



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS**  
**AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE RESIDUOS**  
**DE LA AGROINDUSTRIA (*Bagazo de caña*) POR ACCIÓN DEL**  
**MICROORGANISMO *Aspergillus niger***

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO**  
**AGROINDUSTRIAL**

**Autor: MUÑOZ FUÉREZ SERGIO EDUARDO**

**Director: Ing. Jimmy Nuñez Pérez MSc**

**Ibarra -Ecuador**

**2023**



## CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

Ibarra, 9 de marzo del 2023

Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: **"OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA (*Bagazo de caña*) POR ACCIÓN DEL MICROORGANISMO *Aspergillus niger*"**, de autoría del señor **MUÑOZ FUEREZ SERGIO EDUARDO** estudiante de la Carrera de **INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**, el tribunal tutor **CERTIFICAMOS** que el/la autor/a o autores ha procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencia realizadas por este tribunal.

Atentamente,

TRIBUNAL TUTOR

FIRMA

Ing. Jimmy Nuñez Pérez MSc.

DIRECTOR TRABAJO TITULACIÓN

REPÚBLICA DEL ECUADOR



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE  
ACREDITADA RESOLUCIÓN N°: 173-SE-33-CACES-2020  
FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES  
CARRERA DE AGROINDUSTRIA



### CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

Ibarra, 9 de marzo del 2023

Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: **"OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA (*Bagazo de caña*) POR ACCIÓN DEL MICROORGANISMO *Aspergillus niger*"**, de autoría del señor **MUÑOZ FUEREZ SERGIO EDUARDO** estudiante de la Carrera de **INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**, el tribunal tutor **CERTIFICAMOS** que el/la autor/a o autores ha procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencia realizadas por este tribunal.

Atentamente,

TRIBUNAL TUTOR

FIRMA

Ing. Holguer Pineda Flores MBA.

MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN



### CERTIFICACIÓN TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN

Ibarra, 9 de marzo del 2023

Para los fines consiguientes, una vez revisado el documento en formato digital el trabajo de titulación: **"OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE RESIDUOS DE LA AGROINDUSTRIA (*Bagazo de caña*) POR ACCIÓN DEL MICROORGANISMO *Aspergillus niger*"**, de autoría del señor MUÑOZ FUEREZ SERGIO EDUARDO estudiante de la Carrera de INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL, el tribunal tutor CERTIFICAMOS que el/la autor/a o autores ha procedido a incorporar en su trabajo de titulación las observaciones y sugerencia realizadas por este tribunal.

Atentamente,

TRIBUNAL TUTOR

FIRMA

MSc. Valeria Olmedo Galarza

MIEMBRO TRIBUNAL TUTOR TRABAJO DE TITULACIÓN



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**  
**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN**  
**A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

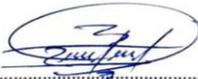
DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	100382317-4		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Muñoz Fuez Sergio Eduardo		
DIRECCIÓN:	Cotacachi (Comunidad de Quitugo) antigua carretera Cotacachi-Otavaló		
EMAIL:	semunozf@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	0968065263	TELÉFONO MÓVIL:	0968065263

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Obtención de ácido cítrico a partir de residuos de la agroindustria ( <i>Bagazo de caña</i> ) por acción del microorganismo <i>Aspergillus niger</i>
AUTOR:	Muñoz Fuez Sergio Eduardo
FECHA:	14/03/2023
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Jimmy Nuñez Pérez, MSc

**2. CONSTANCIAS**

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros. Ibarra, a los 14 días del mes de marzo de 2023.

EL AUTOR:

  
Firma.....  
Muñoz Fuez Sergio Eduardo



## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado por el Sr. Muñoz Fierrez Sergio Eduardo, bajo mi supervisión



.....  
**Ing. Jimmy Nuñez, MSc**  
**DIRECTOR DE TESIS**

## **DEDICATORIA**

A Dios, que me acompaña y siempre me levanta de todos los tropiezos.

A mis padres, que han sido el motor y el soporte más grande que he tenido, a pesar de las circunstancias siempre me han brindado todo el apoyo, a mis hermanos mayores que han sido el mejor ejemplo para seguir adelante y lograr culminar una etapa más en mi vida.

A mi familia que siempre me dieron los ánimos para seguir adelanté en esta etapa universitaria.

A mis maestros que me han ayudado a formarme como una persona de bien, así como profesionalmente, y ser una persona decidida, crítico y muy responsable.

A mis amigos que me animaron y ayudaron en toda la etapa universitaria, dejando las mejores experiencias.

Así como también a mis compañeros de clase que me ayudaron a crecer y aprender el uno del otro para seguir adelante.

*Sergio*

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron conmigo y permitieron que sea posible esta investigación.

A Dios, por darme la fortaleza, la oportunidad de no decaer en el camino elegido y por haberme bendecido con una familia increíble.

A mi madre María, por brindarme todo ese apoyo, comprensión, por ese amor y sobre todo por esa paciencia que me ha tenido, a mi padre Luis, por todo ese esfuerzo y sacrificio que ha hecho y me ha brindado siempre, gracias a ellos por todo ese amor, sus enseñanzas, consejos y por su buen ejemplo he llegado al lugar donde estoy. A si también agradecer a mis hermanos Edwin, René y Jander que siempre me han aconsejado y apoyado en todo este proceso.

A mis maestros de la Universidad Técnica del Norte por haberme enseñado y brindado todos los conocimientos durante la etapa universitaria, misma que me ayudara a desenvolverme en el ámbito profesional y en la vida como tal. Al Ing. Jimmy Nuñez MSc por guiarme en este trabajo investigativo, de igual manera a la MSc. Valeria Olmedo y al Ing. Holguer Pineda MBA, quienes en calidad de asesores me brindaron un poco de su tiempo y paciencia para poder culminar con mi trabajo.

Agradezco también a la Dra. María Echeverría, a la Ing. Karina Garzón y al Ing. Daniel Ruiz, por brindarme el acceso a los laboratorios para poder terminar mi trabajo de titulación.

A mis amigos, compañeros de aprendizaje, con quienes compartí buenos y malos momentos, pero pese a todo siempre me han motivado, aconsejado para no rendirme y quedarme a medio camino y llegar a cumplir mis sueños sin darme por vencido, a cada uno de ellos estaré completamente agradecido y que por ningún motivo los olvidare.

No existen palabras para expresar lo agradecido que estoy con todas y cada una de las personas que estuvieron ahí para apoyarme y guiarme, en especial a mi familia.

*Sergio*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
Resumen.....	iii
Summary .....	iv
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 PROBLEMA.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	2
1.3 OBJETIVOS:.....	3
1.3.1 GENERAL .....	3
1.3.2 ESPECÍFICOS .....	3
1.4 HIPÓTESIS.....	3
1.4.1 ALTERNATIVA.....	3
1.4.2 NULA.....	3
CAPÍTULO II .....	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN EL ECUADOR .....	4
2.2 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES Y SU IMPACTO AMBIENTAL .....	5
2.3 APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA.....	6
2.4 ALTERNATIVAS DE VALORIZACIÓN PARA LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES.....	7
2.4.1 VALORIZACIÓN BIOTECNOLÓGICA .....	7
2.4.2 VALORIZACIÓN ENERGÉTICA.....	8

2.5 DERIVADOS DE LA AGROINDUSTRIA AZUCARERA .....	8
2.6 BAGAZO DE CAÑA .....	9
2.7 ESTRUCTURA DEL BAGAZO DE CAÑA .....	9
2.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y COMPONENTES DEL BAGAZO DE CAÑA.....	10
2.9 MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES .....	10
2.10 MICROORGANISMOS UTILIZADOS .....	12
2.10.1 DESCRIPCIÓN.....	13
2.10.2 CARACTERÍSTICAS .....	13
2.10.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	14
2.11 FERMENTACIÓN .....	15
2.11.1 FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO (FES).....	15
2.12 CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO SUMERGIDO Y CULTIVO EN SUSTRATO SÓLIDO .....	16
2.13 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO .....	17
2.14 ÁCIDO CÍTRICO .....	19
2.15 PRINCIPALES USOS DEL ÁCIDO CÍTRICO.....	20
2.16 MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y RENDIMIENTOS .....	21
2.16.1 ANTECEDENTES DE PRODUCCIÓN.....	21
2.16.2 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN.....	21
2.17 PROCESO FERMENTATIVO Y FACTORES INFLUYENTES.....	21
2.18 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ÁCIDO CÍTRICO.....	23
CAPÍTULO III.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24

3.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	24
3.2 MATERIALES Y EQUIPOS.....	24
3.2.1 MATERIA PRIMA E INSUMOS.....	24
3.2.2 EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIO.....	25
3.3 MÉTODOS .....	25
3.3.1 ESTANDARIZAR EL BAGAZO DE CAÑA PREVIO A LA OBTENCIÓN DE UN SUSTRATO APTO PARA LA FERMENTACIÓN. ..	25
3.3.2 EVALUAR EL TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL BAGAZO DE CAÑA Y LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN EN EL RENDIMIENTO DEL ÁCIDO CÍTRICO.....	26
3.3.3 ESTABLECER LAS CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO CÍTRICO OBTENIDO.....	29
3.4 MANEJO DEL EXPERIMENTO .....	29
3.4.1 DIAGRAMA DE BLOQUES PARA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.....	30
3.4.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.....	32
CAPÍTULO IV.....	37
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	37
4.1 ESTANDARIZAR EL BAGAZO DE CAÑA PREVIO A LA OBTENCIÓN DE UN SUSTRATO APTO PARA LA FERMENTACIÓN. ....	37
4.1.1 ANÁLISIS PROXIMAL.....	37
4.2 EVALUAR EL TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL BAGAZO DE CAÑA Y LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN EN EL RENDIMIENTO DEL ÁCIDO CÍTRICO.....	39
4.2.1 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.....	39
4.2.2 GENERACIÓN DE ESPORAS .....	42

4.3 ESTABLECER LAS CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO CÍTRICO OBTENIDO .....	49
CAPÍTULO V .....	52
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
5.1 CONCLUSIONES .....	52
5.2 RECOMENDACIONES .....	53
5.3 BIBLIOGRAFÍA CITADA .....	53
ANEXOS .....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Derivados de la industria azucarera.....	8
<b>Tabla 2</b>	Composición química del bagazo de caña .....	10
<b>Tabla 3</b>	Microorganismos más utilizados en la degradación de sustratos para producir ácido cítrico.....	10
<b>Tabla 4</b>	Clasificación taxonómica.....	14
<b>Tabla 5</b>	Ubicación y datos meteorológicos del área de estudio.....	24
<b>Tabla 6</b>	Variables Cuantitativas del Análisis Físico Químico.....	26
<b>Tabla 7</b>	Factores y niveles en estudio.....	26
<b>Tabla 8</b>	Descripción de los tratamientos.....	27
<b>Tabla 9</b>	Análisis de varianza.....	27
<b>Tabla 10</b>	Variables experimentales.....	28
<b>Tabla 11</b>	Constituyentes del método.....	29
<b>Tabla 12</b>	Análisis fisicoquímicos del bagazo de caña triturado.....	37
<b>Tabla 13</b>	Análisis de varianza para la concentración del ácido cítrico.....	39
<b>Tabla 14</b>	Prueba Tukey para la interacción de las variables de estudio .....	40
<b>Tabla 15</b>	Análisis de varianza para la generación de Esporas.....	42
<b>Tabla 16</b>	Prueba Tukey para la interacción de la variable en la generación de esporas .....	43
<b>Tabla 17</b>	Análisis de varianza para el consumo fuente de carbono .....	45
<b>Tabla 18</b>	Prueba Tukey para la interacción de la variable en el consumo fuente de carbono .....	45
<b>Tabla 19</b>	Análisis de varianza para la productividad del ácido cítrico .....	47
<b>Tabla 20</b>	Prueba Tukey para la interacción de la variable en el consumo fuente de carbono.....	48
<b>Tabla 21</b>	Constante de disociación del ácido cítrico (pka).....	51

<b>Tabla 22</b> Determinación de punto de fusión del ácido cítrico .....	52
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Características del <i>Aspergillus niger</i> .....	13
<b>Figura 2</b> Estructura del ácido cítrico.....	19
<b>Figura 3</b> Diagrama de bloques para producción de ácido cítrico .....	31
<b>Figura 4</b> Curva de calibración de azúcares reductores.....	34
<b>Figura 5</b> Curva de calibración de ácido cítrico.....	35
<b>Figura 6</b> Interacción Temperatura y Tamaño de partícula en la concentración de Ácido cítrico.....	41
<b>Figura 7</b> Interacción Temperatura y Tamaño de partícula en la generación de esporas .....	44
<b>Figura 8</b> Interacción Temperatura y Tamaño de partícula en el consumo fuente de carbono .....	46
<b>Figura 9</b> Interacción Temperatura y Tamaño de partícula en la productividad de ácido cítrico .....	49
<b>Figura 10</b> Determinación de la constante de acidez ( $\text{pH} = \text{pKa}$ ) del ácido cítrico. ....	50
<b>Figura 11</b> Equipo ensamblado para determinar el punto de fusión del ácido cítrico .....	51

## Resumen

Uno de los problemas que enfrenta el sector azucarero es la generación de residuos, en el Ecuador en el año 2021 se produjeron un poco más de 11 millones de toneladas de caña de azúcar, donde cerca del 42% es considerado residuo. En los últimos años existe un creciente interés en aprovechar este residuo para darle valor agregado como es la obtención de ácidos orgánicos y reducir el impacto ambiental. El objetivo de esta investigación fue aprovechar el bagazo de caña de azúcar por vía Biotecnológica utilizando el microorganismo *Aspergillus niger* para la producción de ácido cítrico. para ello se llevó a cabo un proceso de fermentación en estado sólido (FES), en la búsqueda de las mejores condiciones del proceso. Se empleó un diseño experimental. Diseño Completamente al Azar (DCA) A x B a tres niveles siendo los factores: tamaño de partícula (1.0, 2.3 y 3.5 mm), temperatura de incubación (22, 26 y 30 °C) y como variables de respuesta el rendimiento de ácido cítrico (g/kg), generación de esporas (esporas/ml), consumo fuente de carbono (%) y productividad (g/kg h) el tiempo de fermentación establecido fue de 8 días. Para el análisis estadístico de los resultados se hace uso del programa Design-Expert 13, teniendo como resultados que a temperatura de 22 °C (ambiente) y tamaño de partícula de 1.0 mm fue favorable para las variables de estudio. y superiores a los reportados en la bibliografía para la producción de ácido cítrico. Demostrando que el bagazo de caña puede ser utilizado en fermentación sólida siendo un sustrato ideal para la obtención de ácido cítrico.

**Palabras clave:** Bagazo de caña, fermentación sólida, tamaño de partícula, temperatura, rendimiento, ácido cítrico.

## Summary

One of the problems that the sugar sector challenged is the generation of waste, in Ecuador in 2021 a little more than 11 million tons of sugarcane were produced, where about 42% is considered waste. In the last years, there has been a growing interest in taking advantage of this residue to give it added value, such as obtaining organic acids and reducing environmental impact. The aim of this research was to take advantage of the sugarcane bagasse by biotechnological way using the microorganism *Aspergillus niger* for the production of citric acid. For this, a solid-state fermentation process (FES) was carried out, in search of the best process conditions. An experimental design was used, completely random design (DCA) A x B at three levels, the factors being: Particle size (1.0, 2.3 y 3.5 mm), incubation temperature (22, 26 y 30 °C) and as response variables, citric acid yield (g/kg), spore generation (spores/ml), carbon source consumption (%) and productivity (g/kg h), the established fermentation time was eight days. For the statistical analysis of the result, the Design-Expert 13 program is used, having as results that at a temperature of 22 °C (Ambient) and a particle size of 1.0 mm. It was favorable for the study variables. And higher than those reported in the bibliography for the production of citric acid. Demonstrating that sugarcane bagasse can be used in solid fermentation, being an ideal substrate for obtaining citric acid.

**Keywords:** cane bagasse, solid fermentation, particle size, temperature, performance, citric acid.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 PROBLEMA

Los residuos del bagazo de caña son materiales que se generan al procesar un producto primario, por tal motivo estos residuos son abandonados en botaderos, quemados de manera descontrolada o arrojados en vertederos a cielo abierto provocando a diario contaminación del medio ambiente (Peñañiel, Brito, & Muñoz, 2015) y producción de gases de efecto invernadero, afectando directamente al campo agroindustrial.

La agroindustria genera residuos en su mayoría conformados por almidones y componentes lignocelulósicos, los cuales se convierten en potencial contaminante y deben ser tratadas mediante transformaciones físicas, químicas y biológicas, para disminuir el impacto ambiental.

Dentro de la industria azucarera ecuatoriana la producción anual de caña de azúcar fue de 11 millones de toneladas/año, esto significa un crecimiento del 18.3% con respecto a la cifra del año anterior, el 37 y 42% es considerada como residuo. Las provincias de Guayas, Cañar y Loja representan el 96.2% de la producción total (INEC, 2021). Esto es debido al desconocimiento de métodos o alternativas apropiadas para su transformación, que no permite darle valor agregado con calidad e inocuidad en la obtención de productos de alto valor agregado como por ejemplo ácido cítrico.

En la actualidad en el Ecuador se hace importaciones de grandes cantidades de ácido cítrico, China es el principal país de donde se importa en un 54.83% con un crecimiento anual del 1%, el crecimiento de las importaciones aumenta la demanda en 3'138.000 kg/año de este producto por un valor de 530.407 \$/año (Tuquerres, y otros, 2020).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN

Buscar alternativas viables para el aprovechamiento de residuos ha tomado gran importancia a nivel mundial en los últimos años, especialmente en el sector agroindustrial, donde los procesos de transformación de productos primarios generan desechos que pueden ser utilizados para la obtención de nuevos productos. El desarrollo en el sector agroindustrial en el Ecuador exige la implementación de métodos o alternativas sustentables que conlleven a generar procesos tecnológicos para el aprovechamiento de subproductos de la industria azucarera como el bagazo de caña, utilizándolos en la elaboración de productos con elevada rentabilidad, potencialidad y sin costo medioambiental (Bastidas, 2016).

Las importaciones de muchos ácidos orgánicos de interés agroindustrial, se evitaría haciendo uso de técnicas apropiadas, dándole valor agregado a los residuos, permitiendo obtener un producto de alto valor, a su vez ayudando a mejorar el deterioro ambiental. El ácido cítrico debido a su baja toxicidad en comparación con otros acidulantes es utilizado dentro de las industrias farmacéutica, cosmética, alimentaria y otras.

