



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES Y APLICADAS.

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

INFORME FINAL DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR,

MODALIDAD PRESENCIAL

TEMA:

**“OBTENCIÓN DE ÁCIDO CÍTRICO POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA, A
PARTIR DE LACTOSUERO, USANDO *Aspergillus niger*”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de INGENIERO

AGROINDUSTRIAL

**Línea de investigación: gestión, producción, productividad, innovación y desarrollo
socioeconómico**

Autor: Ramírez Moya Guido Gabriel

Director: Ing. Jimmy Núñez Pérez MSc.

Ibarra-2023



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

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

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:	1003557848		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Ramírez Moya Guido Gabriel		
DIRECCIÓN:	La Esperanza, barrio San Francisco, calle Galo Plaza Lasso		
EMAIL:	ggramirez@utn.edu.ec – ramggabo1993@gmail.com		
TELÉFONO FIJO:	-	TELÉFONO MÓVIL:	0978785085

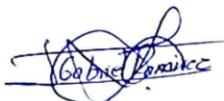
DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	"Obtención de ácido cítrico por fermentación sumergida, a partir de lactosuero, usando <i>Aspergillus niger</i> "
AUTOR:	Ramírez Moya Guido Gabriel
FECHA: DD/MM/AAAA	02/05/2023
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero Agroindustrial.
ASESOR /DIRECTOR:	Ing. Jimmy Núñez Pérez.

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 esta y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 02 días del mes de mayo de 2023

EL AUTOR:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Gabriel Ramirez", is written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat circular.

Sr. Ramírez Moya Guido Gabriel.

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

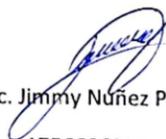
Ibarra 02 de mayo del 2023

MSc. Jimmy Núñez Pérez

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de integración curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.



MSc. Jimmy Núñez Pérez

1756606339

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a las personas más importantes en mi vida; mi madre querida y a mi abuelita adorada.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos mis amigos y compañeros que estuvieron durante mis estudios, también quiero agradecer a la empresa FLORALP SA por el apoyo brindado en esta investigación, de igual manera con mis maestros que supieron guiarme durante el aprendizaje dentro de las aulas, un agradecimiento especial a los docentes: Ing. Jimmy Núñez MSc., Ing. Jimmy Cuarán Mg. I y Ing. Holguer Pineda MBA. que me acompañaron en el proceso para culminar este trabajo.

Eternamente agradecido a mi madre, por la paciencia, amor y dedicación que tuvo durante toda su vida, gracias a todos.

Gabriel.

RESUMEN EJECUTIVO

Este estudio desarrolla la obtención a nivel de laboratorio de ácido cítrico usando un hongo filamentoso identificado morfológicamente como *Aspergillus niger*, el mismo se inocula (1%) en un sustrato líquido a base de lactosuero (99%) para realizar la fermentación por lotes; para el análisis estadístico se usó un Diseño Factorial al Azar con dos factores AxB (3:2): el factor A es la temperatura (25, 30, 35 °C) y el factor B es sustrato: Lactosuero dulce y lactosuero con suplementos (lactosa, sulfato de amonio y fosfato monopotásico) con el objetivo de analizar estos factores para encontrar un medio de cultivo ideal para la producción de ácido cítrico; para fermentar el lactosuero se usó un agitador orbital calibrado a 200 rpm con temperatura de acuerdo a los tratamientos, este bioproceso duró 168 horas; cada 24 horas se midió: lactosa consumida, ácido cítrico y biomasa generada también se calculó las variables de respuesta (concentración de ácido cítrico, biomasa producida, rendimiento producto/sustrato y productividad volumétrica); al finalizar la experimentación los resultados obtenidos muestran que el tratamiento 2 (25 °C; con suplementos) tiene mayor concentración de ácido cítrico (0.37 g/l), el rendimiento del producto en relación al sustrato fue de 4%, la productividad diaria fue de 0.05 g/l de ácido cítrico. La temperatura y un buen sustrato con grandes cantidades de carbono y sales minerales es esencial para la producción de ácido cítrico a nivel de laboratorio, la cepa de *Aspergillus niger* produjo mayor ácido cítrico en los medios de cultivo con mayor porcentaje de lactosa mientras que la temperatura de fermentación que favorece al crecimiento de biomasa fue de 30 °C.

Palabras claves: Ácido cítrico, *Aspergillus niger*, lactosuero, producción.

ABSTRACT

This study develops the laboratory production of citric acid using a filamentous fungus morphologically identified as *Aspergillus niger*, which is inoculated (1%) in a liquid substrate based on whey (99%) for batch fermentation; for the statistical analysis a completely randomized design with two AxB factors was used: factor A is the temperature with three levels (25, 30, 35 °C) and factor B with two levels: Sweet whey and whey with supplements (lactose, ammonium sulfate and monopotassium phosphate) with the objective of finding an ideal culture medium for citric acid production; to ferment the whey an orbital shaker calibrated at 200 rpm with temperature according to the treatments was used, this bioprocess lasted 168 hours; every 24 hours was measured: lactose consumed, citric acid production and biomass generated also the response variables were calculated (citric acid concentration, biomass produced, product/substrate yield and volumetric productivity); at the end of the experimentation the results obtained show that treatment 2 (25 °C; with supplements) has higher citric acid concentration (0,37 g/l), the product yield in relation to the substrate was 4%, the daily productivity was 0,05 g/l of citric acid. The temperature and a good substrate with large amounts of carbon and mineral salts is essential for the production of citric acid at the laboratory level, the strain of *Aspergillus niger* produced more citric acid in the culture media with a higher percentage of lactose, and the fermentation temperature that favors biomass growth was 30 °C.

Key words: Citric acid, *Aspergillus niger*, whey, production.

Índice De Contenidos

INTRODUCCION	14
Problema.....	15
Justificación.....	16
Objetivos	17
General:	17
Específicos.....	17
Hipótesis.....	17
Capitulo 1. Marco Teórico.....	18
1.1. Lactosuero	18
1.1.1. Tipos de Lactosuero	18
1.1.2. Influencia del Lactosuero en el Medio Ambiente.....	19
1.2. Lactosa	19
1.2.1. Cuantificación de Lactosa.....	20
1.3. Caracterización del Género <i>Aspergillus</i>	21
1.3.1. Taxonomía	21
1.3.2. Caracterización Fenotípica.....	22
1.3.3. Características Macroscópicas.....	22
1.3.4. Características microscópicas.....	23
1.4. Métodos de Fermentación	24

	10
1.5. Factores que Afectan la Fermentación	25
1.5.1. Fuente de Carbono	25
1.5.2. Nitrógeno y Fósforo	25
1.5.3. Oligoelementos	25
1.5.4. Concentración de Oxígeno.....	25
1.6. Ácido Cítrico.....	25
1.6.1. Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos.....	26
1.6.2. Métodos de Obtención de Ácido Cítrico.	27
1.6.3. Residuos Agroindustriales Usados en la Producción de Ácido Cítrico	28
1.6.4. Usos del ácido cítrico.....	29
1.6.5. Determinación de ácido cítrico por método espectrofotométrico.....	30
1.7. Diseño factorial	30
1.7.1. Diseños bifactoriales.....	30
1.7.2. Prueba Tukey	30
Capítulo 2. Metodología y métodos.....	31
2.1. Tipo de investigación	31
2.2. Técnicas e Instrumentos de Investigación.....	31
2.2.1. Materiales y Equipos.....	31
2.3. Metodología	31
2.3.1. Caracterizar Morfológicamente la Cepa de <i>Aspergillus niger</i>	31

