



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE *Aspergillus niger* ATCC 16888

Autores:

Rosas Criollo María Belén
Terán Fuentes Diego Felipe

Directora:

Dra. Lucía Yépez Vásquez, Msc.

Comité Lector:

Ing. Jimmy Cuarán, Msc.
Ing. Marcelo Vacas, Msc.
Ing. Carlos Paredes

Ibarra – Ecuador

2015

Lugar de la investigación:

Laboratorio de análisis físicos - químicos y microbiológicos de la Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte

HOJA DE VIDA DE LA INVESTIGADORA



APELLIDOS:	Rosas Criollo
NOMBRES:	María Belén
C. CIUDADANÍA:	100291116-0
TELÉFONO CONVENCIONAL:	062 600804
TELÉFONO CELULAR:	0991970913
CORREO ELECTRÓNICO:	mabel.rosas87@gmail.com
DIRECCIÓN:	Imbabura – Ibarra – San Francisco – Rocafuerte 21-19 y Tobías Mena

HOJA DE VIDA DEL INVESTIGADOR



APELLIDOS:	Terán Fuentes
NOMBRES:	Diego Felipe
C. CIUDADANÍA:	100286353-6
TELÉFONO CONVENCIONAL:	062 533196
TELÉFONO CELULAR:	0991688383
CORREO ELECTRÓNICO:	felikter_87@hotmail.com
DIRECCIÓN:	Imbabura – Antonio Ante – Chaltura – Obispo Mosquera y Amazonas

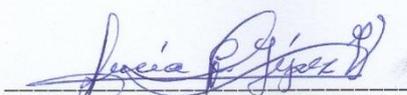
FORMATO DEL REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

ROSAS CRIOLLO, MARÍA BELÉN Y TERÁN FUENTES, DIEGO FELIPE.
OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA,
MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE *Aspergillus niger* ATCC
16888/ TRABAJO DE GRADO. Universidad Técnica del Norte. Carrera de
Ingeniería Agroindustrial. Ibarra 21 de Mayo de 2015.

DIRECTORA: Yépez Vásquez, Lucía

La obtención de ácido cítrico partiendo de materias primas como melaza o cachaza, mediante un proceso de fermentación con ayuda de *Aspergillus niger*, es un aporte a mejorar el uso de estas materias obtenidas de las industrias azucareras y paneleras respectivamente. Esta investigación consto de tres etapas, las cuales fueron: fermentación, purificación y cristalización, controlando en cada una de ellas ciertos parámetros que son fundamentales para el desarrollo del microorganismo y del producto final.

Ibarra 21 de Mayo de 2015



Dra. Lucía Yépez Vásquez
Directora de Tesis



María Belén Rosas Criollo
Autora



Diego Felipe Terán Fuentes
Autor

ARTÍCULO CIENTÍFICO

TÍTULO: OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE *Aspergillus niger* ATCC 16888

AUTORES:

Rosas Criollo María Belén
Terán Fuentes Diego Felipe

DIRECTORA:

Dra. Lucía Yépez Vásquez

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener ácido cítrico a partir de melaza o cachaza, mediante fermentación utilizando cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16888, esta investigación genera una alternativa para mejorar el uso de estas materias primas, obtenidas de las industrias azucareras y paneleras respectivamente.

Esta investigación consto de tres etapas, las cuales fueron: fermentación, purificación y cristalización.

Los resultados obtenidos en esta investigación con la materia prima cachaza no fueron viables, ya que no es un medio de cultivo apto para el crecimiento de los microorganismos por su baja cantidad de carbohidratos, caso contrario sucedió con la materia prima melaza, con la cual los resultados fueron favorables. Luego de un análisis se determinó que el mejor tratamiento es el A1N1 (1 % de inóculo y 0,2 g de nitrato de amonio), con un rendimiento de 10,18 g/l; pureza de 97,38 % y un tiempo de fermentación de 186,67 horas.

ABSTRACT

The goal of this work was to obtain citric acid from molasses or cachaza, through by fermentation using *Aspergillus niger* strain, ATCC 16888, this research generates an alternative to improve the use of these raw materials obtained from sugar industries and panela respectively.

This study consisted of three stages, which were: fermentation, purification and crystallization.

