

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A ESCALA DE LABORATORIO POR VÍA
FERMENTATIVA DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO COMO SUSTRATO DURAZNOS (*Prunus pérsica*)
CULTIVADOS EN LA PROVINCIA DE PAMPLONA (NORTE DE SANTANDER)**

LUIS CAMILO LEÓN LÓPEZ

INGENIERÍA QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CIVIL, AMBIENTAL Y QUÍMICA.

FACULTAD DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

PAMPLONA, COLOMBIA

2018

**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A ESCALA DE LABORATORIO POR VÍA
FERMENTATIVA DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO COMO SUSTRATO DURAZNOS (*Prunus pérsica*)
CULTIVADOS EN LA PROVINCIA DE PAMPLONA (NORTE DE SANTANDER)**

LUIS CAMILO LEÓN LÓPEZ

**Proyecto de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de: Ingeniero
Químico**

Directores

EDWIN GUSTAVO FUENTES ORDOÑEZ

Dr. Ingeniería Química

ANGELA MARÍA IDARRAGA VELEZ

MSc. Ingeniería Química

ANGELA MARITZA CAJIAO PEDRAZA

Microbióloga

INGENIERÍA QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CIVIL, AMBIENTAL Y QUÍMICA.

FACULTAD DE INGENIERIAS Y ARQUITECTURA

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

PAMPLONA, COLOMBIA

2018

RESUMEN

Con el fin de crear productos de valor agregado que generen una estabilidad económica en la región se estudió la producción de ácido cítrico a partir del durazno cultivado en la provincia de Pamplona, por medio del proceso de fermentación utilizando un cultivo del hongo *Aspergillus niger*. Para esto es necesario el uso de un biorreactor que garantice las condiciones del proceso. En primera instancia se realizó la caracterización fisicoquímica de las materias primas para definir el tipo de fuente rica en carbono para la fermentación. Dado que no se contaba con un equipo adecuado para este fin se realizó el diseño y posterior construcción de este. Para la validación de los experimentos se cuantificaron los azúcares totales consumidos y la cantidad de ácido producido. Utilizando las técnicas de fenol sulfúrico y Safran-Densted, respectivamente. Obteniendo una concentración de 6,9 g/l en un tiempo de 84 horas a partir de 2 litros de sustrato con un contenido de azúcares equivalente 5 grados brix de cual se consumió el 60%; y un inóculo de concentración 1×10^6 esporas por mililitros.

Palabras clave: Bioreactor, Fermentación, ácido cítrico, *Aspergillus niger*, Monitoreo y Control.

CONTENIDO

1	OBJETIVOS.....	9
1.1	OBJETIVO GENERAL	9
1.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	9
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	9
3	MARCO TEÓRICO	10
3.1	<i>ASPERGILLUS NIGER.....</i>	<i>10</i>
3.1.1	<i>Caracterización de la cepa.....</i>	<i>10</i>
3.2	SUSTRATO	11
3.3	BIOMASA	11
3.4	ÁCIDO CÍTRICO	12
3.5	FERMENTADOR.	12
3.6	CINÉTICA MICROBIOLÓGICA.....	13
4	ESTADO DEL ARTE	14
5	METODOLOGÍA.....	15
5.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS.....	15
5.2	EQUIPO	17
5.2.1	<i>Diseño</i>	<i>17</i>
5.2.2	<i>Construcción.....</i>	<i>18</i>
5.2.3	<i>Adecuación y puesta en marcha</i>	<i>18</i>
5.3	ENSAYOS PRELIMINARES.....	19
5.4	FERMENTACIÓN.....	19
5.4.1	<i>Preparación del inóculo</i>	<i>19</i>
5.4.2	<i>Medio de fermentación.....</i>	<i>19</i>
5.4.3	<i>Preparación de equipo</i>	<i>19</i>
5.4.4	<i>Fermentación</i>	<i>19</i>
5.5	CUANTIFICACIÓN	20
5.5.1	<i>Biomasa</i>	<i>20</i>
5.5.2	<i>pH.....</i>	<i>20</i>
5.5.3	<i>Grados Brix.....</i>	<i>21</i>
5.5.4	<i>Azúcares Totales</i>	<i>21</i>
5.5.5	<i>Ácido Cítrico</i>	<i>24</i>
5.6	OBTENCIÓN DE LAS CINÉTICAS	25
6	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	28
6.1	CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS	28
6.1.1	<i>Aislamiento de la cepa.....</i>	<i>28</i>
6.1.2	<i>Sustrato.....</i>	<i>29</i>
6.1.3	<i>Inóculo.....</i>	<i>29</i>

6.2	EQUIPO	29
6.3	ENSAYOS PRELIMINARES	33
6.4	FERMENTACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS.....	34
6.5	OBTENCIÓN DE LAS CINÉTICAS	37
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
7.1	CONCLUSIONES	40
7.2	RECOMENDACIONES.....	40
8	BILBIOGRAFÍA	41
9	ANEXOS	47
	ANEXO I.....	47
	ANEXO II.....	48
	ANEXO III.....	51
	ANEXO IV	55
	ANEXO V	56

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. SOLUCIONES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE AZUCARES POR EL MÉTODO DE FENOL-SULFÚRICO.....	22
TABLA 2. SOLUCIONES PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR EL MÉTODO DE SAFRAN-DENSTEDT.	24
TABLA 3. VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO MÁXIMA PARA DIFERENTES TIPOS DE MO.	26
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DEL SUSTRATO.....	29
TABLA 4. DIMENSIONES DE LOS COMPONENTES DEL REACTOR.....	30
TABLA 6. CANTIDADES DE MICRONUTRIENTES PERMISIBLES PARA LA FERMENTACIÓN Y CONTENIDAS EN EL DURAZNO.	35
TABLA 7. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL MODELO TEÓRICO Y LOS DATOS EXPERIMENTALES.	38

LISTA DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. TIEMPOS DE REPUESTA DE CONTROLADOR.....	32
GRÁFICA 2. PERFIL DE CONSUMO DE AZÚCARES EN LOS ENSAYOS PRELIMINARES.	33
GRÁFICA 3. PERFIL DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO EN LOS ENSAYOS PRELIMINARES	33
GRÁFICA 4. PERFIL DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.....	35
GRÁFICA 5. PERFILES DE CONCENTRACIÓN. A. AZÚCARES TOTALES. B. BIOMASA TOTAL Y BIOMASA MICROBIANA.	36
GRÁFICA 6. PERFILES DE CONCENTRACIÓN CON AJUSTE POLINOMIAL. (A) ÁCIDO CÍTRICO. (B) AZÚCARES TOTALES. (C) BIOMASA	37
GRÁFICA 7. PERFILES DE CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.....	39

LISTA DE IMÁGENES

IMAGEN 1. <i>Aspergillus niger</i> .	10
IMAGEN 2. MOLÉCULA DE ÁCIDO CÍTRICO.	12
IMAGEN 3. COMPONENTES PRINCIPALES DE UN FERMENTADOR.	13
IMAGEN 4. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL MODELO DE MONOD-	13
IMAGEN 5. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA EN LA INVESTIGACIÓN.	15
IMAGEN 6. DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO.	20
IMAGEN 7. DETERMINACIÓN DEL PH.	21
IMAGEN 8. LECTURA DE LOS GRADOS BRIX.	21
IMAGEN 9. ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE GLUCOSA.	22
IMAGEN 10. DETERMINACIÓN DE AZUCARES TOTALES EN LAS MUESTRAS POR EL MÉTODO DE FENOL – SULFÚRICO.	23
IMAGEN 11. ELABORACIÓN DE LA CURVA PATRÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.	24
IMAGEN 12. DETERMINACIÓN LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO EN LA MUESTRA	25
IMAGEN 13. CRECIMIENTO DE COLONIAS EN EL DURAZNO. A. FRUTO FRESCO. B. FRUTO DESPUÉS DE 8 DÍAS.	28
IMAGEN 14. COLONIAS DE <i>Aspergillus niger</i> . (A) BAJO EL MICROSCOPIO. (B) EN LA CAJA DE PETRI.	28
IMAGEN 15. SOLUCIÓN DE INOCULACIÓN.	29
IMAGEN 16. RENDER DEL EQUIPO ELABORADO EN SOLIDWORKS.	30
IMAGEN 17. DIAGRAMA DE LAZOS DE CONTROL.	31
IMAGEN 18. EQUIPO CONSTRUIDO.	31
IMAGEN 19. INTERFAZ DE USUARIO DEL SISTEMA DE FERMENTACIÓN.	32
IMAGEN 20. REACTOR CARGADO E INOCULADO.	34
IMAGEN 21. RESUMEN DE LA RUTA METABÓLICA PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.	36

1 OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la producción de ácido cítrico a escala de laboratorio por vía fermentativa de *Aspergillus niger* utilizando como sustrato Durazno (*Prunus pérsica*) cultivados en la provincia de Pamplona (Norte de Santander).

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Realizar la caracterización fisicoquímica del sustrato utilizado en el proceso de fermentación.

Aislar una cepa de *Aspergillus niger* presente en la degradación del Durazno para su aplicación durante el proceso de producción de ácido cítrico.

Diseñar y construir un sistema que provea un ambiente adecuado para el crecimiento del *Aspergillus niger* en el proceso de fermentación.

Determinar la cinética y selectividad del proceso de producción de ácido cítrico mediante la fermentación de duraznos con *Aspergillus niger*.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Al estar ubicados en la provincia de Pamplona, Norte de Santander; y entender un poco de la economía del lugar, es fácil reconocer que se dedican en mayor parte a la agricultura. Esta es una zona reconocida por ser productora de Duraznos a nivel nacional, a lo largo de la provincia existen aproximadamente 200 productores, los cuales manejan un total de 300 hectáreas (Fischer, 2013). Adentrándose en el cultivo a gran escala de Durazno en amplias extensiones de las laderas montañosas que forman la geografía de la zona, se observan diferentes problemas.

Para este estudio se evidenció un inconveniente que se presenta en el momento del almacenaje; ya que es un alimento perecedero, su duración en stand no puede ser prolongado y la comercialización no es continua. Las épocas de máxima cosecha se presentan en los meses de marzo y octubre (Restrepo, Sánchez, & Gómez, 2012), momento durante el cual la producción se aumenta a gran escala y este no siempre puede ser comercializado, el Durazno restante que no pudo salir del campo es producción perdida.

Dado que el Instituto Colombiano Agropecuario, en su resolución 030021 del 28 de abril de 2017 “Manual de requisitos para la certificación en buenas prácticas agrícolas en producción primaria de vegetales y otras especies para el consumo humano” (Agropecuario, 2017), no es específico en el tratamiento de los cultivos pos cosecha este producto es tomado por el campesino productor como desecho. En el mejor de los casos es utilizado para compostaje, produciendo el abono de las tierras nuevamente, el que no alcanza a ser utilizado para este fin es incinerado, generando contaminación al medio ambiente por desprendimiento de CO₂; o es enterrado, generando plagas e insectos que contaminan los nuevos sembradíos o hasta proliferar enfermedades en los humanos.

Empleando los conocimientos adquiridos en la formación como Ingeniero Químico en la Universidad de Pamplona, y buscando generar procesos sostenibles que sean amigables con el ambiente se plantea una alternativa de solución a esta problemática. Con esto en mente se ha pensado en un

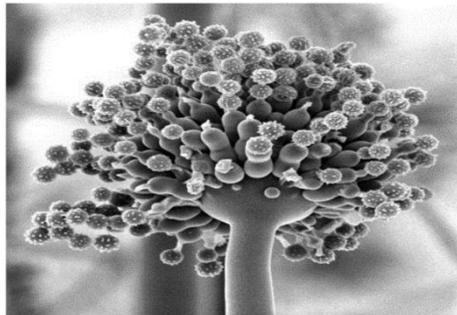
nuevo ciclo productivo para esta materia prima, el cual consiste en aprovechar el Durazno de poscosecha para generar un producto de valor agregado que permita a los campesinos de la región dejar de ser productores primarios y entrar en el mercado industrializado, el cual representa una mayor estabilidad económica. El ácido cítrico a nivel mundial tiene unas aplicaciones que van desde la industria de las bebidas hasta los cosméticos pasando por la industria de fabricación de elementos de aseo (Soccol, Vandenberghe, Rodrigues, & Pandey, 2006). Por estas razones el ácido cítrico se ha convertido en un producto de primera necesidad, generando un amplio espectro de comercio con un crecimiento anual de más de 3.5% según lo reportado por Anastassiadis 2008 (Anastassiadis, Morgunov, Kamzolova, & Finogenova, 2008a).

3 MARCO TEÓRICO

3.1 *Aspergillus niger*

Se trata de un miembro de género *Aspergillus*, el cual incluye un grupo de hongos que, por lo general, son considerados asexuales. Aunque en algunos casos se han encontrado cepas que se reproducen de manera sexual. Este género es conocido por ser un microorganismo ambiental. Dada su facilidad de colonizar una gran variedad de sustratos estos pueden ser encontrados en diferentes lugares con condiciones medioambientales muy variadas. El *Aspergillus niger* se encuentra comúnmente sobre la vegetación muerta, en pilas de compost o cualquier otro tipo de vegetación en estado de descomposición. Principalmente es utilizado para la producción de enzimas y ácidos orgánicos mediante fermentación. (Muredzi, 2013; Sáez Vega, Flórez Valdés, & Cadavid Rendón, 2002).

Imagen 1. *Aspergillus niger*.



Fuente: Muredzi, 2013

3.1.1 Caracterización de la cepa

Por años, los hongos han sido estudiados por su variada aplicación a nivel industrial para la obtención de productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos; o para evitar sus efectos perjudiciales y de esta forma contrarrestarlos (Schöler, Jacquiod, Vestergaard, Schulz, & Schloter, 2017).

Los hongos filamentosos son microorganismos implicados en procesos biotecnológicos debido a su alto potencial en el desarrollo de productos industriales de origen natural, ya que estos producen

gran cantidad de compuestos que pueden ser aislados y utilizados en diferentes campos a nivel industrial tales como ambiental, alimenticio, farmacéutico, entre otro (Muredzi, 2013).

Para la aplicación y el conocimiento del potencial de estos hongos filamentosos a nivel industrial es necesaria la completa caracterización de las cepas con las que se desea trabajar, tanto a nivel microscópico y macroscópico, como a nivel molecular, para así determinar el potencial del hongo y de los compuestos que produce.

Debido al uso de estos compuestos y su alto potencial biotecnológico, es necesaria la búsqueda de mejoras en los procesos de aislamiento y producción de estos mismos por medio de diferentes técnicas, para las cuales se hace necesaria la identificación de dichos microorganismos, recurriendo a métodos moleculares con la finalidad de identificar genes potenciales cuya función esté relacionada con la producción de metabolitos secundarios con potencial industrial, permitiendo el mejoramiento de los procesos industriales en los que el microorganismo se encuentra implicado.

Hongos filamentosos pertenecientes a los géneros como *Aspergillus* sp. y *Mucor* sp. son conocidos en diferentes campos a nivel industrial. Por ejemplo, en el campo farmacéutico *Mucor circinelloides* es empleado en la producción de ácido kojico, que se utiliza como principio activo de cremas des manchadoras del rostro, en el área industrial se encuentran aplicaciones en la producción de biodiesel, isoprenoides, vitaminas, etc.

3.2 SUSTRATO

Se conoce como el medio que sirve para proveer a un ser vivo de todos los nutrientes necesarios para su supervivencia. Con la ayuda de las enzimas los organismos toman las moléculas que componen el sustrato y las metabolizan en otros productos que pueden llegar a ser valiosos (Agamez Ramos, Zapata Navarro, Oviedo Zumaqué, & Barrera Violeth, 2008).

El sustrato puede ser aprovechado por los organismos de diferentes formas, dependiendo de la naturaleza de las reacciones que se llevan a cabo (Beltrano & Gimenez, 2015), estas pueden ser:

Químicas: Son aquellas en las que el sustrato se hidroliza en solución, liberando iones que pueden causar variaciones en el pH o en las que se pueden liberar iones metálicos, causando alteraciones durante el proceso o hasta la inhibición de los microorganismos.

Físico-químicas: Se presentan principalmente en los sustratos con un alto contenido de materia orgánica. Dado que son reacciones de intercambio iónico pueden generar variaciones en el pH y cambios de la composición del sustrato.

Bioquímicas: Estas reacciones se llevan a cabo con la ayuda de las enzimas, en las cuales los microorganismos degradan la materia orgánica liberando CO₂ y otros elementos minerales por medio del metabolismo.

