



Titulo

**ESTUDIO DE LAS VARIABLES DE
OPERACIÓN DE UN BIORREACTOR PARA
MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO
CÍTRICO POR VÍA FERMENTATIVA DE
Aspergillus niger UTILIZANDO COMO
SUSTRATO DURAZNOS (*Prunus pérsica*)
CULTIVADOS EN LA PROVINCIA DE
PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER**

Autor

JAIME ENRIQUE BAYONA SOLANO

Universidad de Pamplona
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Departamento de ingeniería Ambiental, Civil y Química
Programa de Ingeniería Química
Pamplona, Norte de Santander
Colombia
2019

**ESTUDIO DE LAS VARIABLES DE OPERACIÓN DE UN
BIORREACTOR PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN
DE ÁCIDO CÍTRICO POR VÍA FERMENTATIVA DE
Aspergillus niger UTILIZANDO COMO SUSTRATO
DURAZNOS (Prunus pérsica) CULTIVADOS EN LA
PROVINCIA DE PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER**

JAIME ENRIQUE BAYONA SOLANO

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Ingeniero Químico

Directoras:

Daisy Lorena Restrepo
Msc. Ingeniería Química

Ángela Maritza Cajiao
Msc. Microbiología

Universidad de Pamplona
Facultad de Ingeniería y Arquitectura
Departamento de Ingeniería Ambiental, Civil y Química
Programa de Ingeniería Química
Pamplona, Norte de Santander
Colombia
2019

Dedicatoria

A dios, la virgen santísima y mi ángel de la guardia que nunca me han dejado solo.

A Jaime y Diana, quienes además de darme a vida, siempre han sido mi apoyo incondicional y mi motivación gigante a seguir cada día. Los amo

Agradecimientos

A mis hermanos, con quienes siempre he contado y han sido mis confidentes en cada locura y situación de mi vida, quienes son la forma que la vida me ha dado para demostrarme que debo dar más cada vez.

A mi sobrino, que quien sin saberlo se volvió en pieza fundamental en mi vida y por quien haría cualquier cosa con tal de ver una sonrisa en su cara.

A mis tíos que siempre y sin dudarlos me han dado su mano amiga y consejo fraterno en cada etapa de este caminar.

A mis primos, que son como mis hermanos y han sido confidentes sin falta.

A mi abuela, quien siempre me dio su bendición y se desea lo mejor para todos nosotros.

A mis angeles en el cielo, que me cuidan y me protegen a diario.

A la Universidad de Pamplona por acogerme en sus brazos y enseñarme a ser un profesional

A la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, Instituto de Biotecnología y Agroindustria IBA, Grupo de investigación en Procesos químicos, catalíticos y biotecnológicos, PQCB; al profesor Carlos Ariel Cardona Alzate, Director.

Participaciones en eventos científicos

- Congreso Internacional de Investigación Academia Journals Hidalgo 2019
Universidad Politécnica Metropolitana de Hidalgo. MEXICO
Construcción de modelo cinético de producción de ácido cítrico por vía fermentativa de *Aspergillus niger* utilizando como sustrato duraznos (*Prunus pérsica*) cultivados en la provincia de Pamplona (Norte de Santander), Colombia
Ponencia Virtual
- XI Semana Técnica de Ingeniería Química Tipo de evento: Congreso Ámbito: Nacional Universidad Industrial de Santander UIS

OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR VÍA FERMENTATIVA DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS DE SUTRATOS ORGÁNICOS BIODEGRADABLES

Póster

- XXVII Encuentro Nacional de Estudiantes de Ingeniería Química
Nacional MANIZALES
Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales UN-Manizales
- XXIX Congreso Colombiano de Ingeniería Química y Profesiones Afines
DISEÑO Y APLICACIÓN DE UN BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR VÍA FERMENTATIVA DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS DE SUTRATOS ORGÁNICOS BIODEGRADABLES
Ponencia
- XXIV CONGRESO LATINOAMERICANO DE ESTUDIANTES DE INGENIERÍA QUÍMICA Y CARRERAS AFINES Buenos Aires, Argentina
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL SEDE BUENOS AIRES UTN.BA
DISEÑO Y APLICACIÓN DE UN BIORREACTOR PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR VÍA FERMENTATIVA DE *Aspergillus niger* UTILIZANDO SUTRATOS ORGÁNICOS BIODEGRADABLES
PONENTE

Publicaciones

- Producción bibliográfica - Artículo - Publicado en revista
JAIME ENRIQUE BAYONA SOLANO, "Estudio de la producción de Ácido Cítrico a escala de laboratorio por vía Fermentativa de *Aspergillus niger* utilizando como sustrato duraznos (*Prunus persica*) cultivado en la provincia de Pamplona, Norte de Santander" En: Colombia
Química E Industria - Barcelona ISSN: 0370-3029 ed: v.19 fasc.1 p.21 - 24, 2018,
- Producción bibliográfica - Artículo
JAIME ENRIQUE BAYONA SOLANO, LUIS CAMILO LEON LOPEZ, ANGELA MARIA IDARRAGA VELEZ, ANGELA CAJIAO PEDRAZA, "Construcción de modelo cinético de producción de ácido cítrico por vía fermentativa de *Aspergillus niger* utilizando como sustrato duraznos (*Prunus persica*) cultivados en la provincia de Pamplona (Norte de Santander) En: México
Revista De La Ingeniería Industrial ISSN: 1940-2163 ed: v.11 fasc.8 p.312 - 320,2019,

Resumen

La provincia de Pamplona, Norte de Santander, presenta una alta producción de durazno. Dada la cantidad producida, se presentan pérdidas de este producto agrícola, por lo cual, el durazno cultivado en dicha provincia se presenta como una materia prima prometedora para su empleo en diferentes procesos de transformación. En este trabajo, se evalúa su potencial para la producción de ácido cítrico mediante procesos de fermentación con el microorganismo *Aspergillus niger*. Para tal fin, se analizarán las variables de operación con miras a encontrar los parámetros tales que permitan maximizar la producción del ácido cítrico. 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; tratando en cada caso con la cinética del proceso. Todo lo anterior se realizó en un biorreactor artesanal, donde los resultados obtenidos fueron comparados con un biorreactor comercial. La determinación final se realiza por medio de un modelo matemático comparativo de las diferentes variables de operación en el interior del reactor.

Palabras clave: Durazno, Biorreactor, Ácido Cítrico, *Aspergillus niger*.

Contenido

Título	I
Agradecimientos	III
Participaciones en eventos científicos	III
Publicaciones	IV
Resumen	VI
Contenido	VII
Lista de Tablas	IX
Lista de Ecuaciones	IX
Lista de Gráficas	IX
Lista de Ilustraciones	X
Objetivos	11
Objetivo General	11
Objetivos específicos	11
Introducción	12
Marco teórico	13
1.1 <i>Aspergillus niger</i>	13
1.2 Durazno	14
1.3 Sustrato	15
1.4 Biomasa	15
1.5 Ácido cítrico	16
1.6 Fermentador	16
1.7 Cinética de producción	17
1.8 Simulación de procesos	18
1.9 Análisis de impacto ambiental	19
1.9.1 Algoritmo de reducción de residuos WAR: simulación de procesos químicos para la reducción de residuos	19
Metodología	21
2. Revisión bibliográfica	22
2.1 Caracterización de las materias primas.	22
2.2 Equipos	23
2.3 Diseño	24
2.4 Ensayos preliminares	24
2.5 Fermentación	24
2.5.1 Preparación del inóculo	25

2.5.2 Medio de fermentación	25
2.5.3 Preparación de equipos	25
2.5.4 Fermentación.....	25
2.5.5 Reactor construido.....	25
2.5.6 Reactor Comercial	26
2.6 Cuantificación.....	26
2.6.1 pH.....	26
2.6.2 Grados Brix.....	26
2.6.3 Azúcar Total Consumido.....	26
2.6.4 Ácido Cítrico	26
2.7 Simulación.....	31
2.1 Análisis de impacto ambiental	31
Resultados y Análisis	33
3.1 Aislamiento de <i>Aspergillus niger</i>	33
3.1.1 <i>Aspergillus niger van Tieghem</i>	34
3.2 Sustrato.....	34
3.3 Inóculo	35
3.4 Variables analizadas	35
3.4.1 Determinación de pH	35
3.4.2 Determinación de azúcares	36
3.4.3 Producción de Ácido Cítrico.....	37
3.5 Relación de producción.....	39
3.6 Simulación.....	41
3.7 Cinética de producción.....	43
3.8 Impacto Ambiental.....	44
Conclusiones.....	46
Recomendaciones.....	46
Bibliografía	48
Anexos	53
7.1 Biorreactor Biotron LiFlus Gs.....	53
7.2 Biorreactor Construido	55
7.3 Tablas de resultados	56
7.3.1 Variación de pH	56
7.3.2 Consumo de azúcar disponible.....	56
7.4 Cálculo de la cinética de producción	58

Lista de Tablas

Tabla 1. Soluciones para la construcción de la curva de calibración de la determinación de azúcares por el método de fenol-sulfúrico.	28
Tabla 2. Soluciones para la construcción de la curva de calibración de la determinación de ácido cítrico por el método de Saffran-Densted.	30
Tabla 3 Características del sustrato.	34
Tabla 4 Condiciones estándar de fermentación	38
Tabla 5 Componentes de la simulación	41
Tabla 6 Variación de pH.....	56
Tabla 7 Consumo de azúcar	56
Tabla 8 Producción de Ácido Cítrico	57

Lista de Ecuaciones

Ecuación 1 Cinética de Monod.....	18
Ecuación 2 Cinética de Monod modificada.....	38
Ecuación 3 Cinética Arrhenius para producción de Ácido Cítrico	43

Lista de Gráficas

Gráfica 1 Variación de pH.....	36
Gráfica 2 Consumo de azúcar	37
Gráfica 3 Producción de Ácido Cítrico	38
Gráfica 4 Análisis de impacto ambiental de la producción de Ácido Cítrico	44
Gráfica 5 Ajuste matemático.....	58

Lista de Ilustraciones

Ilustración 1 <i>Aspergillus niger</i>	13
Ilustración 2. Durazno <i>Prunus pérsica</i> de poscosecha.....	14
Ilustración 3. Molécula de Ácido Cítrico.	16
Ilustración 4. Componentes principales de un fermentador.....	17
Ilustración 5. Grafico del modelo cinético de Monod.....	18
Ilustración 6. Metodología general	21
Ilustración 7. Determinación de pH.....	27
Ilustración 8. Determinación de grados Brix.....	27
Ilustración 9. Elaboración de la curva estándar de glucosa.....	28
Ilustración 10. Determinación de azúcares totales en las muestras por el método de Fenol – Sulfúrico	29
Ilustración 11. Curva patrón método Saffran – Densted.....	30
Ilustración 12 Determinar la concentración de ácido en la muestra	31
Ilustración 13 Crecimiento de colonias en el durazno. a. Fruto fresco.	33
Ilustración 14 Colonias de <i>Aspergillus niger</i> . (a) Bajo el microscopio. (b) En la caja de	34
Ilustración 15 Solución de inoculación	35
Ilustración 20 Reactor Lifus GX	40
Ilustración 21 Reactor Construido.....	40
Ilustración 22 Diagrama de flujo de proceso de producción de Ácido Cítrico	42
Ilustración 23 Resultados simulación en Aspen Plus V8.8.....	43
Ilustración 25 Biorreactor Biotron LiFlus Gs.....	53
Ilustración 26 Panel de control Biorreactor Lifus GX.....	54
Ilustración 27 Regulador de aireación Lifus GX	54
Ilustración 28 Biorreactor construido.....	55
Ilustración 29 Panel de control sistema de fermentación	55

Pag.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar de las variables de operación para la producción de ácido cítrico a escala de laboratorio por vía fermentativa de *Aspergillus niger* utilizando como sustrato durazno nativo del municipio de Pamplona.