The results obtained in this research with the raw material (cachaza) were not viable, since it is not a means of suitable cultivation for the growth of microorganisms by its low concentration of carbohydrates, otherwise happened with the raw material molasses, so which the results were favorable. After an analysis it was determined that the best treatment is the A1N1 (1 % inoculum and 0,2 g of ammonium nitrate), in a yield of 10,18 g/l; purity of 97,38 % and a fermentation time of 186,67 hours.

2. PALABRAS CLAVE

Ácido Cítrico, Melaza, Fermentación, *Aspergillus niger*, Biorreactor.

KEYWORDS

Citric Acid, Molasses, Fermentation, *Aspergillus niger*, Bioreactor.

3. INTRODUCCIÓN

La presente investigación tuvo como fin establecer la mejor forma de producir ácido cítrico a nivel de laboratorio tomando como sustrato cachaza o melaza de caña, que es un subproducto de las industrias paneleras y azucareras respectivamente y que tienen gran importancia por su contenido en azúcares, fibra, proteína y otros componentes, lo cual hace que sean un excelente medio de cultivo para fermentaciones industriales, de esta forma damos a conocer un nuevo método de utilización de estos subproductos. Actualmente en Ecuador no existe producción de ácido cítrico a nivel industrial debido a la falta de tecnología y a una metodología concreta desarrollada para las condiciones que se presentan a nivel local. Con esta investigación en producción de ácido cítrico a nivel experimental (laboratorio), la comunidad en general está en condiciones de adaptarlo y llevarlo a un nivel industrial, con el fin de aprovechar y diversificar estos subproductos de las industrias panelera y azucarera, que bien se convertiría en una fuente de ingresos económicos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un Diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA) en el cual se evaluaron 8

tratamientos y 3 repeticiones. Los sustratos e insumos utilizados se presentan en la siguiente tabla:

Materias primas e Insumos	
Melaza	Agua destilada
Cachaza	Alcohol industrial
Cepa de <i>Aspergillus niger</i>	Desinfectante
Nitrato de amonio	Cloro
Ácido fosfórico	Algodón
Hidróxido de calcio	Papel aluminio
Ácido sulfúrico	

La investigación costó de tres etapas: Etapa de fermentación, Etapa de purificación y Etapa de cristalización.

ETAPA DE FERMENTACIÓN

Se utilizó un biorreactor de capacidad de 3 litros, el cual controla temperatura, aireación, agitación y pH.

Para la fermentación se preparó una solución que actuará como sustrato para el desarrollo del microorganismo que consta de 900 ml de melaza y 2100 ml de agua destilada, se acidifico con ácido fosfórico hasta llegar a un pH entre 3,5 – 4,5 y se agregó nitrato de amonio como nutriente según indica cada tratamiento, esto se esterilizo en el autoclave a 121 °C, 1 atm, 15 minutos, una vez enfriado se colocó en el fermentador previamente esterilizado. Se realizó un raspado de esporas de acuerdo a la cantidad planteada para cada tratamiento, esto se inoculo en la solución sustrato y se inició la fermentación en las siguientes condiciones: temperatura de 28 °C, 200 rpm, aireación, por un tiempo ≥ 6 días. La toma de datos se realizó cada 8 horas durante toda la etapa de fermentación.

ETAPA DE PURIFICACIÓN

Una vez concluida la fermentación se obtuvo un caldo fermentado al que se llevó a temperatura de 50 °C para ser añadido hidróxido de calcio al 10 % hasta llegar a un pH neutro, esto lleva a la formación de citrato cálcico el cual es sólido y se precipita al momento de colocarlo en la centrífuga a 6000 rpm por un tiempo de 6 minutos, posteriormente se realizó varios lavados con agua destilada a temperatura de 40 °C con el fin de eliminar la mayor cantidad de impurezas. Inmediatamente a este citrato se añadió ácido sulfúrico al 10 % en la misma cantidad de hidróxido de calcio más un 5 % extra para asegurarnos que todo el citrato cálcico reaccione y se precipite en forma de yeso o sulfato cálcico, esto se llevó a la centrifuga, permitiendo así liberar el ácido cítrico que se encuentra en forma líquida, del yeso que se encuentra en forma sólida, la centrífuga trabajó a 6000 rpm por un tiempo de 6 minutos.