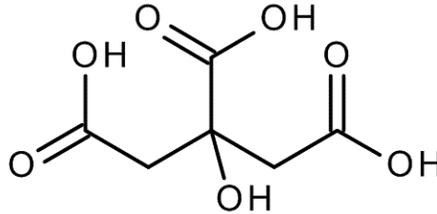
3.3 BIOMASA

El concepto de biomasa puede ser abordado desde dos puntos de vista. Como recurso renovable se entiende como toda aquella materia orgánica que puede ser convertida en energía (Bracmort, 2015). En microbiología se define como la cantidad de microorganismos vivos que se pueden encontrar en un sistema. De esta forma cuando se refiere a procesos biológicos es conveniente entender la biomasa como la cantidad de microorganismos presentes, su importancia en este tipo de procesos radica principalmente en la velocidad de consumo y el grado de conversión de sustrato en el producto deseado (Argun, Kargi, & Kapdan, 2009).

3.4 ÁCIDO CÍTRICO

Se trata de un ácido orgánico de fórmula $C_7H_8O_7$, imagen 2. Dado que es de un producto intermedio del ciclo de Krebs es posible encontrarlo en todos los seres vivos. Mundialmente es conocido por ser el principal componente de las frutas ácidas, como el limón, la naranja, la piña, entre otras. Donde se puede encontrar en concentraciones que se acercan al 10% (Anastassiadis, Morgunov, Kamzolova, & Finogenova, 2008b; Gómez Schouben, 2012).

Imagen 2. Molécula de Ácido Cítrico.



Fuente: Martin, Harper, Mayes, & Rodwell, 1982

El ácido cítrico es utilizado principalmente en las industrias alimentos, fármacos y cosméticos; Principalmente como agente antioxidante, estabilizador de pH, acidulante y conservante. Adicionalmente también se puede encontrar, en una menor medida, en la limpieza y tratamiento de metales, cuero y botellas, así como en los textiles y las tintas de impresión (Grewal & Kalra, 1995; Martin, Harper, Mayes, & Rodwell, 1982).

3.5 FERMENTADOR.

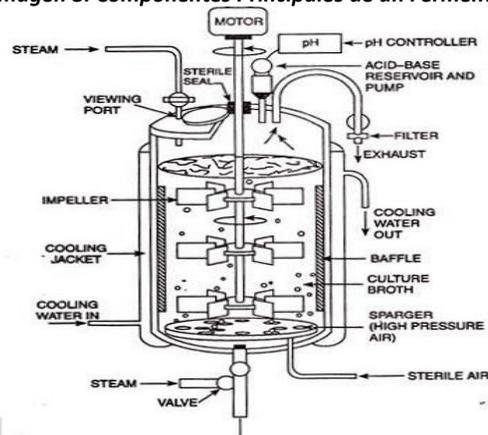
Según Stanbury 1995 la principal función de un fermentador es proveer un ambiente controlado para el crecimiento de los microorganismos (Stanbury, Whittaker, & Hall, 1995). Es necesario tener en cuenta otros puntos importantes, como son:

- El recipiente debe tener la capacidad de ser operado durante días sin que se vean comprometidas las condiciones de asepsia. Por lo cual debe ser confiable durante un largo tiempo.
- Se debe proveer una aireación y agitación adecuada, para garantizar el correcto metabolismo de los MO sin comprometer su integridad.
- Debe contar con un sistema de control de pH y temperatura, así como una fácil adquisición de muestras.
- Idealmente el recipiente debe ser apto para múltiples procesos, teniendo en cuenta las regulaciones de contaminación.

En la imagen 3 (Garg, 2010), se muestran los principales componentes de un biorreactor para su correcto funcionamiento y operación.

El modelamiento de cada uno de los componentes del equipo se realiza por separado, tomando como punto de partida un volumen definido, de acuerdo a la aplicación a la que se va a destinar (Inegbedion, 2002).

Imagen 3. Componentes Principales de un Fermentador.



Fuente: Garg, 2010

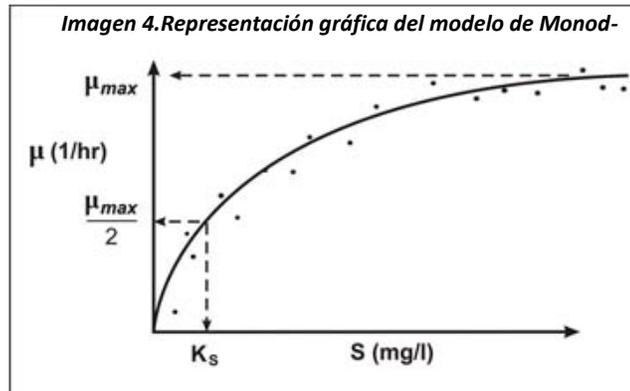
3.6 CINÉTICA MICROBIOLÓGICA

Panikov 2014 define la cinética como la rama de la ciencia que se encarga de las velocidades y los mecanismos de cualquier proceso, ya sea físico, químico o biológico (Panikov, 1991). Para modelar los procesos biológicos se aplican modelos matemáticos, mediante los cuales es posible describir la actividad metabólica de los microorganismos (Nielsen & Villadsen, 1992).

El modelo más utilizado para describir el comportamiento cinético de los microorganismos es el de Monod, el cual está relaciona la velocidad máxima de crecimiento microbiano, la constante de saturación y el coeficiente de conversión en un modelo diferencial de actividad celular y consumo de sustrato, Ecuación 1 (Dette, Melas, Pepelyshev, & Strigul, 2005; Strigul, Dette, & Melas, 2009).

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \quad (1)$$

Gráficamente el modelo de Monod se puede representar como se observa en la imagen 4. Donde es posible observar cada uno de los parámetros involucrados en la ecuación y como se relacionan.(Cunningham, Lennox, & Rockford, 2010).



Fuente: Cunningham, Lennox, & Rockford, 2010

4 ESTADO DEL ARTE

En la actualidad el 99% de la producción de ácido cítrico a nivel mundial se lleva a cabo mediante el proceso de fermentación de diferentes tipos de sustratos y microorganismos (Stazzonelli & Ploper, 2017), principalmente hongos filamentosos (Al-Hindi, Al-Najada, & Mohamed, 2011). Es importante tener en cuenta que la calidad de la producción metabólica depende principalmente de tres factores. El tipo de cepa utilizada, el medio de fermentación y las condiciones de cultivo (Anastassiadis et al., 2008b).

Una numerosa cantidad de cepas han sido estudiadas para la producción de ácido cítrico por medios biológicos, pero no fue hasta 1917, cuando Currie descubrió que algunas cepas de *Aspergillus niger* pueden desarrollar altas concentraciones de AC, que esta se empezó a utilizar industrialmente (Papagianni, 2007). Desde entonces se han probado diferentes técnicas para aumentar la producción de AC. Comparado con la aplicación de agentes mutágenos como el Etil Metil Sulfonato o el naranja de acridina (Lotfy, Ghanem, & El-Helow, 2007), la mutación mediante radiación UV ha demostrado ser una alternativa importante, generando un aumento de hasta 44% comparado con la cepa sin mutación (Adeoye, Lateef, & Gueguim-Kana, 2015). Nuevos estudios han demostrado que es conveniente aislar la cepa de *Aspergillus niger* directamente desde el sustrato que se utilizará durante la fermentación, con el fin de generar un medio confiable para el desarrollo del microorganismo (Betiku & Adesina, 2013).

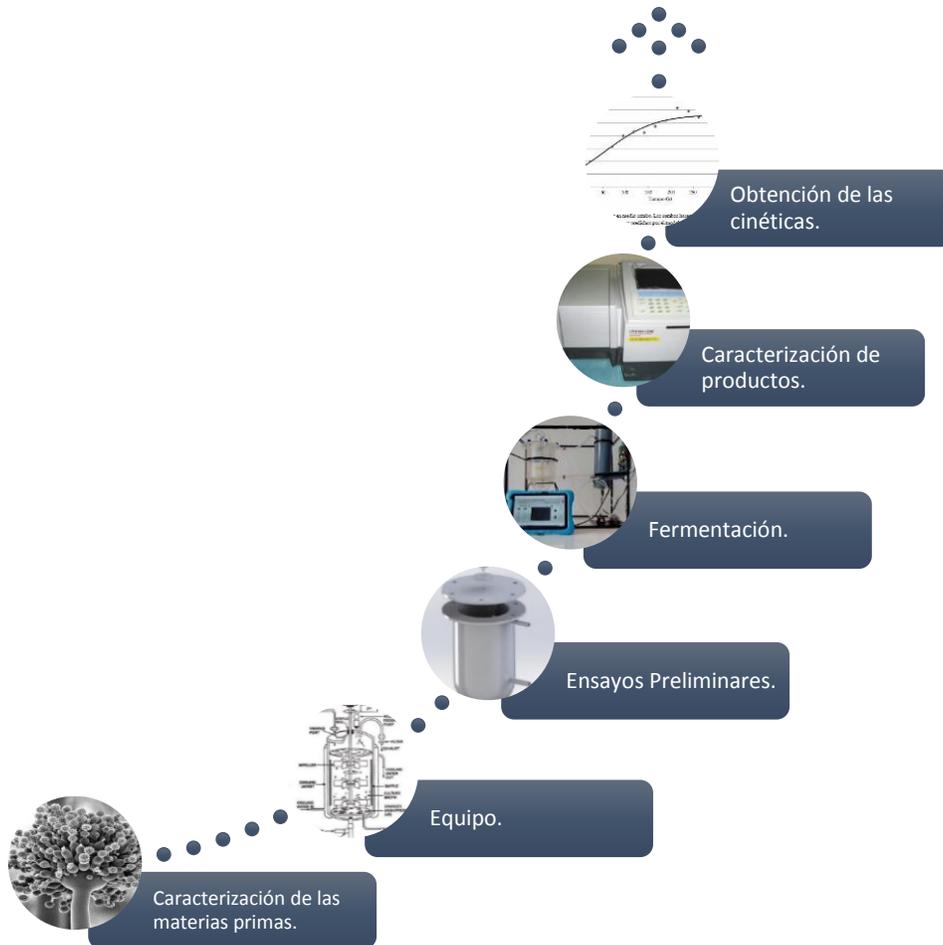
Con el avance de la cultura autosustentable y el incremento en la demanda de ácido cítrico y producciones más limpias (Berovic & Legisa, 2007) se han generado nuevos estudios para este proceso, los cuales involucran el aprovechamiento de residuos orgánicos agroindustriales (Dhillon, Brar, Verma, & Tyagi, 2011). Suero de leche (Elizondo Gómez & Manzanares Estrada, 2009; Leal, Pico, Castro, Guerra, & Castro, 2011; López Ríos, Zuluaga Meneses, Herrera Peganos, Ruiz Colorado, & Medina de Perez, 2006), melazas de remolacha (Rivada Núñez, 2008), residuos de piña (Kareem, Akpan, & Alebiowu, 2010), algunos tipos de plátano (Velásquez, Beltrán, Padilla, & Giraldo, 2010), son algunos de los sustratos utilizados en los cuales se han logrado obtener buenos rendimientos en la producción y a su vez se han aprovechado residuos de otros procesos productivos.

El proceso fermentativo puede ser llevado a cabo utilizando diferentes técnicas de fermentación líquida, la fermentación sumergida que representa el proceso más empleado actualmente (Soccol et al., 2006), la fermentación superficial (Soccol & Vandenberghe, 2003) y la fermentación en estado sólido (Proceso Koji) (Soccol & Vandenberghe, 2003). Esta última reasenta una alternativa viable hacia el futuro de la producción a partir de residuos orgánicos, ya que facilita el uso de diferentes tipos de sustratos con poco pretratamiento (Pandey, 2003). Un claro ejemplo es la producción en estado sólido de AC utilizando bagazo de caña como sustrato (Kumar, Jain, Shanker, & Srivastava, 2003), en este caso se han alcanzado conversiones de 60% (basadas en el azúcar consumido).

5 METODOLOGÍA

Para el estudio de la producción de ácido cítrico se tuvieron en cuenta las siguientes actividades principales, observadas en la imagen 5, cada una de las cuales a su vez contiene subtareas de acuerdo con la complejidad de esta.

Imagen 5. Representación gráfica de la metodología utilizada en la investigación.



Fuente: Autor

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS

Para cumplir esta tarea primero se estudiaron las características del sustrato que se va a utilizar en el proceso, comprobando en primera medida su viabilidad de acuerdo al microorganismo empleado (López Ríos et al., 2006). A continuación, se investigaron las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo. Como son los nutrientes (Kim, Barrington, Sheppard, & Lee, 2006) y el

ambiente (Abín, Coto, & Marrero, 2004; Demirel, Yaykaşli, & Yaşar, 2005; Mourya & Jauhri, 2000) necesarios para su supervivencia y correcto funcionamiento.

Dado que se trabajó con sustratos nativos, es conveniente aislar y replicar los microorganismos a partir de este mismo (Luna, Lozada, & Trigos, 2010). Para lograr esto primero se tomó una muestra de la fruta y se dejó descubierta al medio ambiente hasta ver que se desarrolla la cepa (Möller, Bahnweg, Sandermann, & Geiger, 1992), una vez que se desarrollaron las colonias sobre la muestra se procedió a aislar la deseada, en este caso *Aspergillus niger*, separándola de acuerdo a sus características físicas (Anastasi, Varese, & Filipello Marchisio, 2005). Por último se almacenó adecuadamente a la espera para su uso (Leal & et. al., 2015).

El crecimiento fúngico presente en el Durazno maduro con características presentes de filamentos con cabezuelas negras, son los que se van a tener en cuenta para la presente investigación. Se tomarán porción de estas presentes y se llevarán a caja Petri con medio PDA; Pasado este proceso se incubarán las cajas en incubadora a temperatura de 25°C durante 5-8 días. Se revisarán las cajas y se seleccionarán las que presenten las principales características morfológicas de los hongos que buscamos.

Principales características macroscópicas para tener en cuenta (Carrillo, 2003):

- Diámetro de las colonias.
- Coloración del anverso y del reverso de las colonias.
- Presencia de esclerocios.
- Presencia de gotas de exudado.
- Presencia de pigmento difusible.
- Textura de las colonias.

Principales características microscópicas:

- Disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula.
- Longitud y anchura de los estipes.
- Forma y diámetro de las vesículas.
- Longitud y anchura de las métulas y fiálides.
- Forma, diámetro.
- Ornamentación y color de los conidios.
- Forma, tamaño y color de las células de Hülle.
- Forma, tamaño y color de las ascosporas.

Aspergillus niger presentara las siguientes características macroscópicas: Colonias en CYA de color negro o marrón muy oscuro; reverso incoloro a amarillo; colonia densa, granular a flocosa. En CY20S las colonias son más compactas. Colonias en MEA de color negro; micelio blanco apenas visible; reverso incoloro; textura granular a flocosa (Carrillo, 2003).

Características microscópicas: Cabezas conidiales biseriadas y radiales; estipes de paredes gruesas, lisos, hialinos, amarillentos o de color marrón pálido en especial cerca de la vesícula. Vesícula casi

esférica; méculas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, normalmente muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias (Carrillo, 2003).

5.2 EQUIPO

Dado que en la universidad de Pamplona no se cuenta con un equipo que permita proveer un ambiente adecuado para el desarrollo adecuado de la fermentación fue necesario realizar el diseño y la construcción de uno. Esta fase comprendió una serie de pasos que comenzaron con el diseño y terminaron cuando se tuvo a punto su funcionamiento.

5.2.1 Diseño

Para realizar el diseño de un equipo acorde a las necesidades del proceso primero se decidió cuál de las opciones disponibles se va a utilizar, en estado sólido (Pandey, 2003), semisólido (Rodríguez Couto & Sanromán, 2005) o líquido (Viniestra-González et al., 2003). Con este fin se analizaron las ventajas y desventajas en cada uno de los casos y se tomó una decisión de acuerdo al método Electra (Triantaphyllou, 2000). Cuando se ha llegado a una decisión se realizó el modelamiento matemático de todos los parámetros involucrados dentro del proceso de fermentación, la agitación, aireación, temperatura, así como el dimensionamiento del reactor y sus variables (Chandrashekhar & Rao, 2010). Para facilitar la construcción del reactor y los sistemas de control se realizan modelos digitales con la ayuda de un software de dibujo asistido por computadora¹.

El modelamiento matemático del equipo de fermentación se realizó teniendo en cuenta los criterios más importantes dentro de los procesos biológicos, como son (Ruíz Leza, Rodríguez Jasso, Rodríguez Herrera, Contreras Esquivel, & Aguilar, 2007):

- a. El recipiente de funcionar durante largos periodos de tiempo sin comprometer la inocuidad de la operación.
- b. Contar con un sistema de aireación que mantenga un suministro de oxígeno constante.
- c. Mantener una distribución uniforme de las células dentro de todo el volumen de reacción, es decir, un sistema de agitación.
- d. Minimizar el consumo de energía.
- e. Permitir un cultivo puro; una vez ha sido esterilizado e inoculado.