El desarrollo de este proyecto permitirá evaluar e implementar un bioproceso de obtención de ácido cítrico usando como sustrato bagazo de caña a partir del hongo *Aspergillus niger*, especie más usado en la industria y empleada para este tipo de fermentación en estado sólido (FSS), debido a su facilidad de manejo y habilidad de fermentar una gran variedad de materias primas baratas con altos rendimientos.

### **1.3 OBJETIVOS:**

#### **1.3.1 GENERAL**

Obtener ácido cítrico a partir de residuos agroindustriales (Bagazo de caña) por la acción del microorganismo *Aspergillus niger*.

#### **1.3.2 ESPECÍFICOS**

- Estandarizar el bagazo de caña previo a la obtención de un sustrato apto para la fermentación.
- Evaluar el tamaño de partícula del bagazo de caña y la influencia de la temperatura de incubación en el rendimiento del ácido cítrico.
- Establecer las características del ácido cítrico obtenido.

### **1.4 HIPÓTESIS**

#### **1.4.1 ALTERNATIVA**

- El tamaño de partícula del bagazo de caña y la temperatura de incubación influyen en el rendimiento del ácido cítrico.

#### **1.4.2 NULA**

- El tamaño de partícula del bagazo de caña y la temperatura de incubación no influyen en el rendimiento del ácido cítrico.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES EN EL ECUADOR**

La Agroindustria ecuatoriana procesa un total de 2203 millones TM de materia prima, donde el mayor volumen de residuos se genera por el ingenio azucarero (1,1 millón de TM), seguido por la industria aceitera y en menor proporción por el maíz y arroz (346 y 89 mil TM), no existe un aprovechamiento eficiente de este tipo de residuos agroindustriales, debido a que hay desconocimiento de su valor y por la no disposición de métodos para su preparación y caracterización (Riera, Maldonado, & Palma, 2018).

La Agroindustria en el Ecuador genera grandes cantidades de subproductos algunos de ellos son arrojados a vertederos a cielo abierto, provocando contaminación por su elevado contenido de materia orgánica. Estos subproductos son: residuos de camales, suero de leche y desechos agrícolas como desperdicios de la industria de pulpas y mermeladas. En la actualidad, estos desechos representan un amplio problema ambiental para los productores, con doble incidencia tanto en la sanidad ambiental como en la economía local, lo que genera gastos económicos elevados en vista a minimizar los efectos (Peñañiel, Brito, & Muñoz, 2015).

En el Ecuador se produce una elevada cantidad de residuos provenientes de la agroindustria, tales como: florícola, hortícola, maderera y avícola. La gestión de estos residuos no está optimizada, por lo tanto, existe un manejo inadecuado que a su vez está ligada con las consecuencias ambientales. De este modo, es importante y necesario el desarrollo de técnicas de tratamiento de estos residuos, así como su valorización (Gavilanes, 2016).

Dentro del sector de la economía del país, la agroindustria representa una importante participación. Su labor genera residuos en su mayoría conformados por almidones y residuos lignocelulósicos, mismas que debido a su composición deben ser tratadas mediante transformaciones físicas, químicas y biológicas, de esta manera ser convertidas en un material de alto interés capaz de ser aprovechados

como materia prima en la elaboración de subproductos, material de relleno o precursor de ácidos orgánicos (Riera, Maldonado, & Palma, 2018).

## **2.2 RESIDUOS AGROINDUSTRIALES Y SU IMPACTO AMBIENTAL**

Dentro de la Agroindustria la mayoría de los productos que más industrialización presentan son: frutas, verduras, tubérculos, semillas, raíces, hojas; en su gran mayoría se comercializan en fresco, aunque algunos se aplica un tratamiento previo para obtener harinas, aceites, jugos, ensaladas, néctar, mermeladas, entre otros, por esta razón es notable la generación de residuos. Dentro de estas podemos mencionar algunas agroindustrias con su generación de residuos (Mejías, Orozco, & Galán, 2016).

- **Sector agrícola:** durante la cosecha de sus cultivos se generan residuos primarios hojas y tallos de maíz, tallos y vaina de sorgo, puntas y hojas de caña de azúcar, paja de trigo, etc.
- **Sector azucarero:** durante la producción de azúcar se generan residuos tales como bagazos, cachaza, melazas, vinazas, sacarosa y aguas residuales.
- **Café y cacao:** se aprovecha únicamente el grano que corresponde alrededor de un 10% del peso del fruto fresco.
- **Producción vegetal y animal:** genera una elevada cantidad de residuos como tallos, hojas o frutos con calidad no comercial como resultado de las operaciones de poda, corte, clasificación y renovación de cultivos durante la cosecha y pos cosecha. La agroindustria de origen animal genera residuos como estiércol, purines y subproductos como pelos o plumas.
- **Industria de aceite de palma:** se aprovecha únicamente el 9% de la extracción.
- **Industria cervecera:** utiliza un 8% de los componentes del grano.
- **Industria del papel:** para la producción se utiliza menos del 30% de la materia prima.

Los residuos agroindustriales son materiales generados en el consumo directo o procesamiento de un producto primario, sin utilidad posterior para quien lo genera,

pero que se pueden utilizar para generar otros productos de valor económico de interés comercial y social (Saval, 2012).

Estos residuos pueden ocurrir durante los procesos relacionados con el cultivo u obtención de materia prima o en las actividades de procesamiento de la misma. Si no son reciclados o dispuestos apropiadamente, producen diversos impactos ambientales adversos, lo que genera contaminación en el suelo y el agua, tanto en fuentes superficiales como subterráneas (Guerrero & Valenzuela, 2011).

Durante los últimos años ha crecido el interés por el uso de los residuos lignocelulósicos en varios ámbitos. Esta tendencia tiene sus orígenes en el bajo costo, elevada abundancia y la disponibilidad de estos materiales a nivel mundial, unido a la necesidad de minimizar el deterioro medioambiental provocado por la disposición de los mismos (Cabrera, León, Montano, & Dopico, 2016). Además, estos residuos pueden presentarse en estado gaseoso generando emisiones de carbono (CO<sub>2</sub>), en estado líquido como aguas y lodos residuales, pero la mayoría son de naturaleza predominantemente sólida y orgánica, con alto contenido de material lignocelulósico (Riera, Maldonado, & Palma, 2018).

La presencia de estos residuos agroindustriales genera impactos positivos y negativos en el medio ambiente, sin importar la escala, si no son debidamente manejados estos residuos generan alteraciones adversas en el medio ambiente lo cual afecta perjudicialmente el desarrollo de los seres vivos. Sin embargo, si los residuos agroindustriales son bien tratados y manejados previenen la contaminación de diversos ecosistemas y hasta puede ser posible que se recuperen las condiciones ambientales que han sido alteradas por las diferentes actividades humanas, de esta manera se mejoraría la calidad y se evitarían las afectaciones a la salud humana. (Vargas & Pérez, 2018).

### **2.3 APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA AGROINDUSTRIA**

Para llevar a cabo un buen proceso de FES (fermentación sólida) se pueden utilizar sustratos naturales, o soportes inertes, la selección del tipo de soporte dependerá de las características del proceso y del tipo de producto que se quiere obtener. La mayoría de los procesos desarrollados en los últimos años han sido con sustratos

naturales y que la mayoría son subproductos sin ningún valor económico. De tal manera que la fermentación en estado sólido (FES), es considerada una alternativa que ayuda a dar un valor agregado a esta materia orgánica que sin duda alguna terminaría como desperdicio (Parzanese, 2017).

Dentro del aprovechamiento son muchas las actividades agroindustriales que generan residuos sólidos, líquidos y gaseosos; ya sea a nivel primario, agricultura, producciones pecuarias o en procesos de transformación con materia prima de origen biológico. Esto ha adelantado proyectos o investigaciones tendientes a propiciar el aprovechamiento. A continuación, se detallan los siguientes (Cury, Aguas, Martínez, & Olivero, 2017).

- ✓ Hongos comestibles
- ✓ Enzimas
- ✓ Industria láctea
- ✓ Residuos cítricos
- ✓ Industria azucarera

## **2.4 ALTERNATIVAS DE VALORIZACIÓN PARA LOS RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

Entre las alternativas, básicamente existen dos grupos de tecnologías para la recuperación de recursos: la valorización biotecnológica y la valorización térmica o energética (Mejías, Orozco, & Galán, 2016).

### **2.4.1 VALORIZACIÓN BIOTECNOLÓGICA**

Mediante la biotecnología es posible la bioconversión de los residuos agroindustriales mediante procesos de extracción directa o de transformación microbiana o química en productos comerciales de mayor valor añadido como son: (pigmentos, antibióticos, enzimas, etc.) y con mayor impacto la intención de mejorar la calidad ambiental a través de tecnologías orientadas hacia una transformación sustentable de los recursos naturales. De igual manera uno de los desafíos es la adquisición de materias primas de fácil provecho y bajos costos que sirvan como sustratos fermentables, es decir, ricos en carbono y nitrógeno y estos residuos agroindustriales los proporcionan.

## 2.4.2 VALORIZACIÓN ENERGÉTICA

La valorización energética se realiza mediante las siguientes tecnologías: incineración, gasificación, pirolisis, digestión anaerobia y compostaje, con un doble objetivo:

- 1) Forma eficiente de gestión de los residuos y así obtener unas nuevas fuentes de abastecimiento energético que compita con los combustibles fósiles.
- 2) Que contribuya a reducir la dependencia con estos a nivel mundial.

Las tecnologías que procesan térmicamente los residuos buscan la disminución de su volumen y la recuperación de energía a partir de los gases, líquidos y sólidos que se generan. Estos procesos térmicos pueden clasificarse de acuerdo a los requerimientos de oxígeno. Aquellos que requieren de oxígeno se conocen como calderas o incineradores y los que no, se conocen como pirolisis y termólisis (Rojas, Flórez, & López, 2018).

## 2.5 DERIVADOS DE LA AGROINDUSTRIA AZUCARERA

Los derivados de la industria azucarera presentado por (Aguilar, Debernadi, & Herrera, 2017) se da a conocer en la tabla 1.

**Tabla 1**

Derivados de la industria azucarera

Material	Producción comercial
Residuos de cosecha, bagazo y médula (Subproductos)	Energía y vapor, pulpa, papel, furfural y derivados, fenoles, carbón activado, etanol de segunda generación, azúcares fermentables, hongos comestibles, biogás, lignina, alimento animal, ácidos orgánicos, entre otros.
Melaza y sacarosa (Coproducos)	Etanol combustible, alcoholes de diverso peso molecular, ron, aguardiente, acetona, butanol, levadura para consumo y panadería, concentrado de proteínas, <i>Trichoderma</i> , celulasa, ácidos (acético, cítrico, glutámico, succínico, aspártico), bioplásticos, glutamato, entre otros.
Cachaza (lodo de filtros) (Subproducto)	alimento pecuario, compostas, ceras, fitoesteroles, entre otros.

Fuente: (Aguilar, Debernadi, & Herrera, 2017).

## **2.6 BAGAZO DE CAÑA**

La caña de azúcar (*Saccharum* spp.) actualmente es un cultivo agroalimentario que se produce en el mundo. Debido a su naturaleza química y bioquímica de la materia prima que produce, presenta gran potencial para la diversidad productiva (AGRO PRODUCTIVIDAD, 2017)

El bagazo de caña es el residuo sólido que queda después del proceso de la molienda. Consiste en partículas de materiales vegetales medulosos y celulósicos, con poco de jugo de caña residual. Las partículas del bagazo dependen mucho de las operaciones de preparación de la caña durante la molienda, estos tamaños varían de pequeños a grandes hasta un polvo fino.

El bagazo de caña constituye el mayor residuo generado en el procesamiento agroindustrial de la caña para la obtención de azúcar. Este desecho es quemado provocando graves consecuencias al medio ambiente por sus niveles altos de CO<sub>2</sub> que genera su combustión llegando a afectar a la salud humana, cuando existen núcleos de producción cercanos a las zonas de producción (Bastidas, 2016).

El bagazo es el remanente de la fibra de la caña y este constituye cerca del 30 % del total de la caña de azúcar procesada y posee el 50% de humedad. El bagazo se lo utiliza como combustible para las calderas en los ingenios, así como también para la producción de pulpa y papel. Este residuo fibroso (bagazo) pobre en sacarosa se origina una cantidad de 25 a 30 kg por cada 100 kg de caña (Rosas & Terán, 2015).

## **2.7 ESTRUCTURA DEL BAGAZO DE CAÑA**

El bagazo es el residuo o remanente del tallo de la caña de azúcar después de que esta ha sido sometida a la extracción del jugo azucarado, sale del último molino con un porcentaje del 50% de humedad y un contenido residual de sacarosa del 4% (base seca). Es uno de los subproductos de la caña, además de la miel final y cachaza, representa alrededor del 23% y 27% del total (11-13% base seca). El bagazo se caracteriza por su elevada heterogeneidad morfológica y está formada por 2 fracciones que se diferencian del resto, la fibra y el meollo o parénquima (Del Río Calle, 2018).

## 2.8 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y COMPONENTES DEL BAGAZO DE CAÑA

El bagazo de caña de azúcar es un material lignocelulósico que está constituido por celulosa, hemicelulosa y lignina. Se obtienen como subproductos de la molienda de la caña en las centrales azucareras hasta un 25% y 40% del total de materia procesada, esto depende mucho del porcentaje de fibra y la eficiencia durante la extracción del jugo (Chandler, y otros, 2012). En la tabla 2 se presenta los resultados evidenciándose el contenido de sus componentes estructurales como: celulosa, hemicelulosa y lignina, estos resultados presentan el mismo porcentaje presentado por el otro autor, es decir, no varían sus proporciones (García & Peralta , 2022)

**Tabla 2**

Composición química del bagazo de caña

<b>Componentes</b>	<b>Composición (%)</b>
Celulosa	38-50
Hemicelulosa	17-32
Lignina	15-30
Humedad	14
Ceniza	9.6

Fuente: (García & Peralta , 2022)

## 2.9 MICROORGANISMOS EMPLEADOS EN LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES

En la tabla 3, según investigaciones realizadas por (Shnada, Toyin, & Tahir, 2014), dan a conocer los microorganismos más utilizados en la degradación de los diferentes sustratos para producción de ácido cítrico.

**Tabla 3**

Microorganismos más utilizados en la degradación de sustratos para producir ácido cítrico

<b>Microorganismo</b>	<b>Sustrato degradado</b>	<b>Tiempo de incubación (H)</b>	<b>Rendimiento de ácido cítrico</b>	<b>Referencia</b>
A. níger NRRL 599	casaca de naranja (seco)	85	193.2 mg/g	(Torrado,2011)

A. níger NRRL KS-7	casaca de piña (seco)	120	60.6 g/kg	(Kareem, 2010)
A. níger aislado	casaca de banano (seco)	120	5.12 g/kg	(Iralapati & Kummari, 2015)
	casaca de naranja (fresco)	120	21.76 g/kg	
A. carbonarius	papa cruda	-	3.23 g/kg	(Moyano, 2014)
A. níger	aceite de semilla Vernicia fordii	168	350 g/kg	(M. Schneider, Zimmer, Cremonese & Corbellini, 2014)
A. caespitosus	salvado de trigo	-	5.4 g/kg	(Alegre, 2009)
A. níger NRRL 567	pulpa de manzana	120	294.2 g/kg	(Dhillon, 2013)
A. ornatus y alternaria alternata	orujo de manzana y casaca de maní	48	13.32 mg/g	(Ali, 2016)
Saccharomyces cerevisiae	residuos de zanahoria	-	10.4 g/L	(AIMARETTI & YBALO, 2012)
A. carbonarius	casaca de naranja (seco)	150	126.2 mg/g	(Serrano, 2019)
A. níger ATCC 6275 y Trichoderma harzianum	sustratos orgánicos (compost)	144	3.5 g/L	(Álvarez, 2017)
	Galletas			
	semillas de albahaca			
A. níger CCT 4355	bagazo de caña	168	1.08 mg/L	(Bastos & Ribeiro, 2020)
Trichoderma reesei CMA			0.72 mg/L	
A. Níger	sustrato agrícola (mazorca de maíz)	72	2.32 g/L	(Shankar & Sivakumar, 2016)
	suero de leche	120	2.43 g/L	
A. níger NRRL 567	musgo de turba Sphagnum	288	124 g/kg	(Barrington, Seok Kim, Wang & Woo Kim, 2009)
A. níger	salvado de avena	72	72 g/kg	(Raja & Kruthi, 2013)
A. níger	cáscara de plátano	144	0.51%	

	cáscara de naranja		0.44%	(Dutta, Sahoo, Mishra, Pradhan & Behera, 2019)
	bagazo de caña		0.46%	
	paja de arroz		0.28%	
A. níger	bagazo de caña	96	212.63 mg/L	(Rocha, Silva & Gaspar, 2013)
Trichoderma reesei	Vinaza		113.25 mg/L	
A. níger	bagazo de caña	168	24.9 g/kg	(Goud, Srilakshmi, Kumar & Narasimha, 2012)
A. níger	algarroba africana	120	1.15 g/L	(Shnada, Toyin & Tahir, 2014)
A. níger	pulpa de fruta parkia	144	1.15 g/L	Estudio actual
A. níger	casaca de coco	168	1 g/L	(Sukesh, 2013)
A. níger	suero de leche/sacarosa	96	106.50 g/L	Holi & Delaimy, 2003)
A. níger 14/20	calabaza	168	10.35 g/L	(Majumder, 2010)

Fuente: (Shnada, Toyin, & Tahir, 2014).

## 2.10 MICROORGANISMOS UTILIZADOS

El *Aspergillus níger* es un hongo filamentoso que juega un rol muy importante dentro del campo de la biotecnología, el cual se destaca a nivel industrial en la explotación de ácidos orgánicos y enzimas hidrolíticas (Andersen, y otros, 2011).

Este m/o permite degradar con eficacia los principales polisacáridos presentes en los residuos vegetales y es uno de los más importantes productores de enzimas comerciales para la conversión de biomasa vegetal, debido a su alta capacidad de producción de enzimas como amilasas y proteasas. Este es el microorganismo preferido en la producción de ácido cítrico, debido a su alto rendimiento por unidad de tiempo incluso a valores de pH muy bajos, con la capacidad de fermentar una amplia gama de sustratos baratos (Alfenas & Souza, 2013).