ETAPA DE CRISTALIZACIÓN

El ácido cítrico líquido se llevó a evaporación, dejando 20 ml de este para ser utilizado más adelante en el proceso, en el evaporador se controló la temperatura, que debe ser de 38 ± 1 °C, este proceso toma alrededor de 4 horas dependiendo de la cantidad de agua que contenga, se evaporó hasta llegar a una concentración ≥ 40 °Brix. Paralelo a este proceso se preparó una solución semilla, tomando 1 g de ácido cítrico comercial en 100 ml de alcohol. A continuación se retiró el concentrado del evaporador y se colocó en un recipiente en donde se agregó 10 ml de la solución semilla manteniendo la temperatura a 38 ± 1 °C y con agitación constante, en estas condiciones se va concentrando esta miel y a

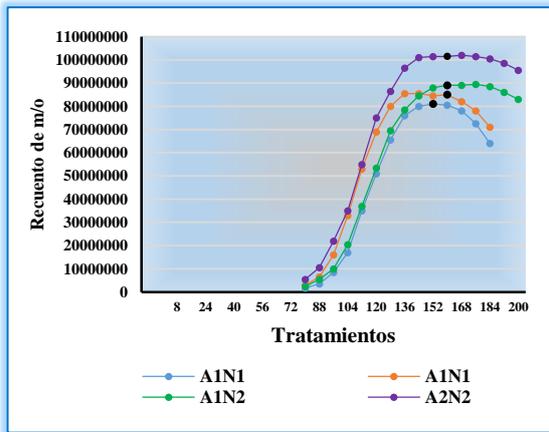
la vez formándose los primeros cristales donde se observa gran cantidad de estos, entre finos y gruesos, se agregó 10 ml de agua destilada con el fin de diluir el cristal fino y que este diluido se una al resto para formar cristales de mayor tamaño mediante concentración, en las mismas condiciones que se está trabajando, con el propósito de obtener un cristal uniforme y de buen tamaño se alimenta con 10 ml de ácido cítrico líquido y se continua concentrando, esta alimentación se la realizó por una ocasiones más en la que se continua concentrando hasta obtener los cristales definitivos.

Los cristales obtenidos se encuentran con un grado de humedad elevado, por lo que es necesario realizar un proceso de deshidratación en donde la temperatura debe ser de 35 ± 1 °C. Una vez concluida esta etapa se procedió a pesar el producto e inmediatamente se envasó en frascos de vidrio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se debe tomar en cuenta que los resultados obtenidos fueron positivos solamente con la materia prima melaza, debido a que la cachaza es un medio con bajo contenido nutricional, lo cual hace que no sea un medio apto para el desarrollo del microorganismo, debido a este motivo los resultados expresados en esta investigación son únicamente de melaza.

Gráfico 1. Curva de crecimiento



Se observa en el gráfico 1 que el tiempo óptimo de fermentación corresponde al tratamiento **A2N2** (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) con la cantidad más alta de crecimiento del microorganismo, producido en 160 horas y por ende se obtuvo un rendimiento de ácido cítrico elevado.

Gráfico 2. Interacción Rendimiento - Pureza

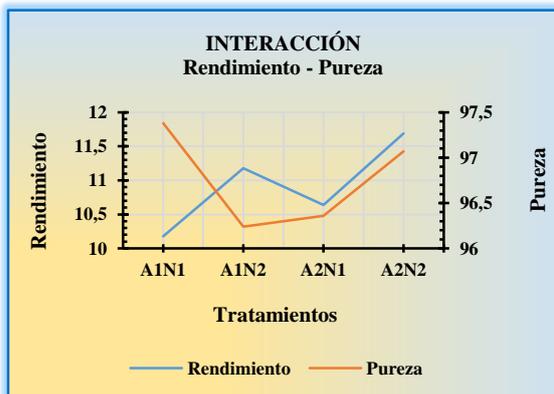
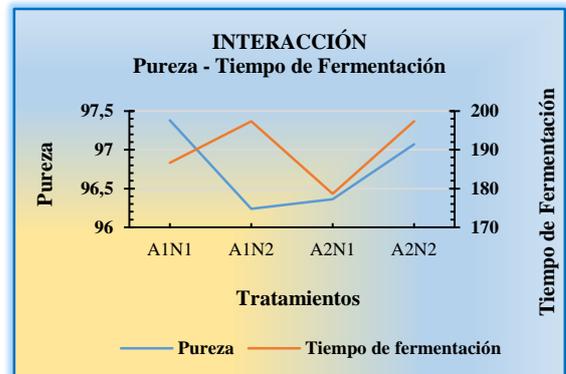