2.3.2.	Analizar variables de temperatura y adición de suplementos en la producción de ácido	33
2.3.3.	Establecer el proceso de obtención de ácido cítrico a partir de lactosuero.....	39
Capítulo 3.	Resultados y Discusión.....	41
3.1.	Caracterizar Morfológicamente la Cepa de <i>Aspergillus niger</i>	41
3.1.1.	Características Macroscópicas.....	41
3.1.2.	Características microscópicas.....	42
3.2.	Análisis de las variables de control y respuesta en la cinética de obtención de ácido cítrico.....	42
3.2.1.	Análisis de varianza para la Concentración de ácido cítrico.	43
3.2.2.	Análisis de varianza para biomasa producida.....	44
3.2.3.	Análisis de varianza de rendimiento: PRODUCTO/SUSTRATO (g de AC/g de Lactosa)	45
3.2.4.	Análisis de varianza para productividad (g de AC/l*días).....	47
3.3.	Establecer un proceso para la obtención de ácido cítrico.....	48
Conclusiones.....		53
Recomendaciones.....		54
Bibliografía:.....		55
Anexos.....		61

Índice de Tablas

Tabla 1 Composición y tipos de lactosuero	19
Tabla 2 Métodos para cuantificar lactosa.	20
Tabla 3 Taxonomía del género <i>Aspergillus</i>	21
Tabla 4 Clasificación de fermentación.....	24
Tabla 5 Residuos agroindustriales usados para la producción de ácido cítrico.	29
Tabla 6 Características fenotípicas de <i>Aspergillus niger</i>	33
Tabla 7 Variables independientes	33
Tabla 8 Tratamientos del experimento.....	34
Tabla 9 Variables cuantitativas.....	34
Tabla 10 Reactivos usados en el reactivo de Tales	35
Tabla 11 Variables dependientes y ecuaciones usadas.	36
Tabla 12 Suplementos usados para fermentación	38
Tabla 13 Resumen de proceso para obtención de ácido cítrico.	40
Tabla 14 Análisis de varianza de la concentración de ácido cítrico.	43
Tabla 15 Análisis de varianza para biomasa producida.....	44
Tabla 16 Análisis de la varianza para rendimiento Producto/Sustrato	46
Tabla 17 Análisis de varianza para productividad.	47

Índice de Figuras

Figura 1. Colonia de <i>Aspergillus niger</i>	22
Figura 2. Estructuras microscópicas del genero <i>Aspergillus</i>	23
Figura 3. Tipo de vesículas del género <i>Aspergillus</i>	23
Figura 4. Ciclo de Krebs.....	27
Figura 5. Diagrama de proceso para identificación de <i>Aspergillus niger</i>	32
Figura 6. Diagrama de proceso para la obtención de ácido cítrico.....	37
Figura 7. Vista microscópica de la cámara de Nuebauer.....	38
Figura 8. Características microscópicas.....	41
Figura 9. Características microscópicas.....	42
Figura 10. Prueba Tukey para concentración de ácido cítrico.....	44
Figura 11. Prueba Tukey para producción de biomasa.....	45
Figura 12. Prueba Tukey rendimiento producto/sustrato.....	46
Figura 13. Prueba Tukey para productividad.....	47
Figura 14. Preparación de inóculo.	48
Figura 15. Fermentación.....	49
Figura 16. Evaporación.....	50
Figura 17. Cristalización.....	50
Figura 18. Producto secado por aire seco y Empacado en material plástico.....	50
Figura 19. Bioproceso para 1m ³ de lactosuero	51

INTRODUCCIÓN

El ácido cítrico es un compuesto utilizado en la industria alimentaria por sus propiedades físicas y químicas, principalmente se usa en: bebidas azucaradas, para controlar el pH o como saborizante natural por su similitud con el limón; el ácido cítrico se industrializó en los años 1860 – 1880; para 1917 James N. Currie estudia la obtención de ácido cítrico en fermentación sumergida con *Aspergillus niger* usando sacarosa como fuente de carbono para el microorganismo, ya en la actualidad alrededor del 90% ácido cítrico es producido mediante este tipo de fermentación en grandes biorreactores que facilita el control del proceso y pureza del producto.

Durante las últimas décadas investigadores han buscado la forma de aprovechar diferentes residuos agroindustriales para usarlos como sustratos en procesos industriales, el lactosuero al ser una fuente rica en nutrientes es ideal para la proliferación y producción de biomasa y compuestos orgánicos, mismos que pueden ser comercializados para abastecer la demanda interna del país, cabe destacar que el lactosuero debido a su composición es un contaminante poderoso y que al industrializar y fragmentar sus compuestos de la fase líquida se logra menorar el impacto ambiental de su desecho, así se valoriza el lactosuero generando mayores rendimientos en la cadena productiva e impulsando la creación de nuevas industrias dentro del país.

La presente investigación trata de como la temperatura y la suplementación con lactosa, sulfato de amonio y fosfato mono potásico influyen en un medio de cultivo líquido a base de lactosuero dulce para obtener ácido cítrico mediante la acción del moho *Aspergillus niger*, el cual es capaz de crecer en medios de cultivo que en su composición exista sacáridos y sales minerales que permitan la propagación del moho en el medio y así este

sintetice mediante su metabolismo citrato que mediante su refinación se obtiene de ácido cítrico.

Problema

Según (Campaña et al., 2021) en Ecuador genera aproximadamente 1102 millones de litros anuales de lactosuero proveniente de la elaboración de queso u otros productos lácteos, este excedente usualmente se usa como materia prima para elaborar bebidas lácteas o suero en polvo entre otros sin embargo el porcentaje de lactosuero aprovechado por pequeñas empresas del Ecuador no representa el 10% de la producción anual, estas empresas no disponen de la capacidad para invertir miles de dólares para industrializar el lactosuero (Granda, 2018) además existe diferentes leyes e impuestos que impiden una fácil comercialización y uso de este producto.

El lactosuero excedente y que no es industrializado es desechado a los afluentes muchas veces sin ningún tratamiento previo que atenúe el impacto ecológico que afecta principalmente a las cuencas fluviales esto debido a que en su composición se encuentra el 55% de nutrientes de la leche entre ellos proteínas, grasas y lactosa estos compuestos favorece el aumento de la demanda biológica y química de oxígeno (DBO y DQO) (Prado et al., 2018), también incrementa la salinidad en los suelos al usarlos como fertilizante.