Los microorganismos capaces de producir y acumular ácido cítrico son de los géneros *Aspergillus*, *Citromyces*, *Penicillium*, *Monilia*, *Candida* y *Pichia*. Las especies de *Aspergillus negros* y especialmente *Aspergillus níger*, son las más empleadas y las más efectivas, debido a que presentan baja actividad de las enzimas

isocitrato deshidrogenasa y aconitasa hidratasa y una alta actividad del citrato sintetasa (Velásquez, Beltran, Padilla, & Giraldo, 2010).

### 2.10.1 DESCRIPCIÓN

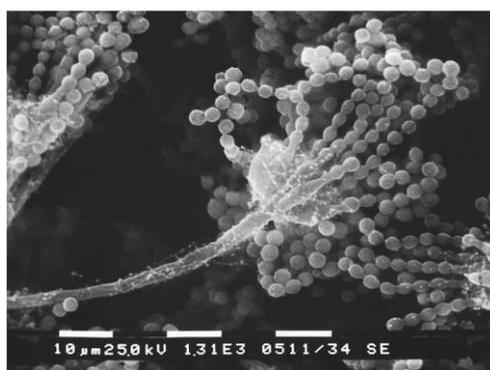
El *Aspergillus niger* es un hongo filamentoso del grupo Deuteromicetes u hongos imperfectos, este tipo de hongos son de aspecto microscópico y se caracteriza por poseer estructuras esporíferas o reproductoras llamadas cabezas conidiales, estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas. Además, este tipo de hongos debido a su diversidad algunas tienen el micelio lanoso de color blanco amarillento que cambia a negro, conidióforos largos y lisos que cubren completamente la vesícula (Rosas & Terán, 2015).

### 2.10.2 CARACTERÍSTICAS

El *Aspergillus* es un hongo filamentoso hialino, saprofita que pertenece al filo *Ascomycota*. Está formado por hifas hialinas septadas y presenta dos tipos de reproducción: la sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios) (INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO, 2012).

#### Figura 1

Características del *Aspergillus niger*



Fuente: (INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO, 2012).

Entre las características más representadas por este hongo según (Gil, 2016) tenemos:

### 2.10.2.1 Reproducción

El hongo *Aspergillus niger* se reproduce por vía asexual a través de la producción de conidios. Sus conidios pueden encontrarse en el suelo y en un gran número de sustratos naturales. Las mismas se esparcen gracias al viento, para hospedarse sobre distintas superficies.

### 2.10.2.2 Contagio

Este hongo afecta más a las personas adultas sea hombre o mujer, niños y hasta inclusive animales, las enfermedades que producen estos hongos no son contagiosas.

### 2.10.2.3 Beneficios

Degrada todo tipo de desechos agroindustriales, que luego son utilizados para elaborar productos de provecho y de esta manera ayuda al saneamiento del medio ambiente.

## 2.10.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La clasificación taxonómica presentada en la tabla 4 por (Gil, 2016), del *Aspergillus niger* es:

**Tabla 4**

Clasificación taxonómica

<b>Dominio</b>	<b>Eukarya</b>
Reino	Fungí
Filo	Ascomycota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>

Fuente: (Gil, 2016).

## **2.11 FERMENTACIÓN**

La fermentación se emplea para describir cualquier proceso para la obtención de un producto por medio de un cultivo de un m/o, el producto puede ser la célula referida como producción de biomasa. Si se desea obtener biomasa es necesario tener en cuenta algunos factores para poder obtener una oxidación completa del sustrato liberando toda la energía y que esta energía sea utilizada para la absorción y asimilación (López, 2018).

La fermentación es un proceso biotecnológico que se viene aplicando desde la antigüedad para la transformación de materias primas con el fin de obtener y conservar alimentos. La fermentación se refiere a la acción de los microorganismos que son capaces de degradar todo tipo de sustratos biológicos y entre estos están las (bacterias, hongos o levaduras), es decir aprovechar la actividad metabólica que generan a fin de obtener una transformación favorable de las materias primas para la elaboración de alimentos procesados (Parzanese, 2017).

### **2.11.1 FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO (FES)**

La fermentación en estado sólido (FES) denominado así por sus siglas en inglés, es un método sencillo utilizado para adecuar los residuos sólidos y adicionar un valor nutritivo de manera segura y ambientalmente amigable. Además, la selección del m/o es muy importante en este tipo de fermentaciones, misma que deben de cumplir una serie de requisitos. El uso del hongo *Aspergillus niger* es provechoso debido a que se puede obtener cerca de 19 enzimas y otros compuestos de suma importancia como el ácido cítrico y alcoholes (Grande, 2016).

La fermentación sólida es un proceso que involucra sustratos sólidos en ausencia parcial o total de agua libre, pero el sustrato debe tener la suficiente humedad para permitir el crecimiento del m/o llevando a cabo sus procesos metabólicos, sirve como fuente de nutrientes y soporte para que el microorganismo se desarrolle en él. Este tipo de fermentación sólida es el más utilizado debido por su eficacia y por no requerir equipo especializado (López, 2018).

La fermentación en estado sólido (FES), su principal objetivo es la valorización de los residuos orgánicos, estos procesos se ejecutan debido a que sus costos son muy bajos, menor energía, sencillez, mayor rendimiento de producción, productos más

puros y en concentraciones más altas con facilidad para su extracción, además en este proceso se debe tener un estricto control de la humedad y el microorganismo a emplear para que sea adecuado su uso y que brinde beneficios en la reproducción y crecimiento del mismo (Prieto & Torres, 2020).

Los parámetros que se deben tener en cuenta para una buena fermentación en estado sólido deben ser: tamaño de partícula, porosidad del sustrato, composición química, ingredientes del medio de cultivo, disponibilidad, estabilidad, esterilización del medio, agitación, aireación, humedad, pH, intercambio de calor, el mezclado y el costo de producción (Prieto & Torres, 2020).

Según reportes que da a conocer (Parzanese, 2017), menciona que en todo proceso FSS, los microorganismos crecen en contacto con tres fases.

#### **2.11.1.1 Fase sólida**

Está compuesta por la matriz sólida, ya sea natural o sintética y es la principal que actúa como soporte físico para los microorganismos.

#### **2.11.1.2 Fase gaseosa**

La fase gaseosa permite el aporte del oxígeno necesario para el crecimiento de los microorganismos.

#### **2.11.1.3 Fase líquida**

Esta fase se extiende en una capa muy fina en contacto con la interface aérea, es una fase discontinua formada por una película líquida que está atrapada en la matriz sólida, es la de menor preponderancia y aporta el agua mínima necesaria para el metabolismo celular.

### **2.12 CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO SUMERGIDO Y CULTIVO EN SUSTRATO SÓLIDO**

Las características de los tipos de cultivo se detallan a continuación según (Parzanese, 2017).

#### **Cultivo sumergido**

- El agua es el principal componente mayoritario.
- El medio de cultivo fluye libremente.

- La profundidad del medio es grande.
- El medio se compone de nutrientes provenientes de diversas fuentes.
- No hay gradientes de concentración de nutrientes, sino que hay una uniformidad en la distribución de los mismos en todo el medio.
- Aséptico.
- El medio está constituido por dos fases: una líquida y una gaseosa. El oxígeno disponible está disuelto en la fase líquida.
- Los hongos crecen formando pellets.
- Requiere de una cantidad pequeña de inóculo para iniciar el cultivo.
- El producto final obtenido se encuentra diluido en el medio, requiere etapas posteriores de extracción y concentración.

#### **Cultivo en sustrato sólido**

- El agua no es el componente mayoritario del medio de cultivo.
- El medio de cultivo no fluye libremente.
- Profundidad del medio pequeña
- La fuente de todos los nutrientes la constituye el sustrato sólido, ya sea de forma natural o de un soporte sintético impregnado.
- Existen importantes gradientes de nutrientes, es decir hay zonas del sustrato donde hay grandes concentraciones de nutrientes y otras donde son escasos.
- No aséptico.
- El medio de cultivo se constituye de tres fases: líquida, gaseosa y sólida. El oxígeno disponible se encuentra en la fase gaseosa.
- Los hongos crecen formando hifas, de tipo aéreas o penetrantes.
- Requiere de un inóculo grande para iniciar el cultivo.
- Se obtiene el producto ya concentrado.

### **2.13 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO**

Reportes dado por (*Ballardo, 2016*), da a conocer las ventajas y desventajas de la fermentación en sustrato sólido.

## **Ventajas**

- ✓ Sus costos de inversión y operación son bastante bajos.
- ✓ La tecnología que se utiliza es simple y tiene menores requerimientos energéticos.
- ✓ Los rendimientos de producción son altos y se obtienen cuando el proceso está ajustado correctamente.
- ✓ Se maneja sustratos concentrados y las cámaras de fermentación son de menor tamaño.
- ✓ No requieren tanques de alimentación y se puede utilizar la inoculación con esporas.
- ✓ Los bajos niveles de humedad disminuyen la contaminación del cultivo.
- ✓ El crecimiento de los hongos en el biorreactor es muy similar a las condiciones de su habitat natural, lo que favorece su desarrollo y expresión genética.
- ✓ La aireación forzada en el reactor es más sencilla que para cultivos sumergidos.
- ✓ El downstream (operación de extracción y purificación del producto) es mucho más simple.
- ✓ Admite el aprovechamiento de los subproductos de la agroindustria para la obtención de compuestos de alto valor agregado.

## **Desventajas**

- ✓ El proceso se puede aplicar solo con ciertos microorganismos debido a las condiciones de escasa disponibilidad de agua.
- ✓ El escalado de los procesos de laboratorio a escala industrial, es difícil, principalmente porque la remoción del calor generado por el metabolismo de los microorganismos es una operación dificultosa.
- ✓ El control del proceso y la optimización de las condiciones en escala industrial deben continuar siendo investigadas.
- ✓ El tiempo de fermentación es mayor en caso de que se utilicen microorganismos que presentan bajas velocidades de crecimiento.

- ✓ Se dificulta la medición y la monitorización de los parámetros de la fermentación como: pH, temperatura, humedad, concentración del sustrato y productos.
- ✓ Cuando se trabaja a grandes escalas la extracción del calor metabólico es un problema, ya que es difícil controlar la temperatura del proceso.

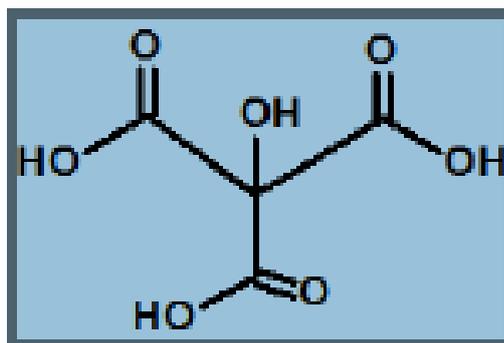
## 2.14 ÁCIDO CÍTRICO

El ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) es considerado como un ácido orgánico tricarbónico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en los cítricos como el limón y la naranja. En su forma industrial el ácido cítrico es un polvo cristalino, blanco, inodoro y con sabor ácido fuerte. Es un producto muy cotizado a nivel mundial debido a sus propiedades que posee como: acidulante y preservante que contribuye asegurar el sabor original, la apariencia natural y la consistencia de los productos. El ácido cítrico es producido principalmente por fermentación sumergida por ser el método más efectivo para este proceso utilizando diversos microorganismos capaces de degradar materias primas como almidón, sacarosa y residuos agroindustriales como: bagazo de caña, mieles de caña, suero de leche y otros (Pérez, Ley Chong, Rodríguez, & González, 2016).

La estructura química del ácido cítrico es.

**Figura 2**

Estructura del ácido cítrico



**Fuente:** (Muñoz, Sáenz, López, Cantú, & Barajas, 2014).

Entre los ácidos orgánicos más utilizados es el ácido cítrico, gracias a su baja toxicidad en comparación con otros acidulantes (Tuquerres, y otros, 2020).

En cuanto a la producción de ácido cítrico, afirman que el pH inicial requerido depende mucho de la fuente de carbono utilizada. Mencionan que los hongos filamentosos como el *Aspergillus niger* acumulan altas concentraciones de ácido cítrico a partir de hexosas o disacáridos cuando es cultivado bajo condiciones particulares (Velásquez, Beltran, Padilla, & Giraldo, 2010).

En la actualidad en el Ecuador no existen antecedentes acerca de la producción de ácido cítrico a nivel industrial, debido a la insuficiente información local, de una propuesta tecnológica y metodológica apropiada a nivel de la zona de estudio (Rosas & Terán, 2015).

## 2.15 PRINCIPALES USOS DEL ÁCIDO CÍTRICO

Según (Rosas & Terán, 2015) en su investigación de tesis realizada con fuentes importantes de otros autores dan a conocer los principales usos del ácido cítrico son:

- **Bebidas:** Se usa como saborizante, regulador del pH y como conservantes antimicrobianos.
- **Dulces y Conservas:** Sirve como Acidulante y regulador del pH para lograr una óptima gelificación.
- **Verduras Procesadas:** En combinación con el ácido ascórbico, previene la oxidación.
- **Alimentos Congelados:** Ayuda a la acción de los antioxidantes, previene los pardeamientos indeseables, inhibe el deterioro del sabor y el color.
- **Frutas y Hortalizas Enlatadas:** Reduce el pH, previene la oxidación enzimática y la degradación del color, resalta el sabor.
- **Aceites y Grasas:** Previene la oxidación.
- **Confitería y Repostería:** Se utiliza como acidulante, resaltador de sabores y optimiza las características de los geles.
- **Quesos Pasteurizados y Procesados:** En forma de sal, sirve como emulsificante y texturizante.
- **Lácteos:** Sirve como estabilizante en cremas batidas.

- **Carnes:** Se utiliza como modificador de textura.

## **2.16 MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y RENDIMIENTOS**

### **2.16.1 ANTECEDENTES DE PRODUCCIÓN**

El ácido cítrico fue aislado en Inglaterra por primera vez por Scheels Karls en 1874, a partir del jugo de limón importado de Italia. Después de esto surgieron numerosas alternativas para la producción de este producto que incluye técnicas químicas y microbianas. En 1923 Wehmer observó la presencia de ácido cítrico como un subproducto del oxalato de calcio producido por el hongo *Penicillium glaucum*, mientras que otras investigaciones mostraron el aislamiento de 2 variedades de hongos que pertenecen al género *Citromyces*. Sin embargo, los ensayos industriales no tuvieron éxito debido a los problemas de contaminación y la larga duración de la fermentación. Este proceso industrial se abrió por primera vez por James Currie, en el año de 1917, donde encontró que el *Aspergillus niger* tenía la capacidad de producir cantidades significativas de ácido cítrico en medio a base de azúcar (Muñoz, Sáenz, López, Cantú, & Barajas, 2014).

### **2.16.2 MÉTODOS DE PRODUCCIÓN**

En la actualidad la producción comercial de ácido cítrico se realiza por procesos de fermentación en tanques profundos (fermentación sumergida, que es el método más común) o en tanques no profundos (fermentación de superficie), mientras que la fermentación en estado sólido es utilizada en menor medida para la producción de ácido cítrico, se usan carbohidratos naturales como: azúcar y dextrosa (como sustratos) y el *Aspergillus niger* como organismo de fermentación (Pérez, Ley Chong, Rodríguez, & González, 2016).

Sin embargo, estos son algunos de los métodos de obtención a nivel industrial del ácido cítrico, pero existen otros métodos, uno de ellos es la obtención del ácido cítrico a partir de cascaras de frutos cítricos como el limón y las naranjas, en medio básico (Muñoz, Sáenz, López, Cantú, & Barajas, 2014).

## **2.17 PROCESO FERMENTATIVO Y FACTORES INFLUYENTES**

El proceso de obtención tiene varias fases: la preparación del inóculo, fermentación y la recuperación del producto (Rosales, 2019).

Para la producción de ácido cítrico es muy importante la elección del sustrato adecuado, ya que de su composición depende el rendimiento de la producción de ácido cítrico. De tal manera que el sustrato debe poseer la característica de ser insoluble en agua, elevado contenido de carbohidratos y proteína y otro factor importante su estructura granular ya que esto hace que sea posible la adhesión y la penetración del microorganismo (Serrano, 2019).

En la fermentación en estado sólido un factor decisivo a tener en cuenta es el contenido de humedad del sustrato, si la humedad es alta provoca descensos en la porosidad y difusión del oxígeno lo que aumenta el riesgo de contaminación bacteriana y la formación de micelio aéreo, en cambio una baja actividad de agua puede producir esporulación del microorganismo. El contenido de humedad para una buena fermentación debe oscilar entre el 30 y 75%, pero cabe recalcar que durante el proceso se ocasionan reducciones de este nivel debido a la evaporación o actividad metabólica de los microorganismos, por esta razón es necesaria la adición de agua estéril al sistema a intervalos diferentes (Muñoz, Sáenz, López, Cantú, & Barajas, 2014).

En este tipo de fermentación sólida, se debe de tener en cuenta dos factores que son de vital importancia que es la aireación y agitación, ya que estos permiten la transferencia de masa tanto a nivel intra e inter particular permitiendo la difusión de gases y la transferencia de oxígeno al sistema, para lograr estas condiciones el sustrato debe representar al menos un 30% del volumen total de la masa de fermentación, al igual es muy indispensable efectuar agitaciones constantes con el fin de eliminar el CO<sub>2</sub> formado y la renovación de aire en los espacios intersticiales (Moyano, Borrás, & Iglesias, 2016).

Los hongos son el microorganismo más utilizado en este tipo de fermentación sólida, debido a que crecen de forma natural sobre materiales sólidos, para poder utilizar el inóculo se parte de la esporulación del hongo y su lavado para obtener una suspensión de esporas que será añadida al sustrato, finalmente el ácido cítrico

producido puede ser recuperado mediante precipitación, adsorción y extracción (Alvarez, 2017).

## **2.18 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE ÁCIDO CÍTRICO**

El uso de nuevos procesos biotecnológicos utilizando hongos ha ganado gran interés en la actualidad para la producción de ácido cítrico, en comparación con la síntesis química que es un procedimiento muy costoso. La fermentación sumergida es el método que más se emplea a nivel industrial, sin embargo, los estudios realizados en fermentación sólida generaron importantes cantidades de ácido cítrico (Alfenas & Souza, 2013).

Aproximadamente el 99% de la producción mundial de ácido cítrico se produce a través de procesos microbianos, que pueden llevarse a cabo utilizando la superficie o cultivos sumergidos (Muñoz, Sáenz, López, Cantú, & Barajas, 2014).