Ya que se trata de un equipo a escala de laboratorio se tomó un volumen nominal de 3 litros (Serrat & Méndez, 2012), a partir del cual se realizó el dimensionamiento de los componentes (Stanbury, P.F. Whitaker, A. Hall, 2013).

$$V = \frac{1}{2} \pi D^2 H \quad (2)$$

$$V_h = \left(\frac{2}{3}\right) \pi r^3 \quad (3)$$

¹ SOLIDWORKS, Dassault Systemes, Evaluation Version. 2014.

Con la ecuación 2 se realizó el cálculo de la altura y el diámetro del reactor, utilizando una relación de 1:1.5 entre el alto y el diámetro del recipiente. El volumen hemisférico del recipiente de reacción se determina con la ecuación 3. Con la ayuda de este volumen se determinó la altura de trabajo, restando la longitud total del recipiente con la longitud representativa del volumen hemisférico.

El sistema de agitación está compuesto por turbinas tipo Rushton con un diámetro igual a 1/3 del diámetro del fermentador, ubicadas a dos diferentes alturas (Nielsen & Villadsen, 2002). Adicionalmente se instalaron deflectores, para evitar la formación de zonas muertas, los cuales son de 1/10 del diámetro del recipiente (Scragg, 1991).

La temperatura se controló mediante una chaqueta de calentamiento, dimensionada con las ecuaciones 4, 5 y 6 (Bergman & Incropera, 2011).

$$q_{cond} - q_{conv} = 0 \quad (4)$$

$$q_{conv} = h_{H_2O} A (T - T_0) \quad (5)$$

$$q_{cond} = kA \left(\frac{T - T_0}{L} \right) \quad (6)$$

5.2.2 Construcción

Con los planos obtenidos en la etapa de diseño se solicitaron cotizaciones de cada uno de los componentes que conforman el equipo, reactor, agitador, aireador, bomba de agua, tanque de almacenamiento, componentes electrónicos y controladores. Una vez se tienen todos los componentes listos se procede a la construcción del equipo y la adecuación de los sistemas electrónicos que componen el control de las variables.

El desarrollo del sistema de control se realizó utilizando la plataforma de hardware libre llamada Arduino (Evans, 2007). Ya que es económica, fácil de usar y tiene una enorme cantidad de módulos, sensores y periféricos. Para el caso referente a esta investigación se utilizaron sensores LM35 (Instruments, 2015), módulos de control de velocidad L298n (EL YAKOUTI, 2017) y módulos de relé (Gibbs & González, 2017), esto para conformar la parte lógica del sistema. La parte de potencia comprende los elementos finales de control, bomba, aireador, resistencia y las fuentes de alimentación para los mismos. La interfaz se realizó con la ayuda del software LabView 2015² el cual permite programar el controlador y generar una aplicación amigable con el usuario.

5.2.3 Adecuación y puesta en marcha

La temperatura es la variable crítica cuando se trabaja en procesos biológicos esta tiene un sistema de control automático, con el fin de evitar saltos en la temperatura dentro del reactor durante el proceso.

Durante este paso se realizó la calibración de los sensores LM35, la ubicación de las bombas y las conexiones del sistema de control. Ya calibrados los sensores y conectados todos los elementos

² Labview, National Instruments, Evaluation Version. 2015.

involucrados se realizan ensayos con agua dentro del reactor. Observando cuidadosamente que todos los componentes se encuentren dentro de los rangos especificados por el usuario y así garantizar el correcto funcionamiento.

Por último, para comprobar la confiabilidad del sistema, se dejó en funcionamiento durante varios días. Midiendo, de manera externa, las variables cada cierto periodo de tiempo para corroborar que se encuentran en su respectivo Set Point.

5.3 ENSAYOS PRELIMINARES

Completado el paso anterior, se prepara una solución con una concentración conocida de azúcares, aproximadamente 5 grados brix, y se fermenta dentro del equipo utilizando un inóculo de *Aspergillus niger*. Midiendo el avance de la reacción mediante la lectura de la disminución de grados brix. Adicionalmente se realizan lecturas externas de temperatura para verificar nuevamente la precisión del sistema.

5.4 FERMENTACIÓN

Para llevar a cabo las experiencias de producción de ácido cítrico fue necesario realizar unos pasos previos, dentro de los cuales se encuentra la preparación del inóculo, preparación del sustrato o medio de fermentación y la verificación del equipo.

5.4.1 Preparación del inóculo

Para realizar los ensayos de obtención de ácido cítrico se preparó un inóculo con una concentración de mínimo 10^6 esporas por ml (Gottwald, 1985). Para la preparación de la solución se tomó la cepa del microorganismo previamente aislada y se realizó una resiembra con agar PDA en cajas de Petri a 25 grados Celsius hasta que germinaron las esporas (Leal et al., 2011). Se tomaron 100 mL del medio de fermentación y se agregaron las esporas previamente preparadas mediante un raspado del medio de contención.

5.4.2 Medio de fermentación

Para preparar el medio de fermentación es necesario garantizar un mínimo de grados brix, ya que de lo contrario el microorganismo no se desarrolla de manera correcta (Stinson, Osman, Huhtanen, & Bills, 1978). Se tomó una muestra de duraznos cultivados en el municipio y se trataron de tal forma que tengan un tamaño suficiente para no bloquear ninguno de los sistemas del reactor. Posteriormente se prepararon dos litros de la solución, correspondiente al nivel de trabajo del reactor, de tal forma que tenga un mínimo de 5 grados brix.

5.4.3 Preparación de equipo

Antes de empezar la fermentación fue necesario realizar la esterilización del equipo, esto con el fin de evitar contaminación y eliminar posibles agentes inhibidores, primero se lavó el recipiente de reacción con suficiente agua caliente y jabón, luego se limpió con alcohol isopropílico dejando hasta que se evapore, por último, se enjuagó con agua destilada para eliminar posibles restos de alcohol (Chisti, 1992).

5.4.4 Fermentación

Este proceso se llevó a cabo durante 7 días consecutivos, durante los cuales se tomaron, cada seis horas, muestras de 6 mL. El medio de fermentación se mantuvo a 30 grados Celsius, temperatura a

la cual es microorganismo puede cumplir con su labor (Dhillon, Brar, Kaur, & Verma, 2013), con agitación y aireación constantes.

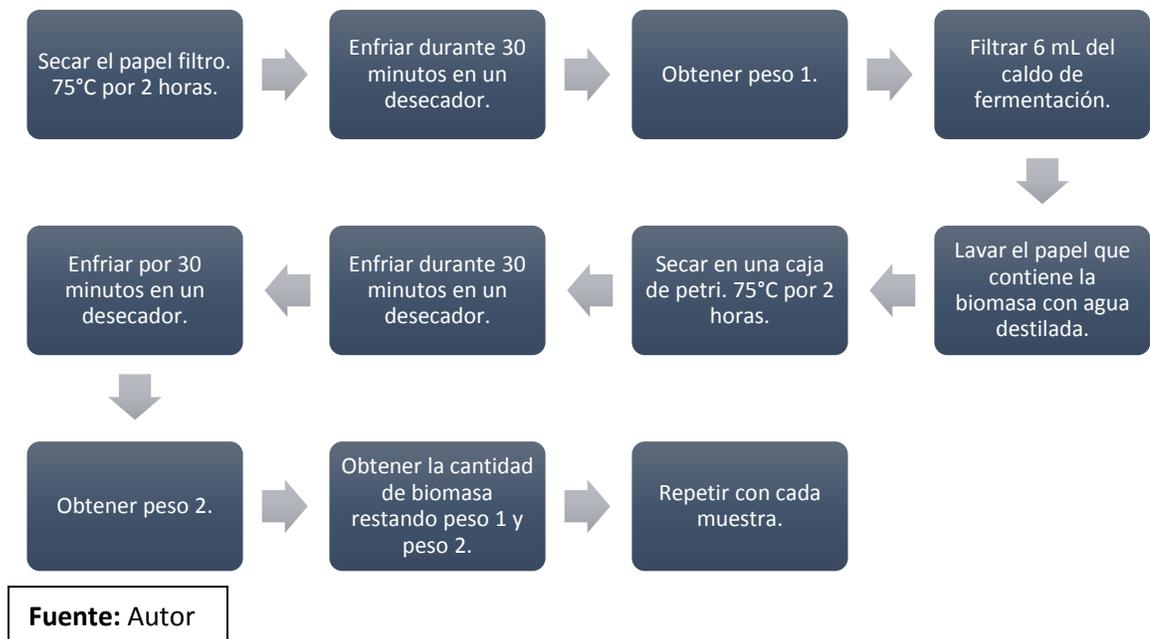
5.5 CUANTIFICACIÓN

La cuantificación del ácido se llevó a cabo mediante los métodos mencionados a continuación:

5.5.1 Biomasa

Es importante conocer la concentración de microorganismos presentes durante todo el proceso, ya que un crecimiento descontrolado llevaría a un consumo acelerado del sustrato. Que si no se controla puede provocar que los microorganismos agoten su alimento antes de lo previsto, la concentración de biomasa se determinó mediante el método de peso seco (Zhu & Lee, 1997), como se muestra en la imagen 6.

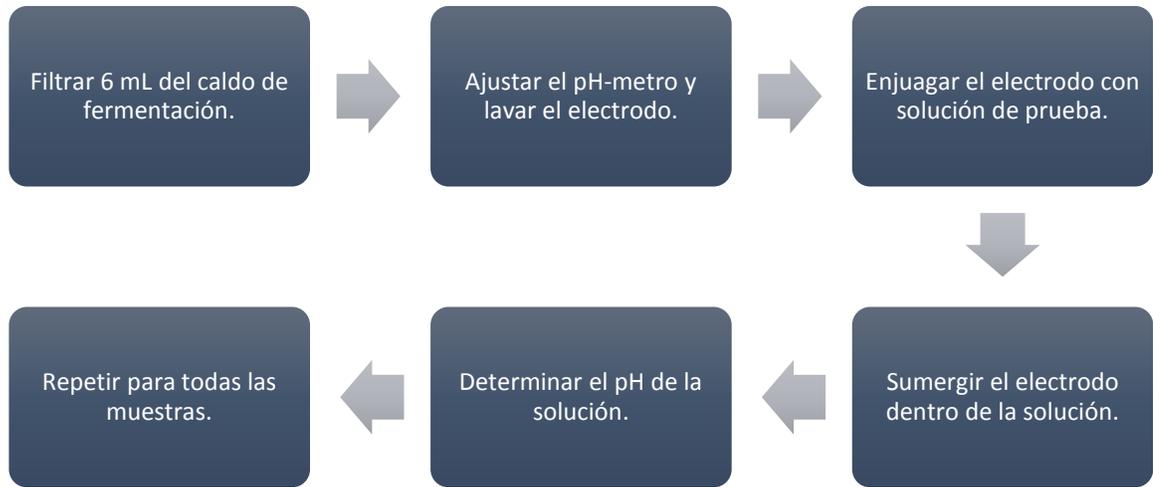
Imagen 6. Determinación de biomasa por el método de peso seco.



5.5.2 pH

Como todos los seres vivos, los microorganismos utilizados en el proceso también son sensibles a los cambios de pH en su ambiente, dado que el producto de la fermentación genera un descenso de este, es importante realizar un seguimiento que permita determinar los límites de tolerancia a los que se pueden someter sin deteriorar su actividad. En la imagen 7 se muestra el procedimiento que se lleva a cabo para la determinación.

Imagen 7. Determinación del pH.



Fuente: Autor

5.5.3 Grados Brix

Se realizó como una medida inmediata de la cantidad de sustrato aun disponible, imagen 8, para consumo de los MO, permitiendo llevar un control durante el desarrollo del proceso de forma ágil y sencilla mediante la lectura en un refractómetro.

Imagen 8. Lectura de los grados Brix.



Fuente: Autor

5.5.4 Azúcares Totales

El método de fenol-sulfúrico permite una cuantificación más exacta de la cantidad de sustrato disponible a lo largo del proceso. Pero a diferencia de los grados brix es necesario realizar un proceso más largo que implica la construcción de una curva de calibración de glucosa, por lo cual solo se lleva a cabo al final de la fermentación (Elizondo Gómez & Manzanares Estrada, 2009).

La imagen 9 muestra el procedimiento mediante el cual se realizó la construcción de la curva patrón de glucosa.

Imagen 9. Elaboración de la curva patrón de glucosa.

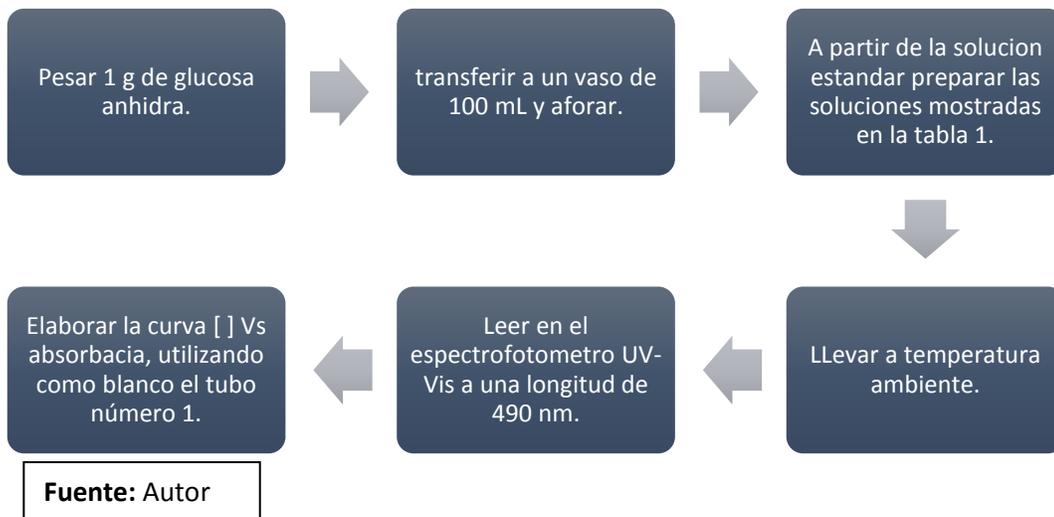


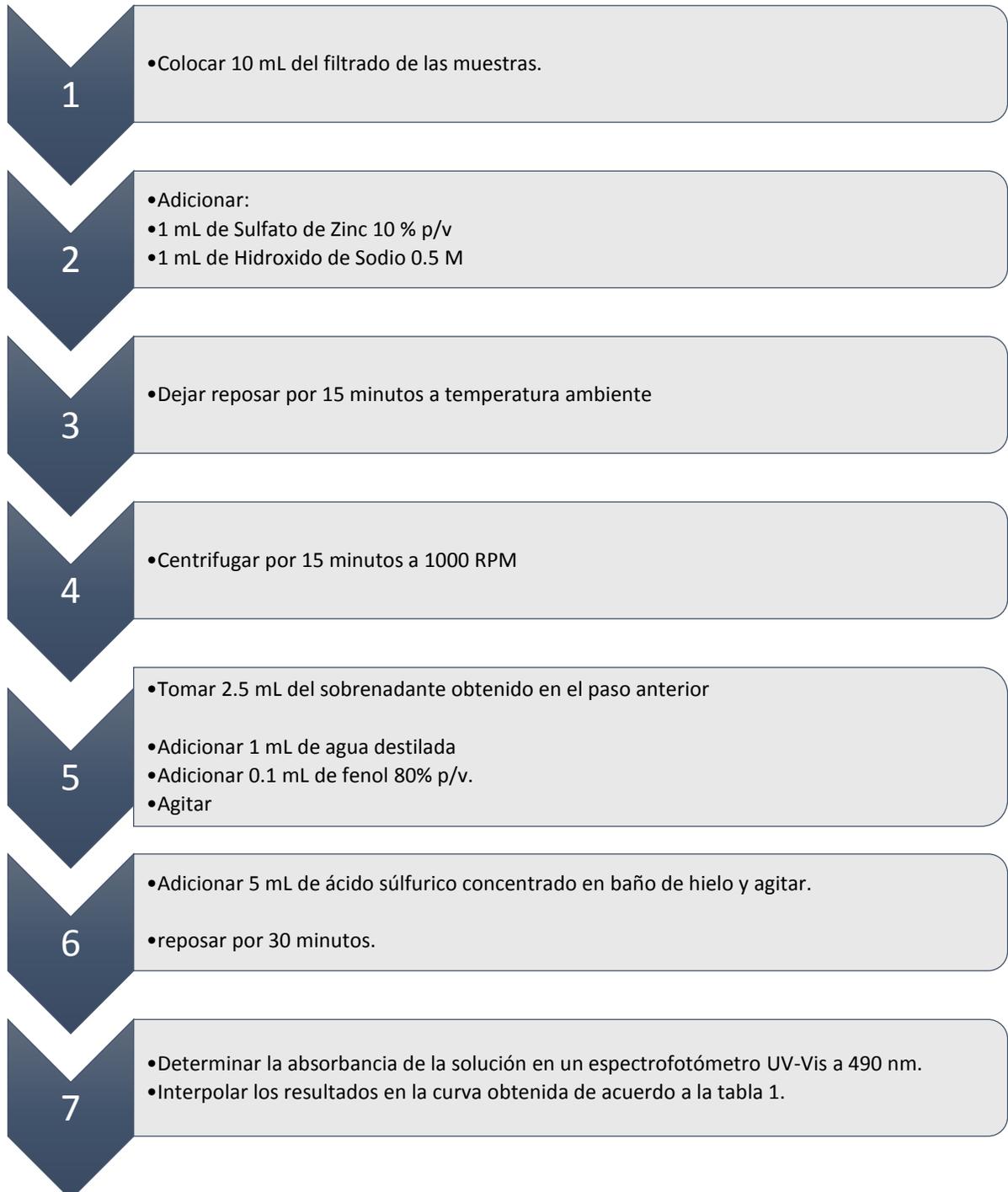
Tabla 1. Soluciones para la construcción de la curva de calibración de la determinación de azúcares por el método de fenol-sulfúrico.