Por otro lado, según Camacho et al., (2010) en su informe “Análisis de materias primas y productos” registra que se utilizaron aproximadamente 532,53 toneladas de ácido cítrico en el año 2009 que fue importado desde China, Australia, Brasil, Colombia o Uruguay, debido a la inexistente producción del insumo en el país, esto representa cerca de 4 millones de dólares anuales, tomando en cuenta que cada año aumenta la producción de

alimentos también aumenta la necesidad de ácido cítrico dentro del país, la poca inversión en tecnologías impide la incorporación de nuevas industrias en la matriz productiva del Ecuador estancando el progreso de diferentes sectores económicos.

Justificación

El *Aspergillus niger* se encuentra en muchos lugares él es causante de la pudrición de verduras y vegetales también tiene la cualidad de desarrollarse en diferentes medios por esta razón es importante para la industria ya que es un microorganismo versátil para la producción de distintos insumos usados principalmente por la industria alimentaria.

El ácido cítrico es ampliamente usado en la elaboración de alimentos debido a sus propiedades acidulantes y organolépticas además es considerado como un alimento no tóxico para el consumo humano, se lo encuentra en diferentes frutas cítricas de donde se extraía antiguamente, aunque hoy en día se usa métodos biotecnológicos para la extracción mediante fermentación sumergida de melazas, jarabes de maíz o desechos agroindustriales como el lactosuero, el cual debido a su valor nutricional resulta un buen sustrato para la obtención de ácido cítrico ya que en su composición existe lactosa una fuente rica en carbono que puede ser usada por el *Aspergillus niger* en su metabolismo y generar metabolitos secundarios como el citrato el cual se transforma en ácido cítrico.

Según la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO) en Latinoamérica el porcentaje de industrialización de lactosuero redondea el 40 % de la producción anual, por esto se busca mediante este trabajo diversificar el uso de este coproducto del queso, mediante su transformación en ácido cítrico a través de bioprocesos que permitirá reducir el impacto ambiental que genera el lactosuero;

también; se pretende establecer un modelo del proceso de purificación de ácido cítrico mismo que servirá para la implementación de nuevas industrias e inversiones en el país.

Objetivos

General:

- Obtener ácido cítrico desde lactosuero utilizando la cepa de *Aspergillus niger* en fermentación sumergida.

Específicos

- Caracterizar morfológicamente la cepa de *Aspergillus niger*.
- Analizar las variables de temperatura y el suplemento en la producción de ácido cítrico.
- Establecer un proceso para la obtención de ácido cítrico.

Hipótesis

Alternativa

La adición de suplemento al lactosuero aumenta la producción de ácido cítrico

Nula

La adición de suplementos al lactosuero no aumenta la producción de ácido cítrico

Capítulo 1. Marco Teórico

1.1. Lactosuero

El lactosuero es obtenido de la elaboración de queso, en dicho proceso la caseína de la leche es cuajada por medios enzimáticos, luego de su cortado y mediante movimientos mecánicos ocurre la separación del lactosuero de la cuajada, dependiendo su acidez se clasifica en suero de leche dulce y suero de leche ácido; este último debido al proceso de acidificación al momento del cuajado.

El lactosuero corresponde al 85-90% del volumen total de la leche utilizada para la elaboración de queso; los nutrientes presentes en el suero corresponden al 55% de los nutrientes de la leche (Menchón, Cadona, & Bruschi, 2016), por este motivo el lactosuero se ha convertido en un producto con igual utilidad que el queso.

El uso del lactosuero ha sido muy variado: mediante procesos físicos se extraen concentrados proteicos, mediante equipos de atomización se puede conseguir suero en polvo es muy utilizado como suplemento alimenticio además mediante fermentaciones anaerobias es posible generar biodiesel o etanol, además con la presencia de oxígeno se ha logrado sintetizar ácidos orgánicos entre otros compuestos usados en alimentos (Campaña et al., 2021).

1.1.1. Tipos de Lactosuero

El lactosuero puede ser de dos tipos dependiendo del proceso previo que se le dio a la leche, aquí tenemos el lactosuero dulce que es proveniente de la leche que no fue adicionada ningún tipo de ácido para cambiar su composición y el lactosuero ácido el cual se obtiene de leche acidificada con la finalidad de obtener un producto como es el

queso mozzarella (Gastalver, 2015). En la Tabla 1 se detalla la composición de los dos tipos de suero.

Tabla 1

Composición y tipos de lactosuero

Compuesto	Lactosuero dulce (%)	Lactosuero ácido (%)
Materia seca	55-75	55-75
Lactosa	40-50	40-55
Grasa	0-5	0-5
Proteína	9-14	7-12
Cenizas	4-6	6-8
pH	>6	<4.4
Acidez	< 20 °D	>50 °D

(Juliano et al., 2017)

1.1.2. Influencia del Lactosuero en el Medio Ambiente

El lactosuero en su composición dispone de compuestos orgánico-susceptibles a procesos oxidativos produciendo CO₂ al momento de su degradación, haciendo que la demanda bioquímica de oxígeno aumente y convirtiéndolo en un potencial contaminante acuático. En Ecuador se produce más de 5 millones de litros diarios de leche de estos el 25% se usa para elaborar queso, tomando en cuenta estos antecedentes en el país se genera 1.2 millones de litros de lactosuero diariamente que en su mayoría son desechados en los sistemas de alcantarillado de la ciudad sin ningún proceso previo que disminuya el poder contaminante (Campaña et al., 2021).

1.2. Lactosa

La lactosa (C₁₂H₂₂O₁₁) representa el principal constituyente de lactosuero (± 4.8 % m/v) ya que representa la mayor parte de sólidos totales. Es un disacárido formado por una molécula de glucosa y una de galactosa, la glucosa es la principal fuente de energía para los microorganismos; se la puede obtener del lactosuero mediante hidrólisis enzimática o

de manera química, este procedimiento va acompañado de modificaciones físicas y químicas.

1.2.1. Cuantificación de Lactosa

Existen diferentes métodos para cuantificar lactosa en la Tabla 2 se describen algunos métodos.

Tabla 2

Métodos para cuantificar lactosa.

Método	Característica.
Polarimétrico	Método físico para la cuantificación de lactosa en productos, se separa la grasa y las proteínas de la muestra ya que interfieren en cuantificación.
Crioscópicos	Se basa en la adición de lactasa a un buffer en donde se mide el punto de congelación, se mezcla e incuba durante 60 min a ± 37 °C. No es necesario eliminar proteínas de las muestras.
Enzimáticos	Este método se usa en muestras con porcentajes mínimos de lactosa y consiste en romper los enlaces de la glucosa y galactosa.
HPLC	Es muy usada en cuantificación de compuestos individuales por su versatilidad y precisión sin embargo no es sensible a los cambios de temperatura, presión o composición de disolventes que pueden ser difícil de conseguir.
Cloramina T	Es un método químico donde la muestra debe ser desproteïnizada, la lactosa reacciona con la cloramina T y mediante titulación con yodo libre y tiosulfato sódico se cuantifica el porcentaje de cloramina T que no reacciona.