Objetivos específicos

1. Aislar una cepa de *Aspergillus niger* presente en la degradación del durazno nativo del municipio de Pamplona. (trabajo previo)
2. Establecer las mejores variables de operación, mediante ensayos en el equipo que provea un ambiente adecuado para el crecimiento del *Aspergillus niger* en el proceso de fermentación.
3. Establecer el rendimiento que presenta el durazno nativo del municipio de Pamplona como sustrato para la producción de ácido cítrico.
4. Determinar el tiempo en el cual se logra la mayor concentración de ácido cítrico a una determinada concentración de microorganismos al hacer los cambios de variables de operación.
5. Cuantificar la producción de ácido cítrico durante la fermentación con *Aspergillus niger*.
6. Establecer la relación de producción de ácido cítrico en un biorreactor comercial a escala laboratorio y un biorreactor diseñado para este proceso.
7. Desarrollar la simulación del proceso biológico en Aspen Plus V.8.8

Introducción

En la Provincia de Pamplona, localizada en el departamento del Norte de Santander, el cultivo de durazno es una actividad agrícola importante, sobre todo en una región con gran vocación frutícola, en especial, si dicha actividad se caracteriza por ser una fuente de ingresos importante para los productores y con gran potencial para el desarrollo económico de los pobladores de la región. (Cancino,2019) Esta es una zona reconocida por ser productora de duraznos a nivel nacional, por sus condiciones ambientales y climáticas, y de donde salen en su mayoría los duraznos que son exportados. Adentrándose en el mundo del cultivo a gran escala de durazno en amplias extensiones de las laderas montañosas que forman la geografía de la zona, que con el paso del tiempo se han venido ampliando y tecnificando, se evidencian diferentes problemas que esto presenta y ha presentado a lo largo de un tiempo.(Villamizar, 2016)

En diversas ocasiones las plagas atacan los cultivos, generando pérdidas en la producción y generando una inestabilidad en el comercio de esta fruta; seguido de los inclementes cambios climáticos que afectan de diversas maneras los terrenos cultivados, en ocasiones inundando los sembradíos, así como generando erosiones en los suelos fértiles ya trabajados y abonados.

Para este estudio se evidenció la problemática que presenta en el momento del almacenaje. El durazno como alimento de primera necesidad y su condición de perecedero no permite que los tiempos de venta sean prolongados, pues empieza su proceso de descomposición; en las épocas del año en que la producción aumenta no todo el producto alcanza a ser comercializado, generando pérdidas a los agricultores.

En algunos casos este producto ya tomado por el campesino productor como desecho es utilizado para compostaje para el abono de las tierras nuevamente y 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.

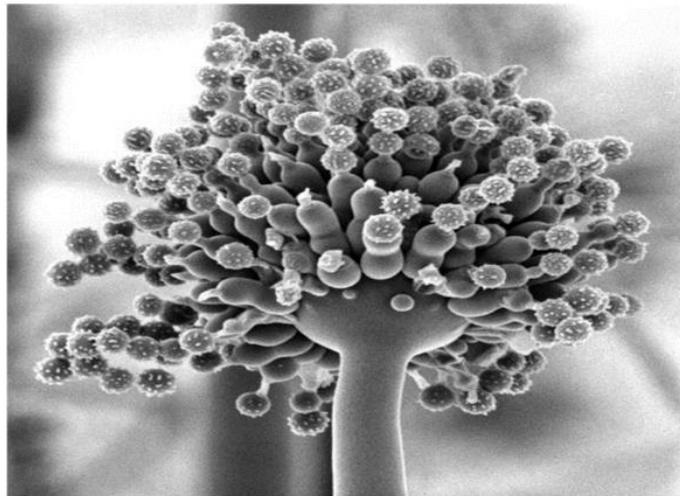
Empleando los conocimientos adquiridos en la formación como ingenieros químicos en la Universidad de Pamplona, y buscando generar procesos sostenibles que sean amigables con el ambiente se plantea una alternativa de solución a esta problemática, tomando como materia prima, lo que para los productores son desechos inservibles, convirtiendo estos en materia prima para la producción de ácido cítrico por medio de la fermentación con un catalizador biológico, convertirlo en un producto de valor agregado de gran aplicación en muchos sectores industriales.

Marco teórico

1.1 *Aspergillus niger*

El *Aspergillus niger*, imagen 1, se encuentra en el grupo de los aspergilos negros, el cual se clasifica dentro de la familia *moniliaceae*, orden *moniliales*, clase *hyphomicetes*, *filum deuteromycota*. Es importante conocer las características del grupo de *Aspergillus niger* para su identificación, las cuales son: cabezas conidiales de tonos negro a negro grisáceo, negro café, negro púrpura o negro carbón, son globosas, radiadas o divididas formando columnas de cadenas de conidios irregulares o bien definidos. Los conidióforos son de color hialino a café, típicamente lisos o en pocas especies ligeramente granulares, de paredes robustas, quebradizas, dividiéndose longitudinalmente al ser trituradas. Vesículas globosas o casi globosas, hialinas o de color café claro a oscuro. Esterigmata en una o dos series dependiendo de las especies, con frecuencia profundamente coloreadas. Los conidios son globosos o subglobosos, elípticos o achatados horizontalmente, lisos o casi lisos, espinosos, o con estriaciones longitudinales marcadas. Esclerotia globosa o subglobosa, de coloración crema cuando es joven, tornándose rosada, gris o café. (Sáez Vega, 2002)

Ilustración 1 *Aspergillus niger*.



FUENTE: (Muredzi, 2015)

1.2 Durazno

El duraznero es una de las especies frutales caducifolias más populares que se cultivan en las zonas templadas de todo el mundo. Su nombre científico, *Prunus persica* (L.) Batsch, sugiere que sería originario de Persia lo que, actualmente, se conoce como Irán (Miranda, 2013), pero ya en la literatura China del 2000 A.C., se hacían descripciones de sus flores y frutos maduros, por lo cual, hoy es aceptado, que su origen está en dicho país (Gratacós, 2008). Probablemente, fue llevado de China a Persia por caravanas de comerciantes y luego pasó, rápidamente, a Europa. En el siglo XVI, ya se encontraba en México, traído por los españoles (Gratacós, 2008).

El duraznero pertenece a la subclase *Rosidea*, orden Rosales, familia *Rosaceae*, subfamilia *Prunoideae*, subgénero *Amygdalus* (L.) Focke. (Miranda et al., 2013; USDA, 2010). Es uno de los frutales comúnmente sembrados en zonas de trópico alto, dentro de la llamada fruticultura de clima frío, debido a las ventajas comparativas que estas regiones poseen, como clima, suelos, precipitación, acumulación de horas frío, vocación frutícola de los productores y experiencia en el manejo de esta especie (Villamizar, 2015), que ha permitido su posicionamiento en muchos de los municipios del departamento de Norte de Santander (Villamizar, 2015) encuentran indicadores que lo ubican como una alternativa atractiva de inversión para la región.

En la maduración del fruto hasta 12 días después de la cosecha se presentaron pérdida del color verde de la epidermis, pérdida de peso, disminución de la firmeza y de la acidez total titulable e incremento en la concentración de sólidos solubles totales, azúcares reductores y la relación de madurez. (Villamizar, 2015)

Ilustración 2. Durazno *Prunus pérsica* de poscosecha



Fuente: (Candan & Calvo, 2012)

1.3 Sustrato

Un sustrato es todo material sólido distinto del suelo, natural, de síntesis o residual, mineral u orgánico, que, colocado en un contenedor, en forma pura o en mezcla, permite el anclaje del sistema radicular de la planta, desempeñando, por tanto, un papel de soporte para la planta. El sustrato puede intervenir o no en el complejo proceso de la nutrición mineral de la planta. (Agamez , E, et al, 2008)

1.4 Biomasa

La biomasa es aquella materia orgánica de origen vegetal o animal, incluyendo los residuos y desechos orgánicos, susceptible de ser aprovechada energéticamente. Las plantas transforman la energía radiante del sol en energía química a través de la fotosíntesis, y parte de esta energía queda almacenada en forma de materia orgánica. (Forcer, 2002)

Según la directiva 2003/30/CE: biomasa es “fracción biodegradable de productos de desecho y residuos procedentes de la agricultura, silvicultura y de las industrias relacionadas, así como de la fracción biodegradable de residuos industriales y municipales”.

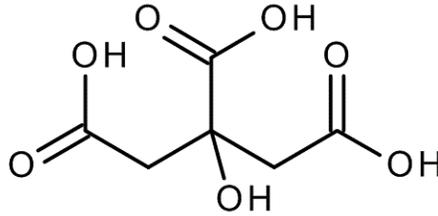
De forma general se puede decir que cualquier definición de biomasa debe englobar principalmente dos términos: orgánico y renovable. (Garrido, 2013)

Se considera biomasa a un grupo de productos energéticos y materias primas de tipo renovable que se originan a partir de materia orgánica formada por vía biológica. Quedan pues fuera de este concepto los combustibles fósiles y las materias orgánicas derivadas de éstos (los plásticos y la mayoría de los productos sintéticos) ya que, aunque aquellos tuvieron un origen biológico, su formación tuvo lugar en tiempos remotos. La biomasa es una energía renovable de origen solar a través de la fotosíntesis de los vegetales.

La biomasa, como recurso energético, puede clasificarse en biomasa natural, residual y los cultivos energéticos. La biomasa natural es la que se produce en la naturaleza sin intervención humana. Por ejemplo, la caída natural de ramas de los árboles (poda natural) en los bosques. La biomasa residual es el subproducto o residuo generado en las actividades agrícolas (poda, rastrojos, etc.), silvícolas y ganaderas, así como residuos de la industria agroalimentaria (alpechines, bagazos, cáscaras, vinazas, etc.) y en la industria de transformación de la madera (aserraderos, fábricas de papel, muebles, etc.), así como residuos de depuradoras y el reciclado de aceites. Los cultivos energéticos son aquellos que están destinados a la producción de biocombustibles. Además de los cultivos existentes para la industria alimentaria (cereales y remolacha para producción de bioetanol y oleaginosas para producción de biodiesel), existen otros cultivos como los lignocelulósicos forestales y herbáceos y cosechas.(Beltrano & Gimenez, 2015)

1.5 Ácido cítrico

Ilustración 3. Molécula de Ácido Cítrico.



Fuente: (Murray, Bender, Botham, Kennelly, & Weil, 2008)

El ácido cítrico es un ácido orgánico tricarboxílico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. Su fórmula molecular es $C_6H_8O_7$, imagen 2. Es un buen conservante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo en el envasado de muchos alimentos como las conservas de vegetales enlatadas. En bioquímica aparece como un metabolito intermediario en el ciclo de los ácidos tricarboxílico, proceso realizado por la mayoría de los seres vivos. El nombre IUPAC del ácido cítrico es ácido 2-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxílico. Las propiedades físicas del ácido cítrico se resumen en la tabla de la derecha. La acidez del ácido cítrico es debida a los tres grupos carboxilos $-COOH$ que pueden perder un protón en las soluciones. Si sucede esto, se produce un ion citrato. Los citratos son unos buenos controladores del pH de soluciones ácidas. Los iones citrato forman sales con muchos iones metálicos. El ácido cítrico es un polvo cristalino blanco. Puede existir en una forma anhidra (sin agua), o como monohidrato que contenga una molécula de agua por cada molécula de ácido cítrico. La forma anhidra se cristaliza en el agua caliente, mientras que la forma monohidrato cristaliza en agua fría. El monohidrato se puede convertir a la forma anhidra calentándolo sobre $74\text{ }^\circ\text{C}$. Químicamente, el ácido cítrico comparte las características de otros ácidos carboxílicos. Cuando se calienta a más de $175\text{ }^\circ\text{C}$, se descompone produciendo dióxido de carbono y agua.(Gómez Schouben, 2012)

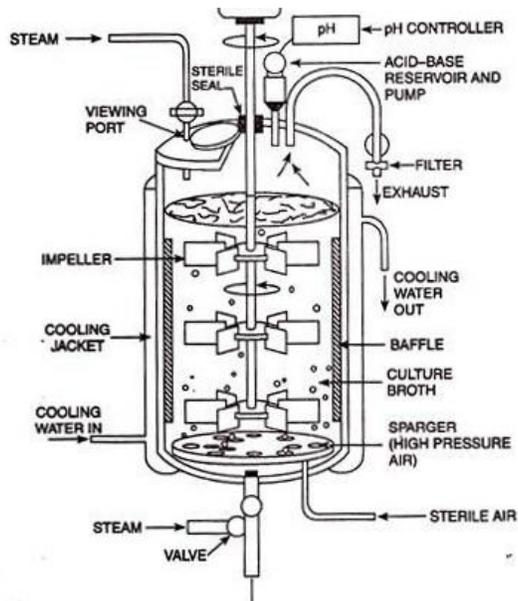
1.6 Fermentador.

Según Stambury (Stambury,P,1995) La principal función de un fermentador es proveer un ambiente controlado para el crecimiento de los microorganismos. Pero 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.
- Dado el caso se debe proveer una aireación y agitación adecuada, para garantizar el correcto metabolismo de los Microorganismo sin comprometer su integridad.

- Se 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 un número de procesos, teniendo en cuenta las regulaciones de contaminación.

Ilustración 4. Componentes principales de un fermentador



Fuente: (Garg, 2016)

En la Imagen 3, se muestran los principales componentes con los que debe contar un biorreactor para su correcto funcionamiento y operación, dentro de los que se encuentran un acceso para la adquisición de muestras, el agitador, una válvula de purga, entre otros.

