



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES

INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

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

Tesis previa a la obtención del Título de  
Ingeniero Agroindustrial

**Autores:**

*Rosas Criollo María Belén  
Terán Fuentes Diego Felipe*

**Directora:**

*Dra. Lucía Yépez*

*Ibarra – Ecuador  
2015*



# INTRODUCCIÓN





Bagazo  
30 %  
300 kg/Ton de caña



Melaza  
29 – 41,6 litros/Ton de caña



Cachaza  
3 – 4 %

# OBJETIVOS

*Objetivo  
General*



Obtener ácido cítrico  
a partir melaza o  
cachaza, mediante  
fermentación  
utilizando cepa de  
*Aspergillus niger*  
ATCC16888

# Objetivos Específicos

Establecer curvas de crecimiento de los microorganismos vs concentración de nutriente

Determinar el medio de cultivo adecuado en base a los nutrientes.

Determinar la pureza del producto obtenido.

Monitorear el pH en el proceso de la fermentación.

Calcular el rendimiento final del ácido cítrico.

## *Hipótesis Afirmativa*

Los subproductos de la industria azucarera (cachaza o melaza) y la cantidad de nutriente, permiten obtener ácido cítrico.

## *Hipótesis Nula*

Los subproductos de la industria azucarera (cachaza o melaza) y la cantidad de nutriente, no permiten obtener ácido cítrico.

# MATERIALES Y MÉTODOS



# Caracterización del área de estudio

<b>Provincia</b>	Imbabura
<b>Cantón</b>	Ibarra
<b>Latitud geográfica:</b>	00° 19' 47" N
<b>Longitud geográfica:</b>	78° 07' 56" W
<b>Altitud:</b>	2256 msnm
<b>Temperatura Media (°C)</b>	17,7
<b>Mx. absoluta. (°C)</b>	32,8
<b>Mn. absoluta. (°C)</b>	1,4
<b>Humedad relativa del aire media (%)</b>	72

La investigación se realizó en dos sectores: la primera fase en las calles Río Chambo 3-55 entre Río Amazonas y Río Blanco y la segunda fase en los laboratorios de análisis físico - químicos y microbiológicos de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales de la Universidad Técnica del Norte.

Ubicación y datos meteorológicos del experimento  
(INAMHI, 2015)

# Materiales y Equipos

## Materias Primas

- ☞ Cachaza
- ☞ Melaza

## Insumos

- ☞ Ácido sulfúrico  $H_2SO_4$  (10 %)
- ☞ Hidróxido de calcio  $Ca(OH)_2$  (10 %)
- ☞ Fuente nitrogenada; Nitrato de amonio  $NH_4NO_3$
- ☞ Cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16888
- ☞ Ácido fosfórico  $H_3PO_4$

## Materiales de laboratorio

- ☞ Cajas Petri
- ☞ Tubos de ensayo
- ☞ Mechero de bunsen
- ☞ Gradilla
- ☞ Aza metálica
- ☞ Vasos de precipitación
- ☞ Erlenmeyer
- ☞ Probeta

## Equipos

- ☞ Biorreactor
- ☞ Balanza gramera digital
- ☞ Autoclave
- ☞ Cocina eléctrica
- ☞ Estufas
- ☞ Plancha agitadora

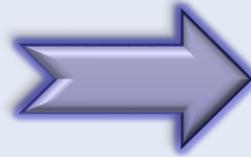
- ☞ Pipetas
- ☞ Piseta
- ☞ Barra de agitación
- ☞ Soporte universal
- ☞ Pinza doble nuez
- ☞ Bureta
- ☞ Tubos de centrifuga

- ☞ Baño maría
- ☞ Brixómetro
- ☞ Centrifuga
- ☞ Deshidratador
- ☞ Microscópico
- ☞ Termómetro



# Diseño Experimental

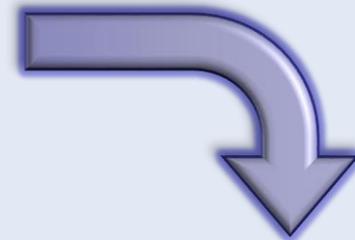
Para la investigación se planteo un diseño de bloques completo al azar (DBCA) con arreglo factorial  $A \times B \times C$ , en donde A corresponde al porcentaje de inóculo, B a la cantidad de nutriente y C a las materias primas.



En el resultado de la investigación se opto por cambiar a un diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial  $A \times B$ , en donde A corresponde al porcentaje de inóculo y B a la cantidad de nutriente.

## Características del experimento

Número de repeticiones: Tres (3)  
Número de tratamientos: Ocho (8)  
Número de unidades experimentales: Veinte y cuatro (24)



Número de repeticiones: Tres (3)  
Número de tratamientos: Cuatro (4)  
Número de unidades experimentales: Doce (12)

# Unidad experimental

Cada unidad experimental estuvo conformada por 3 litros de materia prima.

## Factores en estudio

**Factor A:** Porcentaje de inóculo

**A1** = 1%

**A2** = 1,5 %

**Factor B:** Cantidad de nutriente

**N1** = 0,2 g de amoniaco / l

**N2** = 0,4 g de amoniaco / l

**Factor C:** Materias primas

**M1** = Cachaza panelera

**M2** = Melaza azucarera



**Factor A:** Porcentaje de inóculo

**A1** = 1%

**A2** = 1,5 %

**Factor B:** Cantidad de nutriente

**N1** = 0,2 g de amoniaco / l

**N2** = 0,4 g de amoniaco / l

# Tratamientos

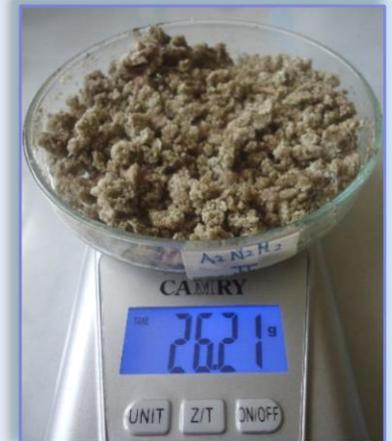
Tratamientos	% de inóculo	Cantidad de nutriente	Materias primas	Combinaciones
T1	A1	N1	M1	A1N1M1
T2			M2	A1N1M2
T3		N2	M1	A1N2M1
T4			M2	A1N2M2
T5	A2	N1	M1	A2N1M1
T6			M2	A2N1M2
T7		N2	M1	A2N2M1
T8			M2	A2N2M2



Tratamientos	% de inóculo	Cantidad de nutriente	Combinaciones
T1	A1	N1	A1N1
T2		N2	A1N2
T3	A2	N1	A2N1
T4		N2	A2N2