Gráfico 3. Interacción Pureza – Tiempo de Fermentación



En los Gráficos 2 y 3 podemos observar que las interacciones entre Rendimiento – Pureza y Pureza – Tiempo de Fermentación, apuntan a que el mejor tratamiento es **A1N1** (1 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente), debido a que el grado de pureza es elevado en comparación al resto de tratamientos, lo que nos indica que a pesar de que su rendimiento sea menor, su contenido de ácido cítrico se encuentra más libre de impurezas, de igual manera se puede observar que el tiempo de fermentación es aceptable ya que no difiere del menor tiempo con tan solo 8 horas.

6. CONCLUSIONES

Al utilizar melaza como sustrato, se observó un excelente crecimiento del hongo *Aspergillus niger*, concluyendo así, que este sustrato es un medio de cultivo idóneo para el desarrollo de este, esto se confirma con los resultados de los análisis físicos – químicos, en donde se evidencia un alto contenido de carbohidratos, mientras que al utilizar cachaza, se observó que no existe crecimiento del microorganismo, ya que este sustrato no aporta con los carbohidratos necesarios para el desarrollo del

mismo, resultado que se confirma con el mismo análisis mencionado.

Durante toda la etapa de fermentación, se observó que los valores de pH se mantuvieron fluctuando entre 3,5 – 3,8; por lo que se concluye que, la producción de ácido cítrico se lleva a cabo durante todo el proceso de crecimiento del microorganismo.

Una vez realizadas las interacciones entre Rendimiento – Pureza y Pureza – Tiempo de Fermentación, se concluye que el mejor tratamiento es A1N1 (1 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente), observando que su grado de pureza es de 97,38 %, con un rendimiento de 10,18 g/l y un tiempo de fermentación aceptable de 186,67 horas.

Se acepta parcialmente la hipótesis afirmativa planteada al inicio de la investigación, es decir, que los subproductos de la industria azucarera (melaza) y la cantidad de nutriente permiten obtener ácido cítrico, mientras que la cachaza no es una materia prima adecuada para la obtención de ácido cítrico.

7. RECOMENDACIONES

La fuente de materia orgánica y sacarosa que se utilizó (melaza), para el desarrollo del microorganismo fue esencial en la investigación, por esta razón se recomienda el análisis de otras fuentes ricas en materia orgánica y sacarosa como podrían ser otros residuos agroindustriales.

Dentro del proceso de purificación, se recomienda utilizar un método de clarificación

eficiente para el ácido cítrico líquido, antes de continuar con el proceso de cristalización.

Realizar un estudio de factibilidad para la implementación de una planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de la industria azucarera, con el fin de cubrir la demanda nacional del producto.

8. BIBLIOGRAFÍA

Campués Tulcán, J. K., & Tarupí Rosero, J. C. (2011). *Obtención de Alcohol a partir de jugo de caña, cachaza y melaza, mediante la incorporación de dos niveles de fermento (saccharomyces cerevisiae)*. Universidad Técnica del Norte, Ibarra.

CINCAE. (15 de Abril de 2013). *Centro de investigación de la caña de azúcar del Ecuador*. Obtenido de www.cincae.org.

Espinoza Chancay, P., & Pincay Porras, S. (2012). *Elaboración de una Bebida Probiótica con Cultivos de Típicos*. Guayaquil.

Freire Reyes, A. E., & Landázuri Ortiz, R. K. (2011). *Determinación de los requisitos mínimos de calidad para Panela, Azúcar Orgánico y Miel Hidrolizada en la Provincia de Imbabura*.

Romero Robles, L., & Rodríguez Esparza, B. (2014). *Química experimental. Manual de Laboratorio*. Pearson Educación.

Velásquez, J., 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,
135.

White, M. (2010). Clasificación del *Aspergillus*
niger.

[http://www.ehowenespanol.com/clasificacion-
del-aspergillus-niger-sobre_47007/](http://www.ehowenespanol.com/clasificacion-del-aspergillus-niger-sobre_47007/).