Adaptado de (Vázquez, 2017)

1.2.1.1. Método Espectrofotométrico (método de Tales).

Es un método rápido, sencillo y preciso para la determinación de lactosa se por acción del reactivo de Tales (fenol, hidróxido de sodio, ácido pícrico y bisulfito de sodio) junto al hidróxido de bario y sulfato de zinc. La muestra debe ser diluida antes de agregar los reactivos mencionados para que genere un color amarillento, al someterlo al calor, la intensidad cambia de acuerdo con la cantidad de lactosa en la muestra (Teles et al., 1978).

1.3. Caracterización del Género *Aspergillus*

Debido a la capacidad de adaptación las especies del género *Aspergillus* este se encuentra distribuido en diferentes lugares: en frutas, en la tierra, en desperdicios, en piensos, etc, son capaces de producir metabolitos secundarios como micotoxina, ácidos orgánicos e incluso causantes de enfermedades tanto en animales como en vegetales (Rangel, 2019).

1.3.1. Taxonomía

La taxonomía o sistemática es la ciencia de la botánica que se encarga de describir, ordenar y nombrar cada especie según taxones botánicos es decir una clasificación jerárquica que se sustenta en las características morfológicas y genéticas propias del organismo (Morrone, 2013); la jerarquía linneana se denomina a los niveles o taxones usado en la clasificación botánica de una especie estas pueden ser más de 20 niveles sin embargo según (Lanteri & Cigliano) siguen que es obligatorio describir 7 niveles en la clasificación de una especie: Reino, clase, orden, familia, género y especie. En la tabla 3 se describe la taxonomía del espécimen estudiado, dentro de esta investigación se clasificó la especie del microorganismo estudiado.

Tabla 3

Taxonomía del género Aspergillus

Dominio	Eucaryota
Reino	Fungi
División	Ascomicota
Clase	Eurotiomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>

Adaptado de (Cepero et al., 2012)

1.3.2. Caracterización Fenotípica

Se basa en la observación de las características también es el primer paso para determinar la taxonomía de un género específico para el caso del *Aspergillus* las características más importantes a tomar en cuenta son la forma y tonalidad de las colonias, presencia de esclerocio, las estructuras microscópicas que conforman el moho estudiado son: el conidióforo y cabezas conidiales (Soriano, 2015).

1.3.3. Características Macroscópicas.

Se lo realiza a simple vista diferenciando el tamaño, forma y color de las colonias estos aspectos deben ser observados de manera rigurosa (Abarca, 2000).

1.3.3.1. Colonias.

El género *Aspergillus* presenta diferentes formas y tamaños generalmente son redondos u ovalados dependiendo del medio de cultivo usado para la identificación, además puede producir gotas de exudado en la superficie de la colonia, además para el género *Níger* las colonias suelen tener esclerocios.

1.3.3.2. Color de Colonias.

El color esta dado por las características microscópicas y por sus propágulos es decir los conidios, hifas, esclerocios y bandas de micelio, normalmente presenta un color blanco pasando amarillo, finalmente negro el cual es su color característico.



Figura 1. *Colonia de Aspergillus níger.* (Mokobi, 2021)

1.3.4. Características microscópicas.

La estructura del género *Aspergillus* se divide en 2 partes bien diferenciadas: el conidióforo y las cabezas conidiales. En la figura 3 se puede observar las principales estructuras de género *Aspergillus* (A. Hernández et al., 2003).

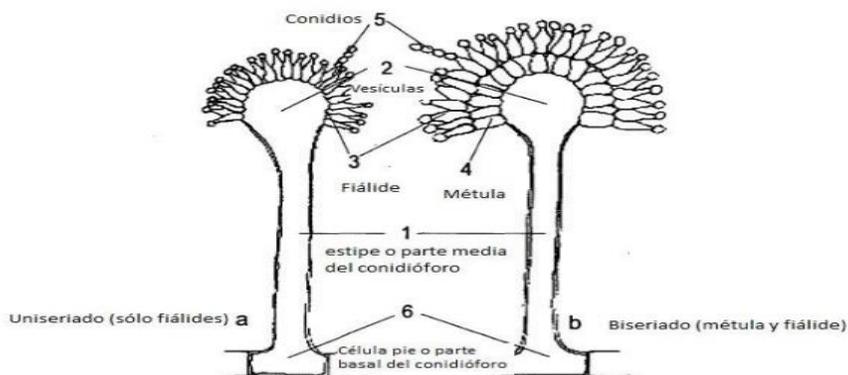


Figura 2. Estructuras microscópicas del género *Aspergillus*. (Piontelli L., 2008)

1.3.4.1. Conidióforo.

Formada por el estipe se podría decir que es el tallo y se encuentra bajo la vesícula mientras que la célula de pie es encargada de fijar la colonia a la superficie; suelen ser de color café o hialino y lisos.

1.3.4.2. Vesícula.

La forma y el tamaño puede variar dependiendo el género del microorganismo.

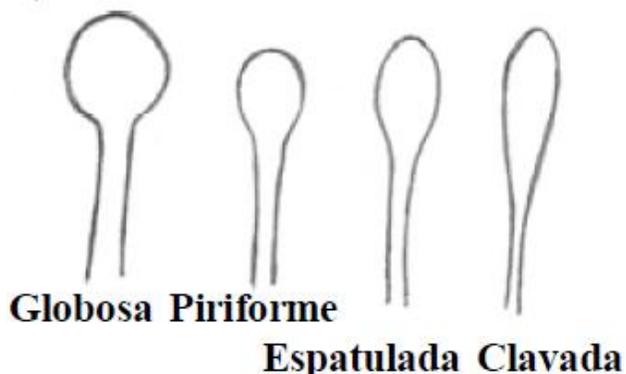


Figura 3. Tipo de vesículas del género *Aspergillus*. (Piontelli L., 2008)

1.3.4.3. Metulas

En algunas especies esta estructura no existe, en las que si se origina a partir de la vesícula estas pueden albergar de un a 10 fiálides.

1.3.4.4. Fiálides.

Suelen ser cilíndricas, alargadas estas dan origen a los conidios.

1.3.4.5. Conidios

Suelen ser bien definidos o irregulares, pueden ser curvados, elipsoidales, globosas, achatados con estriaciones o espinosos.

1.4. Métodos de Fermentación

La fermentación se usa para obtener diferentes metabolitos, biomasa y compuestos como alcoholes a partir de sustancias orgánicas con presencia o ausencia de oxígeno en el medio (A. Hernández et al., 2003) dentro de la se podría clasificar por porcentaje de agua existente en el caldo de cultivo así que se puede producir ácido cítrico por fermentación sumergida (FS), fermentación superficial (FSF) y fermentación en estado sólido (FES).

Tabla 4

Clasificación de fermentación

Fermentación	Porcentaje de agua	Característica
Fermentación sumergida	>70%	Mayores rendimientos, los nutrientes se encuentran suspendidos en la fase líquida, mayor control de parámetros de fermentación.
Fermentación superficial	70-50%	Posee bajo rendimiento, es usado para la determinación de parámetros físicoquímicos en el crecimiento de microorganismos y hongos macro-micetos.
Fermentación sólida	>30% <70%	Sustrato insoluble, se basa en el proceso Koji, se usa para producción de hongos comestibles, enzimas, ácidos orgánicos, antibióticos.