# VARIABLES A EVALUARSE

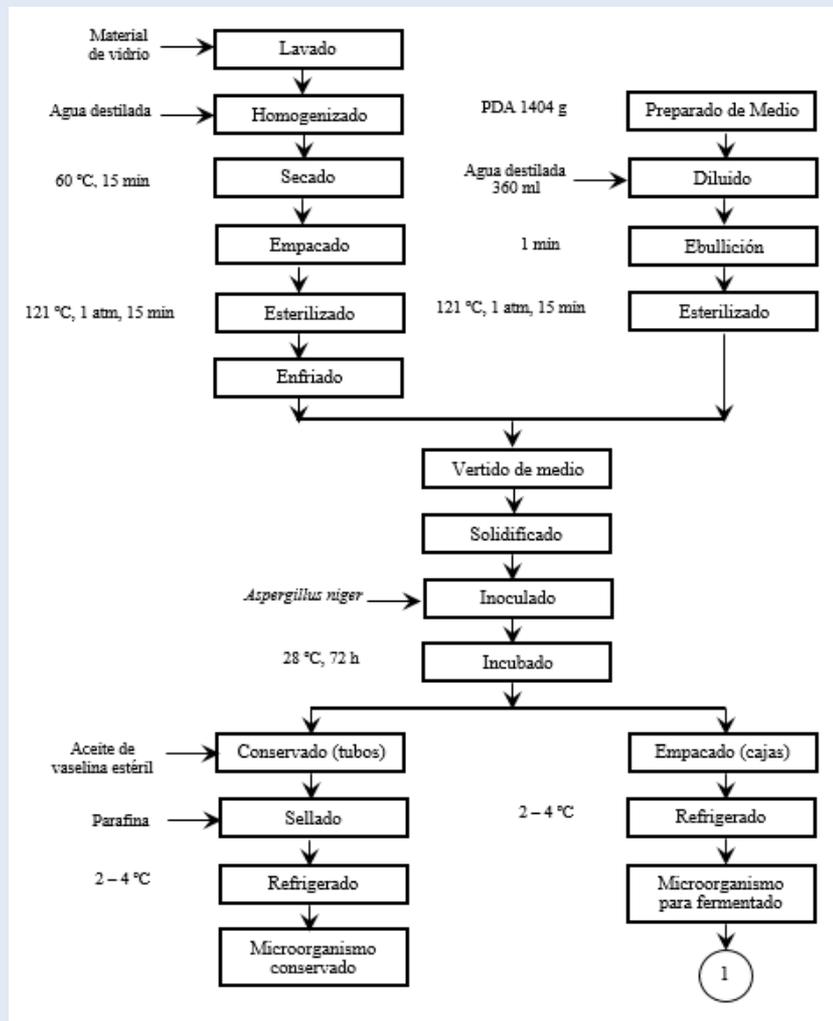
- ⌘ pH
- ⌘ Rendimiento de ácido cítrico
- ⌘ Pureza del producto terminado
- ⌘ Humedad del producto terminado
- ⌘ Tiempo de fermentación