La obtención de ácido cítrico se realiza por vía de síntesis química y por biosíntesis por fermentación en sustrato sumergido de cultivos de *Aspergillus niger*. Igualmente existen mejoras a escala de laboratorio de procesos de FES para la obtención de este producto, con el objetivo de obtener mejores rendimientos y disminuir los costos respecto al cultivo sumergido (Parzanese, 2017).

El nivel de oxígeno es un factor importante en el fermentador para la producción de ácido cítrico por fermentación sólida (FES). Diversos investigadores han estudiado la influencia de la aireación forzada en ese proceso, y se ha concluido que la producción de ácido cítrico por FES con *A. niger* se ve favorecida por una limitada producción de biomasa, lo que ocurre cuando se aplican bajas velocidades de aireación. La producción de ácido cítrico por fermentación sólida con el aprovechamiento de subproductos de la agroindustria es considerada como una alternativa viable a la producción por fermentación tradicional en cultivo sumergido y la síntesis química (Moyano, Borrás, & Iglesias, 2016).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 LOCALIZACIÓN DEL EXPERIMENTO

La experimentación se realizó: En el laboratorio de microbiología y análisis fisicoquímicos de la Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales (FICAYA), ubicado en el campus San Vicente de Paul de la Universidad Técnica del Norte, su ubicación y sus datos meteorológicos se indica en la tabla 5.

**Tabla 5**

Ubicación y datos meteorológicos del área de estudio

Características	Detalle
Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Altitud	2237 msnm
Humedad relativa promedio	79%
Temperatura media	18.1 °C

Fuente: (INAMHI, 2022)

#### 3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

##### 3.2.1 MATERIA PRIMA E INSUMOS

- Residuo bagazo de caña (*Saccharum officinarum* L. POJ 93) Cotacachi
- Cepa del hongo *Aspergillus niger*
- Agua destilada
- Agar PDA (Agar Papa Dextrosa)
- Ácido cítrico
- Ácido 3.5 dinitrosalicílico (DNS)
- Glucosa
- Extracto de levadura
- Sacarosa
- Hidróxido de sodio (0,1N)
- Tartrato de sodio-potasio
- Anhídrido acético

- Piridina
- Fenolftaleína
- Hidróxido de calcio (35%)
- Ácido sulfúrico (98%)

### 3.2.2 EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIO

**Equipos:** biorreactor, balanza analítica, autoclave, estufa, microscopio, potenciómetro, espectrofotómetro, licuadora, secador de bandejas, cámara Neubauer, agitador, centrifuga.

**Materiales:** cajas Petri, mechero, fosforo, gradilla, vasos de precipitación, pipetas, micropipetas, probeta, cuchara, embudo de vidrio, fundas con cierre hermético, tamiz de 3 tamaños: (1.0, 2.3 y 3.5 mm), frascos de vidrio con tapa, papel filtro, varilla de vidrio, celdas plásticas de espectrofotometría.

#### **Software:**

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico:

- Excel 2019
- Design Expert 13

## 3.3 MÉTODOS

### 3.3.1 ESTANDARIZAR EL BAGAZO DE CAÑA PREVIO A LA OBTENCIÓN DE UN SUSTRATO APTO PARA LA FERMENTACIÓN.

Para llevar a cabo la caracterización del residuo bagazo de caña se realizó un previo secado y estandarizado, obteniendo un sustrato apropiado y apto para la fermentación, un proceso que se debe realizar para garantizar la calidad del producto, a su vez se realiza un tamizado para obtener un tamaño de partícula adecuado entre (1.0, 2.3 y 3.5 mm), para facilitar el proceso de desarrollo de la cepa *Aspergillus niger* en la producción del ácido cítrico, de tal manera que a este sustrato se realizó los análisis como: pH, humedad, ceniza, materia seca y azúcares reductores, mismas que se llevaron a cabo con la normativa detallada en la (tabla 6), para su posterior conservación y que actúan como condicionantes para que se lleve a cabo el crecimiento del hongo *Aspergillus niger*.

**Tabla 6**

Variables Cuantitativas del Análisis Físico Químico

<b>Variables</b>	<b>Método</b>	<b>Unidad</b>	<b>Referencia</b>
Humedad	Termobalanza	%	(FONDONORMA, 1979)
Materia seca	Termobalanza	%	(A.O.A.C, 2016)
Cenizas	Cenizas totales	%	(TAPPI T 211, 2007)
Azúcares reductores	Colorimétrico (DNS)	%	(Miller, 1995)
pH	Potenciómetro	Adimensional	(FONDONORMA, 1979)

### 3.3.2 EVALUAR EL TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL BAGAZO DE CAÑA Y LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN EN EL RENDIMIENTO DEL ÁCIDO CÍTRICO.

#### Obtención y manejo de las cepas del hongo *Aspergillus niger*

La cepa del hongo *Aspergillus niger*, se obtuvo del laboratorio de la carrera de Biotecnología Aplicada de la Universidad Técnica del Norte, el crecimiento de este hongo se lleva a cabo por el método ostentado por (Atere & Femi, 2012).

Se trabajó con las cepas que colonizaron por completo la placa, permitiendo de esta manera realizar la experimentación llevando a cabo los 9 tratamientos con sus respectivas replicas en el laboratorio de Análisis Físicoquímicas de la Universidad Técnica del Norte.

#### Factores en estudio

En la presente investigación, se toma como factores de estudio a: (A) tamaño de partícula (mm) y (B) temperatura (°C), para ello se utilizó un diseño experimental  $3^2$  con tres niveles cada uno, los factores se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7**

Factores y niveles en estudio

<b>Factor A</b>			<b>Factor B</b>		
Tamaño de partícula (mm)			Temperatura (°C)		
1	2.3	3.5	22	26	30

### Tratamientos en estudio

En la tabla 8 se presenta la combinación de los dos factores en estudio logrando como resultado nueve tratamientos de experimentación.

**Tabla 8**

Descripción de los tratamientos.

Tratamientos	Tamaño de partícula	Temperatura	Combinación	Descripción
T1	A1	B1	A1B1	1 mm, 22 °C
T2	A1	B2	A1B2	1 mm, 26 °C
T3	A1	B3	A1B3	1 mm, 30 °C
T4	A2	B1	A2B1	2.3 mm, 22 °C
T5	A2	B2	A2B2	2.3 mm, 26 °C
T6	A2	B3	A2B3	2.3 mm, 30 °C
T7	A3	B1	A3B1	3.5 mm, 22 °C
T8	A3	B2	A3B2	3.5 mm, 26 °C
T9	A3	B3	A3B3	3.5 mm, 30 °C

### Características del experimento

Se valoraron 9 tratamientos cada uno con 3 repeticiones, obteniendo un total de 27 unidades experimentales compuestas por 10 g de sustrato previamente esterilizado.

En la tabla 9 se presenta el esquema del análisis de varianza.

**Tabla 9**

Análisis de varianza

Fuentes de variación	Grados de libertad
Total	26
Tratamientos	8
Factor A	1
Factor B	1
A x B	1
Error experimental	18

### Variables a evaluarse

Las variables estimadas se presentan en la tabla 10.

**Tabla 10**

Variables experimentales

Variables	Métodos	Unidad
<b>Independientes</b>		
Tamaño de partícula	Tamización	mm
Temperatura	Controlador STC-3028	°C
<b>Dependientes</b>		
Ácido cítrico	Piridina y Anhídrido acético	g/kg
Biomasa (generación de esporas)	Método microscópico en Cámara de Neubauer	esporas/ml
Consumo fuente de carbono	Azúcares reductores (DNS)	%
Productividad	Piridina y Anhídrido acético	g/kg.h

**Descripción de las variables experimentales**

**Humedad:** El contenido de humedad inicial del sustrato disminuyó mediante la aplicación del secado, método necesario que se requiere aplicar para reducir el tamaño, cuya humedad de 8.28% se estandarizó hasta llegar al 70% durante la fase de experimentación, con cálculos de base seca.

**Tamaño de partícula:** La reducción de tamaño se realizó mediante tamices de diferentes diámetros (1.0, 2.3 y 3.5 mm) logrando obtener 3 tamaños de partículas diferentes y uniformes para el desarrollo del hongo.

**Temperatura:** Fueron medidas a través de un controlador SCT-3028 al igual que la humedad, cuyo margen de error para la temperatura es de  $\pm 0.1$  °C y en la humedad de  $\pm 0.2\%$ .

**Ácido cítrico:** Al finalizar el proceso de fermentación, se obtiene un filtrado (contiene ácido cítrico), se determina mediante espectrofotometría a 420 nm tras añadir piridina y anhídrido acético.

**Biomasa (generación de esporas):** El conteo de esporas se realiza mediante cámara de Neubauer, el cual permite establecer la cantidad de esporas presentes por cada ml de muestra y se lo realiza en el cuadrante que mejor visualización facilite. Las fórmulas de aplicación se presentan en el anexo 1.

**Consumo fuente de carbono:** El consumo fuente de carbono en el sustrato (Bagazo de caña), se realiza mediante la aplicación del método DNS antes y al final de la fermentación.

**Productividad:** Para determinar la productividad del ácido cítrico se realiza los cálculos respectivos una vez que se obtiene el producto final.

### **3.3.3 ESTABLECER LAS CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO CÍTRICO OBTENIDO.**

Para el desarrollo del objetivo descrito se optó por utilizar un paquete estadístico que es Design Expert 13 versión libre para desarrollar el diseño experimental, de esta manera analizar y visualizar los datos de cada experimento. Una vez realizado el diseño del experimento y obtenido el producto (ácido cítrico) se procede a establecer las características de la misma obtenido por fermentación en estado sólido utilizando bagazo de caña, para eso se hace uso el método de titulación que revela el  $\text{pH} = \text{pka}$  de los ácidos débiles (ácido cítrico), y la determinación del punto de fusión, comprobando de esta manera que las características del ácido cítrico obtenido son las mismas del producto comercial.

#### **Características fisicoquímicas del ácido cítrico**

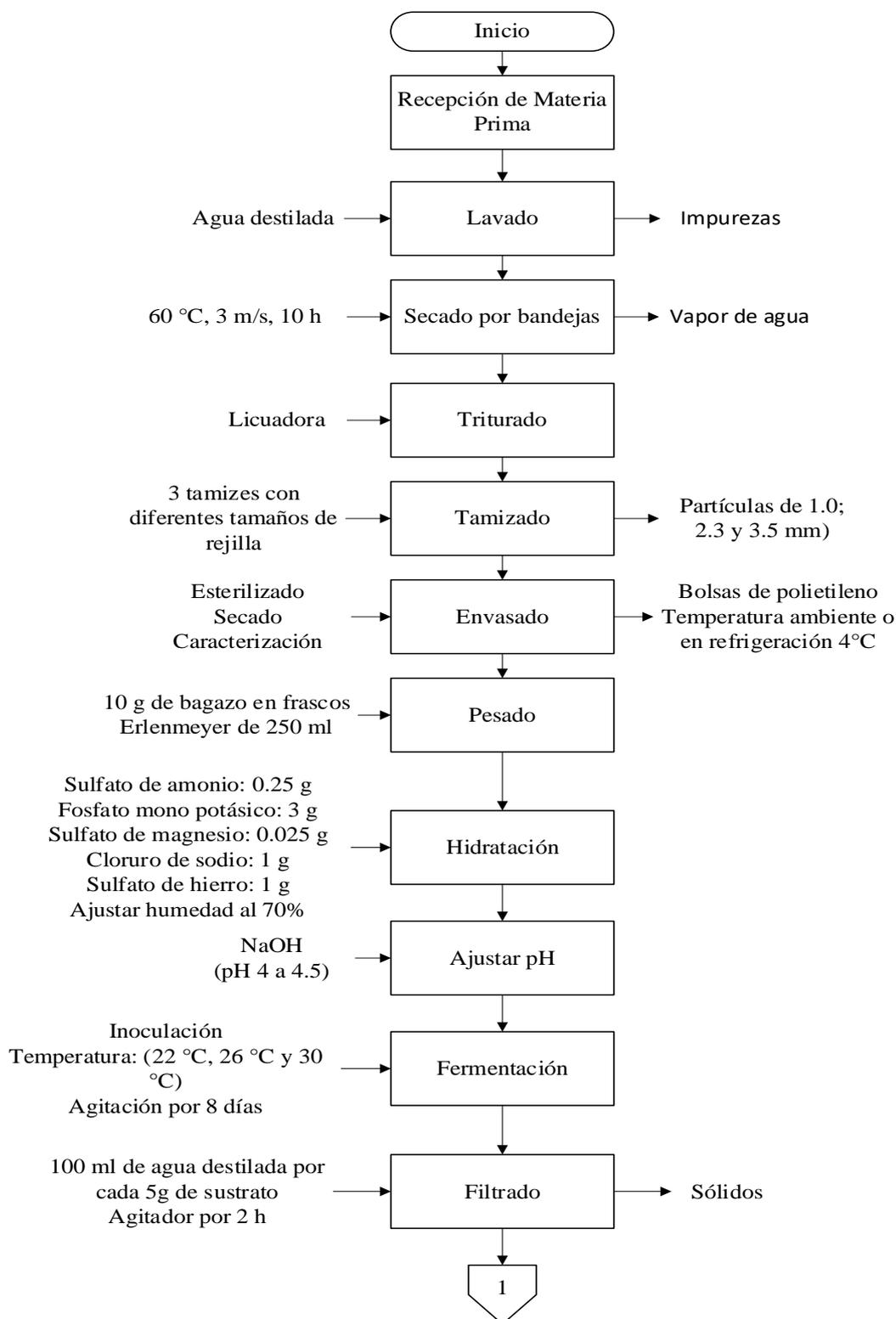
En la tabla 11 se presenta las características del ácido cítrico obtenido.

**Tabla 11**  
Constituyentes del método.

<b>Método</b>	<b>Control</b>	<b>Resultado</b>
Titulación	Acidez ( $\text{pH} = \text{pka}$ )	Ácido cítrico
Punto de Fusión	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Cambio de estado (sólido-líquido)

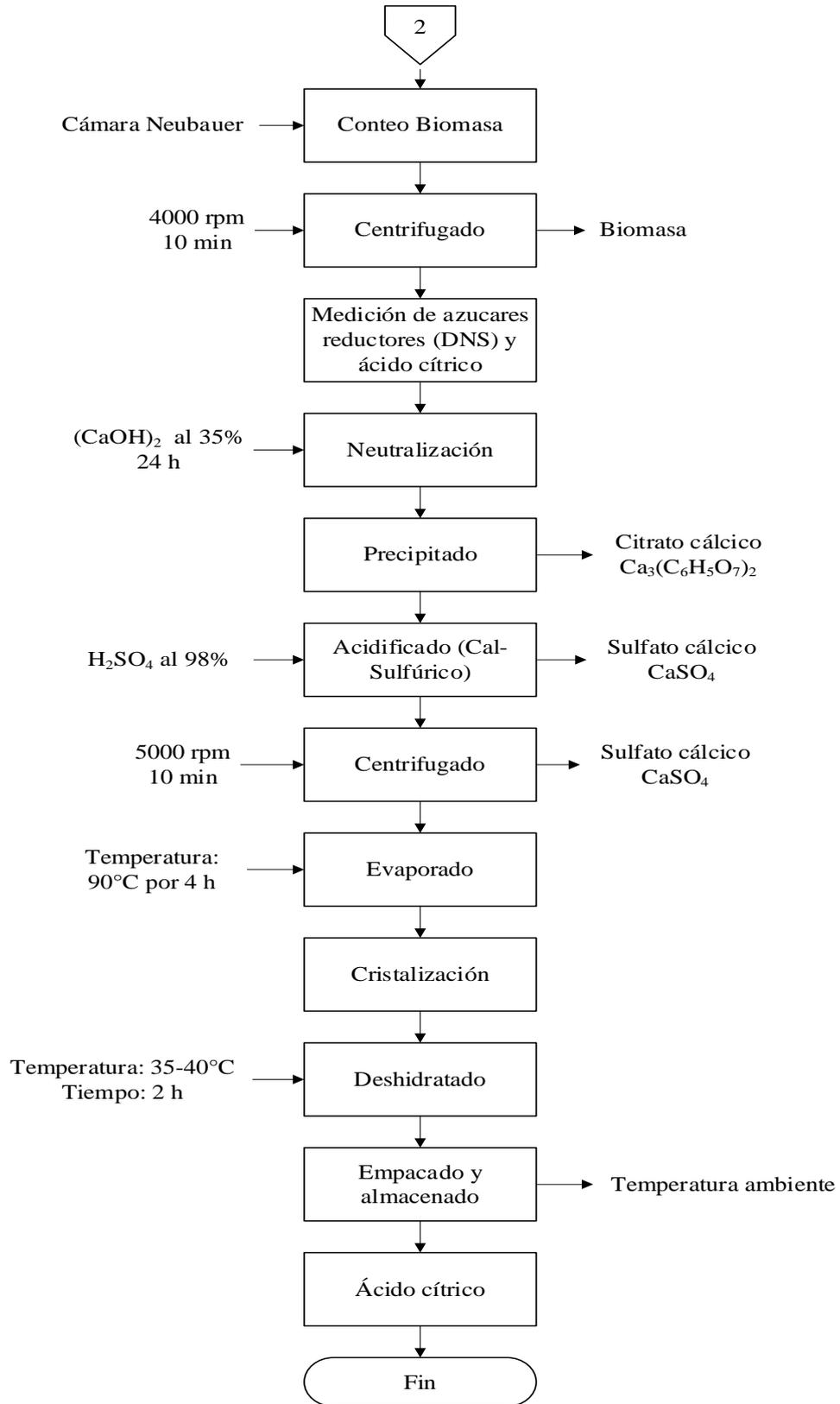
### **3.4 MANEJO DEL EXPERIMENTO**

### 3.4.1 DIAGRAMA DE BLOQUES PARA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO.



**Figura 3**

Diagrama de bloques para producción de ácido cítrico



### **3.4.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO**

#### **Recepción de materia prima**

La materia prima (Bagazo de caña), se obtuvo de un local que se dedica a la comercialización de jugo de caña ubicado en la calle 10 de agosto en la ciudad de Cotacachi. Se recolecto en fundas de basura para posteriormente ser transportada.

#### **Lavado**

Se realiza con la finalidad de eliminar cualquier tipo de impurezas y materia extraña, se realizó un lavado constante con agua destilada por 3 minutos.