1.5. Factores que Afectan la Fermentación

1.5.1. Fuente de Carbono

Pueden ser azúcares reductores como la sacarosa, fructosa o lactosa, estos deben hallarse en exceso debido a tasa de absorción para la producción de ácido cítrico.

1.5.2. Nitrógeno y Fósforo

La concentración y fuente de nitrógeno constituye un parámetro importante en el crecimiento y producción de metabolitos así las sales de amonio (urea, sulfato o nitrato de amonio) son las más utilizadas, en cuanto a la adición del fósforo deben ser bajas ya que afecta la actividad enzimática que es importante para el ciclo del ácido cítrico (Gómez et al., 2014).

1.5.3. Oligoelementos

Se debe tener un control riguroso de la disponibilidad de compuestos como el zinc, manganeso, hierro, cobre y magnesio ya que afectan negativamente a la producción de ácidos orgánicos (Sawant et al., 2018).

1.5.4. Concentración de Oxígeno

Debe ser mayor 25% de saturación ya que es indispensable en el proceso de fermentación sumergida, aporta una ventaja en la formación de pellets además de aumentar la superficie de contactos del pellet con el caldo nutritivo; la cantidad de oxígeno a inyectar depende de la viscosidad del caldo nutritivo.

1.6. Ácido Cítrico.

El ácido cítrico forma parte de las frutas cítricas (limón, naranja, mandarina, etc.), debido a que presenta 3 grupos carboxilos en su estructura molecular, su principal funcionalidad es antioxidante y de gran importancia para la producción de alimentos, medicinas y

cosméticos, fue aislado por primera vez del jugo de limón en el año 1784, pero fue en el año 1890 que Wehmer observó la presencia de ácido cítrico en el oxalato de calcio que fue producido por *Penicillium glaucum*; James Currie en 1917 observó que algunas cepas del género *Aspergillus* eran capaces de producir ácido cítrico teniendo mejores rendimientos sin embargo no se sabía con exactitud el proceso de obtención hasta la publicación de (Krebs, 1953) el mismo que determinó ciclo de los ácidos tricarboxílicos ya en 1929 comenzó la producción de ácido cítrico de forma industrial, hoy en día se obtiene por medio de diferentes técnicas, sustratos y microorganismos.

Se obtiene de fermentados como la remolacha azucarera *Beta vulgaris*, también se ha obtenido de innumerables materias primas con altos contenidos de azúcares como glucosa, sacarosa y lactosa esta última principal constituyente del lactosuero.

Se lo comercializa en forma de cristales de color blanco y aromático muy parecido a la fruta natural (limón), Debido a las cualidades del ácido cítrico se usa en la industria alimentaria, cerca del 90% de la producción mundial es destinada a esta industria, seguido de la farmacéutica y metalúrgica.

1.6.1. Ciclo de los Ácidos Tricarboxílicos.

Consiste en una serie de reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas, el cual comienza con la oxidación de la glucosa en acetyl-CoA, el acetyl se une a dos carbonos al oxaloacetato para formar el citrato, el cual sufre una serie de transformaciones catabólicas hasta volver nuevamente al oxaloacetato. en el ciclo de Krebs se produce cerca de 15 moléculas de ATP por piruvato, cada molécula de glucosa proporciona dos piruvatos, entonces por cada molécula de glucosa se produce en promedio 38 moléculas de ATP (A. Hernández et al., 2003)

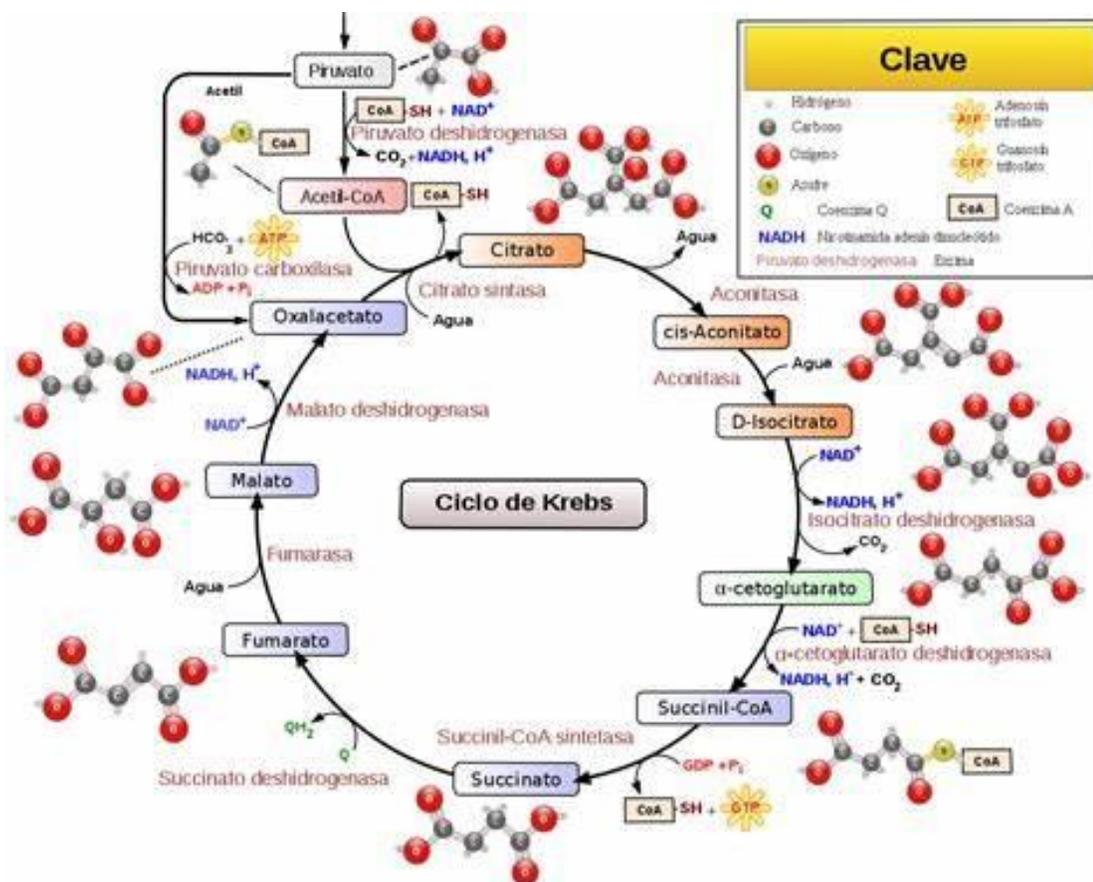


Figura 4. Ciclo de Krebs. (Ganeshprasad, 2020).