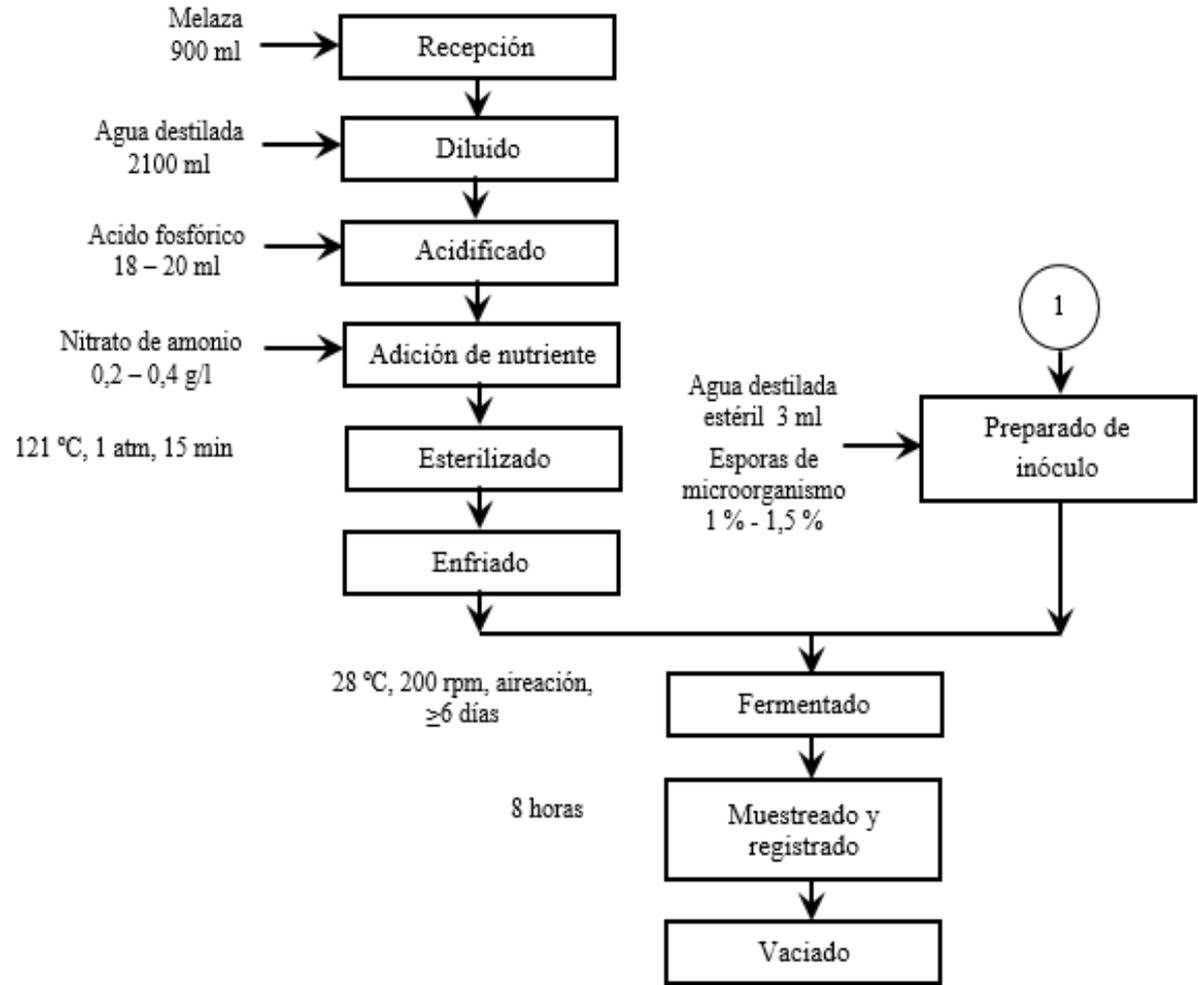


**MANEJO  
ESPECÍFICO  
DEL  
EXPERIMENTO**

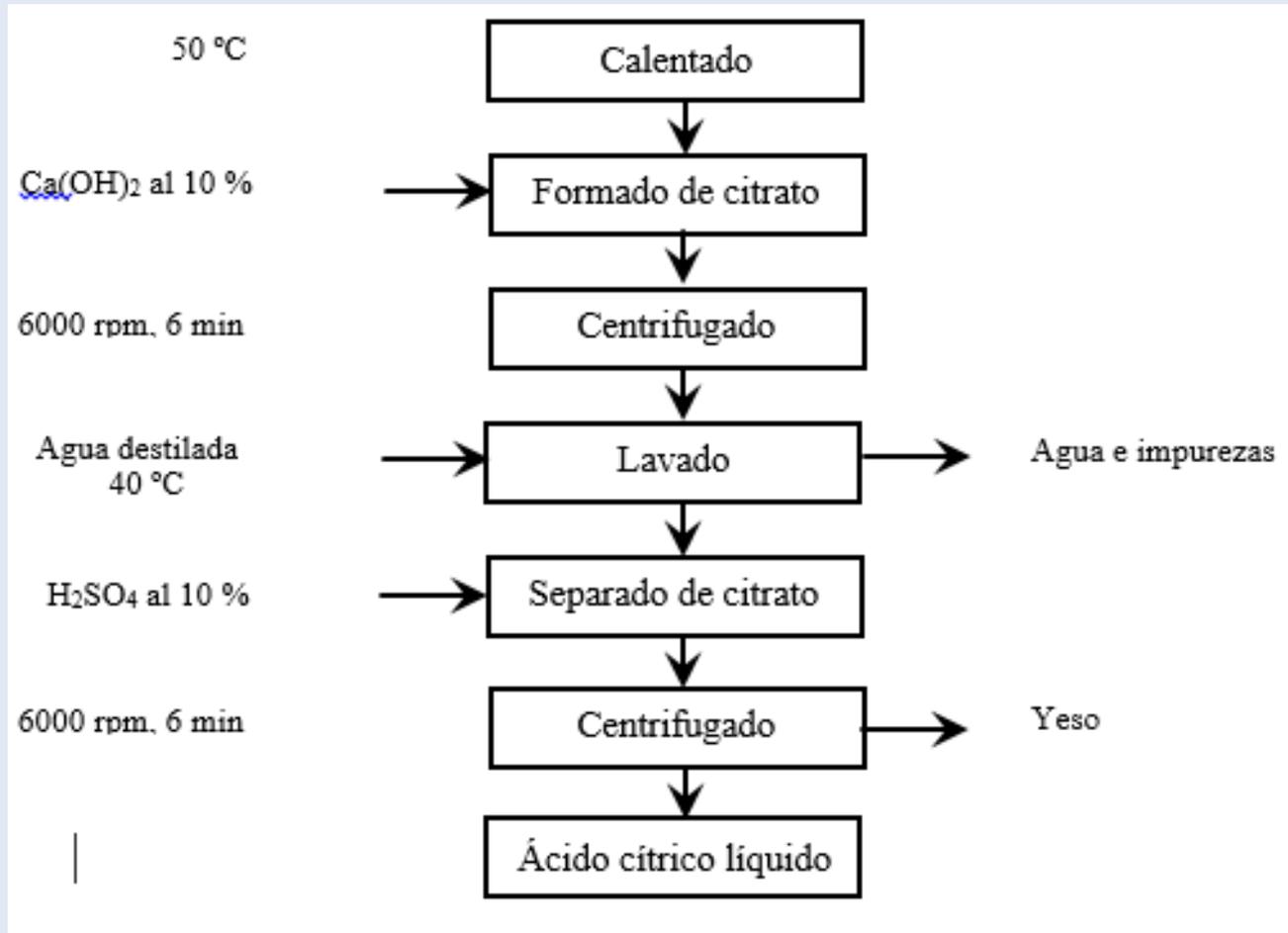
# Reproducción y conservación de la cepa *Aspergillus niger*



