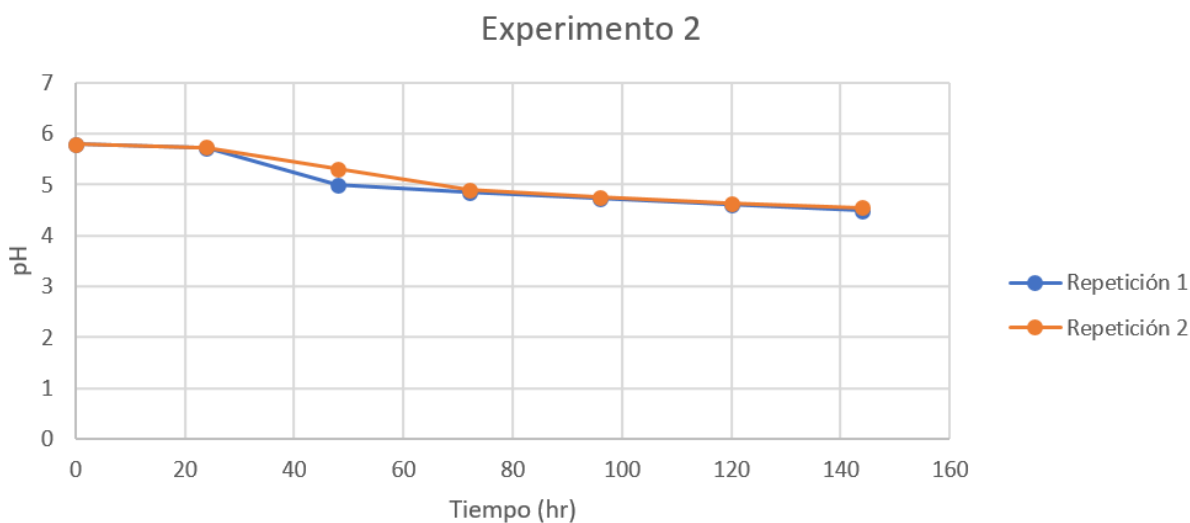
En la anterior tabla se observa el decrecimiento del pH a lo largo de la fermentación evidenciándose cuanto ácido cítrico se está produciendo a lo largo del tiempo tomando en cuenta que el metabolismo del *Aspergillus Niger* al final concentra el ácido cítrico en el fermentado podemos hacer una relación grafica aproximada de como el ácido cítrico se fue formando a lo largo del tiempo de fermentación.

Se contempla también que para cada experimento se obtiene un pH final relativamente diferente, esto es lo más lógico ya que cada experimento alcanzara una concentración distinta de ácido cítrico en el medio, la tabla muestra que el experimento 1 tiene los pH finales más bajos obtenidos por lo tanto también la concentración de ácido cítrico más altas en el medio en comparación con los otros experimentos.

Figura 4-5 Curva de fermentación pH vs Tiempo, experimento 1.

Fuente: Elaboración Propia (2023).

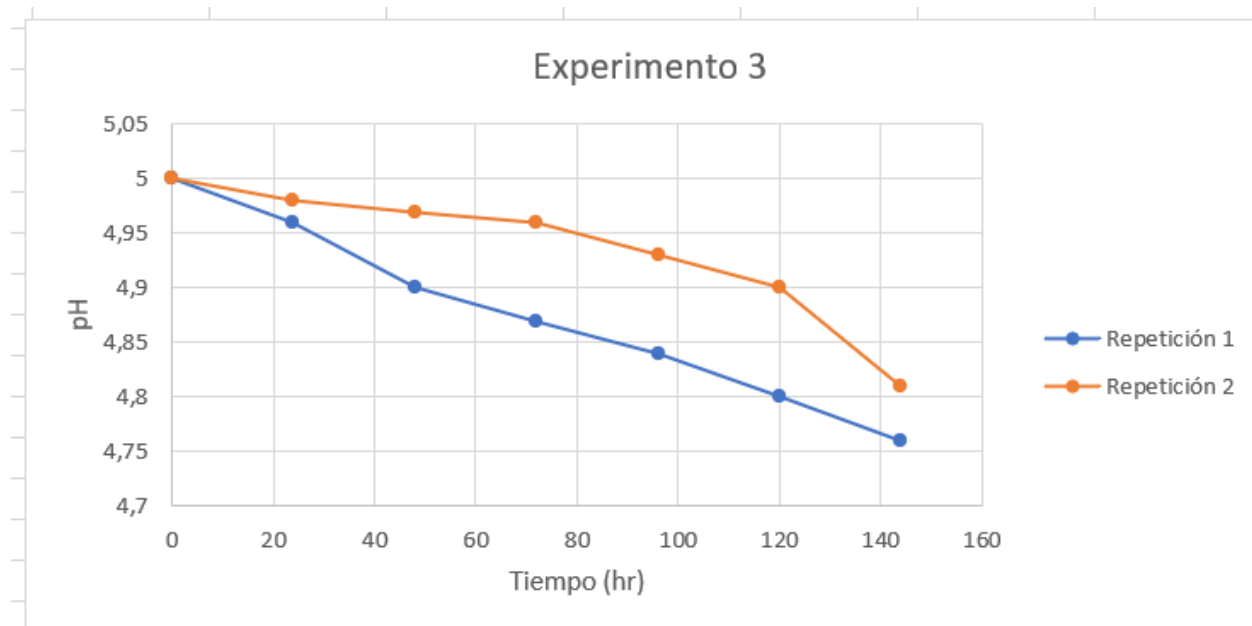
En los pH obtenidos al largo del periodo de fermentación del experimento 1 se puede observar que hay un decrecimiento constante sin variaciones abruptas, también se evidencia que entre las 120 y 144 horas de fermentación se presenta la fase estacionaria del crecimiento de *Aspergillus Niger*, lo que nos dice que en estas horas ya no se están produciendo cantidades significativas de ácido cítrico.

Figura 4-6 Curva de fermentación pH vs Tiempo, experimento 2.

Fuente: Elaboración Propia (2023).