1.7 Cinética de producción

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, 2016). 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)

Ecuación 1 Cinética de Monod

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

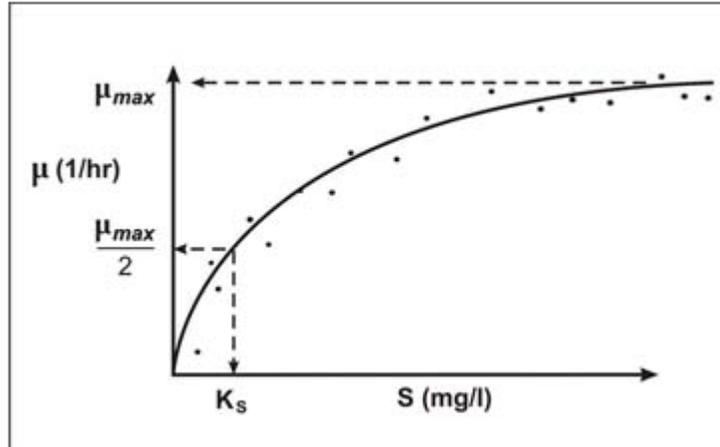
Fuente: (Dette et al., 2005)

Dónde:

- μ : Es la tasa de crecimiento específica de los microorganismos.
- μ_{\max} : Es la tasa de crecimiento específica máxima de los microorganismos.
- S : Es la concentración del sustrato limitante para el crecimiento.
- K_s : Es la constante de media velocidad.

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. (Lester & Birkett, 2010)

Ilustración 5. Grafico del modelo cinético de Monod.



Fuente: (Dette et al., 2005)

1.8 Simulación de procesos

La Simulación de Procesos, resume toda la teoría relacionada con un proceso en el cual se sustituyen las situaciones reales por otras creadas artificialmente, de las cuales se deben aprender ciertas acciones, habilidades y hábitos. En los últimos años, la simulación de procesos ha llegado a ser una herramienta adecuada y oportuna de apoyo para el diseño, caracterización, optimización y monitoreo del funcionamiento de procesos industriales. Para

aplicar estas simulaciones existen en la actualidad una gran variedad de Simuladores de Procesos(Tadeo, 2014).

La simulación de procesos químicos es una herramienta moderna que se ha hecho indispensable para la solución adecuada de los problemas de proceso. Permite efectuar el análisis de plantas químicas en operación

La mayoría de los problemas encontrados en ingeniería son sofisticados e interdisciplinarios. Aspen Plus® es un software que permite la simulación de procesos químicos y una de las herramientas empleada para simulación de procesos de tipo biológico, aplicando todos los conocimientos adquiridos durante la carrera. En general, una planta de procesamiento químico se compone zona de pretratamiento y/o acondicionamiento, zona de reacción o de obtención del producto, y zona de separación o purificación, Aspen Plus es una herramienta muy poderosa que se puede utilizar para abordar diferentes procesos químicos desde modelamiento, simulación, optimización, regresión de datos, especificaciones de diseño, análisis de sensibilidad, manejo de sólidos, dinámica y control, ahorro de energía, cumplimiento de seguridad y, finalmente, análisis económico de procesos(AspenTech, 2019).

1.9 Análisis de impacto ambiental

1.9.1 Algoritmo de reducción de residuos WAR: simulación de procesos químicos para la reducción de residuos

Tradicionalmente, los diseños de procesos químicos se centran en minimizar los costos, mientras que a menudo se pasa por alto el impacto ambiental de un proceso. Esto puede en muchos casos conducir a la producción de grandes cantidades de materiales de desecho. Es posible reducir la generación de estos desechos y su impacto ambiental modificando el diseño del proceso. El algoritmo de reducción de residuos (WAR) por sus siglas en inglés, se desarrolló para poder evaluar fácilmente los impactos ambientales de los diseños. El objetivo de WAR es reducir los impactos ambientales y relacionados con la salud humana en la etapa de diseño (Young & Cabezas, 1999).

El algoritmo WAR evalúa los procesos en términos de posibles impactos ambientales (PEI). Los posibles impactos ambientales de una sustancia química se definen como el efecto que una sustancia química tendría en el medio ambiente si simplemente se emitiera al medio ambiente. El objetivo de esta metodología es minimizar el PEI para un proceso en lugar de minimizar la cantidad de desechos (contaminantes) generados por un proceso. El algoritmo de estimación de impacto es sofisticado, pero lo suficientemente flexible como para permitir a los usuarios enfatizar o disminuir los riesgos según sea necesario para aplicaciones particulares (EPA, 2017).

WAR incluye posibles impactos ambientales de ocho categorías:

- Potencial de toxicidad humana por ingestión (HTPI)

-
- Potencial de toxicidad humana por exposición (HTPE)
 - Potencial de toxicidad acuática (ATP)
 - Potencial de toxicidad terrestre (TTP)
 - Potencial de calentamiento global (GWP)
 - Potencial de agotamiento de ozono (ODP)
 - Potencial de formación de smog (PCOP)
 - Potencial de acidificación (AP)

Metodología

La metodología comprende la parte más importante de una investigación, ya que esta nos marca el hilo conductor en el que se va completando cada uno de los objetivos específicos. Como se muestra en la imagen 6 es necesario completar una serie de actividades principales, cada una de las cuales a su vez contiene sub tareas de acuerdo a la complejidad de la misma.

Ilustración 6. Metodología general



Fuente. Autor

2. Revisión bibliográfica

Durante la revisión bibliográfica se hace una búsqueda profunda de toda la información relevante involucrada en la investigación que se lleva a cabo; se obtiene mayoritariamente de libros, artículos científico de bases de datos, información en internet tanto en inglés con en español. De esta forma se puede dar una viabilidad inicial a la idea que se plantea, además de encontrar un sustento teórico el cual pueda ser el cimiento en la investigación.

2.1 Caracterización de las materias primas.

Con el fin de llevar a cabo el primer objetivo, se estudian las características del sustrato que se va a utilizar en el proceso, comprobando en primera medida su viabilidad para el proceso de acuerdo al microorganismo (MO) que se empleara. A continuación, se investigan las condiciones óptimas para el crecimiento de MO. Como son los nutrientes y las condiciones necesarios para su supervivencia y correcto funcionamiento.

Dado que el sustrato empleado es nativo de la región, se hace conveniente aislar y replicar los microorganismos a partir de este mismo. Para lograr esto primero se toma una muestra de la fruta y se deja descubierta al media ambiente hasta ver que se desarrolla la cepa, una vez que se desarrollan las colonias sobre la muestra se procede a aislar la deseada, en este caso *Aspergillus niger*, separándola de acuerdo a sus características físicas tal como se plantea en el objetivo número 2. Por último se almacenó adecuadamente a la espera para su uso.

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 Rios, 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 (Demirel, Yaykaşlı, & Yaşar, 2005; Lutgarda Abín, Orquídea Coto, 2004; 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 media 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, & Filippello Marchisio, 2005). Por último se almacenó adecuadamente a la espera para su uso (Lea & et. al., 2011).

El crecimiento fúngico presente en el Durazno maduro con características presentes de filamentos con cabezuelas negras, son los las 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.

Características utilizadas en la identificación de las especies. Los criterios seguidos hasta el momento para clasificar las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos son principalmente morfológicos. No obstante, se sugiere realizar posteriormente estudios bioquímicos o moleculares encaminados a resolver algunos de los problemas planteados en su clasificación. Se utilizó el sistema de identificación propuesto por (Carrillo, 2003; Klich & Pitt, 1988).

Principales características macroscópicas para tener en cuenta:

- 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 Klich y Pitt (1988), (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; métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, normalmente muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias (Carrillo, 2003; Klich & Pitt, 1988).

2.2 Equipos

Para este proceso se emplearan dos equipos de fermentación, los cuales serán un biorreactor diseñado por el autor bajo especificación de proceso y otro biorreactor comercial a escala de laboratorio

La construcción del equipo cuenta con una serie de pasos que comienzan con el diseño y terminan cuando se tiene a punto su funcionamiento.

2.3 Diseño

Para realizar el diseño de un equipo acorde a las necesidades del proceso primero se debe decidir cuál de las opciones disponibles se va a utilizar, en estado sólido, semisólido o líquido. Con este fin se analizan las ventajas y desventajas en cada uno de los casos y se toma una decisión de acuerdo al método Electra (Milklos, 2010). Cuando se ha llegado a una decisión se realiza 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. 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 computadora (SOLIDWORKS, 2019).

Adecuación y puesta en marcha

Dado que 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 realiza 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 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 ultimo para comprobar la confiabilidad del sistema, se deja 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.

2.4 Ensayos preliminares

Completado el paso anterior, se prepara una solución de melaza con una concentración conocida de azúcares, aproximadamente 5° Brix, y se fermenta dentro del equipo utilizando levadura comercial. 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.

2.5 Fermentación

El proceso de fermentación consta de sub tareas discriminadas a continuación

2.5.1 Preparación del inóculo

Para realizar los ensayos de obtención de ácido cítrico es necesario preparar un inóculo que contenga como mínimo una concentración de 10^{10} esporas por ml. La solución se prepara tomando 100 mL del medio de fermentación y cuantificando las esporas en cámara de Neubauer, (Bustillo, 2015), agregando las esporas previamente preparadas mediante un raspado del medio de contención elaborado en la replicación y masificación de la cepa proveniente de etapa de aislamiento y caracterización.

2.5.2 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. Se toma una muestra de duraznos cultivados en el municipio, se eliminan las cáscaras y se pican de tal forma que tengan un tamaño suficiente para no bloquear ninguno de los sistemas del reactor. Posteriormente se preparan tres litros de la solución, correspondiente al nivel de trabajo del reactor, de tal forma que tenga un mínimo de 5° Brix.

2.5.3 Preparación de equipos

Antes de empezar la fermentación es necesario realizar la esterilización de los equipos que se emplearan, esto con el fin de evitar contaminación y eliminar posibles agentes inhibidores, primero se lava el recipiente de reacción con suficiente agua caliente y jabón, luego se limpia con alcohol isopropílico dejando hasta que se evapore, por último, se enjuaga con agua destilada para eliminar posibles restos de alcohol para el equipo construido. El equipo comercial es lavado con los mismos parámetros y posteriormente es llevado a auto clave por 90 minutos a una temperatura de 60°C.

2.5.4 Fermentación

La fermentación se desarrolló en dos reactores. El reactor construido para este proceso y en un reactor comercial a escala de laboratorio

2.5.5 Reactor construido

Este proceso se lleva a cabo usando como reactivos 2 L de sustrato a 5° Brix y 50 ml de biomasa a 1×10^{10} concentración de esporas, durante 96 horas consecutivos; durante los cuales se toman tres muestras de 2 ml. El medio de fermentación se mantiene a temperatura constante a la cual el microorganismo puede cumplir con su labor, con agitación y aireación constantes.

2.5.6 Reactor Comercial

Este proceso se llevó a cabo en el reactor Biotron LiFlus Gs de 1 L ubicado en el laboratorio de microbiología del instituto de Instituto de Biotecnología y Agroindustria Investigaciones Biológicas y Agroindustriales IBA de la universidad Nacional de Colombia sede Manizales en el campus la Nubia.

La fermentación se lleva a cabo empleando 800 ml de sustrato y 20 ml de biomasa durante 100 horas consecutivas.

2.6 Cuantificación

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

2.6.1 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 del mismo es importante realizar un seguimiento que permita determinar los límites de tolerancia a los que se pueden someter sin deteriorar su actividad, esta medición se hace necesario realizarla a cada uno de las muestras tomadas.

2.6.2 Grados Brix

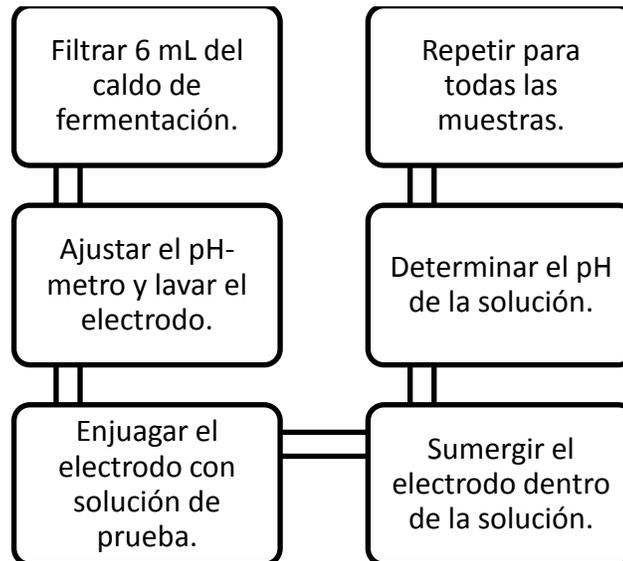
Se realiza como una medida inmediata de la cantidad de sustrato aun disponible para consumo de los MO, permitiendo llevar un control durante el desarrollo del proceso de forma ágil y sencilla mediante la lectura en un refractómetro.