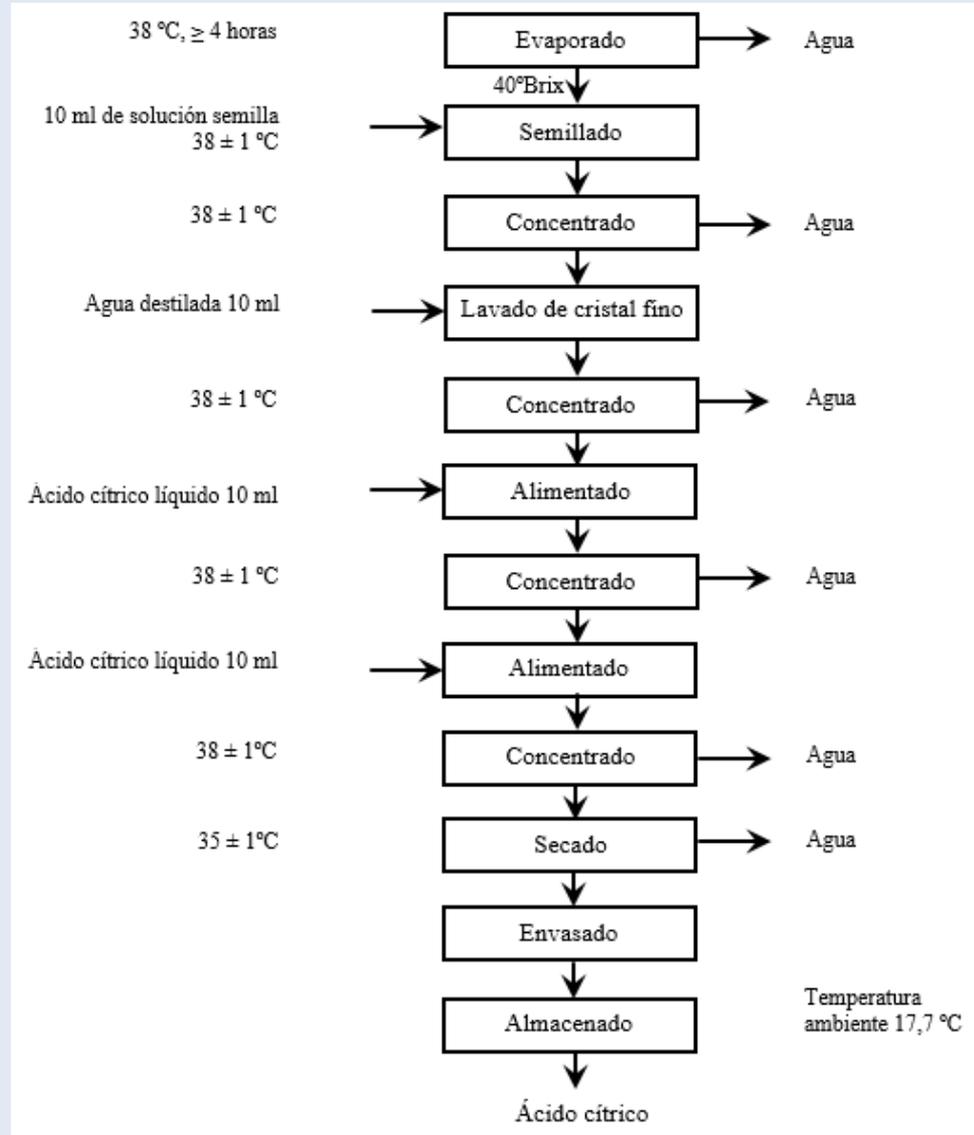
# le Fermentación



# Etapa de Purificación



# Etapa de Cristalización



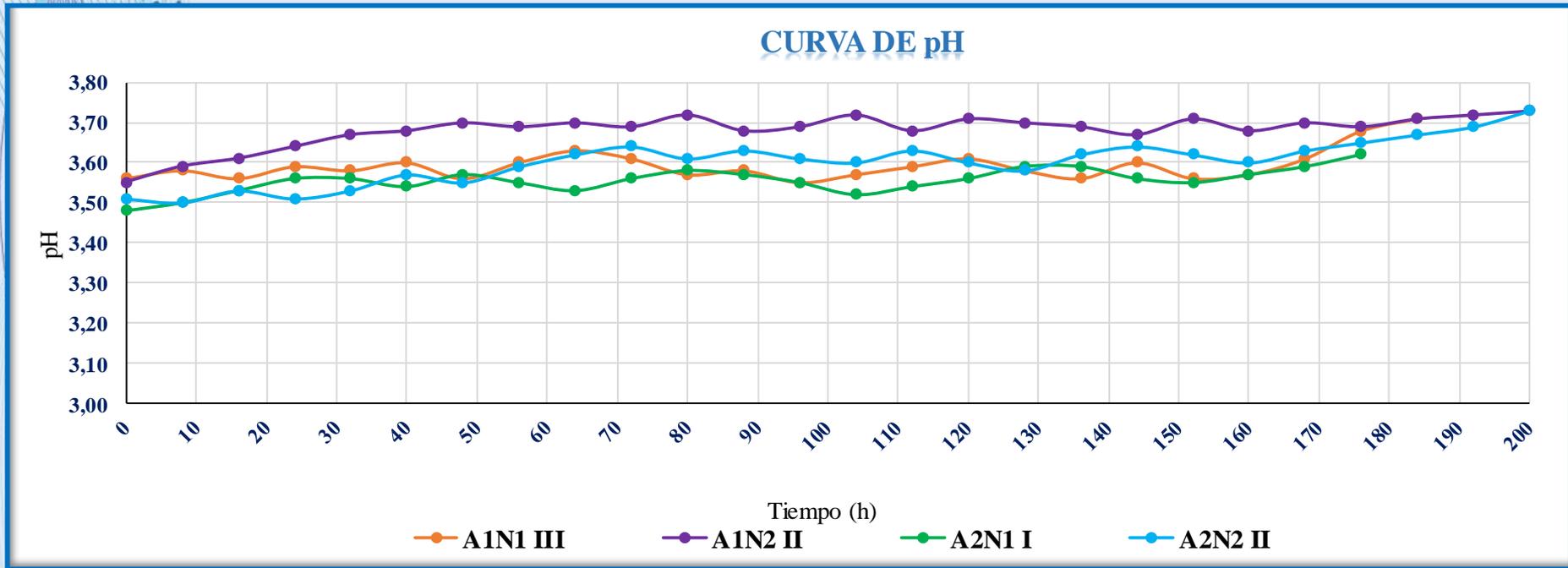


**RESULTADOS  
Y  
DISCUSIÓN**

Antes de dar inicio a 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.