1.6.2. Métodos de Obtención de Ácido Cítrico.

Actualmente al ácido cítrico se produce mediante métodos biotecnológicos a través de la fermentación en estado sólido, superficial o sumergido; de estos métodos el último es más usado a nivel industrial por su fácil control de parámetros en el proceso, como sustrato se usan fuentes con grandes cantidades de azúcares reductores, glucosa o sacarosa que se obtiene de distintas materias primas. Estas materias primas se usan como fuente de carbono para el metabolismo del microorganismo fermentativo que normalmente son levaduras o mohos teniendo mayor preferencia el género *Aspergillus* que se utiliza para la producción industrial de ácido cítrico este microorganismo es de fácil adaptación a diferentes sustratos y condiciones lo que favorece la obtención de ácido cítrico, el

proceso para la obtención de ácido cítrico según (Alcoser et al., 2021) se divide en 3 etapas indistintamente al tipo de fermentación seleccionada para este fin.

- Preparación de inóculo: se busca reproducir y conservar el microorganismo fermentativo lo cual se lo realiza mediante siembras y sub-siembras en cajas Petri con agar; el inóculo se prepara antes de la fermentación en este estudio se usó la siguiente suspensión de esporas 1×10^7 UFC/ml.
- Fermentación: en esta etapa se acondiciona, esteriliza y adiciona suplementos al caldo de cultivo o sustrato; normalmente la fermentación dura entre 8 a 15 días luego de este periodo de tiempo se filtra el caldo de cultivo para separar la materia orgánica del caldo de cultivo fermentado.
- Purificación del producto: se refina con la adición de hidróxido de calcio y ácido sulfúrico, obteniendo como resultado ácido cítrico y sulfato de calcio, el ácido cítrico se purifica usando carbón activado y resinas para eliminar impurezas, por último, se evapora, cristaliza y seca, para almacenarlo.

1.6.3. Residuos Agroindustriales Usados en la Producción de Ácido Cítrico

El interés de maximizar el rendimiento de los procesos en diferentes industrias agroindustriales ha llevado a realizar diferentes investigaciones para usar residuos agroindustriales para la obtención de ácido cítrico u otros productos de interés, la forma de obtener ha sido variada dependiendo de la naturaleza de los residuos, en la Tabla 5 se encuentran algunas investigaciones realizadas con diferentes técnicas, sustratos y microorganismos.

Tabla 5

Residuos agroindustriales usados para la producción de ácido cítrico.

Método fermentativo.	Microorganismo usado	Materia prima	Referencia
Fermentación sólida	<i>Aspergillus niger</i>	Residuos de piña	(Kareem et al., 2010)
Fermentación sólida	<i>Aspergillus niger</i>	Cascara de granada	(Roukas & Kotzekidou, 2020)
Fermentación sólida	<i>Candida tropicalis</i>	Desechos de manzana y platano	(Hesham et al., 2020)
Fermentación sumergida	Mutación UV de <i>Aspergillus niger</i>	Melaza de remolacha y licor de maíz	(Lotfy et al., 2007)
Fermentación sumergida	<i>Aspergillus niger</i> GBCT7	Melaza de caña	(Ali et al., 2002)
Fermentación sumergida	<i>Yarrowia lipolytica</i> NCIM 3589	Glicerol	(Imandi et al., 2007)

1.6.4. Usos del ácido cítrico.

La mayor parte de la producción mundial es destinada a la industria alimentaria, pues posee cualidades antioxidantes, acidulantes, además de ser un mejorador de sabor y olor los cuales son muy parecidos al natural, también es muy utilizado en la producción de mermeladas, jaleas y confitería; en menor porcentaje se utiliza en la farmacéutica como: controlador de pH, en vitaminas y medicamentos, además es utilizado en diferentes industrias como la metalurgia es retirar óxido de los materiales metálicos y de superficies ferrosas; en la fabricación de detergentes se utiliza los citratos por su biodegradabilidad y facilidad de tratamiento; también en la industria textil, en el curtido de cuero (Muñoz et al., 2014). El ácido cítrico es un producto con alto valor comercial, en el mundo la producción anual ha pasado de 700 mil toneladas en 1993 a 1.6 millones en el 2008 (Yalcin, Bozdemir, & Ozbas, 2010).

1.6.5. Determinación de ácido cítrico por método espectrofotométrico.

Este método de estimación usa la piridina con anhídrido acético para desarrollar un color amarillento el cual se aprecia luego de un tiempo determinado, esta reacción es exotérmica; los valores obtenidos de las muestras son comparado con la curva de calibración realizada con anterioridad para esto se realiza diferentes concentraciones de ácido cítrico a partir de una solución madre (Marier & Boulet, 1958).

1.7. Diseño factorial

Según (R. Hernández et al., 2014): “Los diseños factoriales manipulan dos o más variables independientes e incluyen 2 o más niveles o modalidades de presencia en cada una de las variables independientes.”

1.7.1. Diseños bifactoriales

Estos diseños están constituidos por dos factores de estudio, dentro de estos factores existe niveles pueden ser 2x2, 3x3 o 2x3; con estos factores y niveles se establece las combinaciones o tratamientos ejecutables durante el experimento (Latorre et al., 2005).

1.7.2. Prueba Tukey

Esta prueba se usa en estadística para determinar la diferencia entre la media de los factores y niveles de un experimento, la característica principal de esta prueba es que las repeticiones sean las misma además el nivel de confianza es fijado por el investigador (Fallas, 2012).

Capítulo 2. Metodología y métodos

Esta investigación se realizó en la ciudad de Ibarra- Ecuador, en el laboratorio de análisis físico químico y microbiológicos y en el laboratorio de biotecnología aplicada ubicados en la Universidad Técnica del Norte – campus San Vicente.

2.1. Tipo de investigación

La investigación tiene un orden establecido a partir de un problema del cual se buscó y se planteó las diferentes variables del experimento con enfoque cuantitativo y descriptivo. Mediante la recolección de datos y posterior análisis se y así mediante la hipótesis llegar a la conclusión del fenómeno estudiado.

2.2. Técnicas e Instrumentos de Investigación

2.2.1. Materiales y Equipos.

MATERIALES	INSUMOS Y REACTIVOS.	EQUIPOS
Cajas Petri, frasco con rosca 1 l, tubos de ensayo. Matraces Erlenmeyer, tubos de ensayo, frascos de rosca, vasos de precipitación, embudos, profeta, balón aforado, cámara de Neubauer, pipetas (5 y 10 ml) Frascos de vidrio, micropipeta, embudo, papel filtro.	Lactosa, sulfato de amonio, fosfato monopotásico, sulfato de zinc, cloruro de sodio, sulfato de magnesio, ácido pícrico, fenol, hidróxido de sodio, bisulfito de sodio, hidróxido de bario. Agua destilada, hidróxido de calcio, ácido sulfúrico.	Mechero, hornilla, agitador, microscópio, incubadora. Agitador orbital, agitador magnético, estufa, mufla, pH metro, autoclave, espectrofotómetro. Balanza analítica, agitador termomagnético, centrifuga.

2.3. Metodología

2.3.1. Caracterizar Morfológicamente la Cepa de *Aspergillus niger*.

Se uso una técnica de observación de aspectos y características tanto macroscópicas como microscópicas que sirvieron para determinar el

género y la sección del espécimen estudiado, en la Figura 5 se observa el diagrama de proceso para la identificación del *Aspergillus* sp.