#### **Secado por bandejas**

El secado se realiza en un secador de bandejas programado por un tiempo prolongado de 10 horas a una temperatura de 60 °C, con un flujo de aire de 3 m/s.

#### **Triturado y tamizado**

La materia prima se sometió a un proceso de reducción de tamaño haciendo uso de una licuadora, posteriormente se lleva a tamizar y se obtiene 3 tamaños de partícula (1.0, 2.3 y 3.5 mm).

#### **Envasado**

Previo al envasado se realiza un esterilizado de la materia prima, después un secado por 2 horas para que todos los experimentos empiecen con el mismo nivel de humedad y se realiza una caracterización para envasar el sustrato hasta el momento de su uso en bolsas de polietileno a una temperatura ambiente o a 4 °C.

#### **Pesado**

Se pesa 10 gramos de sustrato de los 3 tamaños de partícula en frascos Erlenmeyer de 250 ml.

#### **Hidratación**

La hidratación se realiza mediante el cálculo de diferencia de pesos, para ello se toma en cuenta la humedad inicial del sustrato y de esta manera se determina la cantidad de agua a completar con la solución salina, ajustando la humedad del sustrato a un 70% durante toda la fase de fermentación.

#### **Ajustar pH**

La medición del pH se realiza con un potenciómetro, se debe de ajustar el sustrato hidratado a un pH de 4 a 4.5 con hidróxido de sodio, que son valores adecuados y óptimos para la producción de ácido cítrico.

### **Fermentación**

Previo a la fermentación se realiza la inoculación del hongo en el sustrato, se inocula con 2 ml de hongo *Aspergillus niger*. En la etapa de fermentación se introducen los frascos Erlenmeyer que contienen el sustrato en cada uno de los compartimentos del Biorreactor, en donde se debe de controlar las variables de temperatura y humedad durante 8 días de fermentación, para ello se trabaja con 3 niveles de temperatura (22 °C, 26 °C y 30 °C) y la humedad del 70%, para lograr controlar la humedad se utiliza un humidificador (Mist Maker) de 1 membrana que funciona mediante ultrasonidos generando diminutas gotas que contribuyen a aumentar la humedad relativa, este humidificador está conectada a un controlador de temperatura y humedad (Termostato STC-3028) y este al biorreactor, haciendo que la humedad se mantenga en el 70% durante los 8 días de fermentación y se debe de agitar los frascos cada 24 horas.

### **Filtrado**

Una vez transcurrido los 8 días del proceso de fermentación se realiza el filtrado, por cada 5 gramos de sustrato se adiciona 100 ml de agua destilada, la mezcla se agita en un agitador rotatorio por 2 horas y luego se filtró a través de papel filtro Whatman #1.

### **Conteo biomasa**

Una vez que se tiene el filtrado, se procede a realizar el conteo de esporas haciendo uso de la Cámara de Neubauer y microscopio, donde podemos determinar la formación de esporas aplicando la respectiva formula.

### **Centrifugado**

Esta etapa se realiza a 4000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, consiste en eliminar las esporas (micelio) del hongo *Aspergillus niger* y obtener un filtrado libre de impurezas.

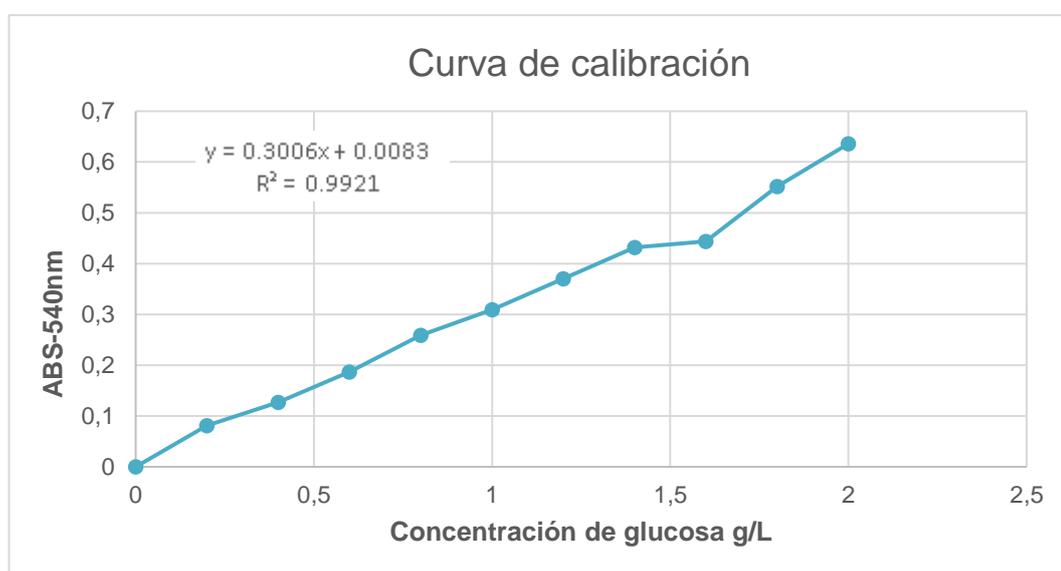
### **Medición de azúcares reductores (DNS)**

El DNS es un método colorimétrico que ayuda a determinar la cantidad de azúcares reductores presente en una muestra (Bagazo de caña), para llevar a cabo este procedimiento se hace reaccionar el ácido 3.5 Dinitrosalicílico, este método se utiliza para realizar los análisis antes y después de la fermentación.

Para la medición de los azúcares reductores en la muestra se realiza una curva de calibración de glucosa, dicha curva se presenta en la figura 4.

#### Figura 4

Curva de calibración de azúcares reductores



Según el método DNS (técnica de Miller 1959), es una técnica colorimétrica que sirve para cuantificar los azúcares reductores producidos durante la fermentación o en una reacción enzimática. La absorbancia se determina en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm, para realizar la curva de calibración se realizaron diluciones de glucosa (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 y 2 g/L), todas estas concentraciones fueron llevadas a tubos de ensayo en relación 50:50 (500  $\mu$ L de muestra y 500  $\mu$ L de reactivo DNS), se llevó a ebullición por 5 minutos y se enfrió rápidamente hasta temperatura ambiente, se tomó 1 ml de la muestra y se colocó en las cubetas del espectrofotómetro y se procede con la lectura, por consiguiente se realiza una curva de calibración considerando la representación gráfica de un eje de coordenadas, donde el eje Y es la absorbancia y el eje X la concentración.

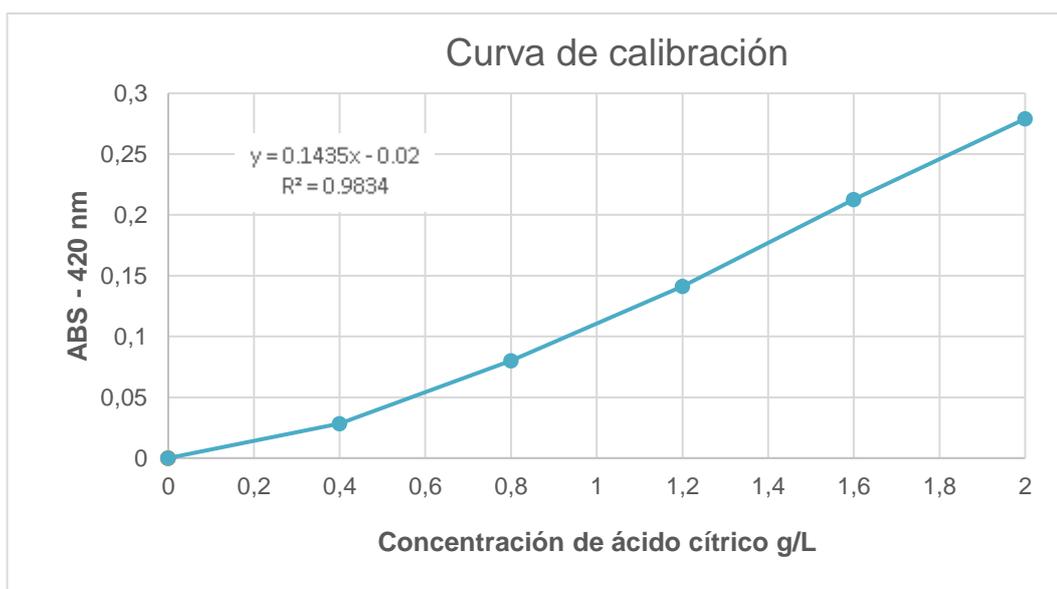
#### Medición de ácido cítrico

La medición del ácido cítrico se realiza la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm, se prepara diluciones de ácido cítrico (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2 g/L) para realizar la curva de calibración, estas concentraciones son llevadas a tubos de ensayo en relación 50:50 (500 uL de la solución madre ácido cítrico y 500 uL de agua destilada) a esto se adiciona 1.3 ml de piridina y 5.7 de anhídrido acético, se produce una reacción y se deja en reposo por 20 minutos hasta que se enfríe y se procede con la lectura para realizar la curva de calibración considerando las coordenadas donde el eje Y es la absorbancia y el eje X la concentración.

Para la medición del ácido cítrico en la muestra se realiza una curva de calibración de ácido cítrico, dicha curva se presenta en la figura 5.

**Figura 5**

Curva de calibración de ácido cítrico



### Neutralizado y precipitado

El filtrado que contiene ácido cítrico, se adiciona hidróxido de calcio (CaOH)<sub>2</sub> al 35%, se deja por un tiempo de 24 horas para que se precipite y forme el citrato cálcico Ca<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>.

### Acidificado (Cal-sulfúrico)

Una vez que se genera el precipitado de citrato cálcico Ca<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>, se retira el sobrenadante y se adiciona al precipitado ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98%, de igual

manera se deja en reposo por 24 horas lo que hace que se forme sulfato cálcico  $\text{CaSO}_4$ .

### **Centrifugado**

Se realiza el centrifugado de sulfato cálcico a 5000 rpm por 10 minutos, obteniendo un filtrado libre de impurezas.

### **Evaporado**

Una vez recuperado el sobrenadante libre de cualquier impureza se lleva a un evaporado a una temperatura de 90 °C por un tiempo de 4 horas.

### **Cristalización**

Conforme el proceso de evaporado va avanzando se van formando los primeros cristales de ácido cítrico.

### **Deshidratado**

Cuando se evapora la mayor cantidad de agua posible, los cristales que se forman se filtran en papel filtro para retirar el excedente de agua y llevarlo a un deshidratado a una temperatura de 35 °C a 40 °C por un tiempo de 2 horas, para que el producto final ácido cítrico salga lo más seco posible.

### **Empacado y almacenado**

Una vez que el producto se seca, se retira y se procede a empacar en un recipiente de vidrio y dejarlo almacenado a una temperatura ambiente para su conservación.

### **Ácido cítrico**

El producto final obtenido es un polvo cristalino de color blanco.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1 ESTANDARIZAR EL BAGAZO DE CAÑA PREVIO A LA OBTENCIÓN DE UN SUSTRATO APTO PARA LA FERMENTACIÓN.

##### 4.1.1 ANÁLISIS PROXIMAL

Los análisis fisicoquímicos se presentan en la tabla 12, permitiendo determinar el punto de partida del experimento.

**Tabla 12**

Análisis fisicoquímicos del bagazo de caña triturado

	<b>Humedad (%)</b>	<b>Materia seca (%)</b>	<b>Cenizas (%)</b>	<b>Azúcares reductores (g/L)</b>	<b>pH Adimensional</b>
Promedio	8.28 ± 0.4	91.72 ± 0.54	6.15 ± 0.41	9.41 ± 1.55	3.28 ± 0.10

\* Promedio ± desviación estándar

##### **Humedad**

El contenido de humedad del residuo del bagazo de caña después del proceso de secado es de 8.28 ± 0.4%, según (Villalba & Arzola, 2019) dan a conocer niveles de humedad del 4% al 12.34%, por lo tanto, el contenido de humedad presente de 8.28% es adecuado para dar inicio al proceso de fermentación.

##### **Materia seca**

Después del proceso de deshidratado la materia seca del bagazo fue de 91.72 ± 0.54% (base seca), según (Cabrera, León, Montano, & Dopico, 2016) dan a conocer que la materia seca empieza a disminuir conforme va avanzando el proceso de fermentación, en sus estudios realizados el bagazo de caña tiene 91.05% de materia

seca y por lo tanto el sustrato empleado en este experimento puede prolongar el proceso fermentativo.

### **Cenizas**

El porcentaje de cenizas obtenido fue de  $6.15 \pm 0.41\%$ , estudios realizados por (Oliva & Antolin, 2015), dan a conocer que el contenido de cenizas en el bagazo de caña en (base seca) es alrededor del 6% al 8%, pero estos valores pueden llegar a elevarse de manera considerable a valores del 12% al 15% como consecuencia directa de la postcosecha, cosecha, mecanización y fuertes temporadas de lluvia, etc. Pero este aumento de cenizas según dan a conocer (Resano, Guillen, Ubillús, & Barranzuela, 2022) tiene sus beneficios, a mayor cantidad de cenizas mayor será el porcentaje de azúcares reductores aproximadamente 3 veces más.

Estudios realizados por (Tlachi, y otros, 2007) mencionan que valores menores al 6% pueden causar deficiencia y bajo desarrollo del m/o, mientras que reportes de (Cabrera, León, Montano, & Dopico, 2016) aseveran que elevadas concentraciones de cenizas por encima del 15% provoca un aumento de pH y genera toxicidad en el sustrato y que sea casi imposible el desarrollo del m/o.

### **Azúcares reductores**

La cantidad de azúcares reductores obtenida del bagazo de caña es de  $9.41 \pm 1.55$  g/L, según reportes dados por (Chaves, 2004) dan a conocer que los niveles de azúcares reductores conocidos como (Brix) en el bagazo de caña fluctúa entre 2 y 16% lo cual es propio de la caña y que además esto depende del estado de maduración de la materia prima. Al tener mayor cantidad de azúcares reductores en el sustrato existe una mayor disponibilidad de fuente de carbono y hay mayor obtención de metabolitos producidos por el hongo *Aspergillus niger*.

### **pH**

El valor promedio fue de  $3.47 \pm 0.10$  es un valor ácido, el cual se encuentra en un rango establecido para un proceso de fermentación, según (Villalpando, y otros, 2010) el hongo puede desarrollar sin ningún problema la actividad enzimática inclusive a pH inferiores a 2, por tal motivo el sustrato (Bagazo de caña) con un pH de 3.47 es ideal para una buena fermentación en estado sólido, reportes de (Artemio, Robles, Ruiz, & Castañeda, 2018) mencionan que el pH del bagazo de caña es de 5.13 y al inocular con el hongo *Aspergillus niger* observaron un descenso del pH,

por tal razón es un organismo altamente acidificante del medio por su capacidad de sintetizar ácidos orgánicos.

## **4.2 EVALUAR EL TAMAÑO DE PARTÍCULA DEL BAGAZO DE CAÑA Y LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACIÓN EN EL RENDIMIENTO DEL ÁCIDO CÍTRICO**

Para el desarrollo de esta investigación, se trabajó con 3 tamaños de partícula y diferentes niveles de temperatura con el fin de determinar el mejor tratamiento en el rendimiento del ácido cítrico, generación de esporas, consumo fuente de carbono y productividad. A estos valores obtenidos se determinó la normalidad, análisis de varianza y la interacción entre las variables.

### **4.2.1 CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO**

La concentración de ácido cítrico se obtuvo mediante la transformación de los azúcares reductores obtenidos en la muestra bagazo de caña por un factor de conversión.

#### **Análisis de varianza**

La concentración de ácido cítrico presentó una distribución normal representado en el anexo 2. Los valores de p-valué obtenidos en el análisis de varianza que se detalla en la tabla 13, prueban que hay significancia estadística para los factores A (tamaño de partícula), B (Temperatura) y para su interacción AxB; por lo tanto, las variables de estudio si influyen directamente en la concentración del ácido cítrico, de esta manera se confirma la aceptación de la hipótesis alternativa con un 95% de confianza.

**Tabla 13**

Análisis de varianza para la concentración del ácido cítrico

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>GI</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-valué</b>	<b>p-valué</b>
Modelo	748,70	8	93,59	49,80	< 0.0001 *
A-Tam. Partícula	257,35	2	128,67	68,46	< 0.0001
B-Temperatura	322,75	2	161,37	85,86	< 0.0001
AB	168,61	4	42,15	22,43	< 0,0001

Error	33,83	18	1,88
Total	782,53	26	

**Nota:** Todas las razones F-valué se basan en el cuadrado medio del error residual.

Los valores obtenidos de  $R^2 = 0.95$  y  $R^2$  ajustado = 0.93 demuestra que la combinación de los dos factores en estudio puede ser replicados y obtener valores casi idénticos en un 93%.

Al encontrarse significancia estadística en los tratamientos, se realiza la prueba Tukey al 5%, alcanzando resultados que se presenta en la tabla 14.

**Tabla 14**

Prueba Tukey para la interacción de las variables de estudio

Tratamientos	Combinación	Media	Rango
T1	A1B1	47.82	a
T5	A2B2	45.62	a
T2	A1B2	44.10	a b
T4	A2B1	41.41	b c
T7	A3B1	41.07	b c
T6	A2B3	37.75	c d
T3	A1B3	35.11	d e
T8	A3B2	32.71	e
T9	A3B3	32.58	e

**Nota:** medias con una letra común no son significativamente diferentes.

La prueba aplicada de Tukey al 5% definió que los tratamientos **T1** y **T5** son estadísticamente iguales con respecto a la concentración de ácido cítrico, estos tratamientos están dentro del límite de producción del ácido cítrico con el hongo *Aspergillus niger* en el sustrato de bagazo de caña. Resultados similares presentaron algunos autores como (Dutta, y otros, 2019) y (Shankar & Sivakumar, 2016), donde trabajaron con diversos residuos agroindustriales con condiciones similares al experimento aplicado en esta investigación, los cuales resultaron ser análogos entre sí. No obstante, este experimento revelo que 2 tratamientos tienen un buen potencial para la concentración del ácido cítrico.