# Variable pH

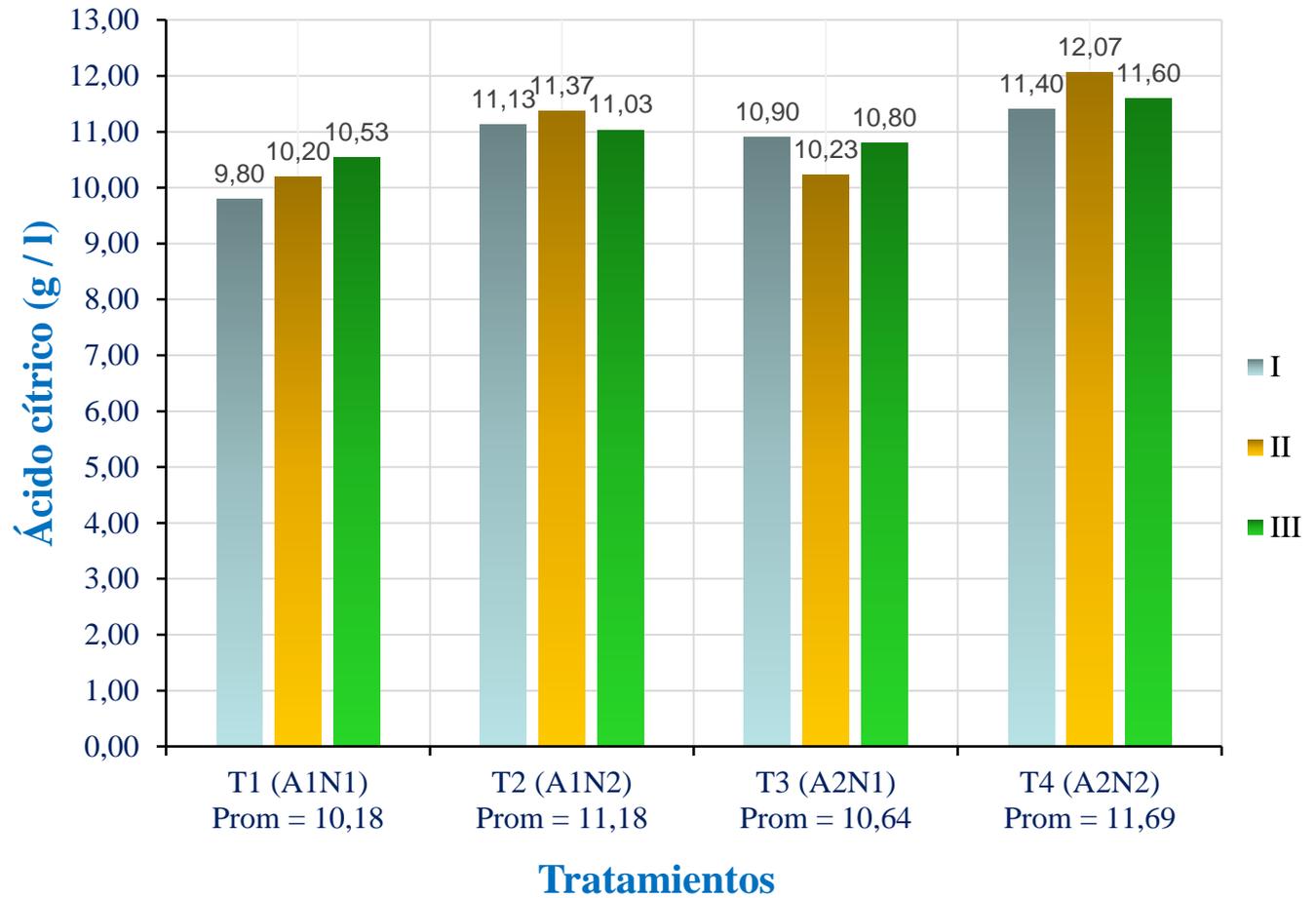


# Análisis estadístico de la variable Rendimiento en el producto terminado

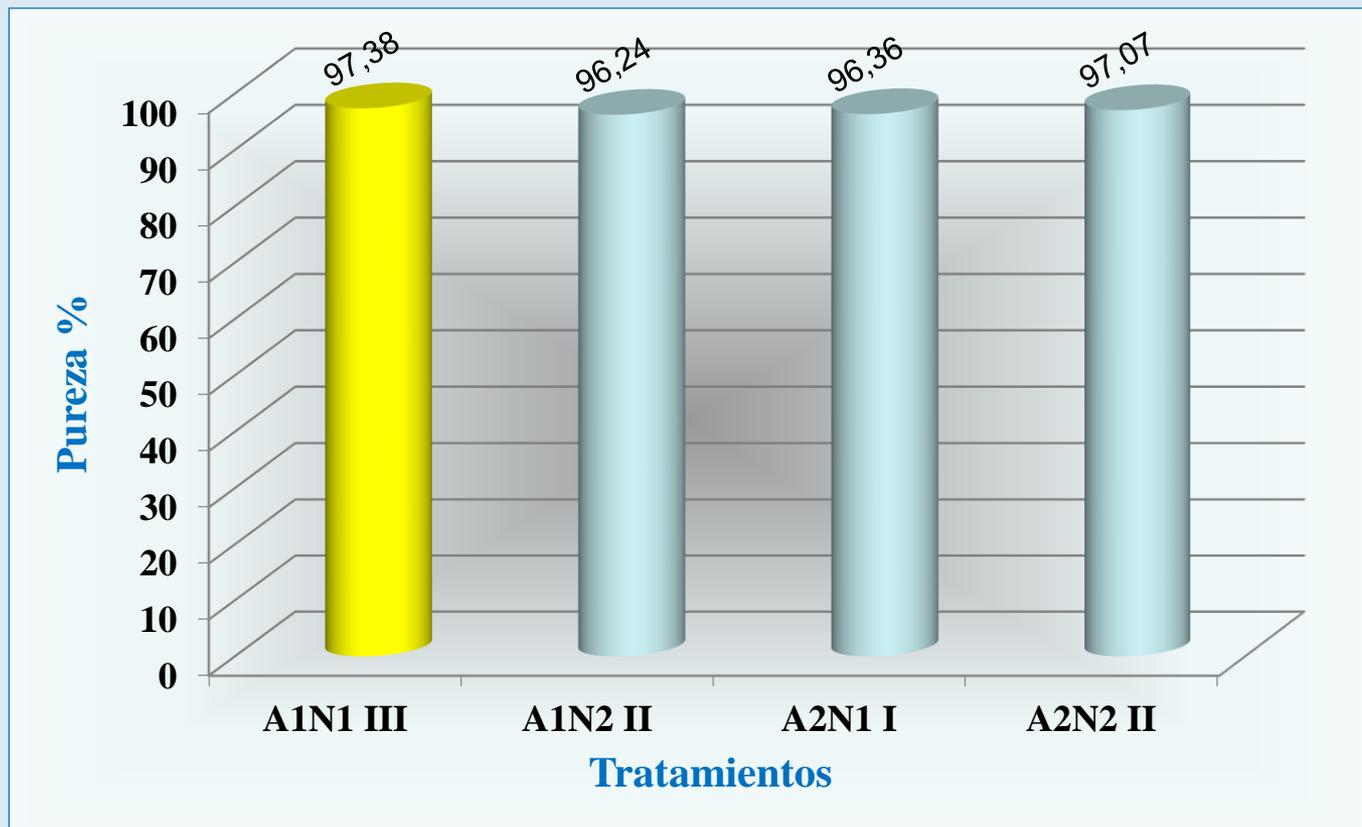
F de V	G.L	S.C	C.M	F.C	Signif.	5 %	1 %
<b>Total</b>	11,00	42,07					
<b>Tratamientos</b>	3,00	34,68	11,56	12,52	**	4,07	7,59
<b>Factor A</b>	1,00	6,45	6,45	6,99	*	5,32	11,26
<b>Factor N</b>	1,00	28,21	28,21	30,56	**	5,32	11,26
<b>I (AXN)</b>	1,00	0,01	0,01	0,01	NS	5,32	11,26
<b>E. Exp.</b>	8,00	7,39	0,92				