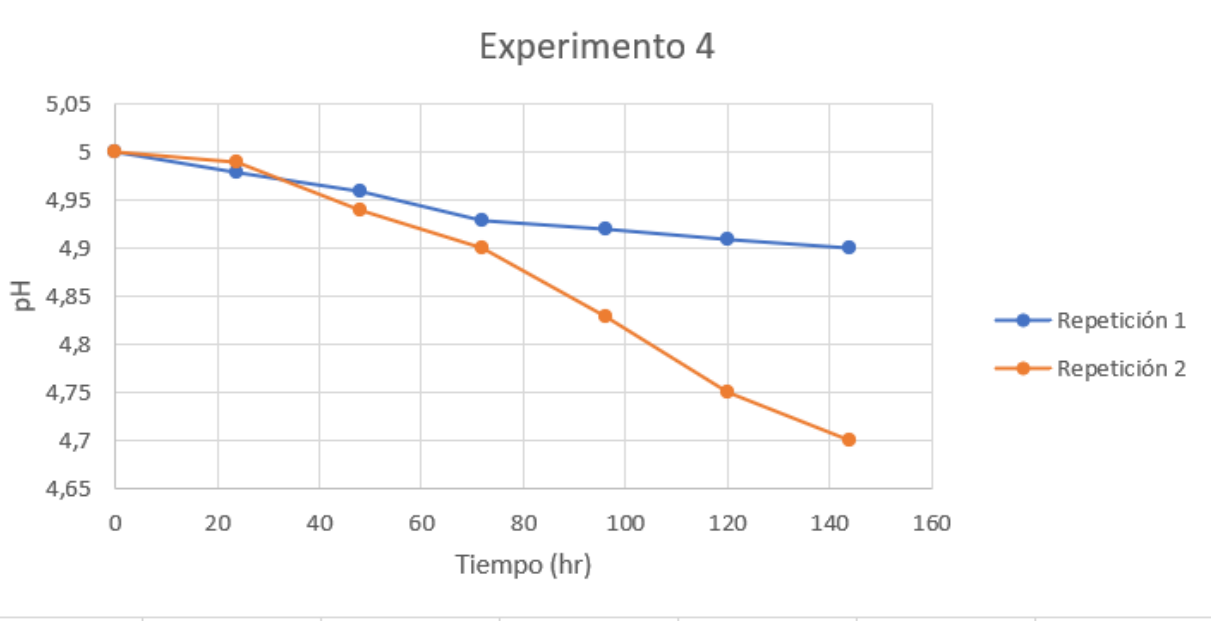
En los pH obtenidos al largo del periodo de fermentación del experimento 2 lo más llamativo es observar es que existe un tiempo de entre las 110 a 144 horas donde no se produce ácido cítrico significativamente por lo tanto se está priorizando la formación de biomasa.

Figura 4-7 Curva de fermentación pH vs Tiempo, experimento 3.



Fuente: Elaboración Propia (2023).

En los pH obtenidos al largo del periodo de fermentación del experimento 3 se contempla una caída abrupta en el pH lo cual indica una rápida asimilación metabólica del *Aspergillus Niger* como también una selectividad más hacia la producción de ácido cítrico que a la producción de biomasa incluso en la fase estacionaria, pero si bien se prioriza la formación de ácido cítrico, no logra llegar a una concentración superior al del experimento 1.

Figura 4-8 Curva de fermentación pH vs Tiempo, experimento 4.

Fuente: Elaboración Propia (2023).

En los pH obtenidos al largo del periodo de fermentación del experimento 4 se verifica que efectivamente los pH en este experimento son los que menos decrecieron en relación a su pH inicial, se contempla que no hubo una fase exponencial relativamente significativa en comparación a los otros experimentos, esto debido a que el microorganismo no pudo adaptarse lo mejor posible a ese pH inicial y por lo tanto su crecimiento no fue el adecuado a un inicio lo que no le permitió tener una alta población para acentuar su crecimiento.

Con los resultados que se obtuvieron de pH al final de la fermentación se procede a sacar el promedio:

Tabla IV-4 Resultados de la medición de pH en el fermentado.

N°	Parámetros en la fermentación		pH final		Promedio
	pH inicial	Temperatura	Replica 1	Replica 2	
1	5,8	30	4,48	4,51	4,495
2	5,8	35	4,49	4,55	4,52
3	5	35	4,76	4,81	4,785
4	5	30	4,9	4,7	4,8

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Este promedio nos permite englobar los experimentos con su repetición y tener así un solo valor significativo del pH final para cada experimento realizado.

A continuación, se presenta la concentración de azúcares reductores al final de la fermentación (los detalles del análisis se pueden observar en el ANEXO 1).

Tabla IV-5 Concentración final de azúcares reductores en el fermentado

PARÁMETRO	TÉCNICA	CONCENTRACIÓN
Azúcares reductores	NB 38033:14	1,60g/100g

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Se puede apreciar una concentración de azúcares reductores relativamente baja ya en el fermentado, se contrarresta con el descenso de los grados Brix que descendieron indicando el decaimiento de la concentración en los azúcares totales corroborando así que efectivamente la fermentación llegó a un punto de estancamiento y muerte del microorganismo por escasos de nutrientes accesibles para el mismo.

4.3.3. Titulación del fermentado

Como el procedimiento realizado cumple los requerimientos de que el proceso de fermentación duro hasta que el *Aspergillus Niger* consumió todos los nutrientes disueltos en la melaza hasta el punto que el pH no descendió más indicando que la fermentación se detuvo. Se puede aplicar este método de estimación del ácido cítrico en solución ya que según la investigación de Muñiz (2016) si se cumple la anterior condición citada, la acidez del fermentado es provocada por el ácido cítrico ya que según el metabolismo del *Aspergillus Niger* Soria (1997) explica que a falta de una

concentración idónea de azúcares reductores en el medio, el *Aspergillus Niger* empieza a metabolizar los oxalatos, malatos y otras trazas de fuentes de carbono convirtiéndolos en citrato y luego en ácido cítrico, este proceso sigue hasta que prácticamente solo el ácido cítrico se encuentra como ácido en el medio de fermentación y por ello la población de *Aspergillus Niger* desciende y se llega a la fase de muerte por la insuficiencia de más nutrientes.

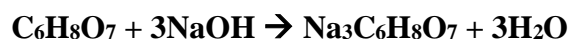
Se usa una solución titulante de hidróxido de sodio 0,1 N en 30 ml de fermentado y se titula desde el pH final del fermentado hasta el pH inicial donde empezó el experimento, Muñiz (2016), para tener un control exacto en tiempo real del pH se usó un pH -metro digital LAQUA con un electrodo modelo 9615S-10D.