2.6.3 Azúcar Total Consumido

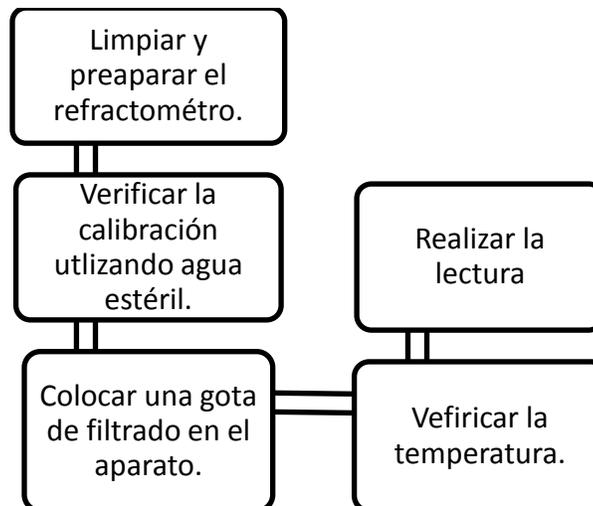
El método de fenol-sulfúrico permite una cuantificación más exacta de la cantidad de sustrato disponible a lo largo del proceso. Pero a diferencia de los grados Brix es necesario realizar un proceso más largo que implica la construcción de una curva de calibración de glucosa, por lo cual solo se lleva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

2.6.4 Ácido Cítrico

El producto deseado en el proceso, se cuantifica mediante el método de Saffran - Densted.

DETERMINACION DE pH**Ilustración 7.** Determinación de pH

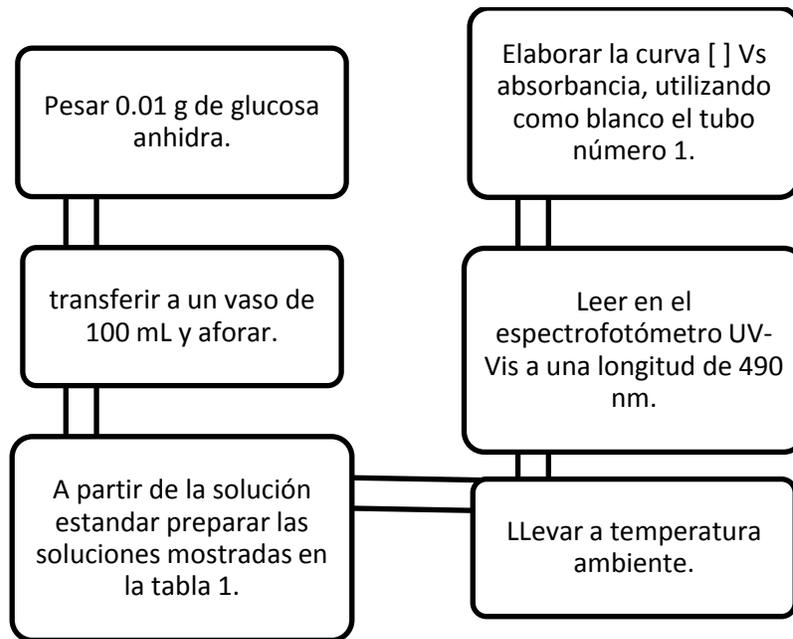
Fuente: Autor

DETERMINACION DE GRADOS BRUX.**Ilustración 8.** Determinación de grados Brix

Fuente: Autor

ELABORACIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR DE GLUCOSA

Ilustración 9. Elaboración de la curva estándar de glucosa



Fuente:(Elizondo Gómez & Manzanares Estrada, 2009) modificado por el Autor.

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

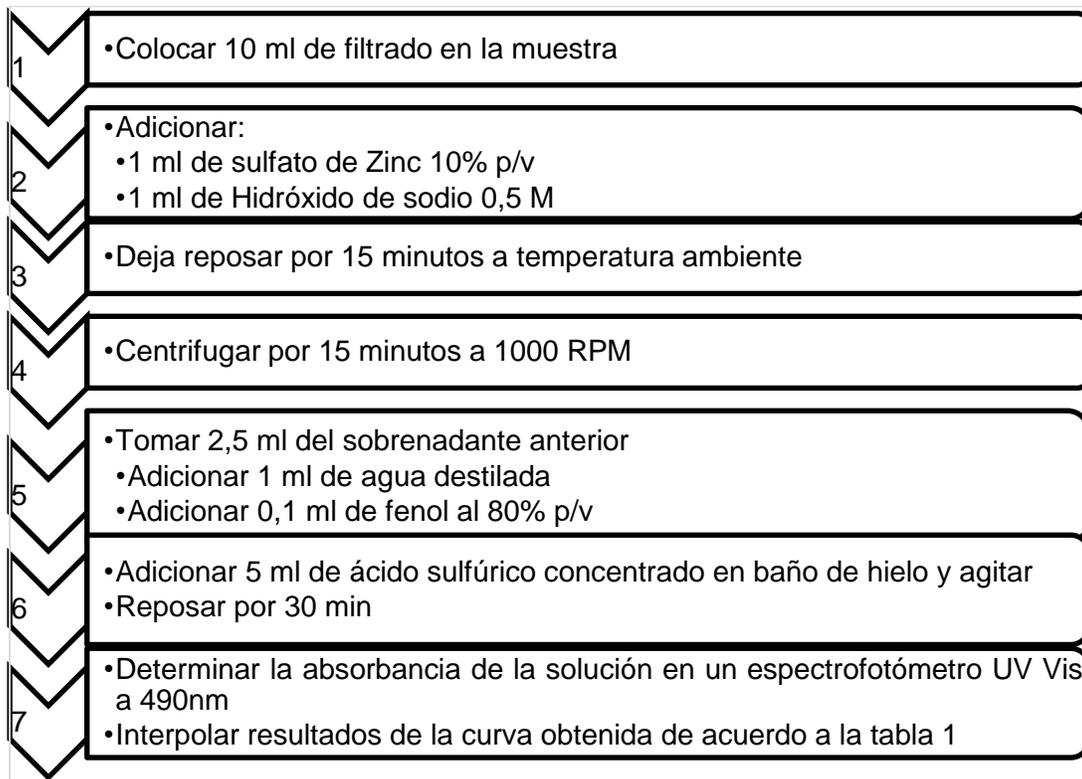
Tubo N°	mL. de Sln. de glucosa anhidra	mL. de Agua estéril	mL. de Fenol 80%	mL. de H ₂ SO ₄ concentrado
1	0.0	5.0	0.1	5.0
2	0.25	4.75	0.1	5.0
3	0.5	4.5	0.1	5.0
4	1	4	0.1	5.0
5	1.5	3.5	0.1	5.0
6	2	3	0.1	5.0
7	2.5	2.5	0.1	5.0

Fuente: Autor

Nota: cada tubo se colocó en baño de hielo y el ácido sulfúrico fue añadido lentamente por las paredes del tubo.

DETERMINACION DE AZÚCARES TOTALES EN LAS MUESTRAS POR EL MÉTODO DE FENOL – SULFURICO.

Ilustración 10. Determinación de azúcares totales en las muestras por el método de Fenol – Sulfúrico

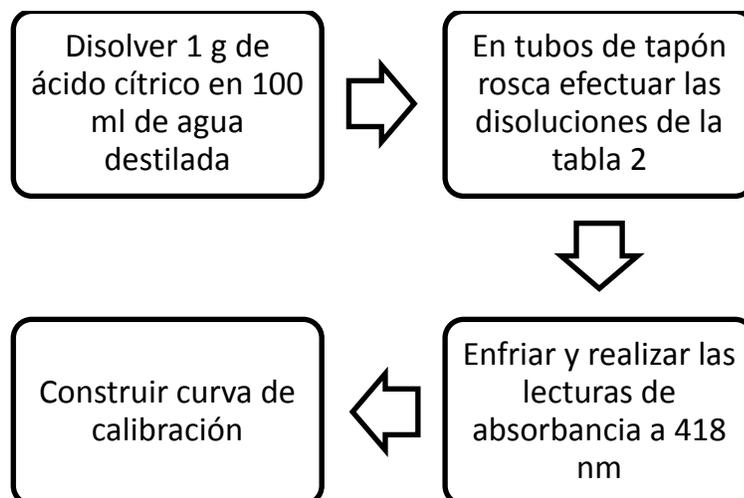


Fuente: Autor

CUANTIFICACION DE ÁCIDO CÍTRICO POR EL METODO DE SAFFRAN – DENSTED.

Construir la curva patrón.

Ilustración 11. Curva patrón método Saffran – Densted.



Fuente: (Saffran & Denstedt, 1948) modificado por Autor

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

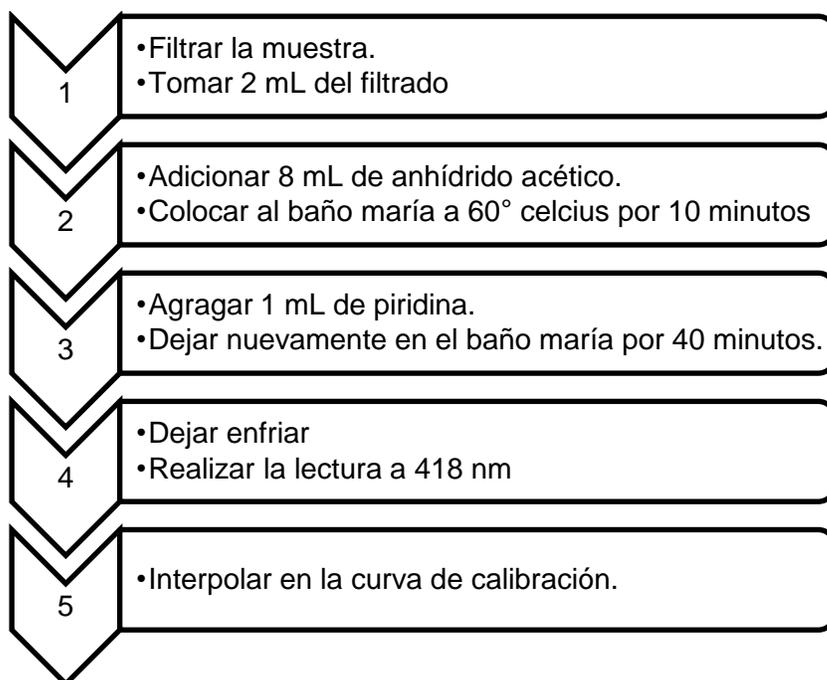
Tubo N°	mL. de Sol. de Ácido Cítrico	mL. de Agua Destilada	mL. de Anhídrido	mL. de Piridina
1	0.0	1.0	8.0	1.0
2	0.2	0.8	8.0	1.0
3	0.4	0.6	8.0	1.0
4	0.6	0.4	8.0	1.0
5	0.8	0.2	8.0	1.0
6	1	0.0	8.0	1.0

Fuente: Autor

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

Determinar la concentración de ácido en la muestra

Ilustración 12 Determinar la concentración de ácido en la muestra



Fuente: (Saffran & Denstedt, 1948) modificado por Autor

Nota: Mantener cerrados los tubos para que no se evapore en anhídrido acético

2.7 Simulación

Para modelar este proceso se empleó el software de simulación de procesos físico-químicos Aspen Plus V8.8; en el que se realiza un pretratamiento del zumo de durazno en un reactor estequiométrico, sus productos son llevados a un reactor de mezcla completa en el que se desarrolla la reacción principal de conversión de azúcares fermentables al adicionar la biomasa y el oxígeno. En esta corriente se realiza un sistema de calentamiento el cual es el lazo de control de temperatura que se establece como parámetro en el proceso fermentativo, así como el sistema de aireación a flujo constante.

Las reacciones empleadas en este modelamiento son las reportadas teóricamente y la cinética construida para este proceso específico.

2.1 Análisis de impacto ambiental

La metodología del algoritmo WAR, desarrollada por el National Risk Management Research Laboratory de la Agencia de Protección Ambiental de Estado Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), propone añadir una relación de conservación sobre el PEI basado en los flujos de impacto de entrada y salida del proceso. En este contexto se entiende el PEI

de una cantidad dada de materia o energía, como el efecto que esta materia y energía tendría en promedio sobre el ambiente si ellos fueran descargados fuera del proceso. Dado que esta definición implica que el impacto es una cantidad aún no realizada el PEI es de naturaleza probabilística. Así, los potenciales de impacto ambiental de una industria química son generalmente causados por la energía y la materia que el proceso adquiere o emite al ambiente.

Las categorías de impacto evaluadas por el algoritmo WAR (Cardona, Sánchez, Montoya, & Quintero, 2005; EPA, 2017) se dividen en dos grupos: atmosférica global y toxicológica global. Las categorías de impacto atmosférico global son: potencial de calentamiento global (GWP), potencial de agotamiento de ozono (ODP), potencial de acidificación o lluvia ácida (AP) y oxidación fotoquímica o potencial de formación de smog (PCOP). Las categorías de impacto toxicológico global son: potencial de toxicidad humana por ingestión (HTPI), potencial de toxicidad humana por inhalación o exposición dérmica (HTPE), potencial de toxicidad acuática (ATP) y potencial de toxicidad terrestre (TTP).