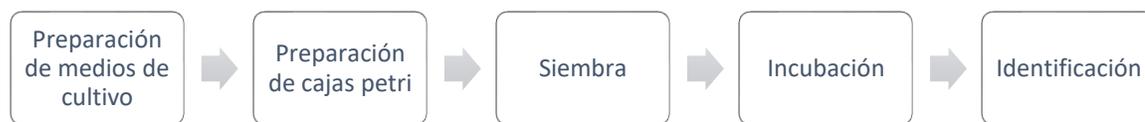


Figura 5. Diagrama de proceso para identificación de *Aspergillus* sp.

Preparación de medios de cultivo: se pesó el agar de acuerdo con lo descrito por el fabricante en la etiqueta, se esterilizo en autoclave (1.5 atm, 110 °C, 15 min). Junto con los materiales usados en esta fase.

Preparación de cajas Petri: vertimos alrededor de 20 ml de agar en cajas Petri, dejamos enfriar y solidificar, almacenamos en refrigeración (4 °C).

Siembra: para evitar la contaminación del medio se usó un mechero y con la ayuda del asa de siembra se toma la muestra del espécimen donado; se punzo dos veces sobre el agar estéril.

Incubación: fue a 30 °C durante 14 días hasta que existió la presencia de micelio y esporas.

Identificación: la técnica utilizada para recoger la muestra fue con un pedazo de cinta de 5 cm aproximadamente con el cual se tomó una porción de micelio y esporas, se colocó en un portaobjetos con 2 gotas de lactofenol, finalmente se usó un microscopio con lente de 100x. para realizar la identificación se tomó en cuenta aspectos macroscópicos y microscópicos descritos en la Tabla 6.

Tabla 6*Características fenotípicas de Aspergillus niger.*

Características macroscópicas	Características microscópicas
Coloración del adverso y reverso de la colonia	Presencia de metulas
Presencia de exudado	Forma de cabeza conidial
Diámetro de la colonia	Longitud y ancho de métulas y fiálides
Textura de la colonia	Forma de conidios
Presencia de pigmento difusible	

(Piontelli L., 2008)

2.3.2. Analizar variables de temperatura y adición de suplementos en la producción de ácido

Se evaluó dos factores, usando el diseño completamente al azar (DCA) se realizó 3 repeticiones, además se realizó la prueba de significancia Tukey al 5% que sirvió para determinar la significancia entre los tratamientos.

2.3.2.1. Factores de estudio.

Las variables independientes y niveles estudiados en esta investigación se presentan en la Tabla 7, se analizó 3 diferentes temperaturas de fermentación y dos medios de cultivo a base de lactosuero dulce las cuales se comparó con las variables dependientes (Tabla 12) que se obtuvo durante la fermentación.

Tabla 7*Variables independientes*

Factor	Variabes	Niveles
Factor A	Temperatura	T1: 25 °C
		T2: 30 °C
		T3: 35° C
Factor B	Lactosuero	Ss: Sin suplemento
		Cs: Con suplemento*

*Los suplementos usados en el experimento se detallan en la tabla 12.

2.3.2.2. Tratamientos.

Los tratamientos es el total de fermentación que se realizó por triplicado de acuerdo con la Tabla 8.

Tabla 8

Tratamientos del experimento

Tratamientos	Combinación	Descripción.
T1	T1; Ss	25 °C; sin suplemento
T2	T1; Cs	25 °C; Con suplemento
T3	T2: Ss	30 °C; Sin suplemento
T4	T2; Cs	30 °C; Con suplemento
T5	T3; Ss	35 °C; Sin suplemento
T6	T3; Cs	35 °C; Con suplemento

2.3.2.3. Variables del experimento.

En la tabla 9 se describe las variables cuantitativas con su respectiva referencia.

Tabla 9

Variables cuantitativas.

Variable	Método	Unidad	Referencia
Biomasa	Peso húmedo	g/ml	(AOAC 925.10.)
Concentración de sustrato (lactosa)	Espectrofotométrico	g/ml	(Teles et al., 1978)
Concentración de ácido cítrico	Espectrofotométrico	g/ml	(Marier & Boulet, 1958)

Biomasa (g/l): se midió la biomasa generada en final de la fermentación mediante el método de peso húmedo, se pesó el tubo Ependorf vacío posteriormente se tomó un ml del caldo de cultivo y mediante centrifugación se separó el líquido de la materia orgánica,

el sobrenadante se reservó para las demás mediciones y la materia orgánica se pesó junto al tubo Ependorf.

Consumo de sustrato (g/l): durante la fermentación se evaluó el consumo de lactosa mediante el método de Tales para lo cual se usó las siguientes diluciones: 4.5% (p/v) de hidróxido de bario y 5% (p/v) de sulfato de zinc; para el reactivo de Tales se prepara estas diluciones por separado con agua destilada: sulfato de zinc 5% (p/v); hidróxido de bario 4.5% (p/v), fenol 1% (v/v), ácido pícrico 1% (v/v), hidróxido de sodio 5% (p/v), bisulfito de sodio 1% (p/v), estas diluciones se mezclaron de acuerdo a la Tabla 10, en el mismo orden y agitando entre cada adición.

Tabla 10

Reactivos usados en el reactivo de Tales

Compuesto	Volumen para realizar el reactivo de Tales
Fenol.	6 ml
Hidróxido de sodio.	12 ml
Ácido pícrico.	12 ml
Bisulfito de sodio.	6 ml

(Teles et al., 1978)

Cálculos:

Ecuación 1.

$$Lactosa \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} * 50}{\text{Absorbancia de estandar}}$$

Concentración de ácido cítrico: esta variable esta inversamente relacionada al consumo de sustrato, para determinar se usó piridina y ácido acético para realizar una reacción exotérmica la cual junto al ácido cítrico forma un color amarillo, la tonalidad depende de la cantidad de ácido cítrico en la muestra.

2.3.2.4. Variables dependientes.

Las variables dependientes o de respuesta se obtuvieron luego de realizar la parte experimental de la investigación y consistió en fermentar lactosuero con *Aspergillus* durante un periodo de 168h donde cada 24 horas se tomaron muestras para medir las variables cuantitativas del experimento. Se realizó el promedio entre repeticiones y se calculó las variables respuesta mediante las fórmulas de la Tabla 11.

Tabla 11

Variables dependientes y ecuaciones usadas.

Variables dependientes	Ecuación de calculo
Concentración de ácido cítrico	-
Biomasa producida	-
Rendimiento producto/sustrato	$Y \left(\frac{P}{S} \right) = \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1}$
Productividad	$P = \frac{P_1}{T}$

2.3.2.5. Unidad experimental.

Se uso 500 ml de lactosuero a los que se le inoculo el 0,1% (v/v) que contenía aproximadamente 1.7×10^7 esporas/ml.

2.3.2.6. Análisis funcional.

Una vez determinado el análisis de varianza se realizó la prueba de Tukey (5%) usando programa estadístico IFOSTAT 2020.