Tabla IV-6 Volumen de la solución titulante usada.

pH inicial	Temperatura	pH final	Volumen en ml de NaOH 0,1N
5,8	35	4,49	29,6
5	35	4,76	18,4
5,8	30	4,48	39,45
5	30	4,90	15,5
5,8	35	4,55	28,7
5	35	4,81	17,1
5,8	30	4,51	39,1
5	30	4,70	13,8

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tomando en cuenta la siguiente ecuación de la reacción del NaOH con el ácido cítrico:



Calculamos la concentración del ácido cítrico:

Tabla IV-7 Calculo del ácido cítrico total obtenido en cada experimento (10 Litros).

pH inicial	Temperatura	pH final	Moles de NaOH Usados en 25 ml de fermentado	Moles de NaOH Usados en 1L de fermentado	Moles de ácido cítrico en un Litro de fermentado	Concentración de ácido cítrico en gr/L	Ácido cítrico total obtenido (gr)
5,8	35	4,49	0,00296	0,09866667	0,03288889	6,31874489	63,1874489
5	35	4,76	0,00184	0,06133333	0,02044444	3,92786844	39,2786844
5,8	30	4,48	0,003945	0,1315	0,04383333	8,42143533	84,2143533
5	30	4,90	0,00155	0,05166667	0,01722222	3,30880222	33,0880222
5,8	35	4,55	0,00287	0,09566667	0,03188889	6,12662089	61,2662089
5	35	4,81	0,00171	0,057	0,019	3,650356	36,50356
5,8	30	4,51	0,00391	0,13033333	0,04344444	8,34672044	83,4672044
5	30	4,70	0,00138	0,046	0,01533333	2,94590133	29,4590133

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Como se puede observar, se obtuvo una mayor cantidad de ácido cítrico con un pH inicial de 5,8 y a una temperatura constante de 30°C con un tiempo constante de fermentación para los 4 experimentos de 6 días.

4.4.4. Cálculo del rendimiento del proceso tecnológico

Para el cálculo del rendimiento del proceso tecnológico se tomó en cuenta la máxima cantidad de ácido cítrico obtenida en relación a la cantidad que se puede obtener por 1 L de fermentado de melaza.

El rendimiento referencial es el promedio que se toma en cuenta según los rendimientos obtenidos en otros estudios similares como ser los de Rosas y Terán (2015), Abín et al. (2004) y Velásquez et al. (2010),

$$\text{Rendimiento (\%)} = (\text{Macido cítrico obtenida} / \text{Macido cítrico teórica}) \times 100$$

Tabla IV-8 Rendimientos Obtenidos.

Temperatura	pH inicial	Ácido cítrico obtenido (gr/L)	Ácido cítrico teórico (gr/L)	% de rendimiento
35	5,8	6,31874489	10	63,1874489
35	5	3,92786844	10	39,2786844
30	5,8	8,42143533	10	84,2143533
30	5	3,30880222	10	33,0880222
35	5,8	6,12662089	10	61,2662089
35	5	3,650356	10	36,50356
30	5,8	8,34672044	10	83,4672044
30	5	2,94590133	10	29,4590133

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Como se puede observar en la tabla anterior el mayor rendimiento obtenido se lo consigue a una temperatura de 30 °C y un pH inicial de 5,8, siendo el rendimiento más alto conseguido el de:

$$\text{Rendimiento (\%)} = 84,21 \%$$

Se llega a la conclusión entonces que los valores de los parámetros óptimos para obtener el mayor rendimiento de obtención de ácido cítrico en solución con la melaza del ingenio azucarero son:

Tabla IV-9 Valores óptimos para obtener el mayor rendimiento.

PARÁMETRO	VALOR ÓPTIMO
Temperatura	30°C
pH	5,8
Tiempo de fermentación	6 días
Aireación	4 L/min (constante)

PARÁMETRO	VALOR ÓPTIMO
Proporción de dilución de melaza	3 L de melaza por cada 7 L de agua (350 g melaza/L)
Cantidad de <i>Aspergillus Niger</i>	8 gramos de cultivo (constante)
Rendimiento	84,21 %

Fuente: Elaboración Propia (2023).

4.4.5. Comparación de rendimiento con la obtención de alcohol etílico usando la melaza.

Para la obtención de ácido cítrico en solución se usaron 3 Litros de melaza para obtener un máximo total con el método utilizado de 84,21 gr y por la bibliografía consultada se tiene que por cada 40 kg de melaza se obtienen aproximadamente 6,73 Litros de alcohol etílico, tenemos que:

Tabla IV-10 Datos de densidad de la melaza y el alcohol etílico.

DATOS	
Densidad de la melaza (Kg/L)	Densidad del alcohol Etílico (gr/L)
1,17	789

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Usando la ecuación:

$$Densidad = \frac{masa}{volumen}$$

Se tiene que:

Tabla IV-11 Melaza empleada en litros y cantidad de alcohol etílico obtenido en gramos.

Volumen de melaza empleado (L)	Masa de alcohol etílico obtenido (gr)
34,19	5309,97

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla IV-12 Comparación de rendimientos

	Volumen de melaza empleado (L)	Masa de producto obtenido (gr)	Rendimiento de producto por Litro de melaza (gr producto/Litro de melaza)
Ácido cítrico	3	84,21	28,07
Alcohol Eílico	34,19	5309,97	155.31

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Como se puede observar el rendimiento másico de producto por cada litro de melaza es considerablemente mayor en la obtención de alcohol etílico, justificando así porque la producción de alcohol etílico es la principal alternativa de aprovechamiento de la melaza en el ingenio azucarero de Bermejo, pero hay factores a considerar como ser el precio por 100 gr de ácido cítrico anhidro a la fecha de este estudio es de aproximadamente 94,15 Bs, siendo un alto valor agregado al ácido cítrico en el mercado industrial en comparación al alcohol etílico que su precio por 5 litros es de aproximadamente 52 Bs a la fecha del estudio, teniéndose así un costo de 1,32 Bs por cada 100 gr de alcohol etílico, se puede observar una diferencia espectacular del valor agregado entre los dos productos además de tomar en cuenta que por medio de este estudio se observó que la melaza del ingenio azucarero de Bermejo provee un rendimiento considerablemente eficiente del 84,21% a la hora de obtener ácido cítrico, plasmando así una buena primera impresión en cuanto al rendimiento de obtención de ácido cítrico en comparación con otros estudios y también una salida a otro mercado industrial con un producto de mayor costo de venta permitiendo al ingenio azucarero de Bermejo una mayor diversificación de sus productos.

Los estudios de rentabilidad económica y costos de producción del ácido cítrico con el método empleado en esta investigación a niveles industriales no son los objetivos de este estudio.