### **Interacción entre temperatura y tamaño de partícula en la concentración de ácido cítrico.**

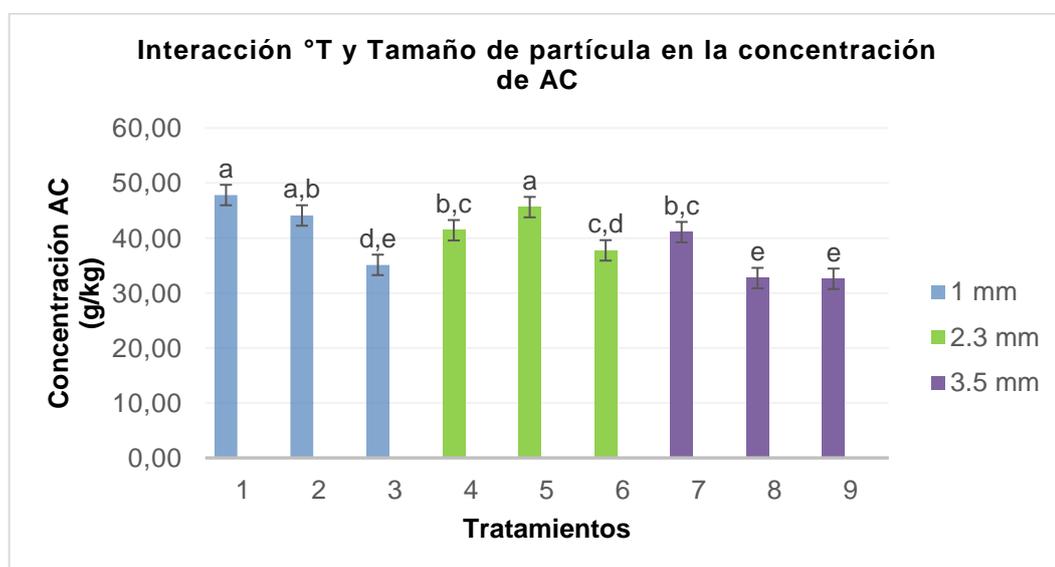
En los tratamientos 1 y 5, se presentan los valores más altos de rendimiento de ácido cítrico presentado en la figura 6, en un periodo de 8 días que duro el proceso

fermentativo en estado sólido utilizando como sustrato bagazo de caña. Sin embargo, se demuestra que a valores de temperatura ambiente de (22 °C), tamaño de partícula de (1.0 mm) y manteniendo la humedad del 70% durante todo el proceso, el T1 se considera como el mejor tratamiento, alcanzando un valor de 47.82 g/kg de ácido cítrico al trabajar con 10 g de sustrato, siendo diferente para el resto de los tratamientos con un 95% de confianza.

Realizando la comparación de estudios de (Gound, Srilakshmi, Kumar, & Narasimba, 2012), que realizaron por fermentación en estado sólido la producción de este metabolito en matraces Erlenmeyer de 250 ml, a una temperatura de 30 °C y una humedad ajustada del 70% durante todo el proceso, obtuvieron valores de 24.90 g/kg de ácido cítrico para un tamaño de partícula de 0.150 mm al trabajar con 5 g de sustrato de bagazo de caña y el valor más alto obtenido de ácido cítrico es de 34.4 g/kg utilizando sustrato de uva.

**Figura 6**

Interacción Temperatura y Tamaño de partícula en la concentración de Ácido cítrico



También estudios realizados por (Raja & Reddy, 2013), realizaron la experimentación con sustrato de avena en fermentación en estado sólido, trabajaron con 5 g de sustrato y ajustando una humedad del 70% a una temperatura de 20 °C, obtuvieron valores entre 35.1 g/kg de ácido cítrico a partir de las 72 horas, en los dos casos mencionados con anterioridad la concentración de ácido cítrico es menor a la obtenida en T1 (47.82 g/kg), pero en la misma investigación a temperaturas de

25 °C y 30 °C la producción es aún mayor entre (60.4 g/kg y 56.4 g/kg) superando valores de T1 de la presente investigación, esto demuestra que no existe inconvenientes para llevar a cabo la producción de este metabolito a una temperatura ambiente con cantidades considerablemente altas.

#### 4.2.2 GENERACIÓN DE ESPORAS

Esta variable indica como se desarrolla el microorganismo y define las fases de crecimiento durante el proceso de fermentación en estado sólido. Se realizó la transformación de los valores a log (número de esporas) para realizar los análisis estadísticos correspondientes.

##### Análisis de varianza

En el anexo 3 la generación de esporas presento una distribución normal con un 95% de confianza. Los valores de p-valué obtenidos en el análisis de varianza de la tabla 15 prueban la significancia estadística de los factores A (Tamaño de partícula) y B (Temperatura), al igual que para la interacción AxB, por lo que las variables de estudio en fermentación solida son determinantes para la generación de esporas. Los resultados de cada tratamiento fueron cantidades exponenciales, por esa razón se realizó la transformación a logaritmo natural para la validación de los resultados.

**Tabla 15**

Análisis de varianza para la generación de Esporas

Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	F-valué	p-valué
Modelo	6,465E+13	8	8,082E+12	16,83	< 0.0001 *
A-Tam. Partícula	2,248E+13	2	1,124E+13	23,40	< 0.0001
B-Temperatura	1,580E+13	2	7,901E+12	16,45	< 0.0001
AB	2,637E+13	4	6,593E+12	13,73	< 0.0001
Error	8,645E+12	18	4,803E+11		
Total	7,330E+13	26			

**Nota:** Todas las razones F-valué se basan en el cuadrado medio del error residual.

Los valores obtenidos de  $R^2 = 0.88$  y  $R^2$  ajustado = 0.83 demostró que la combinación de los factores en estudio puede ser replicados y obtener valores casi idénticos en un 83% cuando se realice los respectivos controles de los parámetros

de fermentación en estado sólido. Al encontrarse significancia estadística en los tratamientos, se realiza la prueba Tukey al 5%, alcanzando resultados que se presenta en la tabla 16.

**Tabla**

**16**

Prueba Tukey para la interacción de la variable en la generación de esporas

Tratamientos	Combinación	Media	Rango
T1	A1B1	3,13E+07	a
T4	A2B1	2,83E+07	b
T2	A1B2	2,81E+07	b
T9	A3B3	2,80E+07	b
T3	A1B3	2,73E+07	b c
T5	A2B2	2,68E+07	b c
T8	A3B2	2,67E+07	b c
T7	A3B1	2,64E+07	b c
T6	A2B3	2,55E+07	c

**Nota:** medias con una letra común no son significativamente diferentes.

La prueba aplicada de Tukey al 5%, definió al tratamiento **T1** como el mejor, mientras que los demás tratamientos son estadísticamente iguales con respecto a la generación de esporas. Estos tratamientos están dentro del límite de producción de esporas, utilizando como sustrato bagazo de caña aplicando las respectivas condiciones de fermentación en estado sólido.

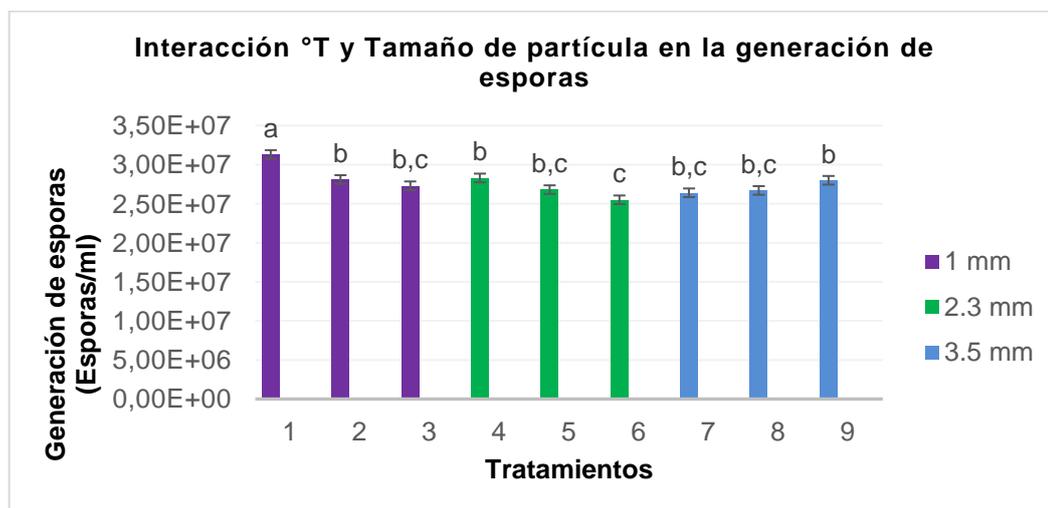
#### **Interacción entre temperatura y tamaño de partícula en la generación de esporas.**

Como se observa en la figura 7, en el tratamiento T1 se alcanza el valor más alto de generación de esporas 3,13E+07 esporas/g que corresponde a una temperatura ambiente de 22 °C, tamaño de partícula (1.0 mm) y humedad del 70% que se mantiene durante los 8 días del proceso de fermentación, sin embargo, también se puede apreciar que en los tratamientos T4, T2 y T9 hay una similitud en la generación de esporas correspondientes a temperaturas de (22, 26 y 30 °C), con tamaños de partícula de ( 2.3 mm, 1.0 mm y 3.5 mm) es estadísticamente igual con valores medio de (2,83E+07, 2,81E+07 y 2,80E+07 esporas/ml), lo que se puede asegurar que a temperatura de 22 °C y manteniendo una humedad del 70% durante

todo el proceso de fermentación utilizando como sustrato bagazo de caña se logra una buena generación de esporas.

**Figura 7**

Interacción Temperatura y Tamaño de partícula en la generación de esporas



Según estudios realizados por (Gound, Srilakshmi, Kumar, & Narasimba, 2012), obtienen un valor de  $2,82E+11$  esporas/ml al trabajar con un tamaño de partícula de 0.25 mm a 30 °C por un tiempo de 6 días utilizando como sustrato bagazo de caña, mientras que (Reinaldo & Hiléia, 2020), obtienen resultados de  $2.51E+08$  esporas/g al trabajar con un tamaño de partícula de 1.15 mm a 30 °C por un tiempo de 7 días con sustrato bagazo de caña, en comparación al obtenido en esta investigación con un valor de  $3.13E+07$  esporas/ml, es considerada como el mejor tratamiento en generación de esporas con otras investigaciones a temperatura de 22 °C, con tamaño de partícula de 1 mm por 8 días utilizando de igual manera bagazo de caña.

### Consumo fuente de carbono

Dentro de esta variable podemos determinar que conforme avanza el proceso de fermentación en estado sólido, se va dando el consumo fuente de carbono y mientras mayor sea el consumo de esta fuente mayor será la producción del metabolito ácido cítrico y la generación de esporas en el sustrato bagazo de caña por la acción del microorganismo *Aspergillus niger*.

## Análisis de varianza

El consumo fuente de carbono presento una distribución normal representado en el anexo 4. Los valores de p-valué obtenidos en el análisis de varianza que se detalla en la tabla 17, prueban que hay significancia estadística para los factores A (tamaño de partícula), B (Temperatura) y para su interacción AxB; por lo tanto, las variables de estudio si influyen directamente en el consumo fuente de carbono, de esta manera se confirma la aceptación de la hipótesis alternativa con un 99% de confianza.

**Tabla 17**

Análisis de varianza para el consumo fuente de carbono

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-valué	p-valué
Modelo	3085,87	8	385,73	245,73	< 0.0001 *
A-Tam. Partícula	1232,20	2	616,10	392,49	< 0.0001
B-Temperatura	1261,14	2	630,57	401,71	< 0.0001
AB	592,53	4	148,13	94,37	< 0,0001
Error	28,26	18	1,57		
Total	3114,13	26			

**Nota:** Todas las razones F-valué se basan en el cuadrado medio del error residual.

Los valores obtenidos de  $R^2 = 0.99$  y  $R^2$  ajustado = 0.99 demuestra que la combinación de los dos factores en estudio puede ser replicados y obtener valores casi idénticos en un 99%.

Al encontrarse significancia estadística en los tratamientos, se realiza la prueba Tukey al 5%, alcanzando resultados que se presenta en la tabla 18.

**Tabla 18**

Prueba Tukey para la interacción de la variable en el consumo fuente de carbono

Tratamientos	Combinación	Media	Rango
T1	A1B1	52.70	a
T5	A2B2	48.88	b
T2	A1B2	46.94	b
T4	A2B1	42.76	c
T7	A3B1	41.59	c
T6	A2B3	36.31	d
T3	A1B3	30.28	e
T8	A3B2	22.59	f
T9	A3B3	21.29	f

**Nota:** medias con una letra común no son significativamente diferentes.

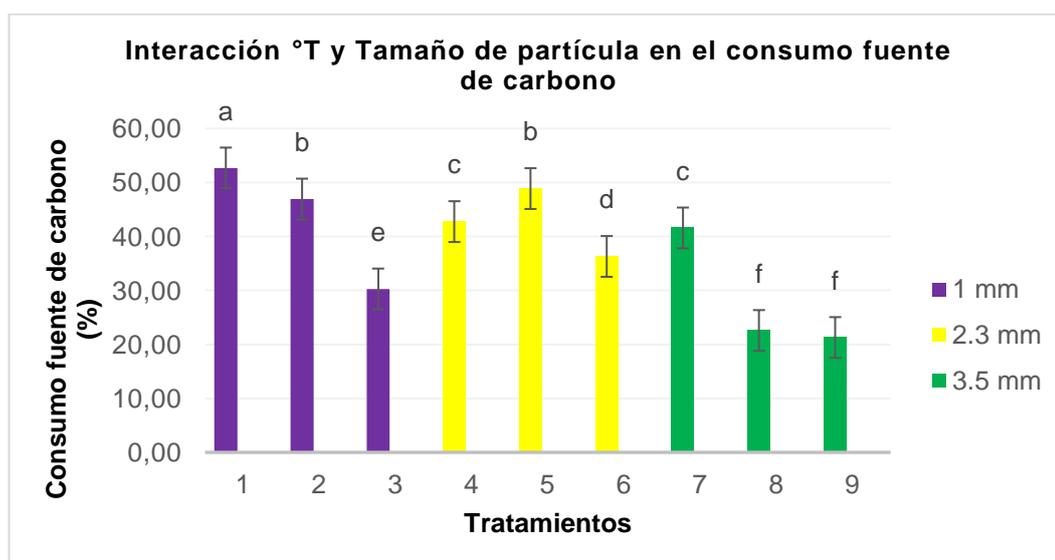
La prueba aplicada de Tukey al 5%, definió al tratamiento **T1** como el mejor, mientras que los demás tratamientos estadísticamente son diferentes, pero todos se encuentran dentro del límite del consumo de carbono utilizando como sustrato bagazo de caña por la acción del hongo *Aspergillus niger* aplicando las respectivas condiciones de fermentación en estado sólido.

**Interacción entre temperatura y tamaño de partícula en el consumo fuente de carbono.**

Como se observa en la figura 8, el tratamiento T1 alcanza el valor más alto de 52.70% en el consumo fuente de carbono, correspondiente a una temperatura ambiente de 22 °C, tamaño de partícula (1 mm) y humedad del 70% que se mantiene durante los 8 días del proceso de fermentación, sin embargo, también se puede apreciar que en los tratamientos T5 y T2 hay una semejanza en el consumo de carbono con valores promedio de (48.88 y 46.94%), por lo tanto la producción de ácido cítrico es constante, es decir, a mayor cantidad de consumo fuente de carbono mayor será la producción del metabolito ácido cítrico al igual que la generación de esporas.

**Figura 8**

Interacción Temperatura y Tamaño de partícula en el consumo fuente de carbono



Estudios realizados por (Gound, Srilakshmi, Kumar, & Narasimba, 2012), obtienen un valor de 92% en el consumo de carbono para la producción de ácido cítrico al trabajar con un tamaño de partícula de 0.25 mm a 30 °C por un tiempo de 6 días

utilizando como sustrato bagazo de caña, mientras que en la investigación realizada utilizando el mismo sustrato en fermentación en estado sólido se obtiene un valor del 52.70%, trabajando con un tamaño de partícula de 1mm a una temperatura de 22 °C (ambiente), por 8 días, por tal razón el tratamiento T1 es considerada como el mejor.

### **Productividad**

La productividad del ácido cítrico se obtuvo mediante la transformación de los azúcares reductores obtenidos en el sustrato bagazo de caña por un factor de conversión.

### **Análisis de varianza**

La productividad del ácido cítrico presento una distribución normal representado en el anexo 5. Los valores de p-valúe obtenidos en el análisis de varianza que se detalla en la tabla 19, prueban que hay significancia estadística para los factores A (tamaño de partícula), B (Temperatura) y para su interacción AxB; por lo tanto, las variables de estudio si influyen directamente en la productividad del ácido cítrico, de esta manera se confirma la aceptación de la hipótesis alternativa con un 95% de confianza.

**Tabla 19**

Análisis de varianza para la productividad del ácido cítrico

<b>Fuente</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F-valué</b>	<b>p-valué</b>
Modelo	11,70	8	1,46	49,80	< 0.0001 *
A-Tam. Partícula	5,04	2	2,52	68,46	< 0.0001
B-Temperatura	4,02	2	2,01	85,86	< 0.0001
AB	2,63	4	0,66	22,43	< 0,0001
Error	0,53	18	0,03		
Total	12,23	26			

**Nota:** Todas las razones F-valué se basan en el cuadrado medio del error residual.

Los valores obtenidos de  $R^2 = 0.95$  y  $R^2$  ajustado = 0.93 demuestra que la combinación de los dos factores en estudio puede ser replicados y obtener valores casi idénticos en un 93%.

Al encontrarse significancia estadística en los tratamientos, se realiza la prueba Tukey al 5%, alcanzando resultados que se presenta en la tabla 20.