El algoritmo WAR maneja dos clases de índices para evaluar el impacto ambiental de una industria química. La primera clase mide el PEI emitido por el proceso y la otra mide la generación de PEI en el proceso. Dentro de cada clase se definen dos índices principales: los de impacto total de salida (expresado como potencial de impacto por unidad de tiempo) y los de impacto por masa de producto.

La primera clase de índices, caracteriza el PEI emitido por el sistema y su principal uso consiste en resolver preguntas acerca de la eficiencia ambiental externa del proceso, es decir, la habilidad de la planta para producir productos deseados a un mínimo potencial de impacto ambiental de descarga. La segunda clase de índices caracteriza el PEI generado por el sistema y su importancia radica en la determinación de la eficiencia ambiental interna del proceso, es decir, cuánto PEI se está generando o consumiendo en el proceso. Entre más pequeño sea el valor de estos índices, el proceso es más eficiente ambientalmente. Dado que este valor depende de la capacidad de la planta, debe usarse el índice por masa de producto si se desea evaluar el potencial de impacto ambiental independientemente del tamaño de la planta, lo cual es muy útil para efectos de comparación entre diferentes plantas o configuraciones tecnológicas de un proceso (Peitz & Xavier, 2019).

Resultados y Análisis

3.1 Aislamiento de *Aspergillus niger*

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*, presenta las características mencionadas en el numeral 2.1.

Se realizó repiques de ésta 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 (Carrillo, 2003) Imagen 13.

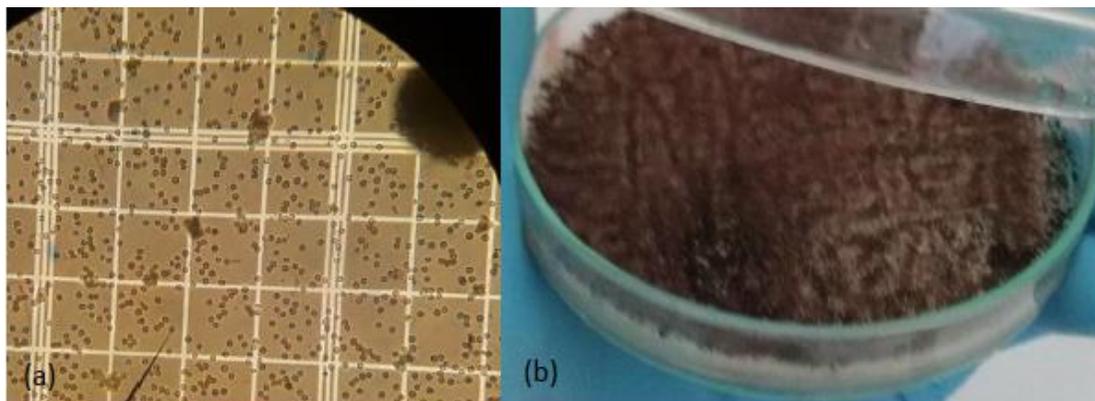
Ilustración 13 Crecimiento de colonias en el durazno. a. Fruto fresco.



Fuente: (León & Cajiao, 2018) Semillero GIMBIO y 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.

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



Fuente: (León & Cajiao, 2018) Semillero GIMBIO y Autor

3.1.1 *Aspergillus niger van Tieghem*

Características macroscópicas: Colonias en CYA de color negro o marrón muy oscuro; reverso incoloro a amarillo; colonia densa, granular a flocosa.

Colonias en MEA de color negro; micelio blanco apenas visible; reverso incoloro; textura granular a flocosa. Características microscópicas Ilustración 14: 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; métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias.

La dificultad que presenta la identificación de las especies requiere de criterios moleculares, es por ello que se propone identificar la cepa molecularmente.

3.2 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 3 resume las principales características.

Tabla 3 Características del sustrato.

Concentración de Azúcares (g/L)	47,75
pH	4,06
Ácido cítrico inicial (g/L)	1,28

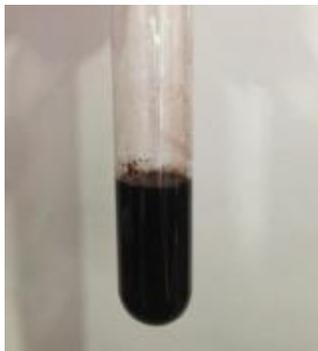
Fuente: Autor

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.

3.3 Inóculo

Mediante un raspado del medio de contención del microorganismo se prepararon 15 mL de una solución de esporas de concentración equivalente a 1.5×10^7 esporas/mL, de acuerdo con lo reportado por (Gottwald, 1985); 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 1×10^7 esporas/L dentro del fermentador. En la imagen 15 se puede observar la solución de inoculación.

Ilustración 15 Solución de inoculación

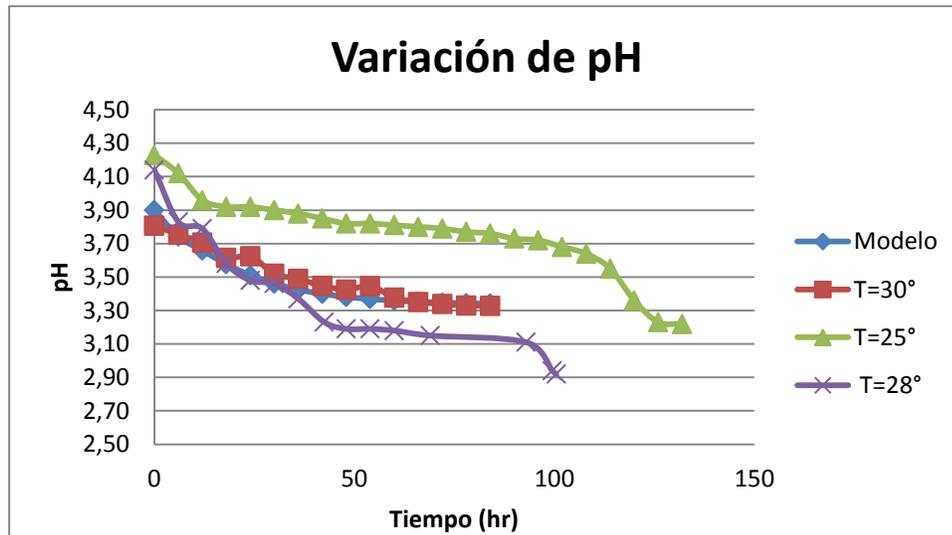


Fuente: (León & Cajiao, 2018) Semillero GIMBIO y Autor

3.4 Variables analizadas

3.4.1 Determinación de pH

La lectura del pH de cada una de las muestras de fermentación tomadas se realizó con el pH-metro ubicado en el Cepario de microbiología en la Universidad de Pamplona.

Gráfica 1 Variación de pH

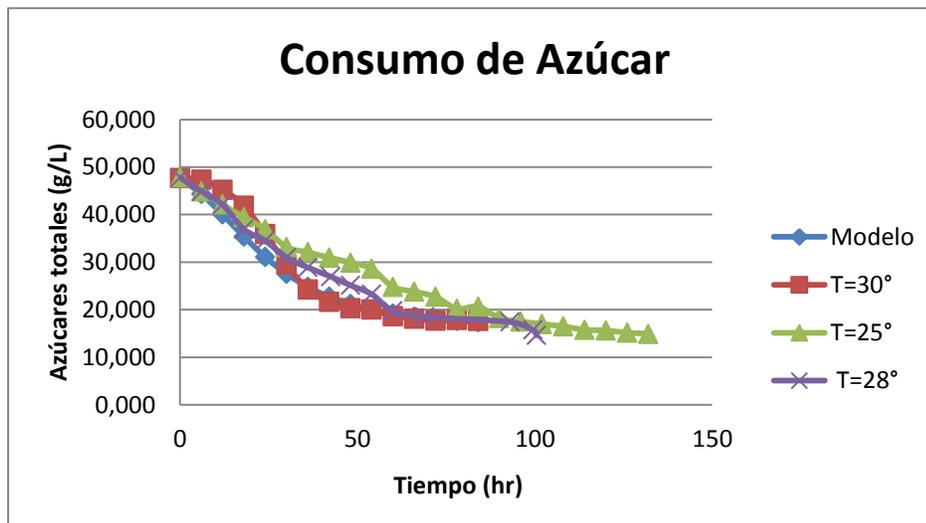
Fuente: Autor

Es posible ver que la disminución de pH es constante en cada una de las muestras, tanto para el modelo guía como para cada uno de los experimentos desarrollados.

En la gráfica 1 se puede encontrar la variación de las lecturas de pH en cada una de las muestras analizadas. Es posible identificar la disminución del pH en función del tiempo de acuerdo con la aparición del ácido como producto de interés de este proceso. El modelo teórico y el experimento a 30° presentan un mínimo de pH antes de la inhibición hasta de 3,33, para el experimento a 28°C se presentan un mínimo de hasta 2,92 de pH.

3.4.2 Determinación de azúcares

La determinación de la cantidad de azúcares consumidos presentes en el sustrato se desarrolla empleando el método de Fenol – Sulfúrico desarrollando las lecturas en el espectrofotómetro Genesys 20 Therm Spectronic con número de inventario 10022705 de la Universidad de Pamplona ubicado en el laboratorio de microbiología.

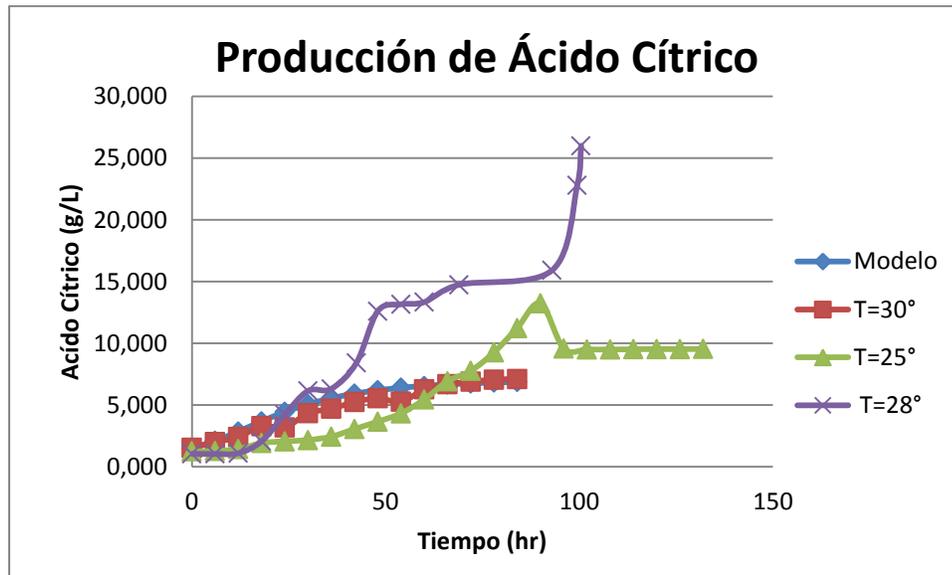
Gráfica 2 Consumo de azúcar

Fuente: Autor

En la Gráfica 2 es posible identificar la tendencia de disminución de la azúcar de acuerdo al consumo de azúcares fermentables disponibles en el sustrato a lo largo del tiempo en el que se tomaron las muestras para medición. Presenta una tendencia muy cercana al modelo teórico tomado como base para este trabajo, sin embargo el aprovechamiento de los azúcares disponibles en sustrato es de hasta el 70%.

3.4.3 Producción de Ácido Cítrico

La medición de lo producido de ácido cítrico en cada uno de los experimentos de realizó por medio del método de *Saffran-Densted*; este arrojo por medio de lecturas que para el reactor artesanal la mejor producción es de 7,092 (g/L) y para el reactor comercial a escala de laboratorio es de hasta 25,996 (g/L)

Gráfica 3 Producción de Ácido Cítrico

Fuente: Autor

La especificación en la construcción de equipos para procesos investigativos se ve influida por la profundidad en la determinación y análisis de cada una de las variables que afectan el proceso; estos se ven reflejado en la cantidad de producto obtenido en cada experimento. En cada uno de los casos anteriores se trabajó con las condiciones estándar de concentración de inoculo, grados Brix de la solución y flujo de aireación.

Tabla 4 Condiciones estándar de fermentación

Concentración de inoculo	1×10^7
Grados Brix de la solución	5
Flujo de aireación (L/min)	5

Fuente: Autor

El modelo base de comparación para este proceso igual que el experimento con una temperatura de 30°C se reportaron hasta un tiempo de 72 horas, pues a partir de allí se presenta una inhibición por producto. Esto se ve reflejado en la cinética tomada como base para el desarrollo y análisis de este trabajo reportada en (León & Cajiao, 2018).