4.3. RESULTADOS DEL DISEÑO FACTORIAL

Tabla IV-13 Resultados de la medición de concentración de ácido cítrico en el medio.

N°	PARÁMETROS EN LA FERMENTACIÓN		CONCENTRACIÓN		PROMEDIO
	pH inicial	Temperatura	Replica 1	Replica 2	
1	5,8	30	8,42	8,35	8,39
2	5,8	35	6,32	6,13	6,23
3	5	35	3,93	3,65	3,79
4	5	30	3,31	2,95	3,13

Fuente: Elaboración Propia (2023).

En la tabla anterior se engloba los datos de concentración obtenidos con un promedio de ambos experimentos esto con el fin de tener un valor significativo de concentración para ser introducido en el programa SPSS.

Tabla IV-14 Matriz de experimentos con los datos experimentales.

N°	Matriz de experimentos		Plan de experimentos		
	A	B	pH inicial	Temperatura	Concentración
1	-1	-1	5,8	35	6,32
2	+1	-1	5	35	3,93
3	-1	+1	5,8	30	8,42
4	+1	+1	5	30	3,31
5	-1	-1	5,8	35	6,13
6	+1	-1	5	35	3,65
7	-1	+1	5,8	30	8,35
8	+1	+1	5	30	2,95

Fuente: Elaboración Propia (2023).

La matriz de experimentos nos muestra el orden en el que van a ser introducidos los datos en el programa SPSS.

4.3.1. Análisis de varianza Univariante

Se realizó un análisis de varianza unitaria para poder determinar la influencia de los factores como la Temperatura y pH, verificando si todos los factores y sus combinaciones son significativos respecto a la variable respuesta.

Los factores inter-sujetos se muestran en la tabla IV-15 con la codificación de cada nivel.

Tabla IV-15 Factores Inter-sujetos.

Factores inter-sujetos		
		N
TEMPERATURA	30	4
	35	4
pH	5	4
	5,8	4

Fuente: Elaboración Propia, SPSS (2023).

La tabla IV-16 muestra las pruebas inter-sujetos para determinar las variables significativas.

Tabla IV-16 Pruebas inter-sujeto

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: pH final					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	34,669 ^a	3	11,556	371,290	<0,001
Intersección	231,770	1	231,770	7446,440	<0,001
pH inicial	29,568	1	29,568	949,978	0,001
TEMPERATURA	1,125	1	1,125	36,145	0,004
TEMPERATURA * pH inicial	3,975	1	3,976	127,749	0,001
Error	0,125	4	0,031		
Total	266,564	8			
Total corregido	34,794	7			
R al cuadrado= 0,996 (R al cuadrado ajustada = 0,994)					

Fuente: Elaboración Propia, SPSS (2023).

En la Tabla IV-16 se observa que en los resultados de la intersección de la variable pH inicial * Temperatura si es significativa como también la temperatura y el pH para la determinación del modelo matemático, por lo tanto, se considera en el siguiente análisis.

4.3.2. Determinación del modelo matemático

Para determinar el modelo matemático se realizó una regresión con las variables significativas, pH inicial, Temperatura y pH inicial * Temperatura, se tomó como la variable dependiente la concentración del ácido cítrico en solución.

En la Tabla IV-17 y IV-18 se muestra un resumen del modelo matemático y del análisis ANOVA para la concentración.

Tabla IV-17 Resumen del modelo matemático.

Resumen del modelo ^b				
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	0,998 ^a	0,996	0,994	0,17642
a. Predictores: (Constante),pHinicial*Temperatura, pH inicial, Temperatura				
b. Variable dependiente: Concentración				

Fuente: Elaboración Propia, SPSS (2023).

En el resumen del modelo matemático se verifica que la línea de regresión generada si está en un rango aceptable respecto a los datos obtenidos ya que presenta un R^2 de 0,996.

Tabla IV-18 ANOVA^a.

ANOVA ^a						
Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	34,669	3	11,556	371,290	0,001 ^b
	Residuo	0,124	4	0,031		
	Total	34,794	7			

Fuente: Elaboración Propia, SPSS (2023).

Como se puede observar en la Tabla IV-18 el valor de significación tiende a cero por lo tanto se puede decir que el modelo matemático es correcto.

Tabla IV-19 Coeficientes del modelo matemático.

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
		B	Desv. Error	Beta		
1	(Constante)	-139,424	11,009		-12,664	0,001

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Desv. Error	Beta		
pH inicial	27,719	2,033	5,317	13,633	0,001
Temperatura	3,657	0,338	4,384	10,828	0,001
PHinicial * Temperatura	-0,705	0,062	-6,345	-11,303	0,001
a. Variable dependiente: Concentración					

Fuente: Elaboración Propia, SPSS (2023).

Según los coeficientes indicados en la Tabla IV-19, el modelo matemático para la determinación de la concentración de ácido cítrico el fermentado responde a la ecuación:

$$Y = 27,719X_1 + 3,657X_2 - 0,705X_1 * X_2 - 139,424$$

Donde:

X1 = pH Inicial

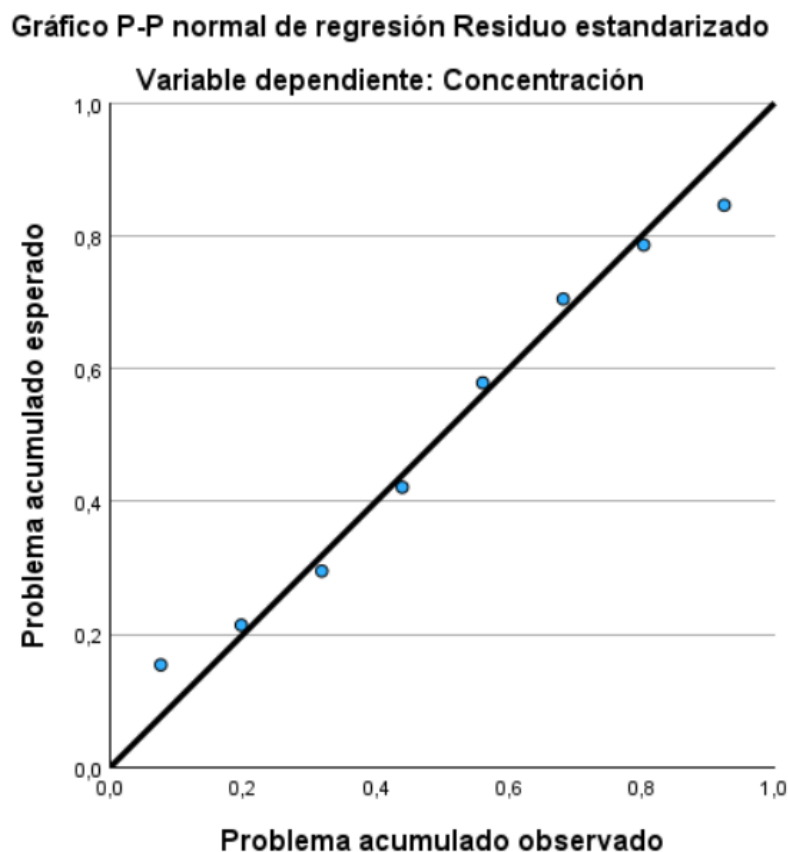
X2 = Temperatura

Y = Concentración

La respectiva ecuación predice el comportamiento de Y (concentración de ácido cítrico en el fermentado) al variar los valores de X1 (pH inicial) y X2 (Temperatura).

En la figura 4-9 se observa el modelo escogido y la posición de los puntos respecto al modelo en donde varios puntos se ajustan al modelo, por lo que se concluye que el modelo escogido es correcto.

Figura 4-9 Modelo Lineal.



Fuente: Elaboración Propia, SPSS (2023).

Se corrobora visualmente en el gráfico anterior que la línea de regresión si está en un rango aceptable sobre los puntos generados con los datos otorgados al programa SPSS.

Tabla IV-20 Concentración observada y calculada por SPSS.

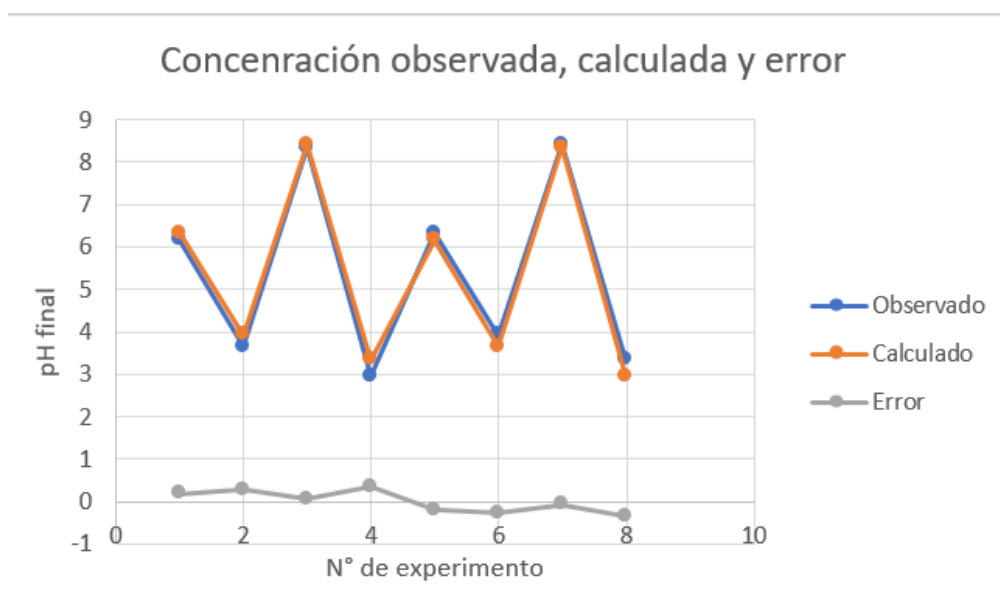
N° Experimento	Concentración observada	Concentración calculada	Error
1	6,32	6,13	0,19
2	3,93	3,65	0,28
3	8,42	8,35	0,07
4	3,31	2,95	0,36
5	6,13	6,32	-0,19
6	3,65	3,93	-0,28
7	8,35	8,42	-0,07

N° Experimento	Concentración observada	Concentración calculada	Error
8	2,95	3,31	-0,36

Fuente: Elaboración Propia (2023).

En la tabla anterior se presentan las variaciones de error entre los datos experimentalmente obtenidos de concentración con los datos teóricamente obtenidos con el modelo matemático generado por el programa SPSS.

Figura 4-10 pH final observado, calculado y error.



Fuente: Elaboración Propia (2023).

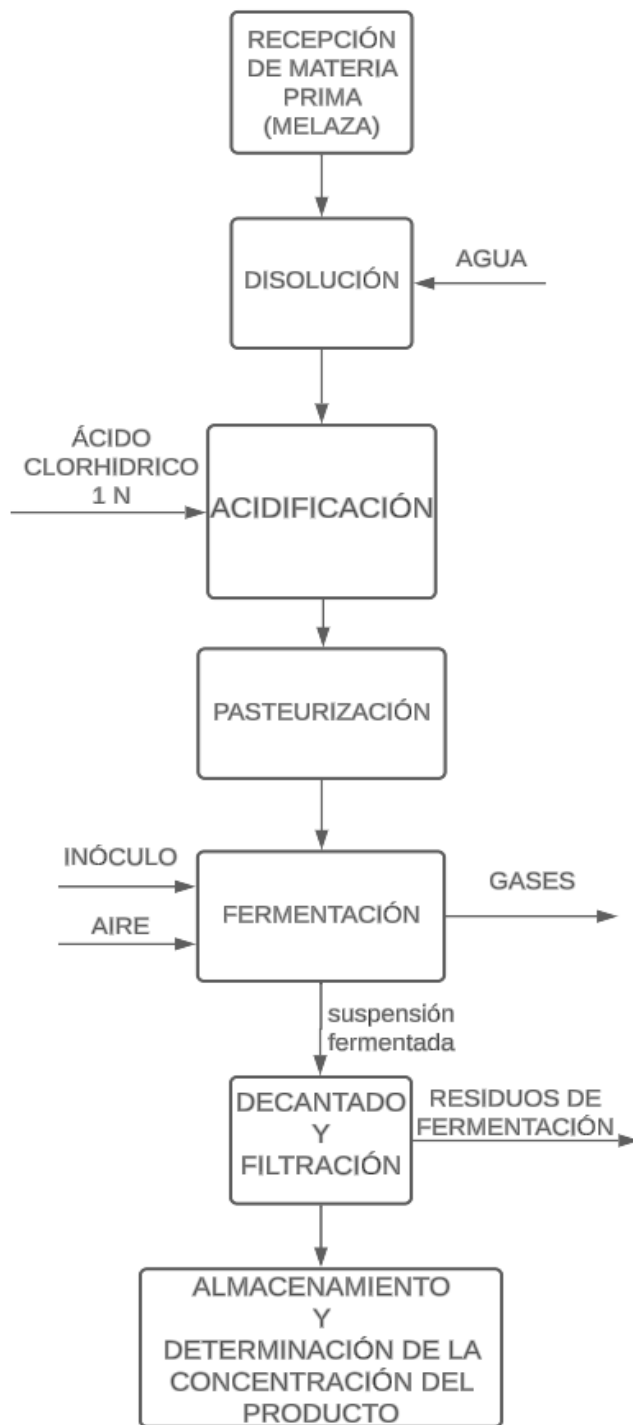
El gráfico anterior nos demuestra visualmente que efectivamente el modelo matemático estipula datos relativamente cercanos a los valores observados considerándose así un modelo matemático viable para expresar matemáticamente el comportamiento de la concentración del ácido cítrico respecto a los cambios de temperatura y pH inicial en la melaza en la fermentación.