Tubo Nº	ml. de Sln. de glucosa anhidra	ml. de Agua estéril	ml. de Fenol 80%	ml. de H ₂ SO ₄ concentrado
1	0.0	5.0	0.1	5.0
2	0.25	4.75	0.1	5.0
3	0.5	4.5	0.1	5.0
4	1	4	0.1	5.0
5	1.5	3.5	0.1	5.0
6	2	3	0.1	5.0
7	2.5	2.5	0.1	5.0

NOTA: Cada tubo se debe colocar en un baño de hielo agregando el ácido sulfúrico lentamente por las paredes del tubo.

El tratamiento de las muestras de fermentado para su análisis se muestra en la imagen 10.

Imagen 10. Determinación de azúcares totales en las muestras por el método de fenol – sulfúrico.

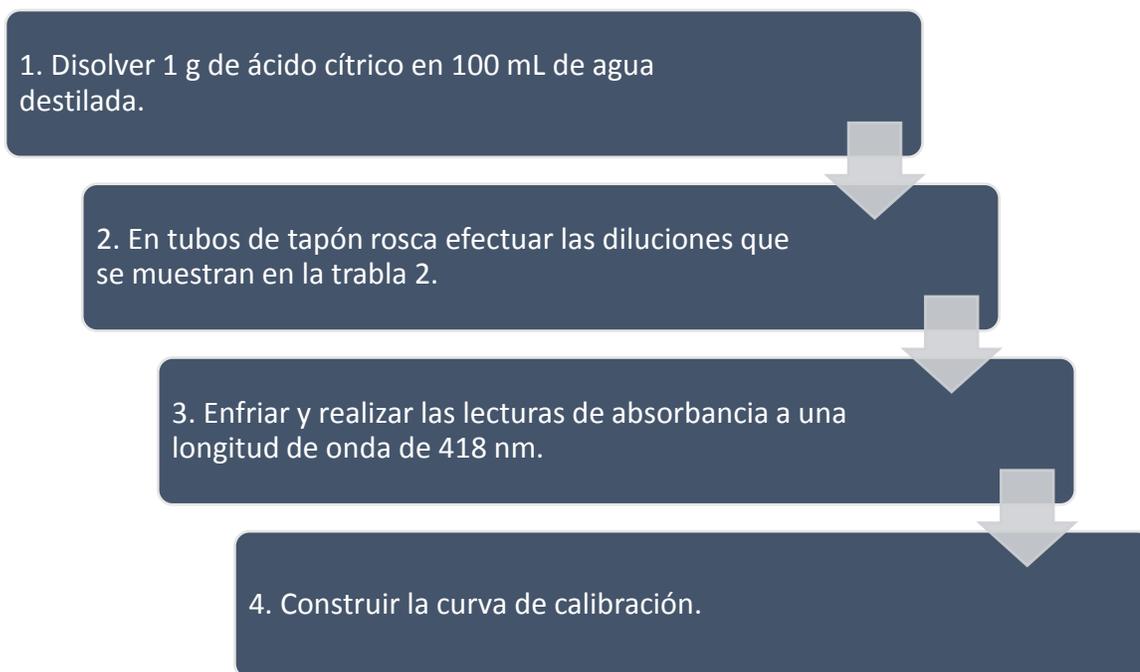


Fuente: Autor

5.5.5 Ácido Cítrico

El producto deseado en el proceso, se cuantificó mediante el método de Safran-Denstedt (Saffran & Denstedt, 1948). El primer paso fue construir la curva patrón, la imagen 11 resume este procedimiento, para esto se utilizó ácido cítrico marca MERK ("Ácido cítrico monohidrato CAS 5949-29-1 | 100244," n.d.) Suministrado por la Universidad de Pamplona.

Imagen 11. Elaboración de la curva patrón de ácido cítrico.



Fuente: Autor

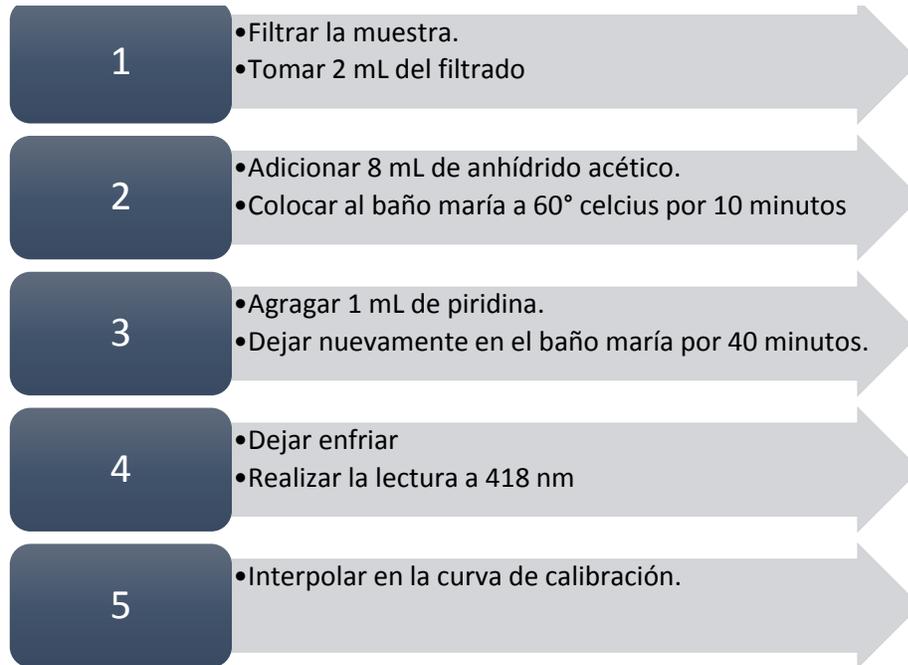
NOTA: Después de agregar en Anhídrido acético dejar las muestras 10 minutos en un baño de térmico a 60°C y 40 minutos después de agregar la piridina.

Tabla 2. Soluciones para la construcción de la curva de calibración de la determinación de ácido cítrico por el método de Safran-Denstedt.

Tubo Nº	mL. de Sol. de Ácido Cítrico	ml. de Agua Destilada	ml. de Anhídrido Aceico	ml. de Piridina
1	0.0	1.0	8.0	1.0
2	0.2	0.8	8.0	1.0
3	0.4	0.6	8.0	1.0
4	0.6	0.4	8.0	1.0
5	0.8	0.2	8.0	1.0
6	1	0.0	8.0	1.0

Para determinar la concentración de ácido cítrico en la muestra se sigue el procedimiento mostrado en la figura 12, manteniendo siempre los tubos cerrados.

Imagen 12. Determinación la concentración de ácido en la muestra



Fuente: Autor

5.6 OBTENCIÓN DE LAS CINÉTICAS

Para el análisis de la cinética del proceso de fermentación fue necesario establecer la relación entre la degradación de sustrato, el aumento de la concentración de biomasa y la producción de ácido cítrico. Ya que en la medida que se agota el alimento la actividad microbiana se ve inhibida (Han & Levenspiel, 1988). Esta relación se puede aproximar con el modelo de Monod.

La tabla 1 muestra la velocidad específica de crecimiento máxima para los hongos de acuerdo con la temperatura de la fermentación, con esta información es posible hacer una comparación con los resultados esperados para la producción de AC.

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento máxima para diferentes tipos de MO.

Microorganismo	Temperatura de Cultivo (°C)	μ_{max} (h ⁻¹)
Bacterias	37	0.6-1.2
Levaduras	30*	0.3-0.5
Actinomicetos	28	0.1-0.3
Hongos	28	0.1-0.3

* Cultivo en condiciones aerobias.

Transcrito de: Kinetics of microbial growth and product formation. (1995).

Para tener en cuenta el efecto de la concentración de producto dentro de la reacción se realiza una modificación de la ecuación de Monod como se muestra en la ecuación 2 (Chap 7 *Microbial Process Kinetics II . Kinetic modeling of cell growth*, 2001).

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \left(\frac{1-P}{K_P} \right) \quad (7)$$

La formación de producto se puede determinar de dos formas diferentes (Doran & García Labiano, 1995; "Kinetics of microbial growth and product formation," 1995):

- a. La velocidad de formación de producto se ve afectada por los mismos factores que la velocidad de crecimiento de biomasa, entonces tenemos la ecuación:

$$\frac{dP}{dt} = K_p \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (8)$$

- b. La velocidad de formación de producto solo depende de la concentración de biomasa:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu}{Y_{PX}} \quad (9)$$

Reemplazando la ecuación 7 en las ecuaciones se obtiene el modelo diferencial completo, así:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X = X \mu_{max} \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \left(\frac{1-P}{K_P} \right) \quad (10)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{\mu}{Y_{XS}} = \frac{\mu_{max}}{Y_{XS}} \left(\frac{S}{S + K_S} \right) \left(\frac{1-P}{K_P} \right) \quad (11)$$

$$\frac{dP}{dt} \frac{1}{X} = \mu K_p = K_p X \mu_{\max} \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(\frac{1}{1 + P/K_i} \right) \quad (12)$$

$$\frac{dP}{dt} = \frac{\mu}{Y_{PX}} = \frac{\mu_{\max}}{Y_{PX}} \left(\frac{S}{S + K_s} \right) \left(\frac{1 - P}{K_p} \right) \quad (13)$$

Donde,

μ Velocidad específica de crecimiento.

μ_{\max} Velocidad específica de crecimiento máxima.

K_s Constante de Consumo de sustrato.

K_p Constante de velocidad de producción de ácido cítrico.

S Concentración de sustrato.

Y_{ij} Rendimiento de la especie i con respecto a j.

X Concentración de biomasa.

P Concentración de producto.

X_0 Concentración inicial de biomasa.

t Tiempo.

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MATERIAS PRIMAS

6.1.1 Aislamiento de la cepa

De acuerdo con las características morfo-fisiológicas del hongo aislado se estableció que pertenecía al género *Aspergillus* y además mostró un perfil aproximado a la especie *niger*; la posible cepa *Aspergillus niger*, presento las características mencionadas en el numeral 5.2.

Se realizó repiques de esta a partir del aislamiento para ser utilizada en la fermentación. Después de ocho días fue posible observar el crecimiento de colonias que presentaban las características de forma y color buscadas en la cepa de *Aspergillus niger*, de acuerdo con Carrilo 2013. Imagen 13.

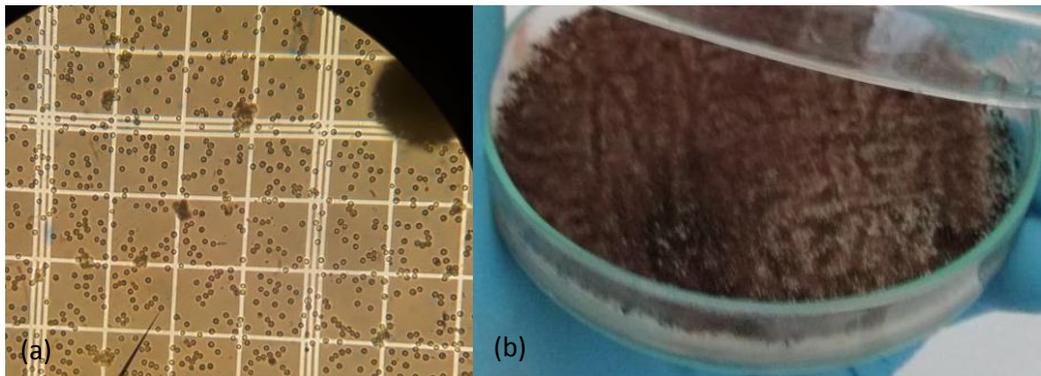
Imagen 13. Crecimiento de colonias en el durazno. a. Fruto fresco. b. Fruto después de 8 días.



Fuente: Autor

Una vez ubicadas, se realizó el aislamiento en agar PDA eliminando aquellas que no presentaran los rasgos buscados. En la imagen 14 se observan las colonias aisladas, las cuales presentan conidios, cabezales conidiales y colonias, que comparadas con lo reportado por Sáez Vega son representativas del hongo buscado.

Imagen 14. Colonias de *Aspergillus niger*. (a) Bajo el microscopio. (b) En la caja de Petri.



Fuente: Autor

6.1.2 Sustrato

El sustrato utilizado para las fermentaciones se preparó con una relación de 1:1.5 de agua durazno, con el fin de obtener 5% de grados Brix. La tabla 5 resume las principales características.

Tabla 4. Características del sustrato.

Concentración de Azúcares (g/L)	48,69
Biomasa suspendida (g/L)	32,4
pH	3,98
Ácido cítrico inicial (g/L)	1,4386

Fuente: Autor

Estos parámetros fueron conservados durante las experiencias de fermentación ya que en esta investigación se pretendía evaluar el comportamiento del proceso con el menor pretratamiento posible de la materia prima y sin la adición de sustancias externas que alteren la composición natural del sustrato preparado.

6.1.3 Inóculo

Mediante un raspado del medio de contención del microorganismo se prepararon 15 mL de una solución de esporas de concentración equivalente a $1.5 \cdot 10^7$ esporas/mL, de acuerdo con lo reportado por Gottwald; medida que fue corroborada mediante un conteo en la cámara de Neubauer. De esta forma al realizar la inoculación, en los dos litros de sustrato, se tiene una concentración de $11 \cdot 10^6$ esporas/L dentro del fermentador. En la imagen 15 se puede observar la solución de inoculación.

Imagen 15. Solución de inoculación.



Fuente: Autor

6.2 EQUIPO

La aplicación del método Electra para la decisión del tipo de proceso que se va a utilizar se realizó mediante la comparación de las variables de; control de temperatura, agitación, aireación, medida del pH, tiempo de reacción, pretratamiento de la materia prima, cantidad inicial de microorganismos y precio de fabricación. Teniendo en cuenta que los procesos líquido y semi-sólido se pueden realizar en un mismo tipo de recipiente de reacción.

Con esta evaluación se determinó que la mejor opción de fabricación es un tanque enchaquetado con agitación constante. En la tabla 4 se pueden observar las características geométricas de dicho recipiente.

Tabla 5. Dimensiones de los componentes del reactor.

Parámetro	Valor
Volumen (L)	3
Volumen de Trabajo (L)	2
Diámetro (cm)	14
Altura (cm)	20
Número de Deflectores	3
Espesor de los Deflectores (cm)	1.4
Tipo de agitador.	Turbina tipo Rushton de 6 Impelentes.
Número de Agitadores	2
Diámetro del agitador (cm)	8.6
Espesor del Material (cm)	0.3
Espesor de la chaqueta (cm)	0.6

Para facilitar la fabricación del equipo se realizó un modelo digital mediante un software de diseño asistido por computadora, en este caso, SOLIDWORKS. De esta forma fue posible establecer la mejor configuración para los sistemas involucrados. Como se muestra en la imagen 16.

Imagen 16. Render del equipo elaborado en SOLIDWORKS.



Fuente: Autor

El control de las variables de proceso se realizó utilizando el hardware Arduino (Evans, 2007), el cual permite la implementación de sistemas proporcionales de control en pequeñas aplicaciones y prototipos. El equipo cuenta con dos lazos cerrados de control de temperatura, mostrados en la imagen 18. Uno para el fluido de trabajo, en este caso agua, manipulado mediante una resistencia de calentamiento y el segundo para la temperatura del fermentador. Donde se manipula el flujo de agua a través de la chaqueta controlando el caudal de una bomba centrífuga. Adicionalmente la velocidad de agitación y la cantidad de aire se controla con dos lazos abiertos que varían la velocidad de los motores involucrados.