**Tabla 20**

Prueba Tukey para la interacción de la variable en el consumo fuente de carbono

Tratamientos	Combinación	Media	Rango
T1	A1B1	5.98	a
T5	A2B2	5.70	a
T2	A1B2	5.51	a b
T4	A2B1	5.18	b c
T7	A3B1	5.13	b c
T6	A2B3	4.72	c d
T3	A1B3	4.39	d e
T8	A3B2	4.09	e
T9	A3B3	4.07	e

**Nota:** medias con una letra común no son significativamente diferentes.

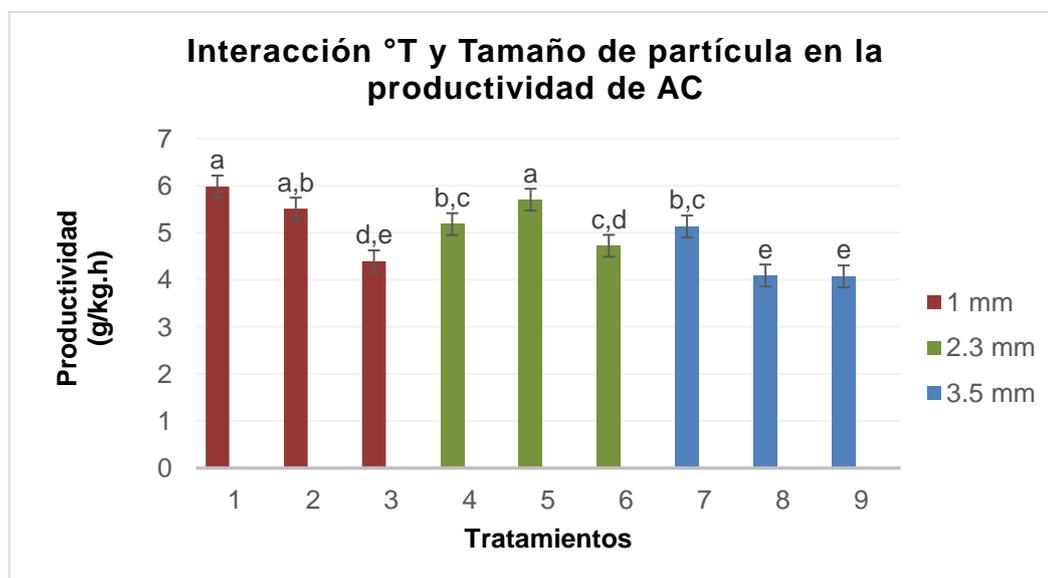
La prueba aplicada de Tukey al 5% definió que los tratamientos **T1** y **T5** son estadísticamente iguales con respecto a la productividad de ácido cítrico, estos tratamientos están dentro del límite de producción del ácido cítrico con el hongo *Aspergillus niger* en el sustrato de bagazo de caña.

#### **Interacción entre temperatura y tamaño de partícula en la productividad de ácido cítrico.**

En los tratamientos 1 y 5, se presentan los valores altos en la productividad de ácido cítrico presentado en la figura 9, en un periodo de 8 días que duro el proceso fermentativo en estado sólido utilizando como sustrato bagazo de caña. Sin embargo, se demuestra que a valores de temperatura 22 °C (ambiente), tamaño de partícula de 1mm y manteniendo la humedad del 70% durante todo el proceso, el T1 se considera como el mejor tratamiento, alcanzando un valor de 5.98 g/kg.h de ácido cítrico al trabajar con 10 g de sustrato, siendo diferente para el resto de los tratamientos con un 95% de confianza.

**Figura 9**

Interacción Temperatura y Tamaño de partícula en la productividad de ácido cítrico



Estudios realizados por (Reinaldo & Hiléia, 2020), obtienen una productividad de 1.18 g/kg.h, trabajaron con un tamaño de partícula de 1.18 mm a una temperatura de 25 °C, el cual el valor de productividad de 1.18 g/kg.h es inferior a la obtenida en esta investigación por tal motivo el tratamiento T1 es considerado como el mejor para una productividad netamente alta utilizando bagazo de caña como sustrato por fermentación en estado sólido empleando el hongo *Aspergillus niger*.

### **4.3 ESTABLECER LAS CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO CÍTRICO OBTENIDO**

Teniendo en cuenta los valores ya reportados con anterioridad y el producto obtenido (ácido cítrico), se procede a realizar la determinación de las características fisicoquímicas de la misma.

#### **Características fisicoquímicas del ácido cítrico obtenido**

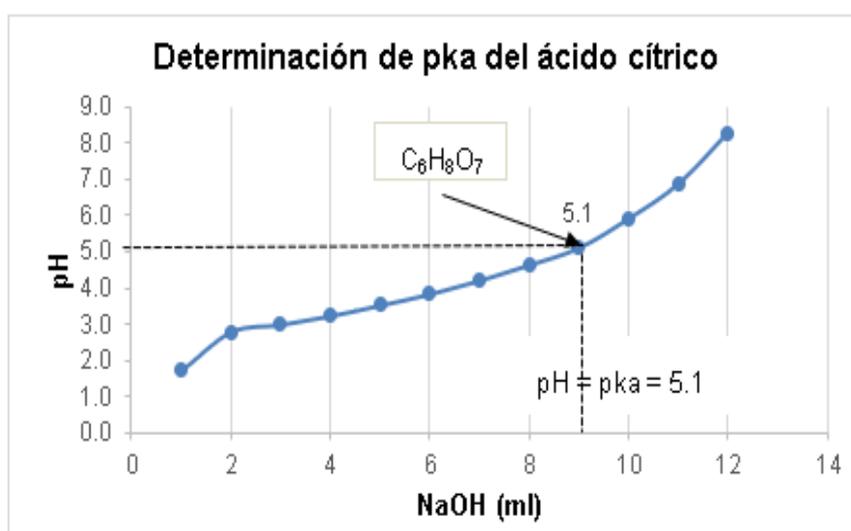
##### **Acidez (pH = pka)**

Para la determinación de la acidez (pH = pka) del ácido cítrico, según (Nelson & Cox, 2009) mencionan que la titulación se usa para determinar la cantidad de un ácido en una disolución dada. Se utiliza un volumen determinado de ácido para titular con una base fuerte, normalmente hidróxido de sodio NaOH (0.1 N), se añade

en cantidades pequeñas hasta que sea consumido (neutralizado) el ácido, según se determina utilizando un colorante indicador o un medidor de pH. Para poder calcular la concentración de ácido en la muestra original se debe de partir del volumen y la concentración de NaOH añadido. Mientras que otra investigación realizada por (Alvarez, 2017), hace mención que la acidez titulable es proporcional a la cantidad de ácido cítrico presente en base a un factor de conversión, para ello se usó 10 ml de la muestra original y se colocó 2 gotas de fenolftaleína al 1% para titular con hidróxido de sodio NaOH (1 M), cuando se alcanza el punto de viraje (color violeta) se registró el volumen de hidróxido consumido y se debe de multiplicar por 6.4 dando así una concentración de ácido cítrico en g/l. El resultado obtenido en esta investigación se presenta en la figura 10.

**Figura 10**

Determinación de la constante de acidez ( $\text{pH} = \text{pka}$ ) del ácido cítrico



En esta investigación para determinar la constante de acidez ( $\text{pH} = \text{pka}$ ) del ácido cítrico por titulación se llevó a evaporación el filtrado (que contiene ácido cítrico), un volumen de 320 ml el cual se evaporó hasta llegar a un volumen de 40 ml, de este concentrado se utiliza 10 ml para llevar a cabo la titulación con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1N y se debe de adicionar 2 gotas de fenolftaleína, conforme se va dando la adición consecutiva de hidróxido se va tomando el valor del pH de la muestra, cuando el hidróxido es consumido una cantidad de 18 ml se da el punto de

viraje (color violeta) como lo menciona (Alvarez, 2017), este procedimiento se realiza por triplicado y se calcula el (pH = pka) del ácido cítrico.

Según reportes de (Sánchez & Vásquez, 2020) y (Bolívar, 2022) el pka del ácido cítrico presenta 3 grupos (1 = 3.15; 2 = 4.77 y 3 = 6.40 pka), de acuerdo a esta contribución se puede determinar que el (pH = pka) de esta investigación se encuentra en el rango del grupo 2 con un valor de pka de 5.1, comprobando así que el producto obtenido es ácido cítrico.

**Tabla 21**

Constante de disociación del ácido cítrico (pka)

Método	Resultado obtenido	Estudios realizados	Referencia
Constante de disociación	pka <sub>2</sub> = 5.1	pka <sub>1</sub> = 3.13 pka <sub>2</sub> = 4.76 pka <sub>3</sub> = 6.4	(ENSIG, 2014)

### Punto de fusión

Para la determinación del punto de fusión del ácido cítrico obtenido en esta investigación se hace uso de un equipo sencillo y fácil de usar, tal cual como se indica en la figura 11.

**Figura 11**

Equipo ensamblado para determinar el punto de fusión del ácido cítrico



El producto sólido se introduce en un capilar una cantidad considerable y misma se debe de atar al termómetro y este a un soporte universal, una vez que el equipo ya

este ensamblado, en el vaso de precipitación se introduce aceite vegetal que servirá como medio de calentamiento que ayudara a determinar el punto de fusión, este método consiste en el cambio de estado sólido a líquido, es decir, que el ácido cítrico se fundirá a una temperatura de 153 °C tal como investigaciones realizadas por (QUIMIPUR , 2015), (GTM, 2016) y (ROTH, 2021).

**Tabla 22**

Determinación de punto de fusión del ácido cítrico

Método	Resultado obtenido	Estudios realizados	Referencia
		153 °C (307 °F)	(GTM, 2016)
Punto de fusión (°C) (Directrices de ensayo 102 del OECD (descomposición)	152 °C	153 °C 153 °C	(ROTH, 2021) (QUIMIPUR, 2015)

En esta investigación el ácido cítrico se funde a una temperatura de 152 °C, el cual pasa de estado sólido a líquido, demostrando que el producto obtenido si es ácido cítrico.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

- El bagazo de caña utilizado califica como un sustrato idóneo para ser empleado en bioprocesos, cuenta con elementos esenciales como ceniza, materia seca y azúcares reductores en cantidades considerables y favorables en el desarrollo del hongo *Aspergillus niger* y la producción de metabolitos primarios como el ácido cítrico.
- Se determino que, dentro de los rangos estudiados tanto a menores valores de tamaño de partícula del bagazo de caña y de temperatura en el bioproceso se tienen los mejores resultados de rendimiento y desarrollo del hongo.

- Se logró obtener un producto final que cumple con las especificaciones del ácido cítrico como son pka y punto de fusión.
- Se acepta la hipótesis alternativa ya que se demostró que el rendimiento de ácido cítrico y desarrollo del hongo en fermentación en estado sólido está determinado por los parámetros de temperatura y tamaño de partícula.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Realizar combinación de residuos como sustratos para la producción de ácido cítrico.
- Ejecutar investigaciones con otras especies de microorganismos buscando mayor degradación de los componentes orgánicos (residuos) ricos en fuentes de carbono.

## 5.3 BIBLIOGRAFÍA CITADA

### BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C. (2016). Official Methods of Analysis. (G. Latimer , Ed.) *AOAC International*, 20(5), 1-30. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022, de <https://www.techstreet.com/products/preview/1937367>

AGRO PRODUCTIVIDAD. (2017). *papel artesanal de paja de CAÑA DE AZÚCAR* (Vol. 10). Texcoco, Estado de México: AP. Recuperado el 2 de Octubre de 2022

Aguilar, R. N., Debernadi, V. T., & Herrera, P. D. (2017). *SUBPRODUCTOS, COPRODUCTOS Y DERIVADOS DE LA AGROINDUSTRIA AZUCARERA* (Vol. 10). Veracruz, México: AGROPRODUCTIVIDAD. Recuperado el 2 de Octubre de 2022

- Alfenas, M., & Souza, D. (2013). The influence of *Aspergillus niger* transcription factors AraR and XlnR in the gene expression during growth in D-xylose, L-arabinose and steam-exploded sugarcane bagasse. *Fungal Genet Biology*, 60(35), 29-45 (32). doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.007>
- Alvarez, S. J. (2017). *Evaluacion de la funcionalidad de produccion de acido citrico usando cepas de Aspergillus Niger identificadas molecularmente*. Quito, Ecuador. Recuperado el 24 de Agosto de 2020, de <https://bit.ly/33dnA0H>
- Andersen, M., Salazar, M., Schaap, P., Culley, D., Thykaer, J., Frisvad, J., . . . Nielsen, J. (2011). Genómica comparativa de *Aspergillus niger* ATCC 1015 productor de ácido cítrico. *Genome Res*, 21(1), 885-897 (885). doi:10.1101/gr.112169.110
- Artemio, M. M., Robles, C., Ruiz, V. J., & Castañeda, H. E. (2018). Compostaje de residuos agroindustriales inoculados con hongos lignocelulósicos y modificación de la relación C/N. *Ciencias Agrícolas (SciELO)*, 9(2), 274. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022, de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342018000200271](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342018000200271)
- Atere, V., & Femi, O. T. (2012). Producción de ácido cítrico a partir del grano gastado de cerveceros por *Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*. *Biociencias*, 2(1), 30-36. Recuperado el 13 de Octubre de 2022, de <https://www.researchgate.net/publication/345025985>
- Ballardo, M. C. (2016). *VALORIZACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE Bacillus thuringiensis MEDIANTE FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO: Aplicación a la Fracción Orgánica de Residuos Municipales para la producción de compost con efecto biopesticida*. Bellaterra, Ecuador. Recuperado el 5 de Octubre de 2022, de [https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2016/hdl\\_10803\\_399721/cvbm1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2016/hdl_10803_399721/cvbm1de1.pdf)

- Bastidas, F. V. (2016). *ENVOLTURA COMESTIBLE A BASE DE CELULOSA MICROCRISTALINA DE BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR*. Ibarra, Ecuador. Recuperado el 23 de Agosto de 2020, de <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/5313>
- Bolivar, G. (2022). *Lifeder*. Recuperado el 25 de Noviembre de 2022, de <https://www.lifeder.com/acido-citrico/>
- Cabrera, R. E., León, F. V., Montano, P. A., & Dopico, R. D. (2016). CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES CON VISTAS A SU APROVECHAMIENTO. (Y. Albernas Carvajal, Ed.) *Scielo*, 43(4), 28-30. Recuperado el 25 de Junio de 2020, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2223-48612016000400003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2223-48612016000400003)
- Chandler, C., Villalobos, M., González, E., Arenas, E., Zulay, M., Ríos, J., & Aiello Mazzari, C. (2012). Hidrólisis ácida diluida en dos etapas de bagazo de caña de azúcar para la producción de azúcares. *Redalyc*, 12(3), 246. Recuperado el 2 de Octubre de 2022, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90426810002>
- Chaves, S. M. (2004). LA CAÑA DE AZÚCAR COMO MATERIA PRIMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL CARBURANTE. *Redalyc*, 1(1), 4,5. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022, de <https://www.midagri.gob.pe/portal/download/pdf/especiales/bioenergia/otros/canadazucar-materiaprima-producciondalcohol-carburante.pdf>
- Cury, K., Aguas, Y., Martinez, A., & Olivero, R. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Colombiana de ciencia animal*, 1(1), 124, 125. doi:10.24188/recia.v9.nS.2017.530
- Del Río Calle, M. A. (2018). *Aprovechamiento del bagazo de caña de azúcar con el fin de generar nuevos usos*. Medellín, Colombia. Recuperado el 3 de Octubre de 2022, de [https://repositorio.itm.edu.co/bitstream/handle/20.500.12622/5666/MariaAlejandra\\_DelRioCalle\\_2018.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.itm.edu.co/bitstream/handle/20.500.12622/5666/MariaAlejandra_DelRioCalle_2018.pdf?sequence=4&isAllowed=y)

- Dutta, A., Sahoo, S., Ranjan, M. R., Pradhan, B., Das, A., & Chandra, B. B. (2019). A comparative study of citric acid production from different agro-industrial wastes by *Aspergillus niger* isolated from mangrove forest soil. *Biología ambiental y experimental*, *1*(1), 115-122 (117). doi:10.22364/eeb.17.12
- FONDONORMA. (1979). ALIMENTOS PARA ANIMALES. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD. *COVENIN*, *1*, 1-6. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022, de <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1156-79.pdf>
- FONDONORMA. (1979). ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DEL pH. (ACIDEZ IONICA) (Vol. 1). CARACAS, VENEZUELA: COVENIN 1315-79. Recuperado el 18 de Junio de 2022, de <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1315-79.pdf>
- García , E., & Peralta , D. (2022). Hidrólisis enzimática de bagazo de caña (*Saccharum sp* híbrido) para la producción de azúcares simples. *Científica Agroindustria*, *18*(1), 119-131 (124). doi:<http://doi.org/10.5281/zenodo.6481849>
- Gavilanes, T. I. (16 de Junio de 2016). *comunicacion*. Recuperado el 19 de Junio de 2020, de <https://comunicacion.umh.es/2016/06/20/un-estudio-analiza-la-gestion-sostenible-de-los-residuos-agroindustriales-generados-en-la-provincia-de-chimborazo-ecuador/>
- Gil, M. (2016). *lifeder*. Recuperado el 25 de Junio de 2020, de <https://www.lifeder.com/aspergillus-niger/>
- Gonzales, Á. D. (2013). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales para la producción de alimentos funcionales*. Antioquia, Colombia. Recuperado el 23 de Agosto de 2020
- Gound, H., Srilakshmi, Kumar, P., & Narasimba. (2012). Citric acid production by *Aspergillus niger* through solid state fermentation using fruit wastes. *Comercio Ciencia (Biotechnology)*, *6*(3), 93-96. Recuperado el 18 de Octubre de 2022, de [https://www.researchgate.net/publication/229378947\\_Citric\\_acid\\_producti](https://www.researchgate.net/publication/229378947_Citric_acid_producti)

on\_by\_Aspergillus\_niger\_through\_solid\_state\_fermentation\_using\_fruit\_wastes

Grande, T. C. (2016). *VALORACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE RESIDUOS AGRÍCOLAS Y AGROINDUSTRIALES*. Cali, Colombia: Bonaventuriana. Recuperado el 5 de Octubre de 2022

GTM. (2016). *ÁCIDO CÍTRICO (FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD)* (Vol. 5). Quito, Ecuador. Recuperado el 25 de Noviembre de 2022, de file:///C:/Users/USER/Downloads/10-ACIDO-CI%CC%81TRICO-ANHIDRO.pdf

Guerrero, F. R., & Valenzuela, S. L. (Junio de 2011). *Agroindustria y medio ambiente* (Vol. 23). Santiago de Chile, Chile: Trilogía. Recuperado el 24 de Junio de 2020, de [https://sitios.vtte.utem.cl/trilogia/wp-content/uploads/sites/9/2018/01/trilogia\\_medio\\_ambiente.pdf](https://sitios.vtte.utem.cl/trilogia/wp-content/uploads/sites/9/2018/01/trilogia_medio_ambiente.pdf)

INAMHI. (2022). *InamhiEmas*. Recuperado el 25 de Febrero de 2022, de <http://186.42.174.236/InamhiEmas/>

INEC. (2021). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua, 2020*. (J. Márquez, Ed.) Quito, Ecuador. Recuperado el 5 de Marzo de 2023, de [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Presentacion%20ESPAC%202020.pdf)

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. (2012). *insst. agentes-biologicos*. Recuperado el 25 de Junio de 2020, de [https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-spp#:~:text=Aspergillus%20es%20un%20hongo%20filamentoso,\(con%20formaci%C3%B3n%20de%20conidios\).](https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/aspergillus-spp#:~:text=Aspergillus%20es%20un%20hongo%20filamentoso,(con%20formaci%C3%B3n%20de%20conidios).)