CAPÍTULO V
BALANCE DE MATERIA Y
ANÁLISIS DE COSTOS

5. BALANCE DE MATERIA Y ANÁLISIS DE COSTOS

5.1. Balance de materia.

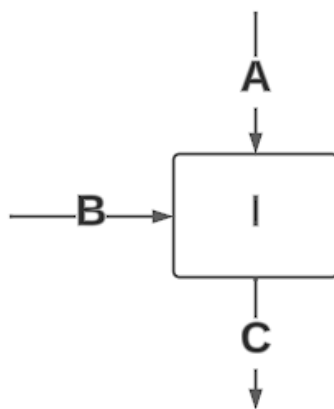
Figura 5-1 Diagrama de flujo para el proceso de obtención de ácido cítrico en solución.



Fuente: Elaboración Propia (2023).

5.1.1. Balance de materia en la disolución de la materia prima

El balance de materia se tomará a partir de la disolución ya que es aquí donde recién ocurren las variaciones de masa en el procedimiento. El balance global para el primer bloque se toma que la densidad del agua es de 1 gr/ ml y que no se toman en cuenta las pérdidas por la evaporación en la pasteurización ya que no son observables.



Donde:

A = Cantidad de melaza = 3500 g

B = Cantidad de agua de mesa = 7000g

C = Cantidad de melaza diluida = 10500 g

Balance para el bloque I:

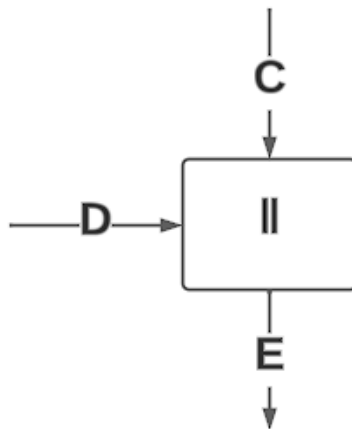
$$C = A + B \quad (5.1)$$

De la ecuación (5.1):

$$C = 10500 \text{ g}$$

5.1.2. Balance en la acidificación del mosto

Para la acidificación del mosto se usó un total de 1L de ácido clorhídrico por cada 10 L de melaza diluida, la densidad del ácido era: 1gr/cm³.



Donde:

C = Cantidad de melaza diluida = 10500 g

D = Cantidad de ácido clorhídrico = 1L \rightarrow 1000 g

E = Cantidad de melaza acidificada = 11500 g

Balance para el bloque II:

$$E = D + C \quad (5.2)$$

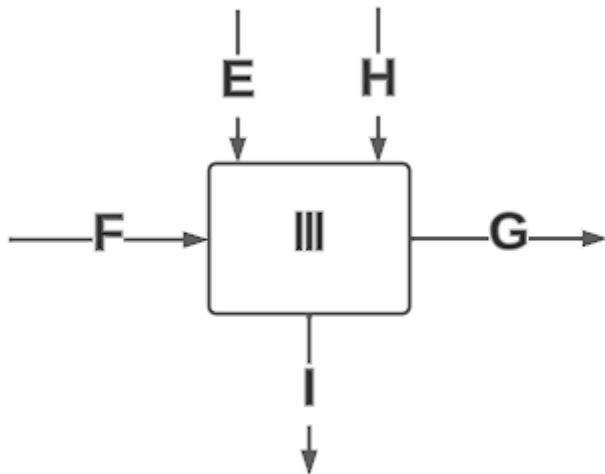
De la ecuación (5.2):

$$E = 11500 \text{ g}$$

5.1.3. Balance de materia en la fermentación de la melaza.

Para el proceso de fermentado se usó un aproximado de 8 gr de *Aspergillus Níger* junto al Agar por cada 10 Litros de melaza diluida, la reacción que se va a tener lugar en el biorreactor es la siguiente:

Se considerarán las pérdidas por el arrastre de agua en el aire saliente como también pérdidas por la extracción de muestras, se tomarán pérdidas de 1000 gr aproximadamente.



Donde:

E = La cantidad de melaza diluida y acidificada = 11500 g

F = Cantidad de *Aspergillus Niger* = 8 g

G = Pérdidas = 1000 g

H = Oxígeno consumido, Agua generada y consumida = 43,3 g

I = Cantidad de fermentado después de la reacción = 10553,3 g

Balance para el bloque III:

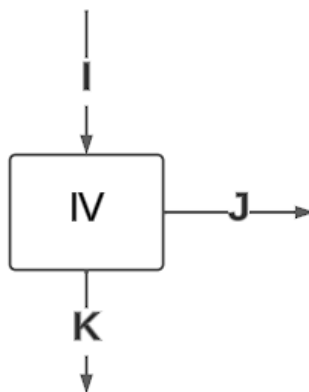
$$E + F - G + H = I \quad (5.3)$$

De la ecuación (5.3):

$$I = E + F - G + H = 10551,3 \text{ g}$$

5.1.4. Balance de materia después del decantado del fermentado

Al final de la decantación se depositó al fondo del biorreactor la cantidad de 700 g entre biomasa y precipitados de la melaza.