Ecuación 2 Cinética de Monod modificada

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

Fuente: (León & Cajiao, 2018)

Siendo P la relación de producto generado, S la cantidad de sustrato adicionado y μ es la tasa de crecimiento específica de los microorganismos

El objetivo general de este trabajo es mejorar la producción de ácido cítrico por medio de fermentación, haciendo un análisis de las variables de operación. Con estos resultados es posible identificar que este objetivo fue llevado a cabalidad.

Si bien la cinética reportada presenta una inhibición por producto en la que el máximo teórico posible de producción es de hasta 7,03 g/L antes de que la producción de estanque en medio de esta inhibición. Sin embargo, con los experimentos desarrollados se logra corroborar que es posible llegar a un cantidad de producto significativamente mayor que lo reportado con anterioridad con hasta 25,996 g/L en un total de 100 horas de fermentación.

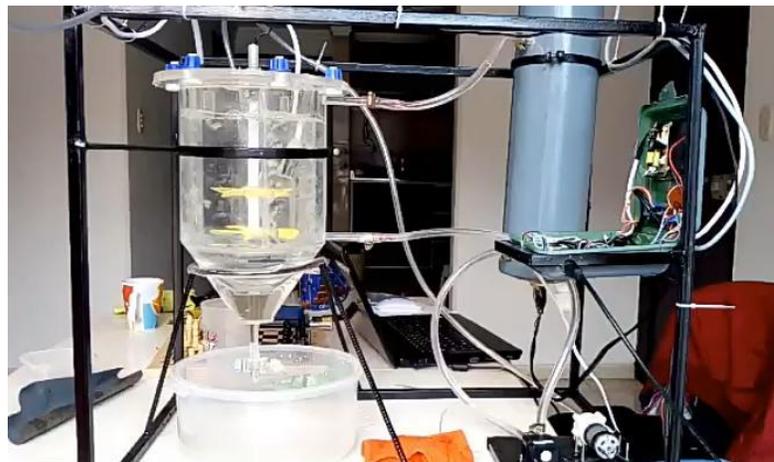
Esto es posible debido a que en la construcción del modelo cinético reportado para este proceso específico, no fue tomada en cuenta como variable influyente la temperatura de fermentación dentro del reactor; que no es solo una variable que afecte el crecimiento de la biomasa, si no que por el contrario genera las condiciones óptimas para incentivar el consumo de azúcares disponibles en el sustrato cómo es posible identificar en los experimentos con temperaturas de 25° C y 28° C que presentan un comportamiento con cercanía al modelo tomado de base, pero que de lejos se ve mejorado.

3.5 Relación de producción

La fermentación desarrollada en este proceso se desarrolló en dos reactores distintos. Uno el reactor construido artesanalmente para este proceso mostrado en la imagen 21 en el que se desarrollaron los experimentos con temperatura de 30° y 25° Celsius. El segundo reactor empleado es el Biotron LiFlus Gs de 1 L, imagen 20, ubicado en el laboratorio de microbiología del Instituto de Biotecnología y Agroindustria Investigaciones Biológicas y Agroindustriales IBA de la universidad Nacional de Colombia sede Manizales en el campus la Nubia; en el que se desarrolló el tercer experimento con una temperatura de 28° Celsius.

Ilustración 16 Reactor Lifus GX

Fuente: (Hanil Scientific, 2010)

Ilustración 17 Reactor Construido

Fuente: Autor

El reactor artesanal presenta rendimientos de producción de ácido según lo reportado en la tabla 6 de máximo 7,092 g/L para $T = 30^{\circ}\text{C}$ y 13,229 g/L para $T = 25^{\circ}\text{C}$ en promedio 10,160 g/L

El reactor comercial a escala de laboratorio con especificaciones técnicas, presenta producción máxima de 25,996 g/L para $T = 28^{\circ}\text{C}$

Es posible encontrar que si bien en los dos equipos trabajados se genera una buena producción de ácido, es notablemente grande la variación de producto que se genera en el reactor a escala de laboratorio con una relación de 25,55% de aumento de producción. Los equipos de construcción industrial podrían tener más parámetro en cuenta a la hora de su fabricación, lo que hace que los procesos desarrollados en su interior puedan generar mejores resultados.

El programa de ingeniería química de la Universidad de Pamplona, tiene la tarea de buscar recursos para invertir en equipos de laboratorio que influyan en mejorar los procesos investigativos y así aprovechar el potencial de sus alumnos y profesores.

3.6 Simulación

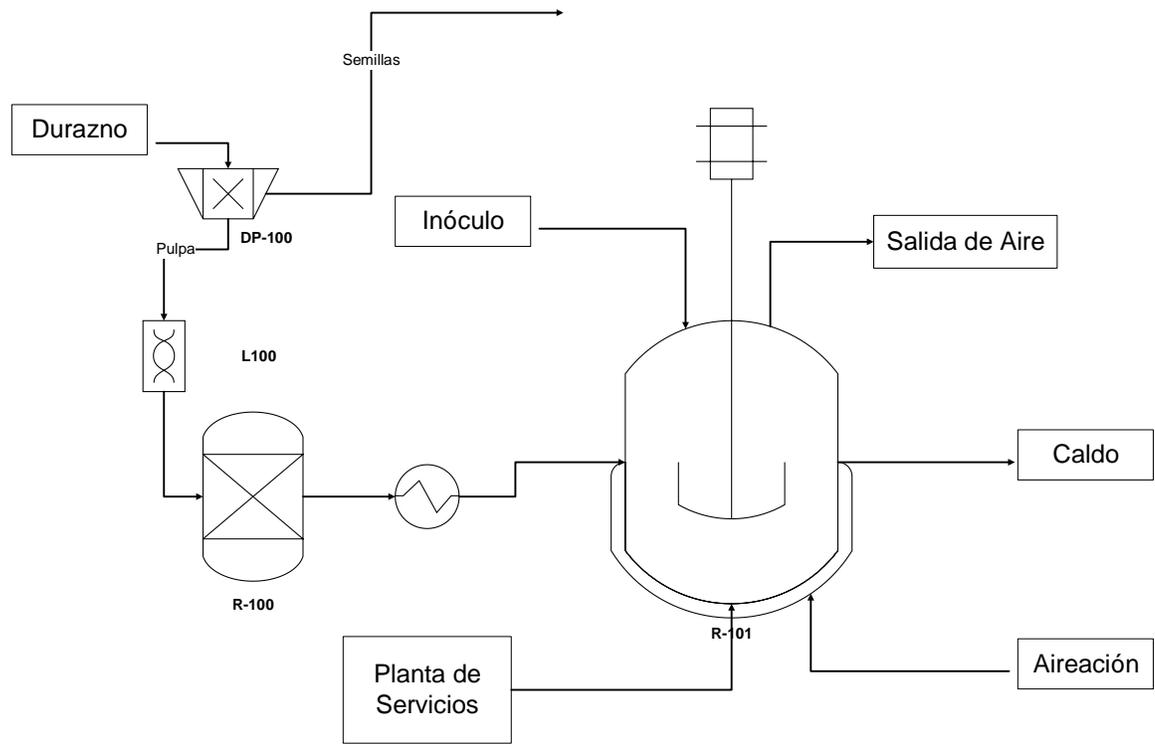
Para el desarrollo de esta simulación se empleó el software Aspen Plus V8. El modelo termodinámico que se definió y recomendado por la literatura para el proceso en cuestión fue el NRTL (Non-Random Two-Liquid model). Dicho método correlaciona y calcula sobre la base de fracciones molares y coeficientes de actividad para diferentes componentes tanto de la base de datos como los hipotéticos necesarios según (Eric C. Carlson, 1996; Suárez-Chernov, López-Díaz, & Álvarez-González, 2019), se seleccionaron componentes reportados en la tabla 5 tanto de la base de datos del programa y componentes especificados según lo reportado por (Wooley & Putsche, 1996), debido a que el proceso de tipo biológico.

Se tomó una base de cálculo de 100 kg/hr como el flujo de proceso inicialmente en una relación 70 - 30 de solución sustrato - agua debido a que es la corriente a la cual se le conocen la mayor cantidad de propiedades posibles (Henley, 1998), a temperatura y presión ambiente posteriormente llevado a la temperatura del proceso con el empleo de un intercambiador de calor en el que se realiza el pretratamiento del fluido y el control de la temperatura de reacción que es alimentado la energía requerida de la planta de servicios, para ser llevado al reactor principal el cual fue dimensionado como un CSTR de diámetro 0,14 m para un volumen de 3 L efectivos y un tiempo de residencia de 120 hr.

Tabla 5 Componentes de la simulación

Nombre del componente	Fórmula	Nombre en la base de datos	Alias en Base de datos	Estado de agregación
Celulosa	$C_6H_{10}O_5^*$	CELLULOS	C6H10O5	Sólido
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	GLUCOSE	C6H12O6	Líquido
Biomasa	$CH_{1,64}N_{0,23}O_{0,31}S_{0,0013}$	BIOMASS	CHXNXOXSX-1	Sólido
Agua	H_2O	WATER	H2O	Líquido
Oxígeno	O_2	OXYGEN	O2	Gas
Nitrógeno	N_2	NIROGEN	N2	Gas
Ácido Cítrico	$C_6H_8O_7$	CITRIC-ACID	C6H8O7	Líquido

Fuente: (Wooley & Putsche, 1996) y Autor

Ilustración 18 Diagrama de flujo de proceso de producción de Ácido Cítrico**Fuente Autor**

El proceso de fermentación de durazno para la producción de ácido cítrico empieza con el despulpe de la fruta, el licuado de la pulpa en solución a la que se le adiciona agua hasta obtener 5° Brix en el refractómetro, ésta solución es llevada al reactor en el que se desarrollan las dos reacciones principales que se discriminan en el diagrama de flujo de proceso para la simulación en dos reactores independientes, sin embargo en el proceso formal se desarrolla en el mismo; la reacción de conversión de la celulosa a glucosa, al que le entra el sustrato en solución; posteriormente la reacción de la conversión de la glucosa al ácido cítrico, que es alimentado con los azúcares disponibles, la biomasa y la relación oxígeno - nitrógeno para la aireación. Este reactor debe tener un sistema de control de temperatura, para a simulación esta se controla con suministrando los servicios necesarios al reactor para obtener las condiciones de operación. Finalmente el caldo de fermentación resultante contiene el ácido cítrico que es nuestro producto de interés en solución con agua la glucosa que no fue consumida.

Ilustración 19 Resultados simulación en Aspen Plus V8.8

	SUSTRATO	AIRE	CALDO
▶ Mass Flow kg/hr			
▶ CELULOSA	0	0	0
▶ BIOMASS	0	0	0
▶ GLUCOSA	30	0	0,0252516
▶ WATER	70	0	83,0999
▶ OXYGEN	0	45,8117	25,2057
▶ NITROGEN	0	17,1883	17,1883
▶ HEMICELU	0	0	0
▶ CITRIC-A	0	0	82,4809

Fuente: (AspenTech, 2019) Autor

El simulador después de especificar corrientes, presiones, temperaturas, flujos y reacciones; desarrolla el cálculo arrojando resultados de un consumo de azúcar del 99% en el reactor generando un flujo másico de 82,48 kg/hr de Ácido Cítrico que representa el 49,81% de flujo líquido total del caldo de fermentación, esto sin tener en cuenta el flujo de la relación Oxígeno – Nitrógeno del aire el cual sale como purga.

3.7 Cinética de producción

La cinética en la que se basó este trabajo es una cinética de Monod modificada, que presenta una inhibición por producto. Sin embargo éste arreglo matemático no presenta la influencia de la temperatura en el proceso; por tal motivo se consideró necesario desarrollar el cálculo de un modelo cinético que incluya ésta variable, usando como base el modelo propuesto por Arrhenius y empleando manejo de datos obtenidos aquí reportados, con el método de mínimos cuadrados se obtuvo la siguiente ecuación:

Ecuación 3 Cinética Arrhenius para producción de Ácido Cítrico

$$k = 2,5 \times 10^{-31} e^{-\frac{-17,232 \times 10^4 \frac{J}{mol}}{RT}}$$

Fuente: Autor

Dónde:

- k (T): Constante cinética.
- A: Factor pre exponencial.