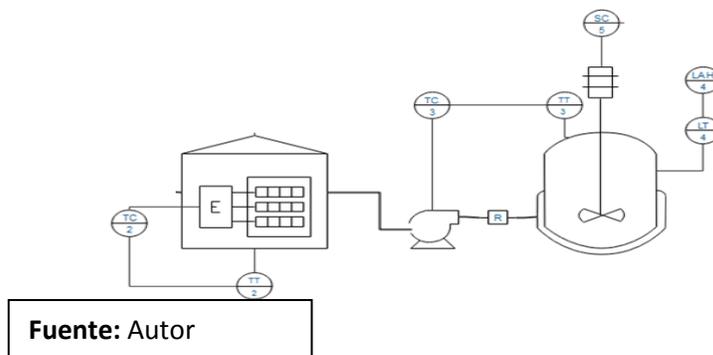
Imagen 18. Equipo Construido.



Fuente: Autor

La fabricación del recipiente de fermentación estuvo a cargo de una empresa especializada en el manejo del acrílico, material del cual fue construido el equipo. La construcción del soporte también fue desarrollada por una empresa especializada. El montaje de los sistemas complementarios fue realizado por el autor, dentro de los cuales se encuentran las conexiones de fluidos de trabajo, la construcción del tanque de almacenamiento, con la adecuación de la resistencia de calentamiento y los sensores de temperatura; así como los circuitos electrónicos, conexiones eléctricas requeridas por el sistema y la decisión de compra de los motores y bombas. El resultado final se puede ver plasmado en la imagen 17.

Imagen 17. Diagrama de lazos de control.

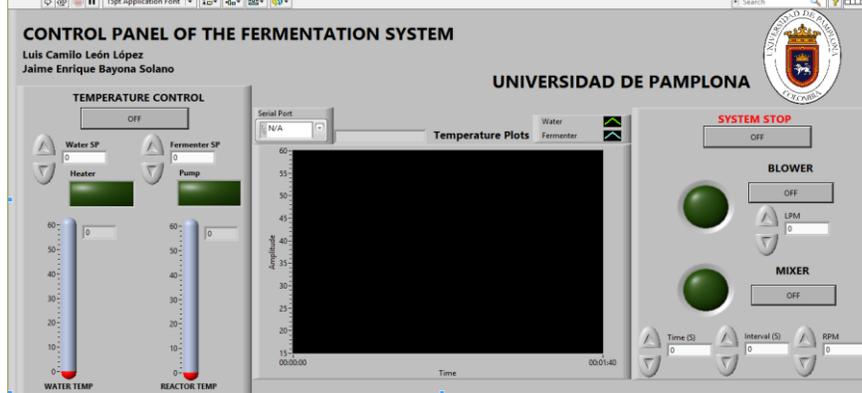


Fuente: Autor

Debido a las restricciones presentadas por el material fue necesario realizar pequeños ajustes al diseño en el momento de su construcción. La modificación más importante fue en el fondo, el cual debió fabricarse con una forma cónica y no semi circular con estaba pensado. Una evaluación del nuevo diseño demostró que el volumen final no se ve afectado, adicionalmente esta es una geometría aplicada industrialmente.

Para facilitar la manipulación de los sistemas se elaboró una interfaz de usuario, utilizando el software LabView, desde la cual es posible manipular la velocidad de agitación, la cantidad de aire que ingresa al fermentador y los Set Point de los lazos de temperatura. Adicionalmente cuenta con una gráfica en tiempo real en la cual es posible observar la temperatura actual del fluido de calentamiento y la cámara de reacción, imagen 19.

Imagen 19. Interfaz de usuario del sistema de fermentación.

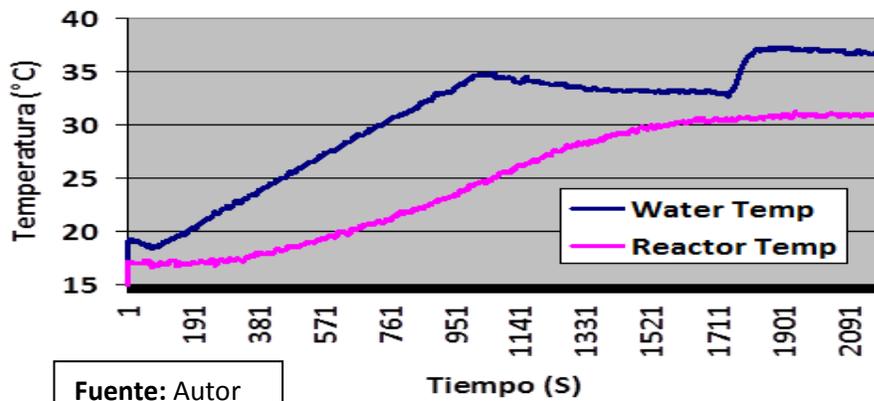


Fuente: Autor

La gráfica 1 representa los tiempos de respuesta de los lazos cerrados del tanque de calentamiento y la chaqueta del reactor. Como es posible observar, los perfiles muestran las respuestas indicadas para los controles proporcional y proporcional integral respectivamente (Smith & Corripio, 1985). Estableciendo un Set Point de 35 y 30 grados Celcius para las temperaturas del tanque de calentamiento y la chaqueta respectivamente, se puede observar que el sistema es confiable. Ya que no presenta picos ni saltos bruscos durante el proceso de calentamiento. Las pequeñas variaciones en la señal se deben al ruido inherente a la recolección de datos mediante sensores, de tipo transistor, LM35.

Gráfica 1. Tiempos de repuesta de controlador.

Tiempos de Respuesta

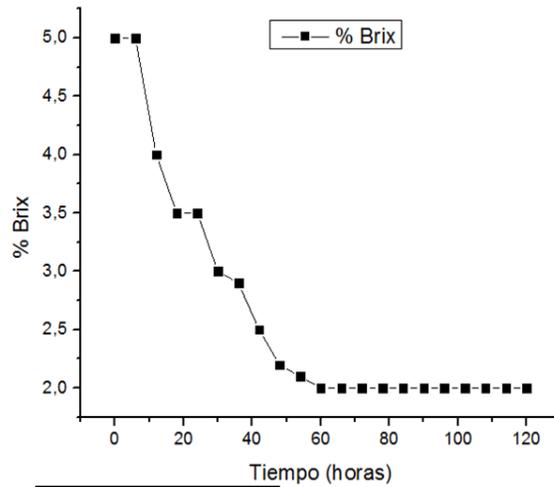


Fuente: Autor

6.3 ENSAYOS PRELIMINARES

El consumo de azúcares se midió como % Brix, dejando en evidencia el consumo de azúcares en los intervalos de 6 horas de la toma de muestras, grafica 2. Este consumo solo se presentó hasta el nivel

Gráfica 2. Perfil de consumo de azúcares en los ensayos preliminares.

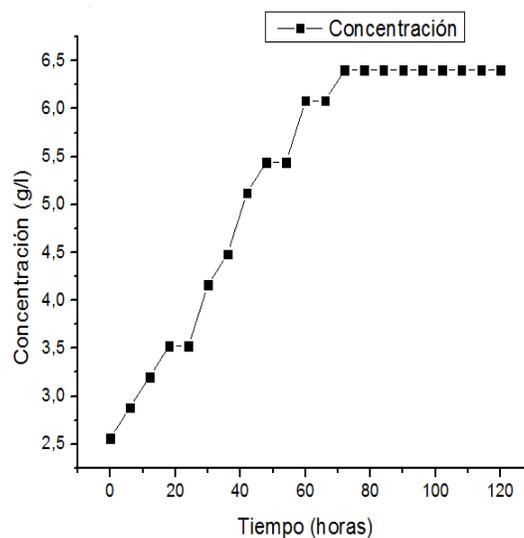


Fuente: Autor

de los 2 grados brix, punto en el cual se detuvo el proceso. Esto corresponde a una posible estabilización de la fermentación por un estrés del hogo o una disminución de la concentración del microorganismo debido al descenso de nivel del caldo de fermentación, haciendo que estos se adhirieran a las paredes del fermentador y no estuviesen sobre el sustrato restante.

En la gráfica 3 es posible observar el perfil de concentración de ácido cítrico en el proceso, donde se tiene un máximo de concentración de 6,4 g/L a las 72 horas.

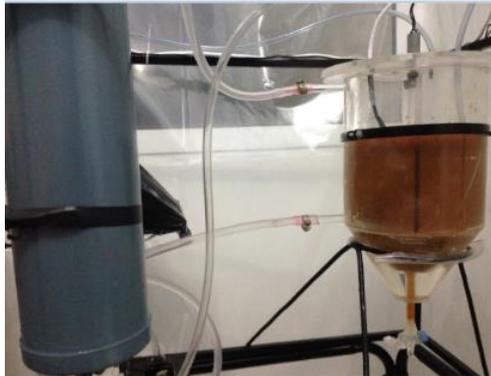
Gráfica 3. Perfil de concentración de Ácido cítrico en los ensayos



Fuente: Autor

Con un consumo de azúcares del 60% y una concentración final de 6,4 g/L de ácido cítrico se determinó que las mejores condiciones de operación se tienen a una temperatura de 30° C dentro del reactor, con un delta de 5° C con respecto al fluido de calentamiento, con un flujo de aire de 5 LPM. Ya que se alcanzó una producción muy cercana a lo reportado por Leal, quién con un consumo de Glucosa superior al 90% obtuvo una concentración de ácido de 9,963 g/L a partir de suero

Imagen 20. Reactor cargado e inoculado.



Fuente: Autor

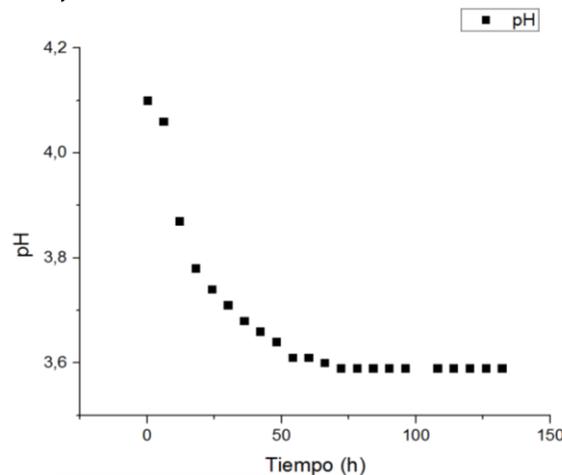
hidrolizado, con un contenido de azúcares y un pH inicial similar al de esta investigación.

6.4 FERMENTACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS

La evaluación de la producción se realizó utilizando un sustrato con las propiedades mencionadas en la tabla 5. Realizando la inoculación cuando el medio ya había alcanzado la temperatura establecida. Como se muestra en la imagen 20

Ya que los ácidos en solución liberan iones de H⁺ uno de los principales indicadores de la formación del ácido cítrico es la depreciación del pH, como se muestra en la gráfica 4 durante el avance del proceso se observa una disminución de este.

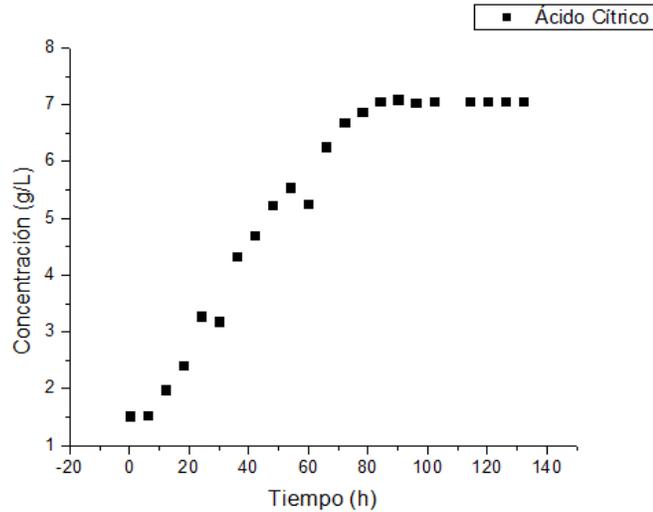
Gráfica 4. Perfil de disminución de pH durante la fermentación.



Fuente: Autor

La grafica 4 muestra el perfil de la producción de ácido cítrico, para un tiempo de fermentación de 132 horas. Como es posible observar nuevamente se tiene una inhibición, como la presentada en los ensayos preliminares. De la misma forma el consumo de azucares también se detiene a partir del momento en el que se inhibe la producción de ácido. Este fenómeno puede ser explicado desde

Gráfica 5. Perfil de la producción de ácido cítrico.



Fuente: Autor

tres posibles factores, el tipo de azucares consumibles por el microorganismo, los micronutrientes presentes en el fermentado o la concentración de ácido cítrico dentro del proceso.

Como lo reporta Papagianni, gracias a la enzima invertasa, el *Aspergillus niger* es capaz de metabolizar la sacarosa en glucosa y fructosa. Los cuales pueden ser utilizados como precursor para la producción de ácido cítrico en forma de citrato. Por lo cual es posible descartar que se trate de un agotamiento del tipo de azúcar metabolizable por el microorganismo. Como señala Velásquez, existen unas concentraciones de micronutrientes bajos las cuales el microorganismo produce la mayor cantidad de ácido cítrico. La tabla 6 compara las concentraciones presentes en el durazno con lo reportado.

Tabla 6. Cantidades de micronutrientes permisibles para la fermentación y contenidas en el durazno.

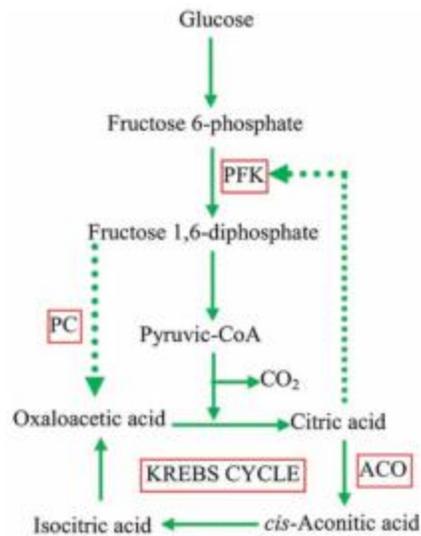
Elemento	Concentración	
	Valores de referencia	Durazno
Hierro (ppm)	>1.3	2.5
Magnesio (ppm)	100>Mn>500	90
Cobre (ppm)	0.001>Mg>10.2	0.68
Manganeso (ppm)	<1	0.61
Zinc (ppm)	0.3	1.7
Nitrógeno (%)	>0.25	14.56

Fuente: Autor

Según lo resumido en la tabla anterior, también se puede descartar una inhibición en la producción por la falta de algún nutriente o, por el contrario, la alta concentración de estos. Ya que cada uno se encuentra dentro los valores establecidos para las mejores condiciones de fermentación (Guc & Erkmen, 2017; López Ríos et al., 2006; Velásquez et al., 2010).

La imagen 21 representa la ruta metabólica, del *Aspergillus niger*, involucrada en la producción de ácido cítrico. Como se puede observar el inicio de esta ruta está marcado por la intervención del gen fosfofructoquinasa (PFK). El cual es inhabilitado cuando se encuentran altas concentraciones de citrato en el caldo de fermentación (Show et al., 2015). Por esta razón resulta correcto afirmar que

Imagen 21. Resumen de la ruta metabólica para la producción de ácido cítrico.

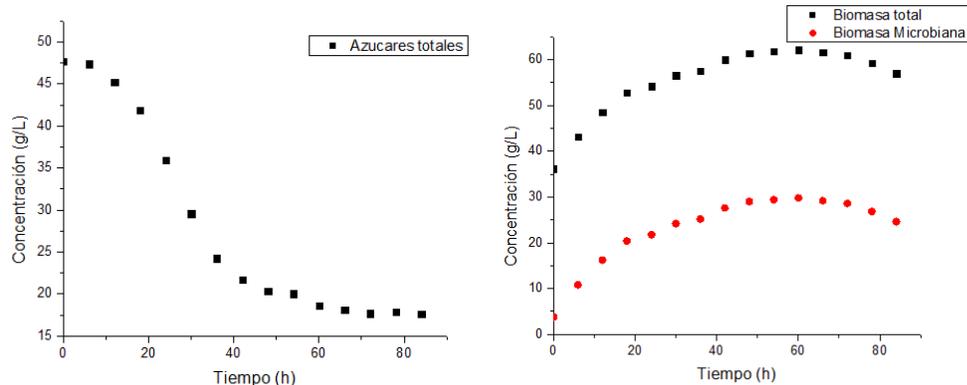


Fuente: Show et al., 2015

la inhibición del proceso de producción de ácido cítrico se debe a la inhibición de dicho gen.