En donde:

I = Cantidad de fermentado = 10551,3 g

J = Cantidad de residuos de la fermentación = 700 g

K = Cantidad de fermentado separado = 9853,3 g

Balance para el bloque IV:

$$K = I + J \quad (5.4)$$

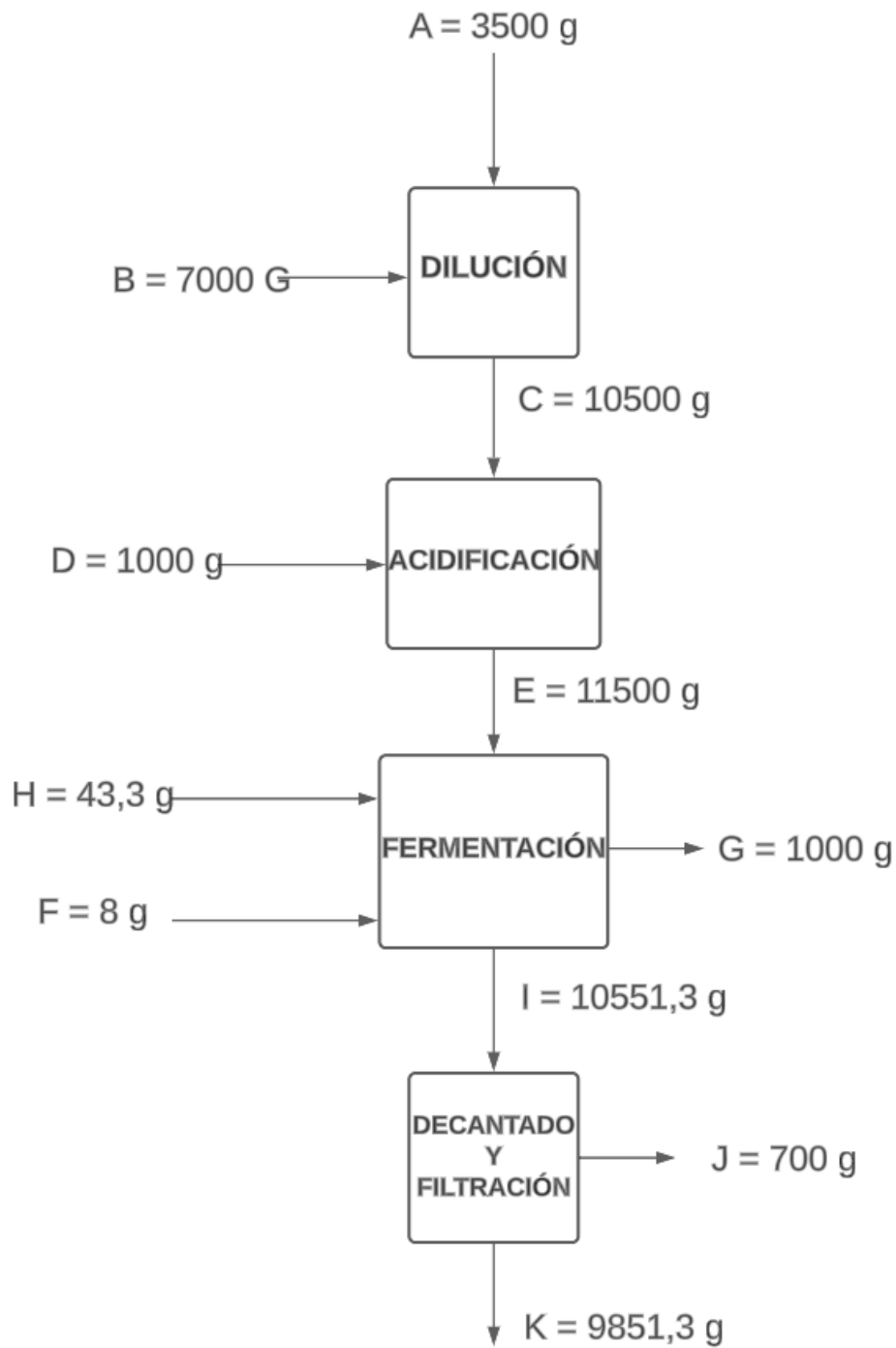
De la ecuación (5.4):

$$K = 9851.3 \text{ g}$$

Posteriormente se pasa al proceso de inactivación de la cepa calentando el fermentado a 60 °C donde las pérdidas por evaporación son despreciables, y luego se procede a su almacenamiento en bidones de 10 litros que permanecerán sellados.

5.1.5 Resumen del balance de materia

Figura 5-2 Resumen del balance de materia en la obtención de ácido cítrico en solución por fermentación de la melaza



Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla V-1 Resultados de corrientes en el balance de materia.

Balance de materia		
Corriente	Definición	Cantidad (g)
A	Melaza	3500
B	Agua de mesa	7000
C	Melaza diluida	10500
D	Ácido clorhídrico	1000
E	Melaza acidificada	11500
F	<i>Aspergillus Niger</i>	10
G	Perdidas	1000
H	Oxígeno y agua	43,3
I	Fermentado	10553,3
J	Residuos	700
K	Ácido cítrico en solución	9853,3

Fuente: Elaboración Propia (2023).

En la tabla y figura anteriores se puede observar un resumen de todo el balance de masa que se realizó a lo largo del experimento tomando como referencia el experimento donde mayor rendimiento se obtuvo, el experimento 1.

5.2. ANÁLISIS DE COSTOS

5.2.1. Costo del estudio

Para determinar el presupuesto de investigación se realizó la evaluación de costos directos, que se realizan durante la elaboración de todo el proyecto. Las siguientes tablas muestran los detalles de los costos indirectos.

Tabla V-2 Detalle de costos de materia prima y reactivos.

Insumos	Cantidad	Unidad	Costo unitario (bs)	Costo total (bs)
Melaza de caña	30	L	5	150
Ácido clorhídrico	4	L	120	480

Insumos	Cantidad	Unidad	Costo unitario (bs)	Costo total (bs)
Agua de mesa	56	L	1	56
Glucosa	25,6	g	0,18	4,6
Alcohol	2	L	9	18
SUBTOTAL				436,62

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla V-3 Detalle del costo total de materiales.

Insumos	Cantidad	Unidad	Costo unitario (bs)	Costo total (bs)
Cacerola	1	Pieza	60	60
Aireadores	2	Pieza	100	200
Bañador	1	Pieza	60	60
Termostato	2	Pieza	65	130
Filtro	1	Pieza	90	90
Bomba de agua	1	Pieza	62	62
Recipiente 12 L	2	Pieza	23	46
Interruptores	3	Pieza	5	15
Cable	12	Metro	4	48
Mangueras	8	Metro	7	56
Válvulas de neumático	6	Pieza	6	36
Cinta adhesiva	1	Pieza	10	10
Esponja	2	Pieza	2	4
Recipiente de 15 L	1	Pieza	26	26
SUBTOTAL				873

Fuente: Elaboración Propia (2023).