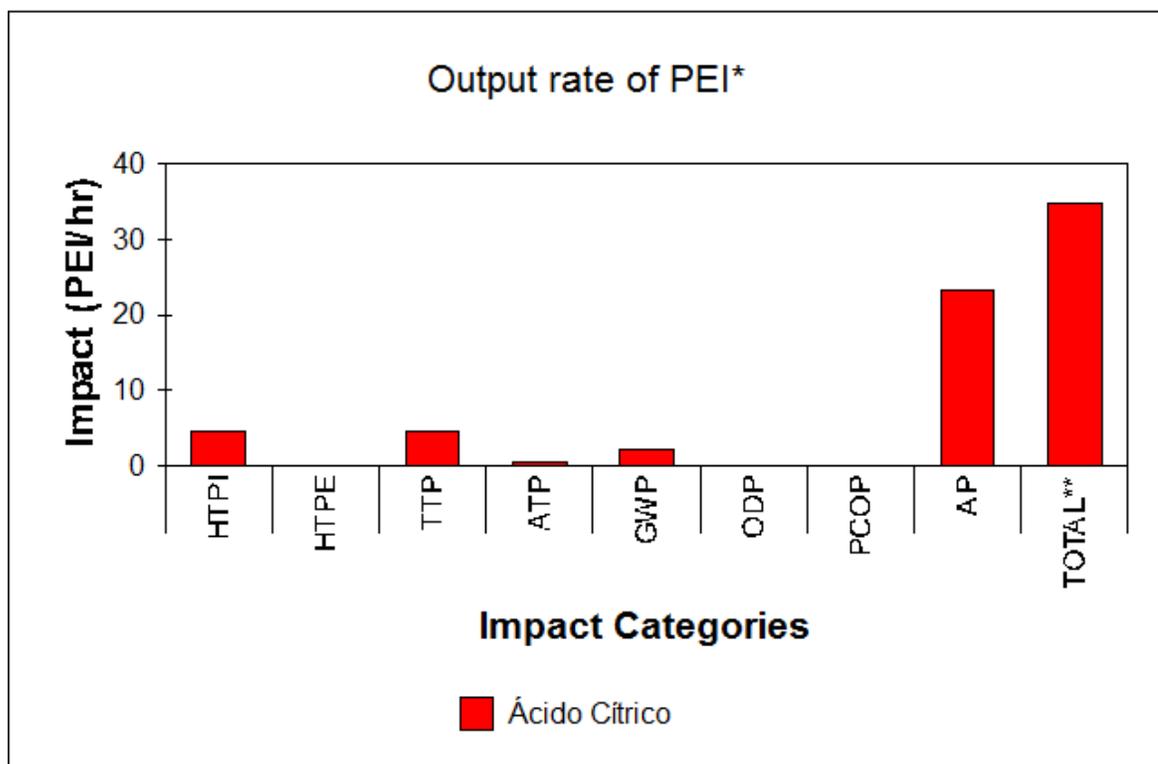
- Ea: Energía de activación, expresada en J/mol.
- R: Constante universal de los gases. Su valor es 8,3143 J·K⁻¹·mol⁻¹
- T: Temperatura absoluta [K]

Siendo $A = 2,5 \times 10^{-31}$, $E_a = -17,232 \times 10^4$ J/mol. De esta manera es posible dejar de un lado la inhibición presentada en las temperaturas de 25 y 30°C buscando la mejor velocidad de aparición del producto de interés.

3.8 Impacto Ambiental

El simulador WAR para el análisis de impacto ambiental de nuevos productos químicos como herramienta ofimática de medición es de gran utilidad, pues al especificar las condiciones de operación de reactivos y corrientes realiza el análisis.

Gráfica 4 Análisis de impacto ambiental de la producción de Ácido Cítrico



Fuente: Autor en Simulador WAR (EPA, 2017)

Los resultados reportados en la gráfica de la Gráfica 4 son valores que registran un muy bajo índice de impacto ambiental en potencial de toxicidad humana por ingestión (HTPI), potencial de toxicidad terrestre (TTP) y potencial de calentamiento global (GWP); así como un valor alto en el potencial de acidificación (AP), lo cual es de esperarse de

acuerdo con el producto de interés en este trabajo. El impacto ambiental que genera la producción de ácido cítrico es realmente mínimo comparado con la disminución de posibles impactos que podría generar el desecho inadecuado de la materia prima a la que se le está dando valor agregado de alto potencial comercial.

Conclusiones

La cepa de *Aspergillus niger* aislada para este proceso, es capaz de metabolizar los azúcares presentes en el sustrato de durazno a partir de desechos de los productores agrícolas de la región.

El durazno como sustrato, nativo de la región de Pamplona, Norte de Santander, tiene azúcares fermentables y genera un rendimiento de aprovechamiento de hasta el 70% en producción de ácido cítrico, dándole un valor agregado para un residuo de los agricultores Durazno en la región.

De acuerdo con el reactor empleado el tiempo de fermentación puede optimizarse, para el reactor artesanal construido para este proceso la mejor producción se obtiene a las 90 horas de fermentación; mientras que el reactor de laboratorio el tiempo adecuado es de 100 horas de fermentación y se encuentran en ordenes cercanos de producción, por lo cual el reactor artesanal construido es un buen acercamiento a un reactor tecnificado

La relación de producción al comparar los reactores empleados para el proceso de fermentación es de un 25,5% mayor en un reactor de laboratorio comparado con la producción en un reactor artesanal.

La producción de ácido cítrico fermentado a partir del durazno de post- cosecha de la región de Pamplona, Norte de Santander es un proceso viable que podría generar una alternativa de ingresos para el productor agrícola de la región.

El empleo de la simulación como herramienta poderosa para el análisis de la viabilidad técnica de un proceso en este caso reporta resultados de un consumo de azúcar del 99% en el reactor generando un flujo másico de 82,48 kg/hr de Ácido Cítrico que representa el 49,81% de flujo líquido total del caldo de fermentación.

Recomendaciones

Para posteriores trabajos se recomienda hacer seguimiento y tipificación molecular de la cepa nativa aislada, posible *Aspergillus niger*.

Asimismo, para el proceso productivo se debe realizar seguimiento y el control de pH durante el tiempo de residencia en el reactor, hacer alimentación de sustrato por lotes al reactor, revisar el proceso de separación del caldo y su posterior cristalización, con el fin de realizar los cálculos de costo en un diseño de ingeniería de detalle.

Bibliografía

- Agamez Ramos, Elkin Yabid; Zapata Navarro, Raúl Ignacio; Oviedo Zumaqué, Luis Eliécer; Barrera Violeth, J. L. (2008). Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp . Evaluating solid fermentation processes and substrates for producing *Trichoderma* sp . spores. *Revista Colombiana de Biotecnología*, X, nú, 23–34.
- 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/10.1080/15572536.2006.11832836>
- AspenTech. (2019). Aspen Plus | Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Recuperado el 25 de noviembre de 2019, de <https://www.utadeo.edu.co/es/continuada/educacion-continua/53376/aspens-plus>
- Beltrano, J., & Gimenez, O. (2015). *Cultivo en hidroponía*. (E. integra la R. de E. U. N. (REUN), Ed.) (Primera ed). Buenos Aires, Argentina: www.editorial.unlp.edu.ar.
- Bustillo, A. E. (2015). Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos, (August 2010). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3594.5128>
- CANCINO, S. E., CANCINO, G. O., & QUEVEDO, E. (2019). Factores determinantes de la rentabilidad económica del cultivo de durazno en la Provincia de Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Revista ESPACIOS*, 40(13).
- Candan, A. P., & Calvo, G. (2012). Poscosecha de fruta de carozo. Cerezas (*Prunus avium*) | Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Recuperado el 21 de noviembre de 2019, de <https://inta.gob.ar/documentos/poscosecha-de-fruta-de-carozo-duraznos-prunus-persica>
- Cardona, C. A., Sánchez, O. J., Montoya, M. I., & Quintero, J. A. (2005). Analysis of fuel ethanol production processes using lignocellulosic biomass and starch as feedstocks. En *7th World Congress of Chemical Engineering, GLASGOW2005, incorporating the 5th European Congress of Chemical Engineering* (pp. 85–86). Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/228898251_Analysis_of_fuel_ethanol_production_processes_using_lignocellulosic_biomass_and_starch_as_feedstocks
- Carrillo, L. (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. *Universidad Nacional de Salta*,

- Argentina*, 118.
- Demirel, G., Yaykaşlı, 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>
- 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. Recuperado de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2608/>
- EPA. (2017). Diseño de procesos sostenibles con simulación: el algoritmo de reducción de residuos (WAR) - ScienceDirect. Recuperado el 14 de diciembre de 2019, de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098135499003063>
- Eric C. Carlson. (1996). Dont Gamble With Physical Properties For Simulations. *Chemical Engineering Progress*, (October), 35–46. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/a691/8690efb562b462410b4bb82a3ec58cd694bc.pdf>
- FORCER. (2002). *Manuales sobre energía renovable: Biomasa* (1a edición).
- Garg, M. Fermentor (Biorreactor): History, Design and Its Construction, Biology Discussion § (2016). Recuperado de <http://www.biologydiscussion.com/industrial-microbiology-2/fermentor-biorreactor-history-design-and-its-construction/55756>
- Garrido, S. G. (2013). *Centrales Termoelectricas de biomasa*. (RENOVATEC, Ed.) (1era ed.). Madrid.
- Gómez Schouben, A. L. (2012). Efecto de la variación de los niveles de P & K en la producción de Ácido cítrico utilizando una cepa de *Aspergillus niger*, 111. Recuperado de <http://www.unal.edu.co>
- 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.
- Gratacós, E. (2008). El cultivo de duraznero. *Prunus persica* (L.) Batsch. En *Apuntes para la cátedra de fruticultura de hoja caduca* (p. 108).
- Hanil Scientific, I. (2010). LiFlus GX.
- Henley, E. J. (1998). Cálculo de balances de materia y energía. Recuperado el 15 de

- diciembre de 2019, de
https://books.google.com.co/books?id=gMQ_1pSwu6AC&pg=PA231&lpg=PA231&dq=porque+tomar+una+base+de+calculo&source=bl&ots=eRnEO0r9S0&sig=ACfU3U1IDA4p2WIIhKFQEHrhphbmKkLOcQ&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwizvNySrbnmAhVCw1kKHbLzAXUQ6AEwAHoECAgQAQ#v=onepage&q=porque
- 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>
- Klich, M. A., & Pitt, J. I. (1988). Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society*, 91(1), 99–108. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(88\)80010-x](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(88)80010-x)
- 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.
- León, L. C. ;, & Cajiao, A. M. (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), (1), 43. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lester, J. N., & Birkett, J. W. (2010). Microbial growth. En *Microbiology and Chemistry for Environmental Scientists and Engineers* (pp. 177–193).
https://doi.org/10.4324/9780203477397_chapter_10
- LÓPEZ RÍOS, C. A. etc. (2006). PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO CON *Aspergillus niger* NRRL 2270 A PARTIR DE SUERO DE LECHE PRODUCTION OF CITRIC ACID WITH *Aspergillus niger* NRRL 2270 FROM MILK WHEY, 150(Cmc), 39–57.
- 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. Recuperado de
https://www.researchgate.net/publication/317446150_Isolation_of_strains_of_Aspergillus_niger_which_produce_ochratoxin_A_isolated_in_stored_green_coffee_Coffea_arabica
- Lutgarda Abín, Orquídea Coto, B. M. y J. M. (2004). Estudio fisiológico de la producción

- de ácido cítrico por *Aspergillus niger* O-5. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 35. Recuperado de <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2004-1-015-018.pdf>
- Milkos, T. (2010). Métodos lineales y multicriterio. UNAM.
- Miranda, D., Fischer, G., & Carranza, C. (2013). *Influence of climatic conditions on harvest and post-harvest quality of agricultural products-Mathematical modeling View project*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/259339482>
- 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. (2015). PRODUCING, (August 2013).
- Murray, R., Bender, D., Botham, K., Kennelly, V., & Weil, P. (2008). *HARPER Bioquímica ilustrada*. Recuperado de http://www.ghbook.ir/index.php?name=هلې در سان و ف رهنگ&option=com_dbook&task=readonline&book_id=13650&page=73&chckhashk=E D9C9491B4&Itemid=218&lang=fa&tmpl=component
- Panikov, N. S. (2016). Kinetics of Microbial Processes☆. En *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.09733-5>
- Peitz, C., & Xavier, C. R. (2019). Evaluation of aerated lagoon modified with spongy support medium treating Kraft pulp mill effluent. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, (92), 60–69. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.20190725>
- 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. F. (1948). A RAPID METHOD FOR THE DETERMINATION OF CITRIC ACID*. Recuperado de <http://www.jbc.org/>
- SOLIDWORKS. (2019). Software de diseño mecánico y CAD 3D. Recuperado el 26 de noviembre de 2019, de <https://www.solidworks.com/es>
- Stambury, Peter; Whitaker, Allan; Hall, S. (1995). *PRINCIPLES OF FERMENTATION*