El consumo de sustrato y el aumento de la biomasa microbiana también presentan una estabilización a partir de la hora 84, en la gráfica 5 se presentan los perfiles hasta el momento en el que se detiene la producción. Es importante resaltar que, debido al alto contenido de sólidos

Gráfica 6. Perfiles de concentración. a. Azúcares totales. b. Biomasa total y Biomasa microbiana.



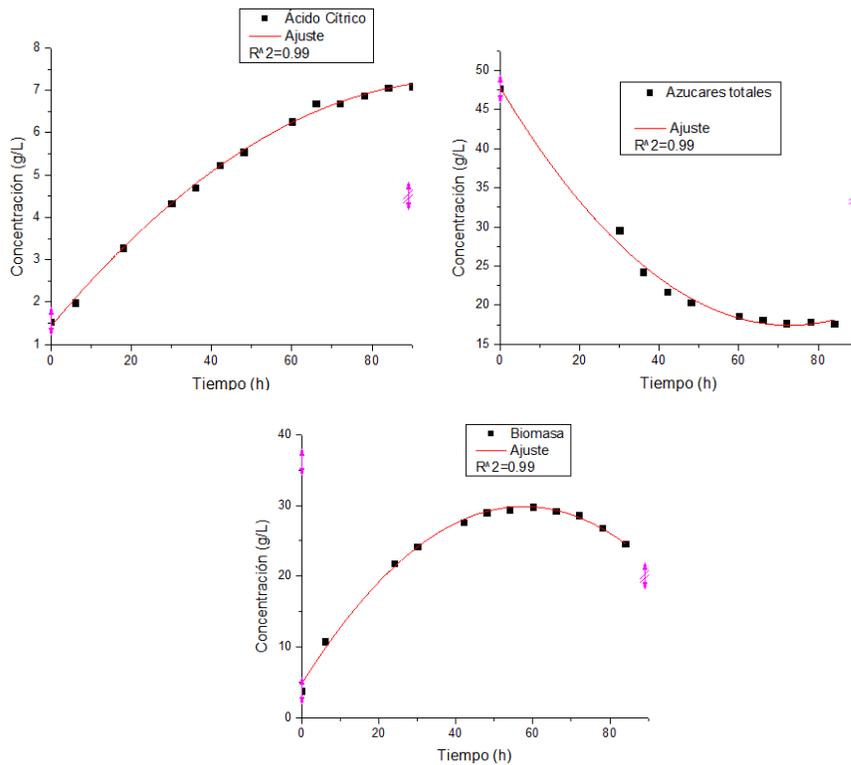
Fuente: Autor

suspendidos, biomasa vegetal, en el durazno el cálculo de la biomasa microbiana se hizo teniendo en cuenta que estos deben ser restados del total calculado mediante el peso seco.

6.5 OBTENCIÓN DE LAS CINÉTICAS

La evaluación de las cinéticas requiere un pretratamiento de los datos obtenidos. Es decir, se realizó un ajuste de los datos experimentales a una ecuación con el fin de suavizar las curvas y poder obtener datos más precisos. En la gráfica 6 se pueden observar las gráficas de los datos

Gráfica 7. Perfiles de concentración con ajuste polinomial. (a) Ácido Cítrico. (b) Azúcares totales. (c) Biomasa



Fuente: Autor

experimentales junto con su arreglo polinomial. Para cada uno de los casos los datos fueron ajustados con polinomios de grado 2.

Después de realizado el ajuste se utilizó el método de los mínimos cuadrados para realizar el cálculo de las constantes requeridas por el modelo. Obteniendo la ecuación de velocidad representada en la ecuación 18.

$$\mu = 0.11 \left(\frac{S}{S + 397.5} \right) \left(\frac{1 - P}{7.04} \right) \quad (14)$$

Con la solución del modelo se obtuvo un valor teórico para cada uno de los datos experimentales. La tabla 7 resume los datos obtenidos en las experiencias y con el modelo cinético generado, donde es posible observar una buena aproximación final. A pesar de que al inicio el modelo se aleja un poco de la realidad experimental. Esto se debe al ajuste realizado a los datos antes de su análisis cinético, ya que como se observa en la tabla el ajuste de los datos suavizados es mejor. Comparado con los experimentales.

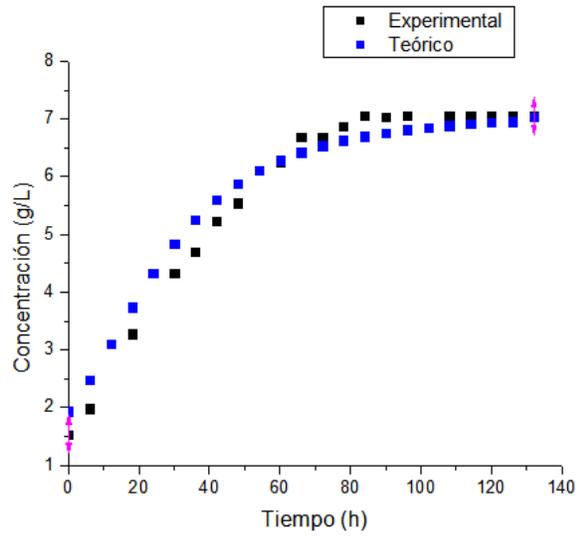
Tabla 7. Comparación de los resultados del modelo teórico y los datos experimentales.

Muestra	Tiempo (h)	Experimental			Modelo		
		Azúcares totales (g/L)	Biomasa (g/L)	Ácido Cítrico (g/L)	Azúcares totales (g/L)	Biomasa (g/L)	Ácido Cítrico (g/L)
0	0	47.6657	3.8000	1.5421	47.6600	3.8	1.5
1	6	47.3810	10.8000	1.9869	45.1894	5.7765	1.9373
2	12	45.2455	16.2000	2.4123	42.0688	8.2729	2.4896
3	18	41.8998	20.4000	3.2826	38.5441	11.0927	3.1134
4	24	35.9204	21.8000	3.1859	34.9707	13.9515	3.7459
5	30	29.5850	24.2000	4.3269	31.6596	16.6003	4.3319
6	36	24.2462	25.2000	4.6943	28.7862	18.8991	4.8405
7	42	21.6836	27.6000	5.2358	26.3945	20.8124	5.2638
8	48	20.3311	29.0000	5.5452	24.4511	22.3671	5.6078
9	54	20.0464	29.4000	5.2552	22.8900	23.6160	5.8841
10	60	18.6227	29.8000	6.2608	21.6416	24.6147	6.1050
11	66	18.1244	29.2000	6.6862	20.6429	25.4136	6.2818
12	72	17.6973	28.6000	6.8796	19.8425	26.0540	6.4234
13	78	17.8396	26.8000	7.0537	19.1888	26.5690	5.5774
14	84	17.6261	24.6000	7.0924	18.6794	26.9845	6.6293
15	90	17.4125	24.4	7.0343	18.2588	27.3210	6.7038
16	96	17.8396	24.5	7.0536	17.9171	27.5943	6.7642
17	102	17.6972	24.4	7.0536	17.6388	27.8170	6.8135

Fuente: Autor

En la gráfica 7 se muestran los perfiles de concentración de ácido cítrico para los datos teóricos y experimentales. Como se puede observar el modelo representa una buena aproximación de la realidad, ya que, a pesar de que al inicio del proceso el modelo tiende a tener una mayor velocidad de reacción en el tiempo de estabilización los datos convergen con un error inferior al 5%.

Gráfica 8. Perfiles de concentración de ácido cítrico



Fuente: Autor

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- Mediante las experiencias realizadas es posible concluir que, al realizar de manera exitosa el aislamiento de una cepa nativa de *Aspergillus niger*, ésta tiene la capacidad de metabolizar los azúcares presentes en el durazno para convertirlos en ácido cítrico.
- El diseño y la construcción de un equipo de fermentación a la medida de las necesidades del proceso permitió mantener las condiciones de temperatura, aireación y agitación; necesarias para el mejor desempeño del microorganismo empleado. Demostrando que la plataforma Arduino representa una alternativa viable para la implementación de sistemas de control proporcional a escala laboratorio, ya que cada uno de los componentes involucrados funcionó de manera confiable durante el tiempo requerido para la fermentación. Permitiendo la visualización y la manipulación, en tiempo real, de cada una de las variables.
- El proceso de producción de ácido cítrico mediante la fermentación de un sustrato de durazno utilizando *Aspergillus niger* representa una alternativa viable para la aplicación a una mayor escala, obteniendo a una concentración de 6.9 g/l de ácido en 84 horas usando la pulpa de durazno de pos-cosecha como sustrato. A pesar de la inhibición presentada por el microorganismo el proceso permite aprovechar más del 50% del azúcar contenido en los frutos desechados, generando una menor cantidad de residuos con un mayor valor; y que pueden ser aprovechados de forma más fácil.
- La aplicación del modelo de Monod modificado permitió establecer un modelo matemático que para la predicción de la producción de ácido cítrico teniendo en cuenta las inhibiciones presentes en el microorganismo debido a la acumulación de producto en el caldo de fermentación.

7.2 RECOMENDACIONES

De acuerdo con lo reportado por múltiples autores el pH juega un papel importante en el rendimiento de la producción de ácido cítrico, por lo tanto, podría ser relevante realizar experiencias en las cuales se mantenga un pH constante durante todo el tiempo de reacción. Para este fin sería necesario instalar un sistema de control que garantice la estabilidad de este.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abín, L., Coto, O., & Marrero, B. (2004). Estudio fisiológico de la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* O-5.
- Ácido cítrico monohidrato CAS 5949-29-1 | 100244. (n.d.). Retrieved April 4, 2018, from http://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Citric-acid-monohydrate,MDA_CHEM-100244?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.co%2F#anchor_Especificaciones
- Adeoye, A. O., Lateef, A., & Gueguim-Kana, E. B. (2015). Optimization of citric acid production using a mutant strain of *Aspergillus niger* on cassava peel substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 568–574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.004>
- Agamez Ramos, E. Y., Zapata Navarro, R. I., Oviedo Zumaqué, L. E., & Barrera Violeth, J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10, 23–34.
- Agropecuario, I. C. (2017). Manual de requisitos para la certificación en buenas prácticas agrícolas en producción primaria de vegetales y otras especies para el consumo humano. Colombia.
- Al-Hindi, R. R., Al-Najada, A. R., & Mohamed, S. A. (2011). Isolation and identification of some fruit spoilage fungi: Screening of plant cell wall degrading enzymes. *African Journal of Microbiology Research*, 5(4), 443–448. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.896>
- Anastasi, A., Varese, G. C., & Filipello Marchisio, V. (2005). Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*, 97(1), 33–44. <https://doi.org/10.3852/mycologia.97.1.33>
- Anastassiadis, S., Morgunov, I. G., Kamzolova, S. V., & Finogenova, T. V. (2008a). Citric acid production patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(2), 107–123.
- Anastassiadis, S., Morgunov, I., Kamzolova, S., & Finogenova, T. (2008b). Citric Acid Production Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(2), 107–123. <https://doi.org/10.2174/187220808784619757>
- Argun, H., Kargi, F., & Kapdan, I. K. (2009). Effects of the substrate and cell concentration on bio-hydrogen production from ground wheat by combined dark and photo-fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(15), 6181–6188. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.05.130>
- Beltrano, J., & Gimenez, D. (2015). *Cultivo en hidroponía*. Universidad de la Plata.
- Bergman, T. L., & Incropera, F. P. (2011). *Introduction to heat transfer*. John Wiley & Sons.
- Berovic, M., & Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnology Annual Review*. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13011-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13011-8)
- Betiku, E., & Adesina, O. A. (2013). Statistical approach to the optimization of citric acid production using filamentous fungus *Aspergillus niger* grown on sweet potato starch hydrolyzate. *Biomass and Bioenergy*, 55, 350–354. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.02.034>

- Bracmort, K. (2015). Biomass: Comparison of Definitions in Legislation Kelsi Bracmort Specialist in Agricultural Conservation and Natural Resources Policy. Retrieved from <http://www.nationalaglawcenter.org/wp-content/uploads/assets/crs/R40529.pdf>
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. *Universidad Nacional de Salta, Argentina*, 118.
- Chandrashekhara, H., & Rao, J. V. (2010). An Overview of fermenter and the design considerations to enhance its productivity. *Pharmacologyonline*, 1, 261–301.
- Chap 7 Microbial Process Kinetics II . *Kinetic modeling of cell growth*. (2001). Cambridge University Press. Retrieved from <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=x-N-DsC-7AEC&oi=fnd&pg=PA127&dq=microbial+process+kinetics&ots=e3kq1ddY3u&sig=7rhL80S748O4hdF-n1mpu4Axq0o#v=onepage&q=microbial+process+kinetics&f=false>
- Chisti, Y. (1992). Assure bioreactor sterility. *Chemical Engineering Progress*.
- Cunningham, A., Lennox, J., & Rockford, R. (2010). Microbial Growth. Retrieved March 28, 2018, from <https://www.cs.montana.edu/webworks/projects/stevesbook/contents/chapters/chapter002/section002/black/page001.html>
- Demirel, G., Yaykaşli, K. O., & Yaşar, A. (2005). The production of citric acid by using immobilized *Aspergillus niger* A-9 and investigation of its various effects. *Food Chemistry*, 89(3), 393–396. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.047>
- Detle, H., Melas, V. B., Pepelyshev, A., & Strigul, N. (2005). Robust and efficient design of experiments for the Monod model. *Journal of Theoretical Biology*, 234(4), 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.12.011>
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Kaur, S., & Verma, M. (2013). Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. *Industrial Crops and Products*, 41(1), 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.001>
- Dhillon, G. S., Brar, S. K., Verma, M., & Tyagi, R. D. (2011). Utilization of different agro-industrial wastes for sustainable bioproduction of citric acid by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 54(2), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.02.002>
- Doran, P. M., & García Labiano, F. J. (1995). *Bioprocess engineering principles. Principios de ingeniería de los bioprocesos*.
- EL YAKOUTI, M. (2017). *Sistemas integrados con Arduino*.
- Elizondo Gómez, B. E. L., & Manzanares Estrada, R. S. (2009). *Obtención de ácido cítrico por medio de fermentación sumergida a partir de aspergillus niger atcc 16404 utilizando suero de leche como medio de cultivo de fermentación*. FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA. UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR, El Salvador.
- Evans, B. (2007). *Arduino: Manual de Programación*. Traducido y adaptado: José Manuel Ruiz Gutiérrez, USA.