El resto de materiales necesarios fueron proporcionados por el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad Autónoma Juan Misael Saracho.

Tabla V-4 Detalles de costos de material de apoyo.

Descripción	Cantidad	Unidad	Costo unitario (bs)	Costo total (bs)
Internet	Horas	200	3	600
Pasajes	-	120	1	120
Papel	Hojas	300	0.1	30
Mano de obra	Horas	150	70	10500
SUBTOTAL				11250

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla V-5 Detalle de costos totales de estudio.

Descripción	Costo Total (bs)
Costo de materia prima y reactivos	436,62
Costo de materiales	873
Costo de material de apoyo	11250
Imprevistos	600
Total	13159,62

Fuente: Elaboración Propia (2023).

El costo de la investigación es de **13159,62** bolivianos.

5.2.2. Costo de producción

A partir de los balances de materia y los gastos energéticos de los equipos utilizados se puede estimar el costo de producción para la obtención de ácido cítrico en solución por fermentación de la melaza.

Los costos fijos asociados a los servicios básicos fueron: energía eléctrica 0,6 Bs/Kwh, Agua 0,7 Bs/m³ y gas natural 1,55 Bs/m³.

Tabla V-6 Detalle de costos de materia prima y reactivos.

Insumos	Cantidad	Unidad	Costo unitario (bs)	Costo total (bs)
Melaza de caña	3	L	5	15
Agua de mesa	7	L	1	7
Glucosa	3,4	g	0,18	0.612
SUBTOTAL				22.612

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla V-7 Detalle de costos de energía de los equipos utilizados.

Equipo	Potencia (KW)	Tiempo (hr)	Energía (KWh)	Costo total (bs)
Termostato	0.3	120	36	21,6
Bomba sumergible	0.012	144	1,728	1,04
Aireador	0.05	144	7.2	4,32
Filtro	0.015	144	2.16	1,3
SUBTOTAL				28,26

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla V-8 Detalle de costo de consumo de agua.

Equipo	Cantidad	Unidad	Costo unitario (bs)	Costo total (bs)
Refrigerante en baño María	43	L	0,7	30,1

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Tabla V-9 Detalle de costos de consumo de gas natural.

Equipo	Cantidad	Unidad	Costo unitario (bs)	Costo total (bs)
Pasteurización de melaza diluida	0.1	m ³	1,55	0,16
Inactivación de la cepa	0.1	m ³	1,55	0,16
SUBTOTAL				0,32

Fuente: Elaboración Propia (2023).

Para el cálculo del consumo de gas natural se tomó en cuenta que el consumo promedio de la cocina de hornalla mediana es de 0,15 m³/hora y el tiempo de pasteurización como también de inactivación de la cepa se tomó que sería de 40 minutos.

El costo total de producción es la suma de los costos de materia prima, consumo energético de los equipos, consumo de agua y gas natural.

$$\text{Costo total} = 22,612 + 28,26 + 30,1 + 0,32$$

$$\text{Costo total} = 81.3 \text{ Bs.}$$

Para la obtención de 84,21 gramos de ácido cítrico a partir de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo se tiene un costo aproximado de 81.3 Bs. Por regla de tres simples, el costo por 100 gr de ácido cítrico es de 103,58 bolivianos.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES Y
RECOMENDACIONES

CAPÍTULO V

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

Se obtuvo exitosamente ácido cítrico en solución, a escala laboratorio por fermentación de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo, departamento de Tarija.

- Se utilizó melaza de caña de azúcar proveniente del ingenio azucarero de Bermejo, Los resultados de los parámetros fisicoquímicos determinados por el CEANID fueron: Acidez (como ácido tartárico) de 0,56 %, azúcares totales de 66,61 %, azúcares reductores del 16,98 %, ceniza del 9,44 %, humedad del 18,66 %, materia seca del 81,34 %, proteína total 2,42 %, Fosforo de 82,1 mg/100 g, nitrógeno total de 0,39 g/100 g, pH de 6,4 y 78° Brix de sólidos solubles.
- Las variables estudiadas en el proceso de obtención de ácido cítrico por fermentación de la melaza del ingenio azucarero de Bermejo fueron pH y temperatura en la fermentación. Concluida la parte experimental, se determinó que las condiciones óptimas del proceso son el pH con valor de 5,8 y la temperatura con valor de 30 °C, en estas condiciones se obtuvieron 84,21 gr de ácido cítrico por 10 litros de fermentado.
- A partir de 3500 gramos de melaza del ingenio azucarero de Bermejo se obtienen 84,21 gramos de ácido cítrico con un rendimiento de 84,21 %.
- El rendimiento másico del ácido cítrico en solución empleando el método del presente estudio es de 28,07 gr/L_{Melaza} y del rendimiento másico de la obtención de alcohol etílico usando la melaza es de 155,31 gr/L_{Melaza}, evidenciándose así que el rendimiento másico es mayor a la hora de obtener alcohol etílico.
- El costo de obtención de ácido cítrico a partir de la melaza de caña del ingenio azucarero de Bermejo fue de 103,58 Bs para obtener 100 gramos de ácido cítrico.

6.2. RECOMENDACIONES

- Aplicar un filtrado más eficiente o una clarificación a la melaza antes de la fermentación para que no intervengan las impurezas en el desarrollo microbiano.
- Hacer estudios de metales presentes en la melaza y posteriormente hacer una precipitación de los mismos de ser necesario

- Usar nutrientes con nitrógeno y también fosforo para poder ayudar a que el periodo de adaptación de la cepa dentro de la melaza diluida sea más rápido y eficiente.
- Usar biorreactores de vidrio que puedan ser esterilizados en una autoclave, esto permitirá mayor exclusividad al desarrollo de la cepa en la fermentación.
- Para futuros estudios usar mayores cantidades de *Aspergillus Niger*, de esa manera se podrán obtener rendimientos más altos.
- Recomendar triturar más uniformemente los cultivos de *Aspergillus Niger* en caso de que también se lo añada con su medio de cultivo al biorreactor.
- Realizar el proyecto de obtención de ácido cítrico por fermentación de la melaza de caña del ingenio azucarero de Bermejo con un estudio detallado de costos para determinar si el mismo es factible a nivel de producción industrial.