**CV = 2,93 %**

## RENDIMIENTO



# Variable Pureza en el producto terminado

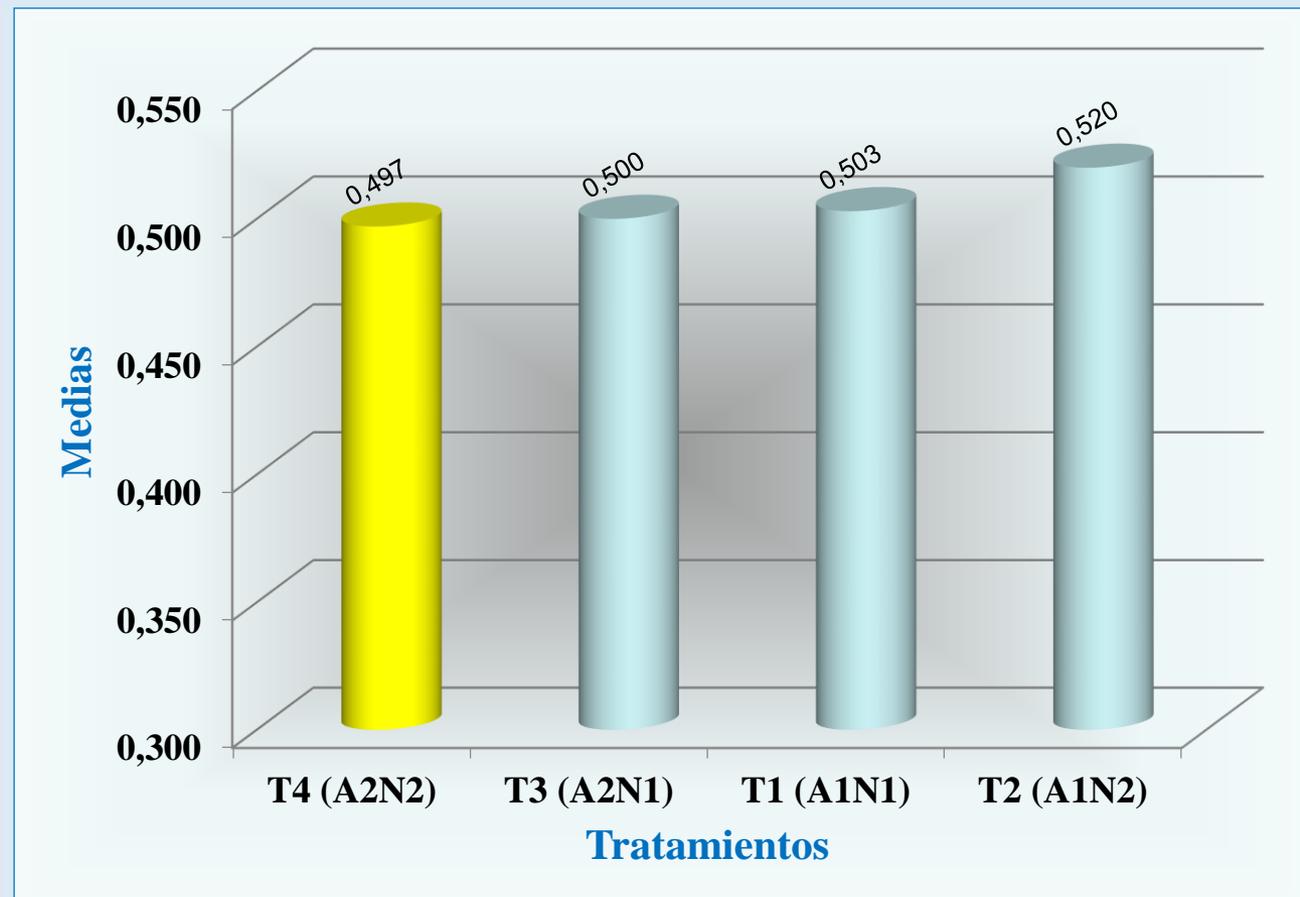


# Análisis estadístico de la variable Humedad en el producto terminado

F de V	G.L	S.C	C.M	F.C	Signif.	5 %	1 %
<b>Total</b>	11,00	0,00270					
<b>Tratamientos</b>	3,00	0,00097	0,00032	1,49	NS	4,07	7,59
<b>Factor A</b>	1,00	0,00053	0,00053	2,46	NS	5,32	11,26
<b>Factor N</b>	1,00	0,00013	0,00013	0,62	NS	5,32	11,26
<b>I (AXN)</b>	1,00	0,00030	0,00030	1,38	NS	5,32	11,26
<b>E. Exp.</b>	8,00	0,00173	0,00022				