- Fischer, G. M. D. (2013). *los frutales caducifolios en Colombia Situación actual , sistemas de cultivo y plan de desarrollo.*
- Garg, M. (2010). Fermentor (Bioreactor): History, Design and Its Construction. <http://www.biologydiscussion.com/industrial-microbiology-2/fermentor-bioreactor-history-design-and-its-construction/55756>.
- Gibbs, A. J. C., & González, E. S. (2017). Implementación de un sistema de control de entrada y salida empleando el módulo de lectura RFID con la tecnología Arduino. *Revista de Iniciación Científica*, 2(2), 19–34.
- Gómez Schouben, A. L. (2012). *Efecto de la variación de los niveles de P & Ken la producción de ácido cítrico utilizandouna cepa de Aspergillus niger. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Colombia, Palmira.*
- Gottwald, T. R. (1985). Influence of temperature, leaf wetness period, leaf age, and spore concentration on infection of pecan leaves by conidia of *Cladosporium caryigenum*. *Phytopathology*, 75, 190–194. Retrieved from https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1985Articles/Phyto75n02_190.pdf
- Grewal, H. S., & Kalra, K. L. (1995). Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*, 13(2), 209–234. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)00002-8](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)00002-8)
- Guc, S., & Erkmen, O. (2017). Citric Acid Production from Nontreated Beet Molasses by a Novel *Aspergillus niger* Strain: Effects of pH, Sugar and Ingredients. *Journal of Food: Microbiology, Safety & Hygiene*, 2(2). <https://doi.org/10.4172/2476-2059.1000122>
- Han, K., & Levenspiel, O. (1988). Extended monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(4), 430–447. <https://doi.org/10.1002/bit.260320404>
- Inegbedion, F. (2002). DESIGN AND CONTRUCTION OF A FERMENTOR FOR THEPRODUCTION OF ETHANOL.
- Instruments, T. (2015). Datasheet LM35. *Acesso Em*, 2.
- Kareem, S. O., Akpan, I., & Alebiowu, O. O. (2010). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. *Malaysian J. Microbiol*, 6(2), 161–165.
- Kim, J. W., Barrington, S., Sheppard, J., & Lee, B. (2006). Nutrient optimization for the production of citric acid by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown on peat moss enriched with glucose. *Process Biochemistry*, 41(6), 1253–1260. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.12.021>
- Kinetics of microbial growth and product formation. (1995). *Progress in Industrial Microbiology*, 31(C), 33–61. [https://doi.org/10.1016/S0079-6352\(06\)80058-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6352(06)80058-5)
- Kumar, D., Jain, V. K., Shanker, G., & Srivastava, A. (2003). Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, 38(12), 1731–1738. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00252-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00252-2)
- Kwon-Chung, K. J., & Bennet, J. E. (1992). Medical mycology. *Revista Do Instituto de Medicina*

Tropical de São Paulo, 34, 504. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651992000600018&nrm=iso

- Leal, D., & et. al. (2015). PRODUCCION DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE SUERO LÁCTEO ENTERO E HIDROLIZADO CON *Aspergillus niger*, POR VÍA FERMENTATIVA, *19*(19), 32–38.
- Leal, D., Pico, Y., Castro, J., Guerra, J., & Castro, G. (2011). PRODUCCION DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE SUERO LÁCTEO ENTERO E HIDROLIZADO CON *Aspergillus niger*, POR VÍA FERMENTATIVA. *Alimentos Hoy*, *19*(19), 32–38. Retrieved from <http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/54>
- López Ríos, C. A., Zuluaga Meneses, A., Herrera Peganos, S. N., Ruiz Colorado, A., & Medina de Perez, I. (2006). Producción de ácido cítrico con *Aspergillus niger* NRRL 2270 a partir de suero de leche. *Dyna*, *73*, 39–57.
- Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., & El-Helow, E. R. (2007). Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology*, *98*(18), 3464–3469. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.007>
- Luna, M., Lozada, Y., & Trigos, Á. (2010). Isolation of strains of *Aspergillus niger* which produce ochratoxin A, isolated in stored green coffee (*Coffea arabica*). *Revista Mexicana de Micología*, *32*, 63–68.
- Martin, D. W., Harper, H. A., Mayes, P. A., & Rodwell, V. W. (1982). *Bioquímica de Harper/Harper's biochemistry*. El Manual Moderno.
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H., & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, *20*(22), 6115–6116. <https://doi.org/10.1093/nar/20.22.6115>
- Mourya, S., & Jauhri, K. S. (2000). Production of citric acid from starch-hydrolysate by *Aspergillus niger*. *Microbiological Research*, *155*(1), 37–44. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(00\)80020-8](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(00)80020-8)
- Muredzi, P. (2013). *Isolation of citric acid producing aspergillus niger strains*.
- Nielsen, J., & Villadsen, J. (1992). Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*, *47*(17–18), 4225–4270. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)85104-J](https://doi.org/10.1016/0009-2509(92)85104-J)
- Nielsen, J., & Villadsen, J. (2002). *Bioreaction engineering principles Second Edition. Reactions*. <https://doi.org/10.1002/ep.670150306>
- Pandey, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2–3), 81–84. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- Panikov, N. (1991). *Kinetics, Microbial Growth*. In: Flickinger, M. C. and Drew, S. W., Eds. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysts and Bioseparation*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25(3), 244–263. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.01.002>
- Restrepo, J., Sánchez, R., & Gómez, E. (2012). Anuario estadístico de frutas y hortalizas 2007-2011 y sus calendarios de siembras y cosechas. *Colombia: JL Impresores LTDA*, 189–192.
- Rivada Núñez, F. J. (2008). *Planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de remolacha*. Universidad de Cádiz, España.
- Rodríguez Couto, S., & Sanromán, M. A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22(3), 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.09.013>
- Ruíz Leza, H. A., Rodríguez Jasso, R. M., Rodríguez Herrera, R., Contreras Esquivel, J. C., & Aguilar, C. N. (2007). Diseño de biorreactores para fermentación en medio sólido. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 6(1), 33–40. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/620/62060105/>
- Sáez Vega, A., Flórez Valdés, L., & Cadavid Rendón, A. (2002). Caracterización de una cepa nativa de *Aspergillus niger* y evaluación de la producción de ácido cítrico. *Revista Universidad EAFIT*, (128), 33–42.
- Saffran, M., & Denstedt, O. (1948). A rapid method for the determination of citric acid. *Journal of Biology and Chemistry*, 175, 849–855.
- Schöler, A., Jacquiod, S., Vestergaard, G., Schulz, S., & Schloter, M. (2017). Analysis of soil microbial communities based on amplicon sequencing of marker genes. *Biology and Fertility of Soils*, 53(5), 485–489. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1205-1>
- Scragg, A. H. (1991). *Bioreactors in biotechnology: a practical approach*.
- Serrat, M., & Méndez, A. (2012). Construcción y Validación Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio Construction and Experimental Validation of a Homemade Stirred Tank Bioreactor for Lab-scale Submerged. *Tecnología Química*, 31(2), 362–375. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000300010
- Show, P. L., Oladele, K. O., Siew, Q. Y., Aziz Zakry, F. A., Lan, J. C. W., & Ling, T. C. (2015). Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 271–283. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1033653>
- Smith, C. A., & Corripio, A. B. (1985). *Principles and practice of automatic process control* (Vol. 2). Wiley New York.
- Soccol, C. R., & Vandenberghe, L. P. S. (2003). Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 205–218. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00133-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00133-X)
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology & Biotechnology*, 44(2).

- Stanbury, P., Whittaker, A., & Hall, S. (1995). *Principles_of_Fermentation_Technology* (Second). Butterworth Heinemann.
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., & Hall, S. J. (2013). Principles of fermentation technology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Stazonelli, E. A., & Ploper, L. D. (2017). Evaluación de sustratos para la producción de esporas de *Trichoderma* y estudio del crecimiento en arroz de las cepas antagonistas TPT03 , TPT02 , 37, 57–66.
- Stinson, E. E., Osman, S. F., Huhtanen, C. N., & Bills, D. D. (1978). Disappearance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(4), 620–622.
- Strigul, N., Dette, H., & Melas, V. B. (2009). A practical guide for optimal designs of experiments in the Monod model. *Environmental Modelling & Software*, 24(9), 1019–1026. <https://doi.org/10.1016/j.envsoft.2009.02.006>
- Triantaphyllou, E. (2000). Multi-criteria decision making methods. In *Multi-criteria decision making methods: A comparative study* (pp. 5–21). Springer.
- Velásquez, J. a., Beltrán, D., Padilla, L., & Giraldo, G. (2010). Obtención de ácido cítrico por fermentación con *Aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico hartón (*Musa aab simmonds*) maduro. *Tumbaga*, 5, 135–147.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. de J., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)
- Zhu, C. J., & Lee, Y. K. (1997). Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 9(2), 189–194.

9 ANEXOS

ANEXO I

Especificaciones de equipos

Características

Todos los equipos están alimentados por fuentes de 12 voltios a una corriente de 1 A.

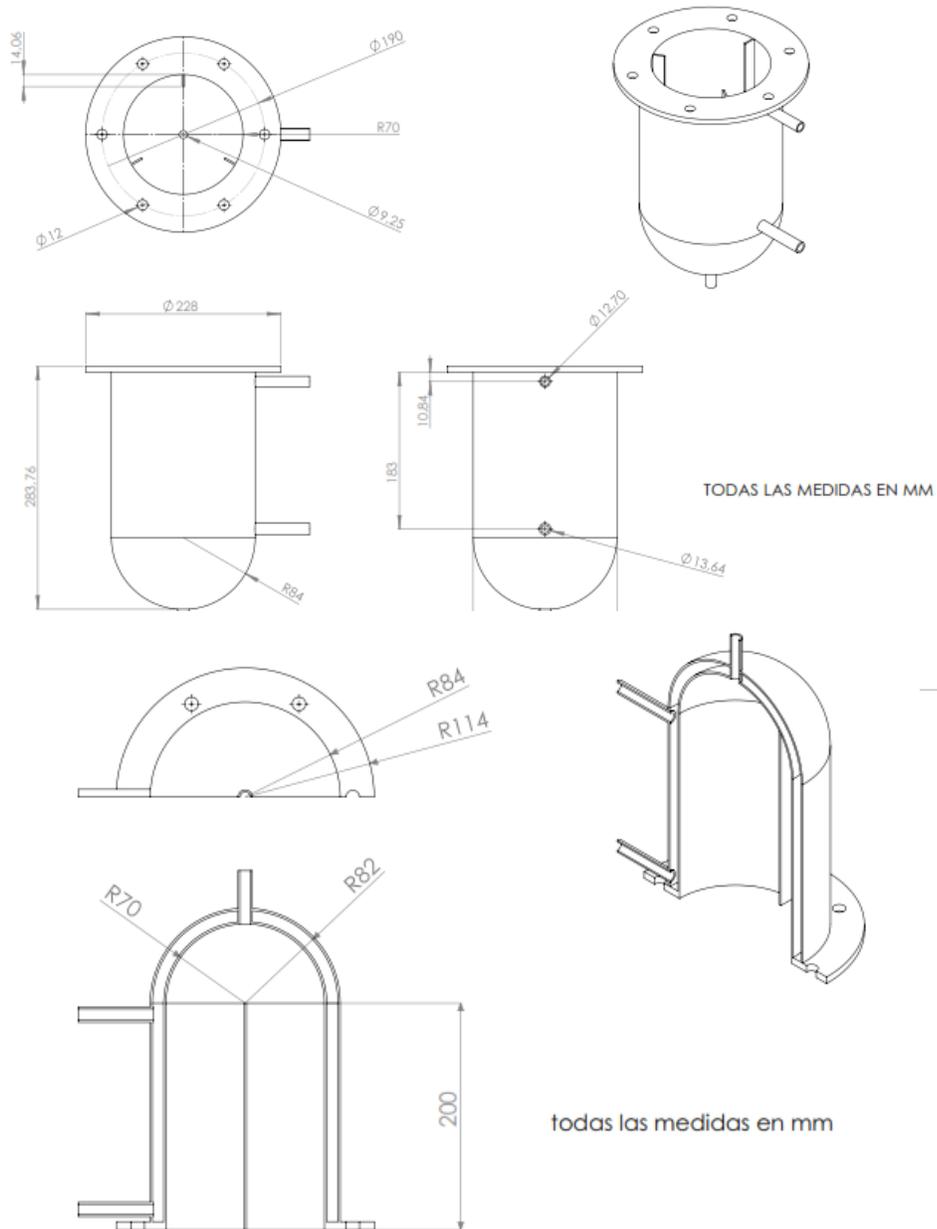
Recipiente de reacción Material: Acrílico, 3 mm de espesor. Capacidad nominal: 3 L Consta de una chaqueta de 1 cm de espesor fabricada del mismo material.
Tanque de calentamiento Material: PVC Capacidad: 4 L
Bomba de alimentación de la chaqueta Tipo: Centrifuga Voltaje: 12 V Corriente: 1 A Caudal: 240 L/h
Bomba de aireación Tipo: Diafragma Voltaje: 12 V Corriente: 1 A Caudal: 5 L/min
Motor del Agitador Tipo: Escobillas Voltaje: 12 V Corriente: 1 A RPM: 200
Módulo de velocidad L298n Voltaje: 12 V Corriente: 1 A
Módulo de relé Arduino Voltaje: 12 V Corriente: 1 A
Sensor LM 35 Voltaje: 5 V Corriente: 1 A Temperatura en grados Celsius

ANEXO II

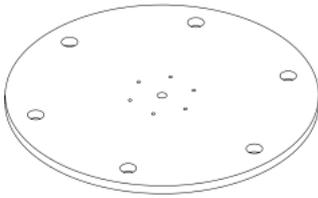
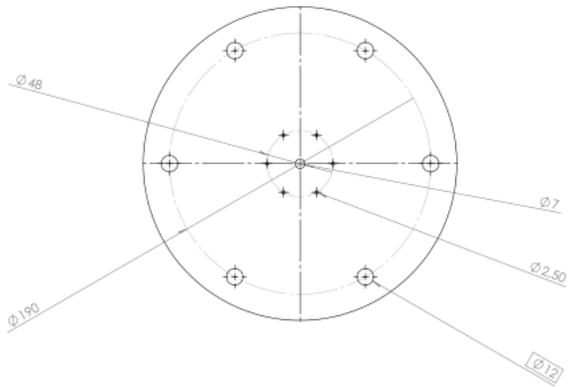
Planos

Todos los planos se elaboraron con medidas en mm

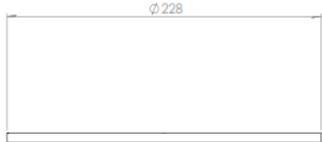
Reactor



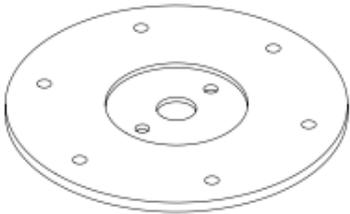
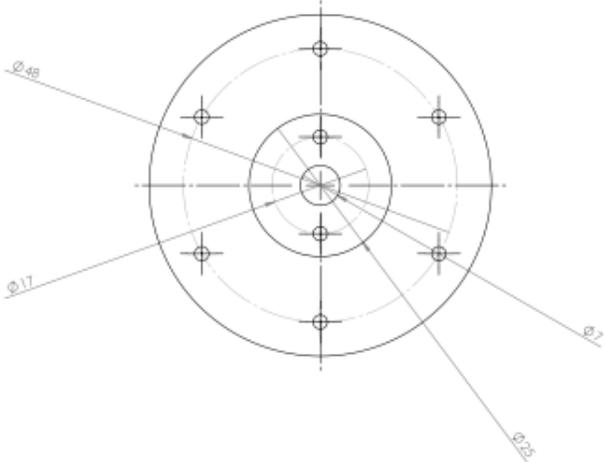
Tapa del reactor