López, A. Y. (2018). *PRODUCCIÓN Y FORMULACIÓN DE Trichoderma asperellum PARA EL MANEJO DE PATÓGENOS DE LA RAÍZ DE CAÑA DE AZÚCAR*. Cuernavaca, México. Recuperado el 5 de Octubre de 2022, de

<http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/646/LOAYLN08T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mejías, B. N., Orozco, G. E., & Galáan, H. N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2(6), 27-41. Recuperado el 19 de Junio de 2020

Miller, L. (1995). *Uso del reactivo de ácido dinitrosalicílico para la determinación del azúcar* (Vol. 31). USA. Recuperado el 8 de Marzo de 2022, de [https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Homayoonzadeh/post/How\\_to\\_properly\\_measure\\_reducing\\_sugars\\_in\\_seeds/attachment/5c629bda3843b0544e65798e/AS%3A725425382772753%401549966297941/download/Dinitrosalicylic+acid2.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Homayoonzadeh/post/How_to_properly_measure_reducing_sugars_in_seeds/attachment/5c629bda3843b0544e65798e/AS%3A725425382772753%401549966297941/download/Dinitrosalicylic+acid2.pdf)

Moyano, B. M., Borrás, S. L., & Iglesias, E. (2016). *engormix*. Recuperado el 10 de Octubre de 2022, de engormix: <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/fermentacion-estado-solido-fes-t39531.htm>

Muñoz, V. A., Sáenz, G. A., López, L. L., Cantú, S. L., & Barajas, B. L. (2014). Ácido Cítrico: Compuesto Interesante. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 6(12), 19, 20, 21. Recuperado el 26 de Junio de 2020, de [https://www.academia.edu/34844431/%C3%81cido\\_%C3%ADtrico\\_Compuesto\\_Interesante\\_Citric\\_Acid\\_Interesting\\_Compound](https://www.academia.edu/34844431/%C3%81cido_%C3%ADtrico_Compuesto_Interesante_Citric_Acid_Interesting_Compound)

Nelson, D., & Cox, M. (2009). *LEHNINGER PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA* (5 ed.). (F. C. Cuchillo, L. P. Suau, & R. J. Vendrell, Trads.) Barcelona, España. Recuperado el 24 de Noviembre de 2022

Oliva, M. D., & Antolin, G. (2015). Caracterización del bagazo de caña de azúcar mediante Análisis Térmico. *Redalyc*, 1(1), 91-96. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022, de <https://www.researchgate.net/publication/273821584>

Parzanese, M. (Octubre de 2017). FERMENTACIÓN EN SUSTRATO SÓLIDO: APROVECHAMIENTO DE SUBPRODUCTOS DE LA

AGROINDUSTRIA. *ALIMENTOS ARGENTINOS*(27), 2,3,4, 5,6. Recuperado el 21 de Junio de 2020, de <https://docplayer.es/15912018-Tecnologias-para-la-industria-de-alimentos-fermentacion-en-sustrato-solido-aprovechamiento-de-subproductos-de-la-agroindustria-ficha-n-27.html>

Peñañiel, A. S., Brito, Z. G., & Muñoz, S. G. (2015). UTILIZACIÓN DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA MICROBIANA. *European Scientific Journal*, 11(27), 201. Recuperado el 11 de Junio de 2020

Pérez, N. O., Ley Chong, N., Rodríguez, M. K., & González, S. E. (2016). OPORTUNIDADES DE PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR VÍA FERMENTATIVA A PARTIR DE SUSTRATOS AZUCARADOS EN CUBA. (Y. Alvernas Carvajal, Ed.) *Centro azucar*, 43(2), 86. Recuperado el 25 de Junio de 2020, de <https://biblat.unam.mx/hevila/Centroazucar/2016/vol43/no2/9.pdf>

Prieto, L. G., & Torres, R. Y. (2020). *Desarrollo de un proceso de fermentación en estado sólido (SSF) para la obtención de proteínas durante la valorización de residuos orgánicos en biorreactores a escala laboratorio*. Bogotá, Colombia. Recuperado el 5 de Octubre de 2022

QUIMIPUR . (2015). *ÁCIDO CÍTRICO ANHIDRO*. Madrid, España. Recuperado el 25 de Noviembre de 2022, de <https://quimipur.com/pdf/acido-citrico-anhidro.pdf>

Raja, R., & Reddy, K. (2013). Production of Citric Acid by *Aspergillus Niger* Using Oat Bran as Substrate. *Internacional de Química e Ingeniería Química*, 3(3), 188. Recuperado el 18 de Octubre de 2022, de [https://www.ripublication.com/ijcce\\_spl/ijccev3n3spl\\_09.pdf](https://www.ripublication.com/ijcce_spl/ijccev3n3spl_09.pdf)

Reinaldo, B. G., & Hiléia, R. C. (2020). Producción de ácido cítrico por el consorcio de cultivo en estado sólido de *Aspergillus Niger* y *Trichoderma Reesei* del bagazo de la caña de azúcar. *Open Biotechnology*, 14(2), 10. doi:<http://dx.doi.org/10.2174/1874070702014010032>

- Resano, D., Guillen, O., Ubillús, F., & Barranzuela, J. (2022). Caracterización fisicoquímica del bagazo de caña de azúcar industrial y artesanal como material de construcción. *SciELO*, 33(2), 7. doi:doi.org/10.4067/S0718-07642022000200247
- Riera, M. A., Maldonado, S., & Palma, R. (2018). RESIDUOS AGROINDUSTRIALES GENERADOS EN ECUADOR PARA LA ELABORACIÓN DE BIOPLÁSTICOS. *Ingeniería Industrial*, 1(3), 227-247. doi:https://doi.org/10.22320/S07179103/2018.13
- Rivada, N. F. (2008). *Planta industrial de producción de ácido cítrico a partir de melazas de remolacha*. Cádiz, España. Recuperado el 23 de Agosto de 2020
- Rojas, G. A., Flórez, M. C., & López, R. D. (2018). Prospectivas de aprovechamiento de algunos residuos agroindustriales. *Cubana de Química*, 31(1). Recuperado el 25 de Junio de 2020, de <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v31n1/2224-5421-ind-31-01-31.pdf>
- Rosales, M. S. (2019). *EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL PH, LA TEMPERATURA Y EL MEDIO NUTRITIVO EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE LA FERMENTACION DE LACTO SUERO CON Aspergillus carbonarius*. Cuenca, Ecuador. Recuperado el 10 de Octubre de 2022, de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17124/1/UPS-CT008184.pdf>
- Rosas, C. M., & Terán, F. D. (2015). *OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DE MELAZA O CACHAZA, MEDIANTE FERMENTACIÓN UTILIZANDO CEPA DE Aspergillus niger ATCC 16888*. Ibarra, Imbabura, Ecuador. Recuperado el 25 de Junio de 2020
- ROTH. (2021). *Ficha de datos de seguridad ÁCIDO CÍTRICO* (Vol. 3). Alemania. Recuperado el 25 de Noviembre de 2022, de <https://www.carlroth.com/medias/SDB-X863-ES-ES.pdf?context=bWFzdGVyfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0c3wyNDc4OTR8YXBwbGljYXRpb24vcGRmfHNIY3VyaXR5RGF0YXNoZWV0>

cy9oMjQvaDZjLzkwNDU5NTgzMjgzNTAucGRmfGIyOWM4ZTFINDU  
5MzZiMDA3ZGFhYjljMmExOTIxOTBIYzBIMzA5ZTcxZDBjM2NING  
MyYmIx

Sánchez, R. P., & Vásquez, N. S. (2020). *ÁCIDO CÍTRICO*. Tuxtla Gutiérrez, México. Recuperado el 25 de Noviembre de 2022, de [http://www.redciteg.org.mx/documentos/tripticos/idioma/acido\\_citrico.pdf](http://www.redciteg.org.mx/documentos/tripticos/idioma/acido_citrico.pdf)

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. (UNAM, Ed.) *Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C*, 16(2), 15,16. Recuperado el 22 de Septiembre de 2022, de [https://smbb.mx/wp-content/uploads/2017/10/Revista\\_2012\\_V16\\_n2.pdf](https://smbb.mx/wp-content/uploads/2017/10/Revista_2012_V16_n2.pdf)

Serrano, M. M. (2019). *EVALUACIÓN DE LA VARIACIÓN DE DIFERENTES MEDIOS EN LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO MEDIANTE FERMENTACION EN ESTADO SÓLIDO CON Aspergillus carbonarius*. Cuenca, Ecuador. Recuperado el 10 de Octubre de 2022, de [https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UPS\\_c9945ec0630588db5ce340b2950d7b64](https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UPS_c9945ec0630588db5ce340b2950d7b64)

Shankar, T., & Sivakumar, T. (2016). Optimization of Citric Acid Production Using *Aspergillus niger* Isolated from the Leaf Litter Soil of Sathuragiri Hills. *horizon research*, 1(1), 79-87 (81). doi:10.13189/ujmr.2016.040401

Shnada, A. H., Toyin, A. K., & Tahir, H. (2014). Producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* cultivado en Pulpa de fruta de *Parkia biglobosa*. (S. Papanikolaou, Ed.) *SciELO*, 20(2), 5, 6. doi:<http://dx.doi.org/10.1155/2014/762021>

TAPPI T 211. (2007). Ash in wood, pulp, paper and paperboard: combustion at 525°C (Five-year review of T 211 om-02) (No changes since Draft 1). *SciELO*, 2(1), 1-8. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022, de <https://www.tappi.org/content/sarg/t211.pdf>

Tlachi, C. C., Soto, S. A., Meneses, M. M., Loera, C. O., Moltalvo, P. C., & Ramírez, B. E. (2007). *EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS*

DEL FERMENTADO DE PAJA DE CEBADA Y RAICILLA OBTENIDO POR FERMENTACIÓN SÓLIDA (FES) CON EL HONGO *Pleurotus sapidus*. *SMBB*, 1(1), 1. Recuperado el 18 de Septiembre de 2022, de [https://smbb.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area\\_II/Carteles/CII-101.pdf](https://smbb.mx/congresos%20smbb/morelia07/TRABAJOS/Area_II/Carteles/CII-101.pdf)

Tuquerres, C. H., Cerda, M. G., Tenemasa, V., Diéguez, S. K., Carrera, S. K., & Pérez, M. A. (2020). DISEÑO DEL PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO A PARTIR DEL BAGAZO DE CAÑA DISPONIBLE EN PASTAZA, ECUADOR. *Centro Azucar*, 47(3), 88. Recuperado el 25 de Junio de 2020, de [https://www.researchgate.net/publication/339800162\\_Disenio\\_del\\_proceso\\_para\\_la\\_obtencion\\_de\\_acido\\_citrico\\_a\\_partir\\_del\\_bagazo\\_de\\_cana\\_disponible\\_en\\_Pastaza\\_Ecuador](https://www.researchgate.net/publication/339800162_Disenio_del_proceso_para_la_obtencion_de_acido_citrico_a_partir_del_bagazo_de_cana_disponible_en_Pastaza_Ecuador)

Vargas, C. Y., & Pérez, P. L. (2018). APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA EL MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AMBIENTE. *Facultad de Ciencias Básicas*, 14(1), 59-72 (61). doi:<http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.3108>

Velásquez, J., Beltran, D., Padilla, L., & Giraldo, G. (2010). Obtención de ácido cítrico por fermentación con *aspergillus niger* utilizando sustrato de plátano dominico. *Dialnet*, 1(5), 136, 137. Recuperado el 25 de Junio de 2020, de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3628261>

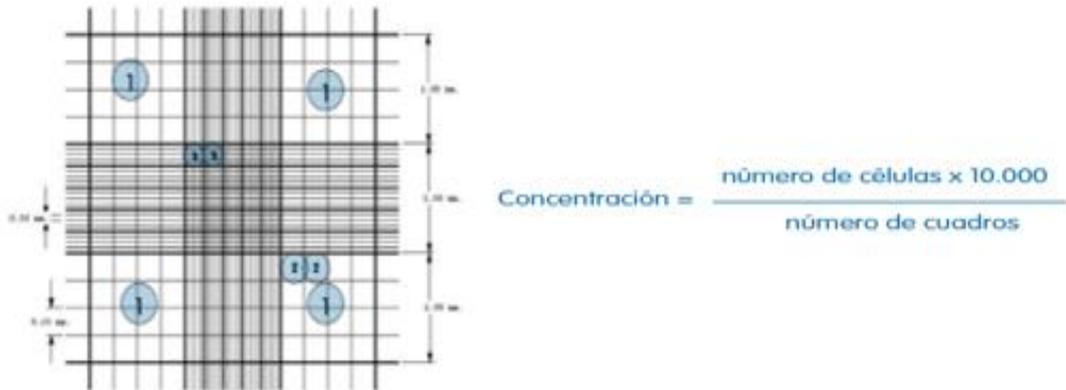
Villalba, V. J., & Arzola, d. I. (2019). Estudio experimental sobre el secado de bagazo de caña de azucar panelera. *Redalyc*, 24(1), 25-34. Recuperado el 13 de Septiembre de 2022

Villalpando, J., Jaubert, S., Ibarra, D., Amaya, L., Mateos, J., Díaz, D., . . . Herrera, E. (2010). PRODUCCIÓN DE PECTINASAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESIDUOS AGROINDUSTRIALES. *Redalyc*, 1(1), 2592-2595. Recuperado el 15 de Septiembre de 2022, de <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/253/1/Produ>

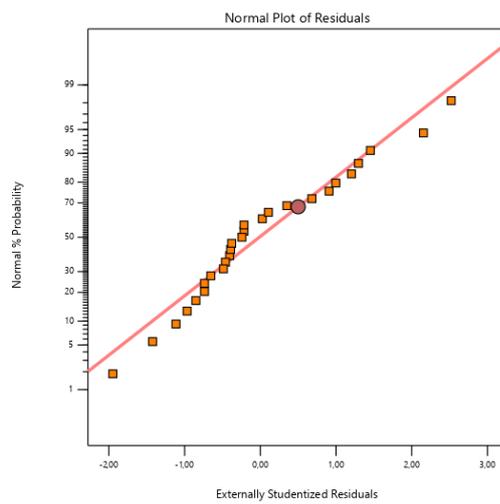
cci% C3%B3n% 20de% 20pectinasas% 20por% 20fermentaci% C3%B3n% 20  
en% 20estado.pdf

# ANEXOS

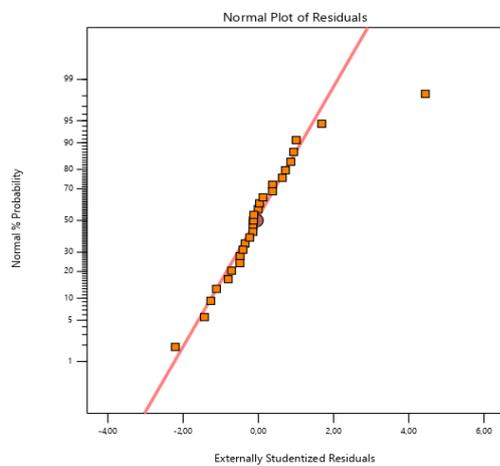
## Anexo 1. Fórmula para cámara de conteo.



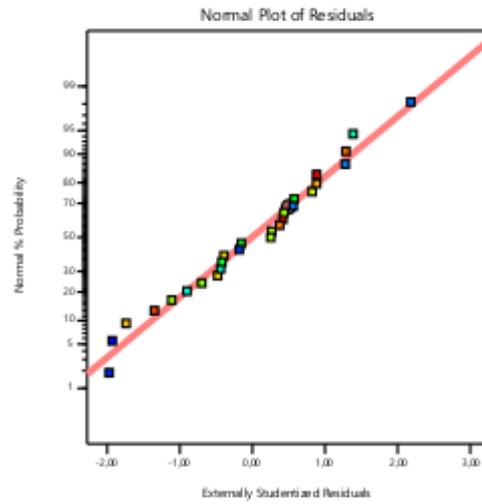
## Anexo 2. Normalidad para concentración de ácido cítrico.



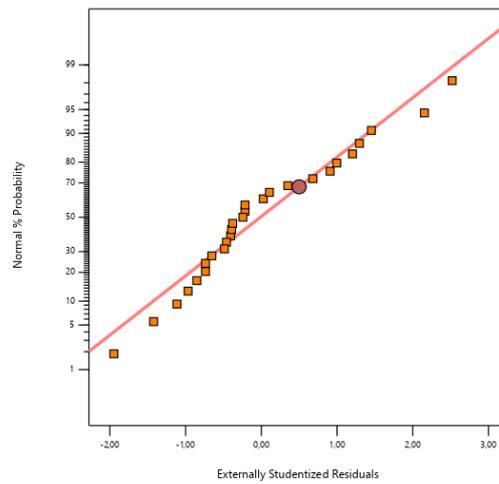
## Anexo 3. Normalidad para generación de esporas.



**Anexo 4.** Normalidad para consumo fuente de carbono.



**Anexo 5.** Normalidad para productividad del ácido cítrico.



**Anexo 6.** Proceso de obtención de ácido cítrico.





**Fotografía 4.** Esterilizado



**Fotografía 5.** Secado



**Fotografía 6.** Caracterización



**Fotografía 7.** Envasado



**Fotografía 8.** Pesado



**Fotografía 9.** Inoculación



**Fotografía 10.** Placa colonizada



**Fotografía 11.** Aspergillus niger



**Fotografía 12.** Fermentación (Biorreactor)



**Fotografía 13. Filtrado**



**Fotografía 14. Conteo de esporas**



**Fotografía 15. Centrifugado de la muestra**



**Fotografía 16. Determinación de azúcares reductores en la muestra**



**Fotografía 17. Determinación de ácido cítrico por el método piridina y anhídrido acético en la muestra**



**Fotografía 18. Neutralizado con hidróxido de calcio**



**Fotografía 19. Acidificado (Cal-Sulfúrico)**



**Fotografía 20. Centrifugado**



**Fotografía 21. Evaporado**



**Fotografía**  
Cristalización

**22.**



**Fotografía**  
Deshidratado

**23.**



**Fotografía 24. Ácido cítrico**