**CV = 2,91 %**

# Comportamiento de la medias de la variable Humedad

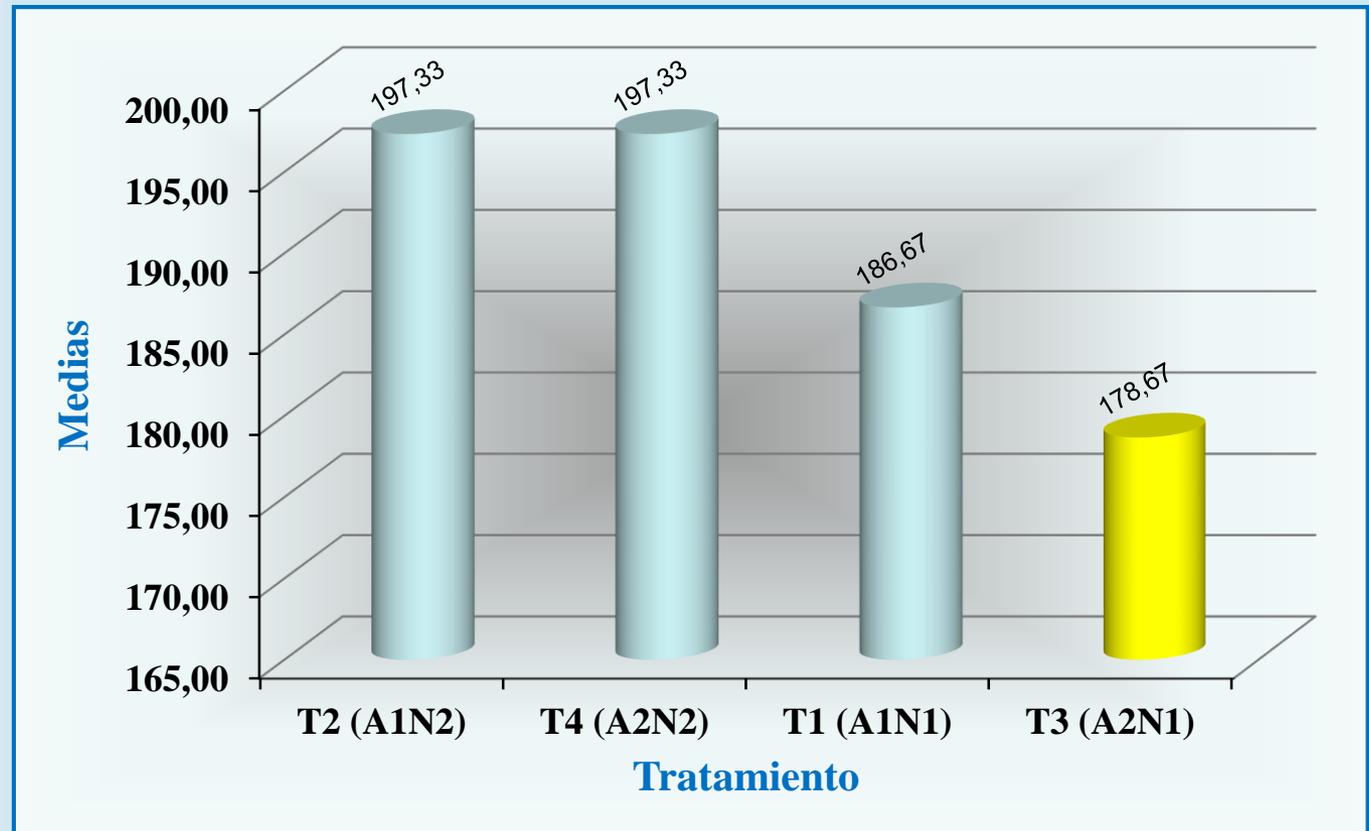


# Análisis estadístico de la variable Tiempo de Fermentación

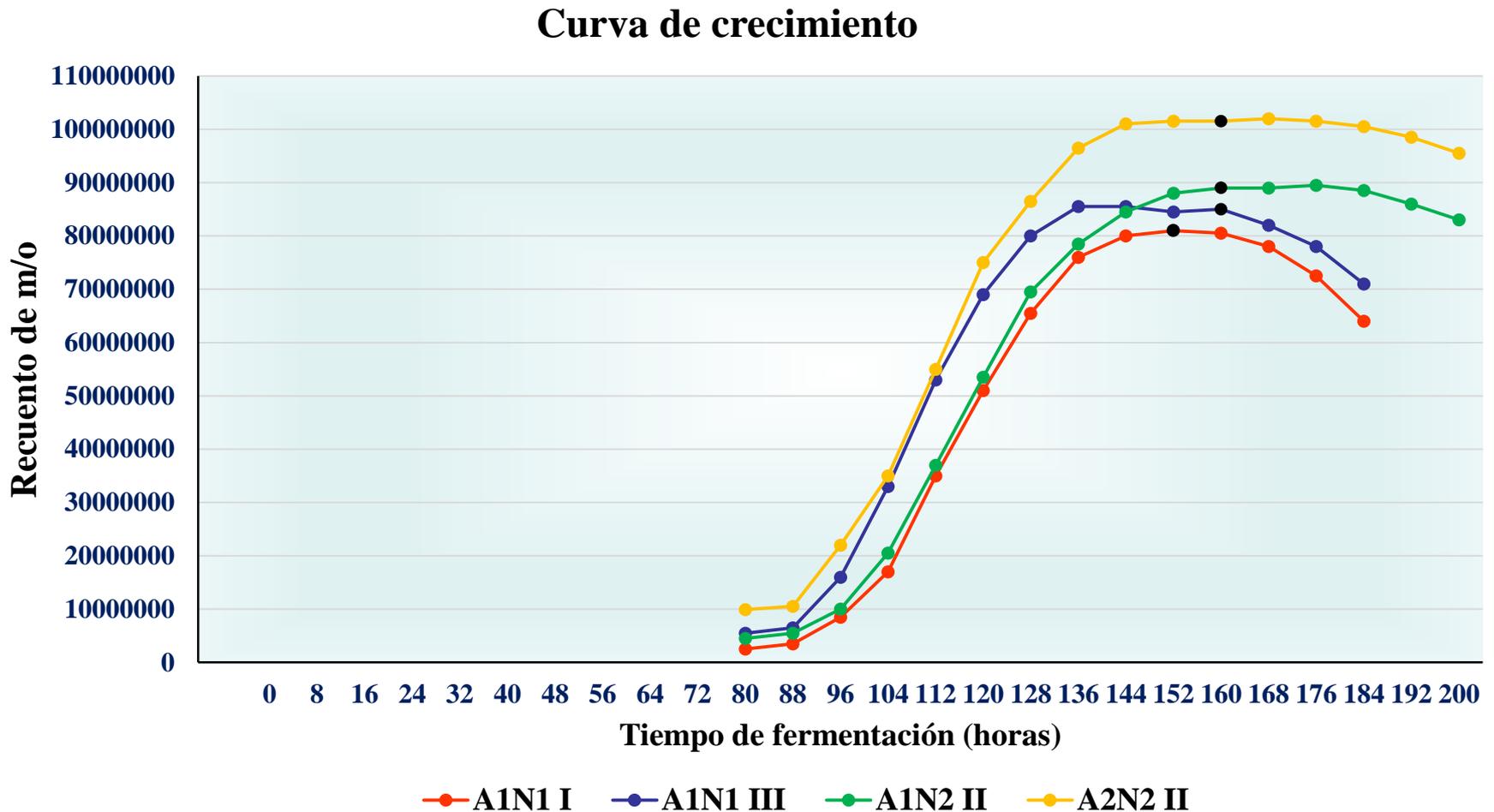
F de V	G.L	S.C	C.M	F.C	Signif.	5 %	1 %
<b>Total</b>	11,00	912,00					
<b>Tratamientos</b>	3,00	741,33	247,11	11,58	**	4,07	7,59
<b>Factor A</b>	1,00	48,00	48,00	2,25	NS	5,32	11,26
<b>Factor N</b>	1,00	645,33	645,33	30,25	**	5,32	11,26
<b>I (AXN)</b>	1,00	48,00	48,00	2,25	NS	5,32	11,26
<b>E. Exp.</b>	8,00	170,67	21,33				

**CV = 2,43 %**

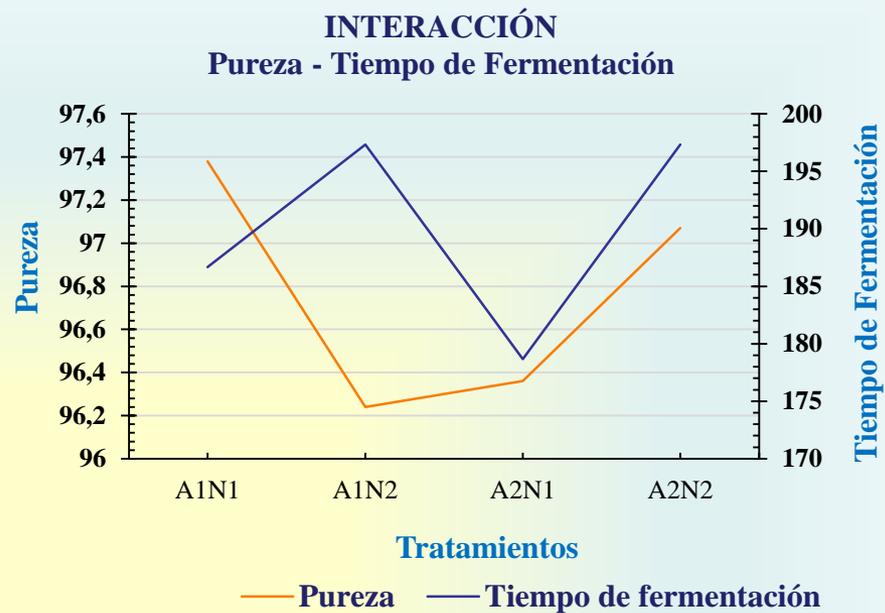
# Comportamiento de la medias de la variable Tiempo de Fermentación