- TECHNOLOGY* (second edi). Hatfield: Butterworth Heinemann.
- Suárez-Chernov, V. D., López-Díaz, I., & Álvarez-González, M. (2019). Estimación De La Producción De Biogás a Partir De Un Modelo De Simulación De Procesos. *Centro Azúcar*, 46(1), 73–85.
- Tadeo, J. (2014). ASPEN PLUS, Curso teorico practico. *UJTL*, 36(2), 1–5. Recuperado de <https://www.aspentech.com/en/products/engineering/ Aspen-plus>
- USDA. (2010). Plants Profile for *Selaginella apoda*. Recuperado el 20 de noviembre de 2019, de <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=PRPE3>
- Villamizar, C; Fernández, D. (2015). CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTORES DE DURAZNO (*Prunus pérsica* (L), (L), 8.
- Villamizar, W., & Gobernador, L. (2016). *Plan de Desarrollo para Norte de “Un Norte Productivo Para Todos” Documento presentado para estudio y aprobación ante la Honorable Asamblea.*
- Wooley, R. J., & Putsche, victoria. (1996). Physical Property Database for, 1–32.
- Young, D. M., & Cabezas, H. (1999). Designing sustainable processes with simulation: The waste reduction (WAR) algorithm. *Computers and Chemical Engineering*, 23(10), 1477–1491. [https://doi.org/10.1016/S0098-1354\(99\)00306-3](https://doi.org/10.1016/S0098-1354(99)00306-3)

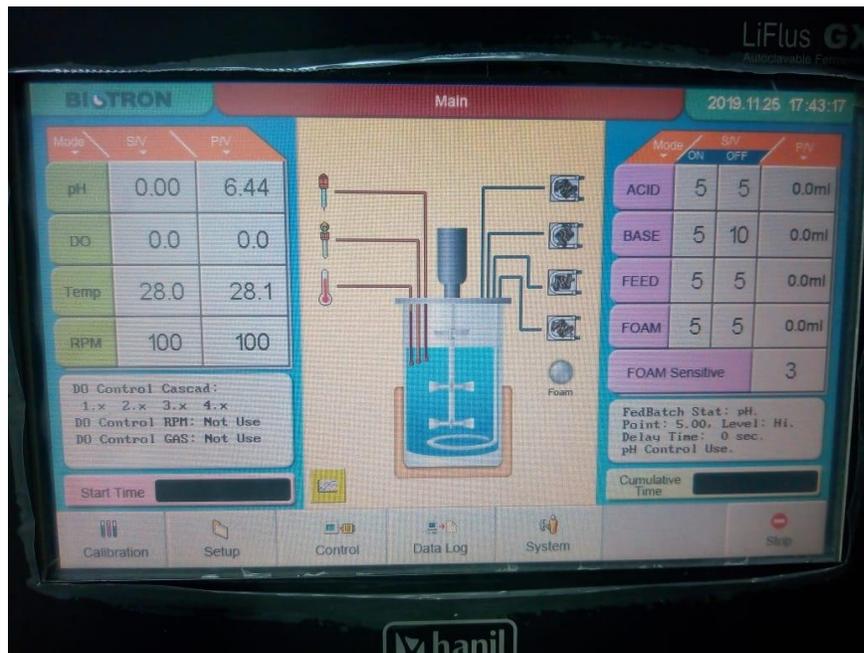
Anexos

7.1 Biorreactor Biotron LiFlus Gs

Ilustración 20 Biorreactor Biotron LiFlus Gs



Fuente: Autor

Ilustración 21 Panel de control Biorreactor Lifus GX

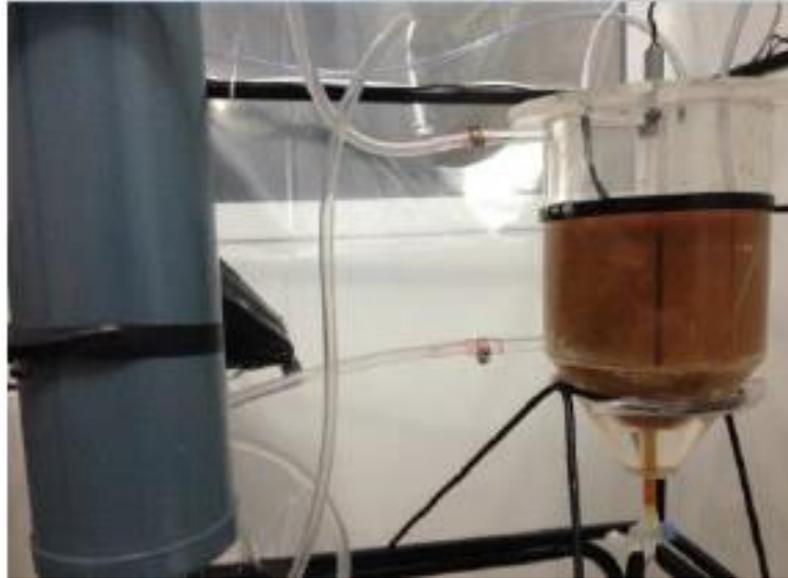
Fuente: Autor

Ilustración 22 Regulador de aireación Lifus GX

Fuente: Autor

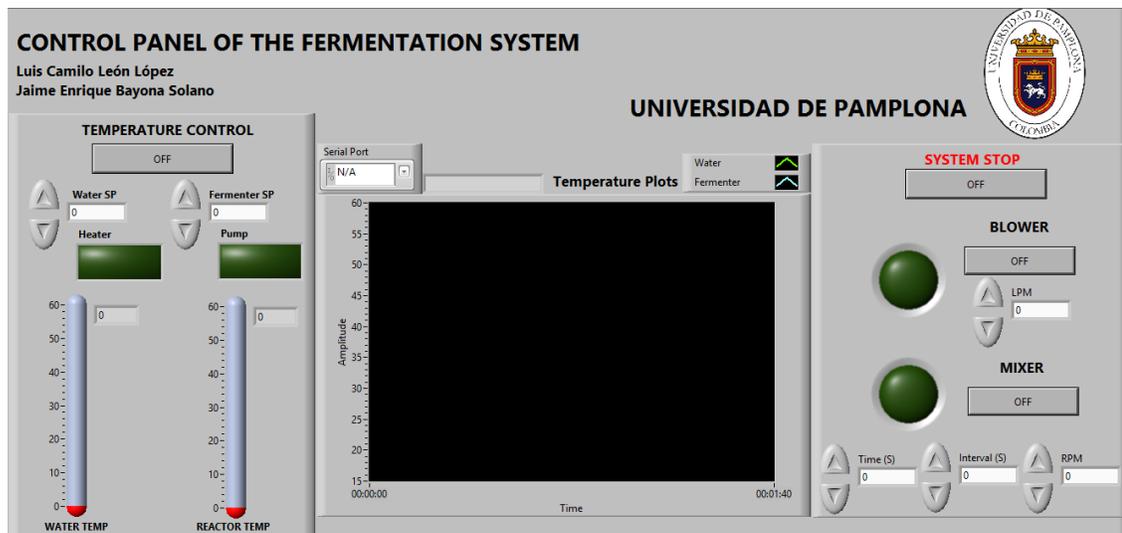
7.2 Biorreactor Construido

Ilustración 23 Biorreactor construido



Fuente: Autor

Ilustración 24 Panel de control sistema de fermentación



Fuente: Autor

7.3 Tablas de resultados

7.3.1 Variación de pH

Tabla 6 Variación de pH

pH							
Muestra	Tiempo (h)	Modelo	T= 30°	Tiempo	T= 28°	Tiempo	T= 25°
0	0	3,90	3,81	0	4,14	0	4,23
1	6	3,74	3,75	6	3,83	6	4,12
2	12	3,66	3,71	12	3,79	12	3,96
3	18	3,58	3,62	18	3,58	18	3,92
4	24	3,51	3,62	24	3,48	24	3,92
5	30	3,46	3,52	30	3,46	30	3,9
6	36	3,42	3,49	36	3,37	36	3,88
7	42	3,40	3,45	42,5	3,23	42	3,85
8	48	3,38	3,42	48	3,19	48	3,82
9	54	3,37	3,45	54	3,19	54	3,82
10	60	3,36	3,38	60	3,18	60	3,81
11	66	3,35	3,35	69	3,15	66	3,8
12	72	3,35	3,34	93	3,11	72	3,79
13	78	3,34	3,33	99,5	2,94	78	3,77
14	84	3,34	3,33	100,5	2,92	84	3,76
15						90	3,73
16						96	3,72
17						102	3,68
18						108	3,64
19						114	3,55
20						120	3,36
21						126	3,23
22						132	3,22

Fuente: Autor

7.3.2 Consumo de azúcar disponible

Tabla 7 Consumo de azúcar

Azúcares totales (g/L)							
Muestra	Tiempo (h)	Modelo	T= 30°	Tiempo	T= 28°	Tiempo	T= 25°
0	0	47,660	47,666	0	47,795	0	47,795
1	6	44,341	47,381	6	44,890	6	44,890
2	12	40,033	45,245	12	42,112	12	42,112

3	18	35,378	41,900	18	36,921	18	39,456
4	24	31,089	35,920	24	34,509	24	36,921
5	30	27,550	29,585	30	30,976	30	33,190
6	36	24,805	24,246	36	28,894	36	32,067
7	42	22,735	21,684	42,5	26,947	42	30,976
8	48	21,189	20,331	48	25,141	48	29,918
9	54	20,034	20,046	54	23,275	54	28,633
10	60	19,167	18,623	60	19,751	60	24,814
11	66	18,513	18,124	69	18,538	66	23,817
12	72	18,016	17,697	93	17,408	72	22,705
13	78	17,638	17,840	99,5	15,790	78	20,211
14	84	17,358	17,626	100,5	14,624	84	20,655
15						90	18,248
16						96	17,511
17						102	16,992
18						108	16,471
19						114	15,784
20						120	15,620
21						126	15,172
22						132	14,921

Fuente: Autor

Producción de Ácido Cítrico

Tabla 8 Producción de Ácido Cítrico

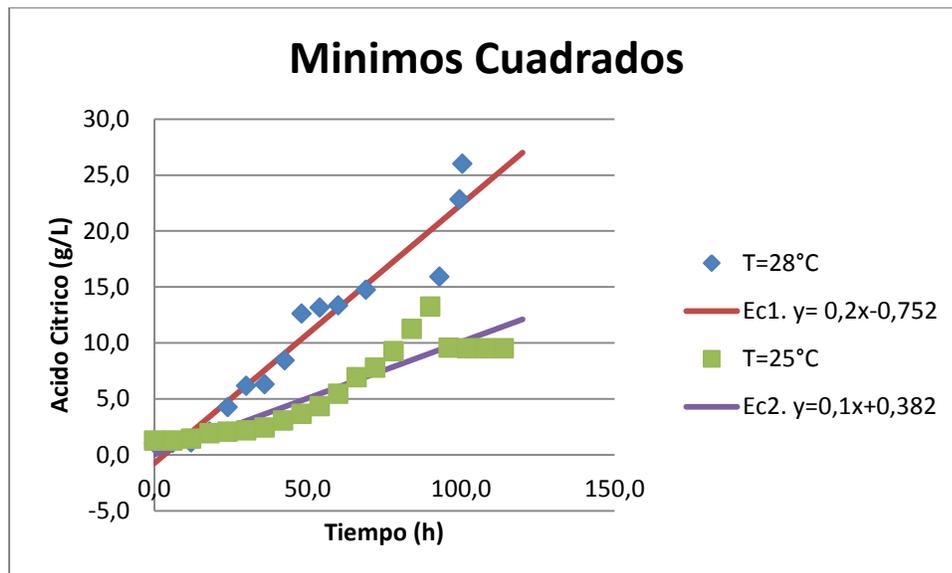
Ácido Cítrico (g/L)							
Muestra	Tiempo (h)	Modelo	T= 30°	Tiempo	T= 28°	Tiempo	T= 25°
0	0	1,500	1,542	0	1,040	0	1,250
1	6	2,088	1,987	6	1,031	6	1,269
2	12	2,850	2,412	12	1,089	12	1,440
3	18	3,674	3,283	18	2,061	18	1,911
4	24	4,433	3,186	24	4,238	24	2,057
5	30	5,059	4,327	30	6,143	30	2,159
6	36	5,545	4,694	36	6,305	36	2,434
7	42	5,912	5,236	42,5	8,419	42	3,049
8	48	6,185	5,545	48	12,598	48	3,652
9	54	6,390	5,255	54	13,157	54	4,319
10	60	6,543	6,261	60	13,329	60	5,443
11	66	6,659	6,686	69	14,739	66	6,927
12	72	6,747	6,880	93	15,909	72	7,760
13	78	6,814	7,054	99,5	22,798	78	9,261

14	84	6,865	7,092	100,5	25,996	84	11,232
15						90	13,229
16						96	9,564
17						102	9,499
18						108	9,492
19						114	9,509
20						120	9,526
21						126	9,519
22						132	9,540

Fuente: Autor

7.4 Cálculo de la cinética de producción

Gráfica 5 Ajuste matemático



Fuente: Autor