TODAS LAS MEDIDAS EN MILIMETROS



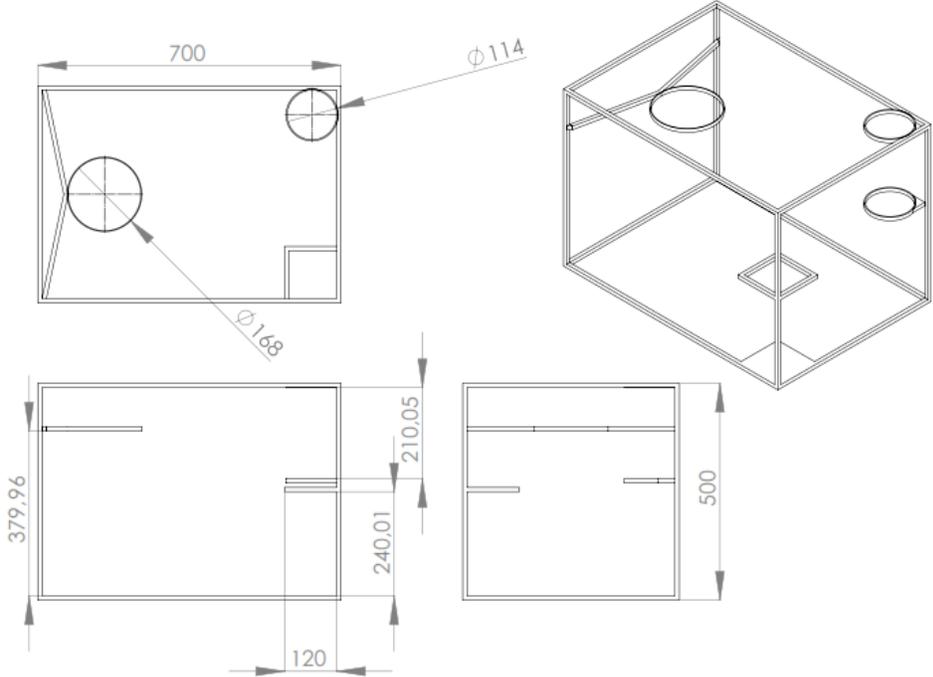
Soporte para el motor



TODAS LAS MEDIDAS EN MILIMETROS
ESCALA 2:1



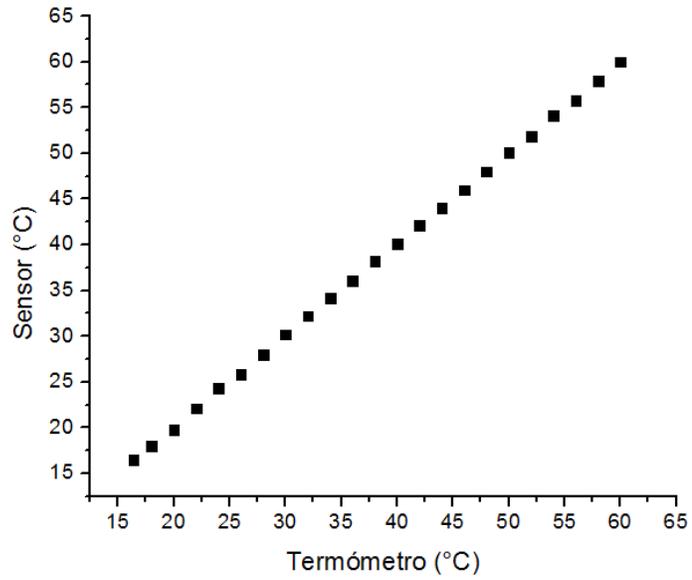
Soporte del equipo



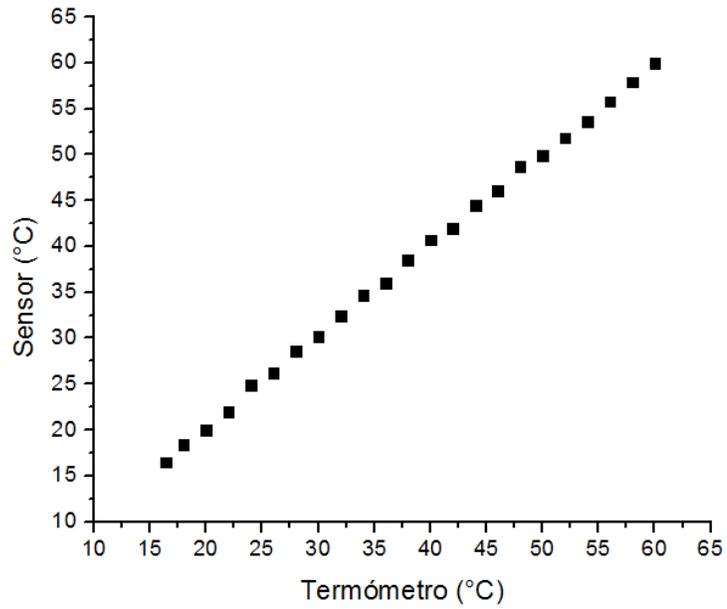
ANEXO III

Curvas de Calibración de Equipos y Sensores

Sensor del Reactor

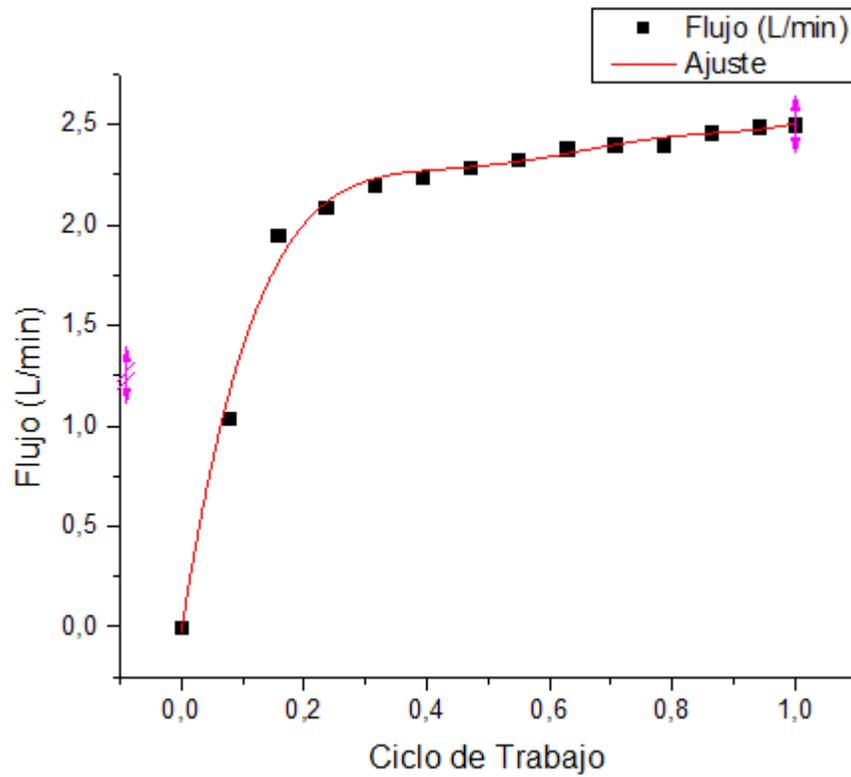


Sensor de tanque de calentamiento



Bomba de Alimentación de la Chaqueta

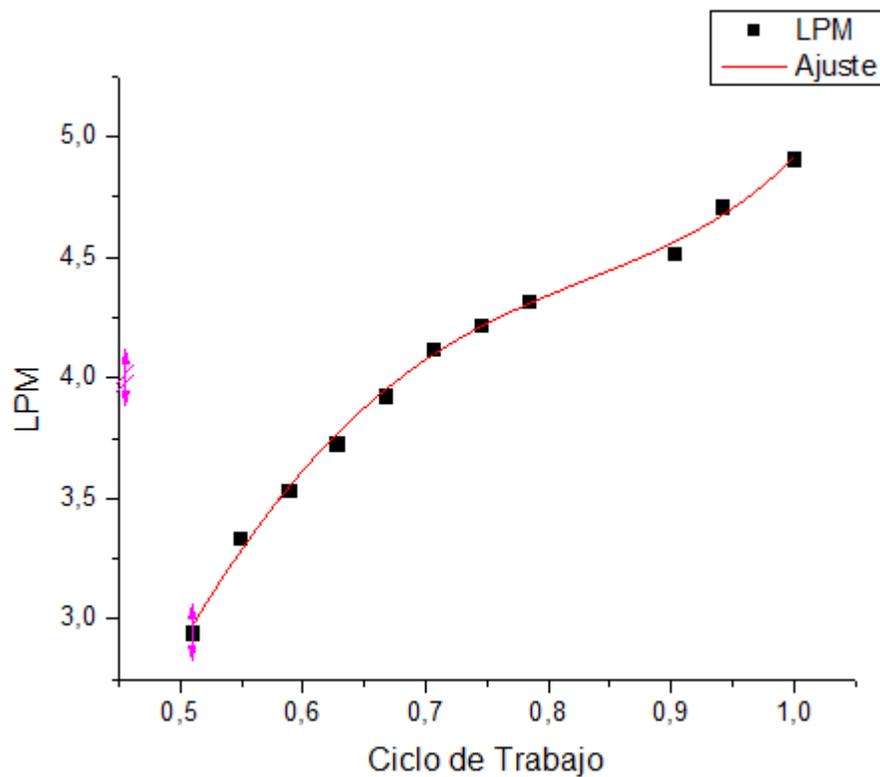
Equation	$y = \text{Intercept} + B_1x^1 + B_2x^2 + B_3x^3 + B_4x^4 + B_5x^5$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,04162		
Adj. R-Square	0,98934		
		Value	Standard Error
B	Intercept	-0,03263	0,06993
	B1	19,95105	1,6157
	B2	-68,0885	11,04318
	B3	113,01942	29,17523
	B4	-89,71943	32,64735
	B5	27,37681	13,00724



Bomba de Aireación

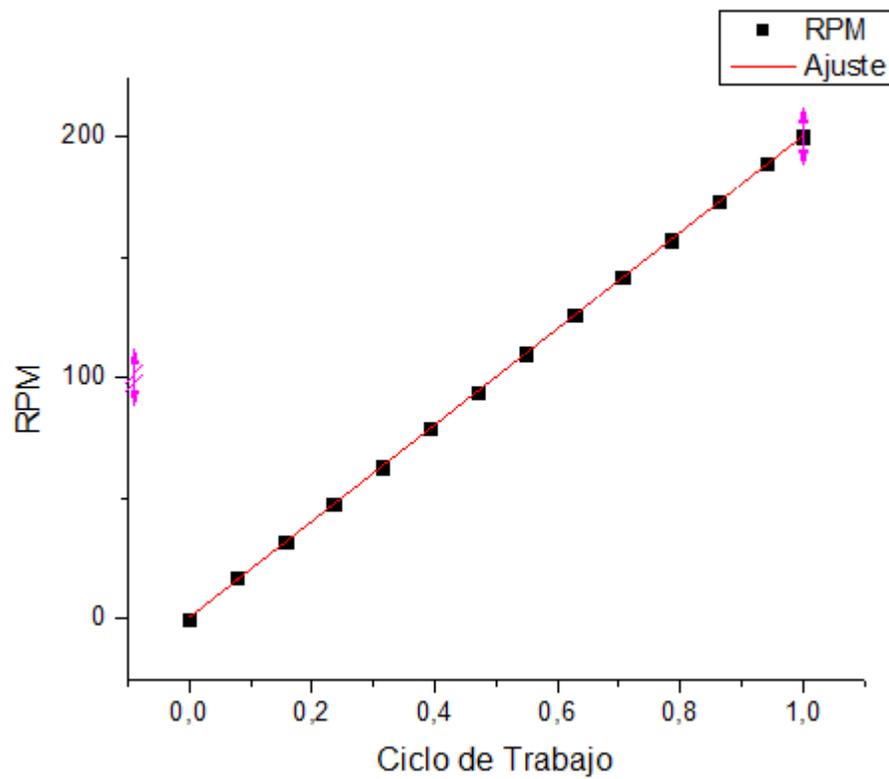
Debido a la configuración de tipo diafragma de la bomba de aireación, mínimo se puede trabajar a 3 LPM con un ciclo de trabajo de 50%.

Equation	$y = \text{Intercept} + B1*x^1 + B2*x^2 + B3*x^3 + B4*x^4$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	0,01048		
Adj. R-Square	0,99516		
		Value	Standard Error
D	Intercept	-3,50422	10,00632
	B1	10,29947	55,56864
	B2	24,03247	113,79321
	B3	-50,3834	101,91555
	B4	24,47065	33,71323



Motor del Agitador

Equation	$y = \text{Intercept} + B1 \cdot x^1$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	2,08805		
Adj. R-Square	0,99996		
		Value	Standard Error
H	Intercept	0,6073	0,21219
	B1	199,714	0,35511



ANEXO IV

Manual de Operación

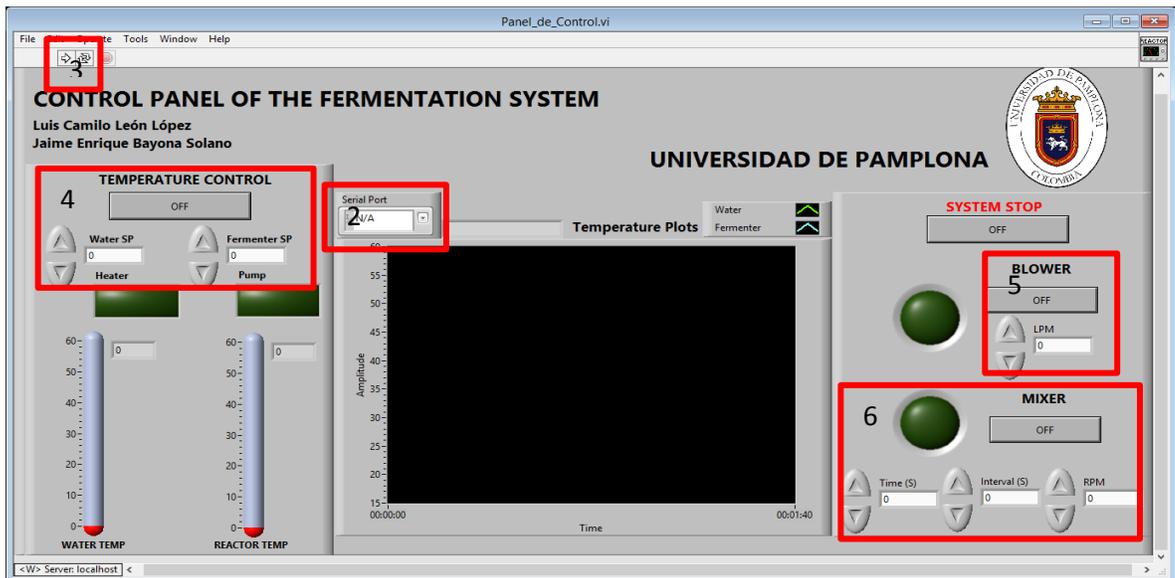
Instalación del Software

Para realizar la instalación por primera vez del software de control del equipo de fermentación primero se deben instalar los controladores del microcontrolador, Arduino. Para esto se ejecuta el programa **Controladores.exe** y se siguen las instrucciones. El siguiente paso es instalar la interfaz de usuario del fermentador. Para esto, desde la carpeta **Control_Install** se ejecuta como administrador el **Setup.exe** y se siguen las instrucciones.

Puesta en marcha del equipo

Antes de poner en marcha el equipo es necesario realizar la verificación de los niveles de fluido de trabajo (Agua) dentro del tanque y la chaqueta. Una vez hecho esto se puede proceder como se muestra a continuación:

1. Conectar el microcontrolador mediante el cable USB y conectar el equipo a la corriente.
2. Ejecutar la interfaz de usuario y seleccionar el puerto serial al que se encuentra asignado el microcontrolador, como se muestra en la figura.
3. Iniciar el programa el programa de control haciendo click en el botón ejecutar.
4. Seleccionar los SetPoint de temperatura del fluido de trabajo y del reactor. Para iniciar el lazo de control proporcional hacer click en el botón. El sistema está diseñado para una temperatura máxima de 60 grados Celcius.
5. La cantidad de aire que ingresa al sistema se puede regular hasta un mínimo de 3 LPM.
6. El sistema de agitación mecánica se puede utilizar mediante intervalos de tiempo en segundos. Donde **Time** se refiere a tiempo en el cual el agitador estará encendido y la ventana **Interval** al tiempo de pausa entre momentos de agitación.
7. Para terminar la ejecución se debe verificar que todos los sistemas se encuentren apagados, es decir, que en cada uno de los botones leamos **OFF**. Posteriormente se hace click en el botón **SYSTEM STOP**.

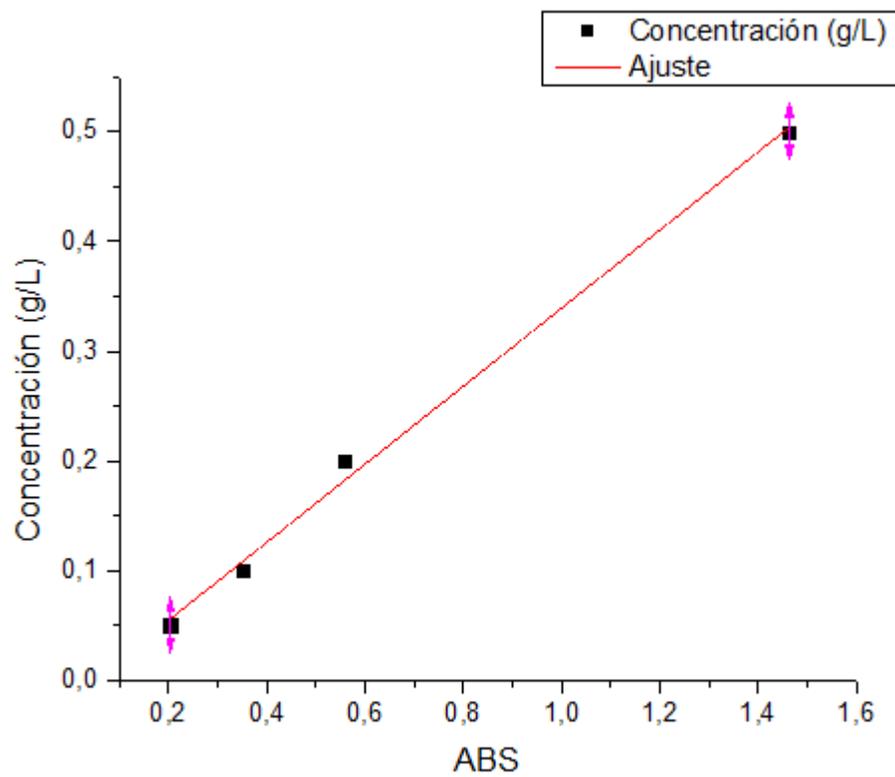


ANEXO V

Curvas de Calibración del Espectrofotómetro

Azucres

Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weighting		
Residual Sum of Squares	4,35855E-4		
Pearson's r	0,99821		
Adj. R-Square	0,99464		
		Value	Standard Error
	Intercept	-0,01651	0,01219
	Slope	0,35592	0,01508



Ácido Cítrico

Equation	$y = a + b \cdot x$		
Weight	No Weightin		
Residual Sum of Squares	0,00258		
Pearson's r	0,99643		
Adj. R-Squar	0,9905		
		Value	Standard Err
B	Intercept	0,1309	0,02685
	Slope	1,9378	0,09479