# Curva de crecimiento en función del tiempo de fermentación



# Interacciones



# Costos de Producción de Ácido Cítrico

Producción de Ácido Cítrico (36,2 g)				
		Cantidad	Unidad	Valor Total (USD)
<b>Materia Prima</b>	Melaza	0,9	l	0,09
<b>Insumos</b>	Agua destilada	2,1	l	1,05
	<i>Aspergillus Niger</i>	1/4	caja	0,55
<b>Reactivos</b>	Nutriente (Nitrato de amonio)	1,2	g	0,16
	Ácido fosfórico	18,6	ml	0,08
	Hidróxido de calcio	30	g	2,41
	Ácido sulfúrico	27,97	ml	0,44
<b>Otros</b>	Electricidad / Fermentador	10,80	kW/h	0,99
<b>TOTAL</b>				<b>5,77</b>

Costos de Ácido Cítrico comercial			
Proveedores	Cantidad		Precio (USD)
<b>MM Representaciones</b>	Alimenticio	1 kg	3,92
	Análítico	500 g	40,32
<b>La casa de los químicos</b>	Alimenticio	1 kg	2,18
	Reactivo	100 g	3,36
<b>SOLVESA</b>	Alimenticio	50 kg	72,50
<b>QUIMATEC</b>	Alimenticio	50 kg	67,20
<b>PROVEQUIM C.A.</b>	Alimenticio	50 kg	66,00



**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 realizado el análisis de varianza en lo que respecta al rendimiento se determinó que el tratamiento A2N2 (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) es el que mayor cantidad de ácido cítrico produce, logrando un rendimiento de 12,07 g/l.

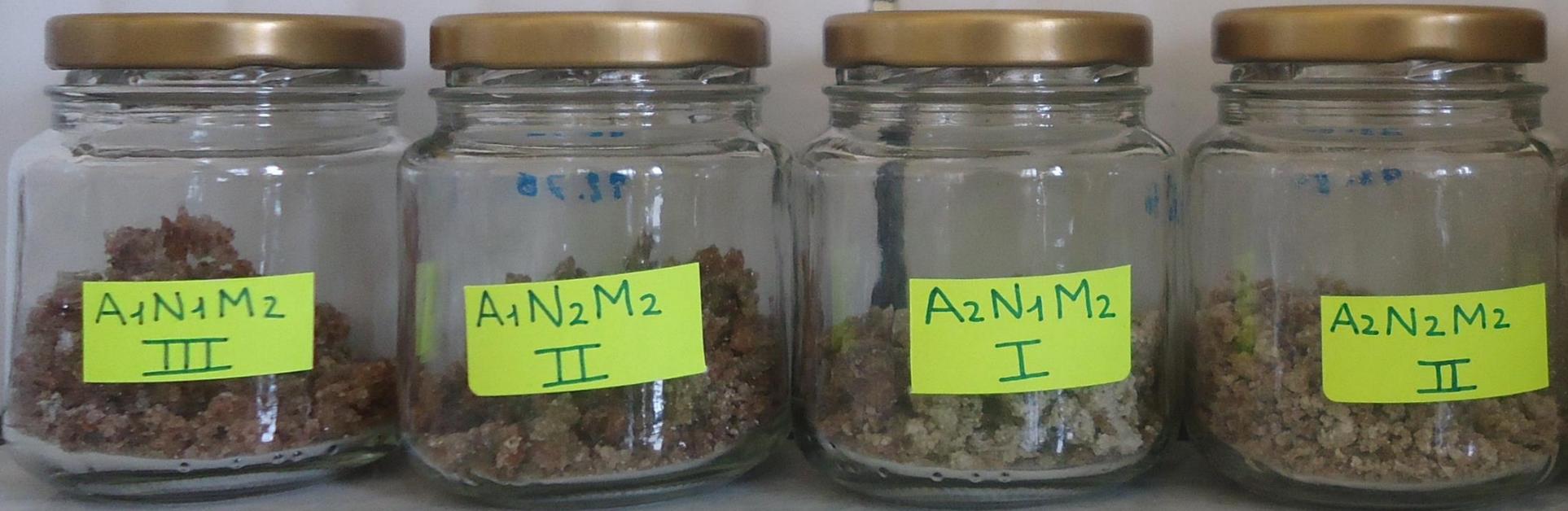
- 
- En lo que respecta a la pureza del producto obtenido se realizó el análisis para los cuatro mejores tratamientos, determinando que el tratamiento A1N1 (1 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente) tiene una pureza del 97,38 %, encontrándose dentro de un rango aceptable, tomando como referencia la norma de calidad del Codex Alimentario INS N° 330.
  - Al analizar la cinética de las curvas de crecimiento, se determina que el tratamiento A2N2 (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) tiene un tiempo óptimo de fermentación de 160 horas, tomando en cuenta que la producción promedio más alta de ácido cítrico fue de 35,07 g.



☞ Al realizar el análisis de humedad del producto, tomando como referencia la norma establecida por el Codex Alimentario en la que se establece que el ácido cítrico debe contener una humedad máxima del 0,5 %, el mejor tratamiento es A2N2 (1,5 % de inóculo y 0,4 g/l de nutriente) al presentar un humedad media de 0,497 %.

☞ En lo que se refiere a la obtención de ácido cítrico en el menor tiempo de fermentación, se determinó que el mejor tratamiento es el A2N1 (1,5 % de inóculo y 0,2 g/l de nutriente) ya que concluye su etapa de fermentación a las 178 horas.

- 
- 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.



# 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 la fase de cristalización.

- 
- ⌘ El procedimiento que se utilizó en la fase de cristalización, se fundamentó en el método de semillamiento por choque que se utiliza en la industria azucarera, se recomienda utilizar un equipo específico para realizar este proceso dentro de la obtención de ácido cítrico.
  - ⌘ Se recomienda realizar una investigación, donde se ensaye el proceso fermentativo de obtención de ácido cítrico, con otro tipo de microorganismo.

- 
- Se recomienda realizar un análisis para determinar el grado de uso (medicamentos, laboratorio o alimentos) del ácido cítrico que se obtiene, al utilizar el método que se ha establecido en esta investigación.
  - 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.

**GRACIAS  
POR SU  
ATENCIÓN**