2.3.2.7. Diagrama de proceso.

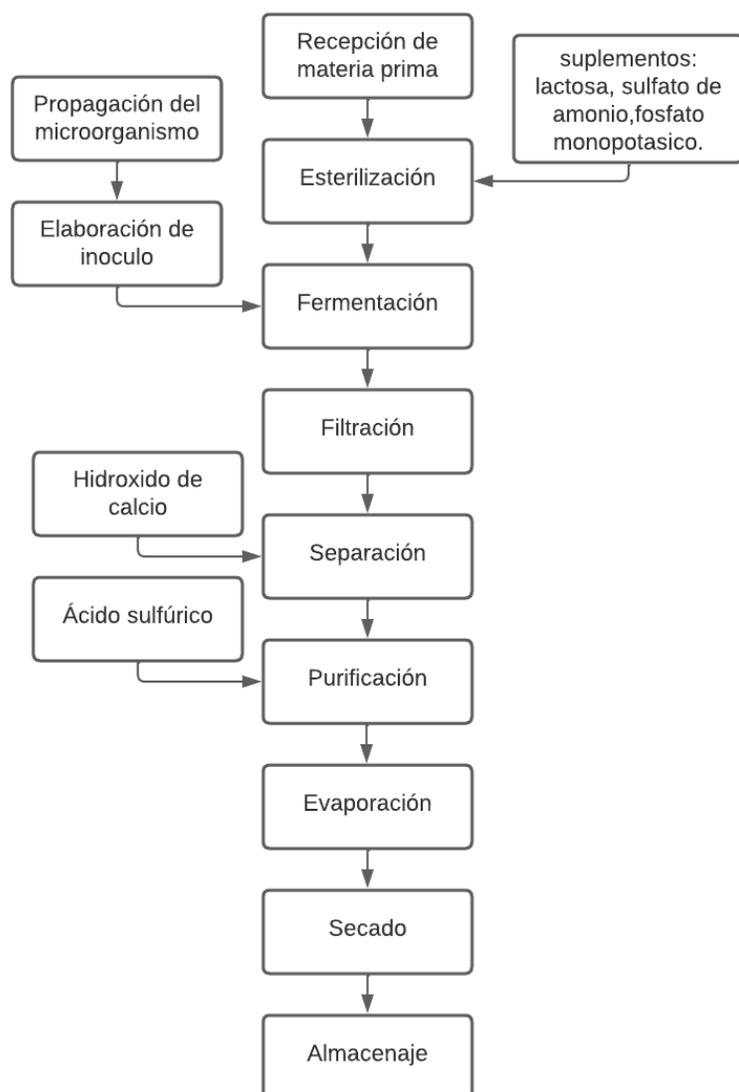


Figura 6. Diagrama de proceso para la obtención de ácido cítrico.

- **Preparación de inóculo.**

Para obtener el inóculo se realizó mediante solución de esporas lavando una caja Petri con 10 ml de agua destilada de esta solución se pipeteo un ml con micropipeta para realizar el conteo se usó lactofenol para colorear las esporas; se llenó de la suspensión coloreada la cámara de Nuebauer en donde se realizó el conteo en 4 cuadrantes como se muestra en la Figura 7, evitando contar las estructuras que están sobre las líneas.

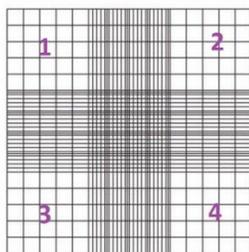


Figura 7 Vista microscópica de la cámara de Neubauer

Ecuación 4

$$C = N * K * D$$

Donde:

C: Esporas/ml

N: Esporas contadas

K: Factor de conversión de μl a ml

D: Factor de dilución

- **Fermentación.**

El lactosuero dulce usado en este experimento fue recolectado de la empresa Floralp S.A. en la ciudad de Ibarra el mismo cumple todos los requisitos para el lactosuero líquido (Instituto ecuatoriano de normalización, 2011), la fermentación se realizó mediante un agitador orbital el cual mantuvo las condiciones necesarias para la fermentación que duró 168 horas el pH del sustrato durante la fermentación fue ácido (pH=4), el lactosuero se esterilizó en autoclave a 1 atm, 120 °C durante 20 minutos, luego se agregó los suplementos descritos en la Tabla 12, estos son de uso alimentario.

Tabla 12

Suplementos usados para fermentación

Compuesto	Sin suplemento	Con suplemento
Lactosa	-	80 g
Sulfato de amonio	-	1.5 g
Fosfato mono potásico	-	1 g
Total	0	82.91 g

Una vez culminado el periodo de fermentación (168 horas) el caldo de cultivo se calentó hasta 70 °C para inactivar al microorganismo y finalizar la fermentación.

- **Filtración.**

Mediante un decantador y un tamiz se separó la materia orgánica y el caldo de cultivo fermentado; este fermentado se envasó en botellas herméticas para ser usado en el punto 2.3.3 en el que se estableció el proceso de obtención de ácido cítrico final.

2.3.3. Establecer el proceso de obtención de ácido cítrico a partir de lactosuero.

Para extraer el ácido cítrico disuelto en el caldo de cultivo fermentado se usó el proceso de separación denominado cal-sulfúrico que consiste en usar cal y ácido sulfúrico para purificar el ácido cítrico que se encuentra combinado con impurezas y restos del microorganismo, en la Figura 6 se puede observar el proceso para la obtención de ácido cítrico. (Sawant et al., 2018)

- **Separación:** en este proceso se precipitó el ácido cítrico en forma de citrato cálcico por la adición de hidróxido de sodio, este proceso duro aproximadamente 24 horas, transcurrido el tiempo se decantó y separó el sólido.
- **Purificación:** luego de la separación el sólido obtenido se mezcló con ácido sulfúrico, formando ácido cítrico disuelto en la fase líquida y sulfato de calcio (yeso) en la parte sólida.
- **Evaporación:** para eliminar el agua excedente del producto final se calentó la fase líquida a 80 °C durante 4 horas, transcurrido ese tiempo se perdió cerca del 70 % del volumen total.

- **Cristalización:** fue el último paso para obtener ácido cítrico de forma sólida, mientras se evaporaba el agua se realizó filtraciones para separar los cristales formados.
- **Secado:** Se secó en hornilla durante 2 horas para obtener los cristales secos.
- **Almacenaje:** los cristales se pesaron y empacaron en tubos plásticos para conservar su naturaleza

Tabla 13

Resumen de proceso para obtención de ácido cítrico.

Proceso	Reactivo	Cantidad / Parámetro	Tiempo (horas)
Separación.	Hidróxido de calcio	1.4 g/l	± 24
Purificación.	Ácido sulfúrico	5 ml de ácido + 10 ml de agua	± 24
Evaporación.	-	80 °C	± 4
Cristalización.	-	70 °C	± 1
Secado.	-	50 °C	± 2

(Sawant et al., 2018)

Capítulo 3. Resultados y Discusión

3.1. Caracterizar Morfológicamente la Cepa de *Aspergillus niger*

3.1.1. Características Macroscópicas.

El *Aspergillus* sp. cuenta con características morfológicas propias de este género que se observaron durante el desarrollo del microorganismo, y se pueden apreciar en la Figura 8.

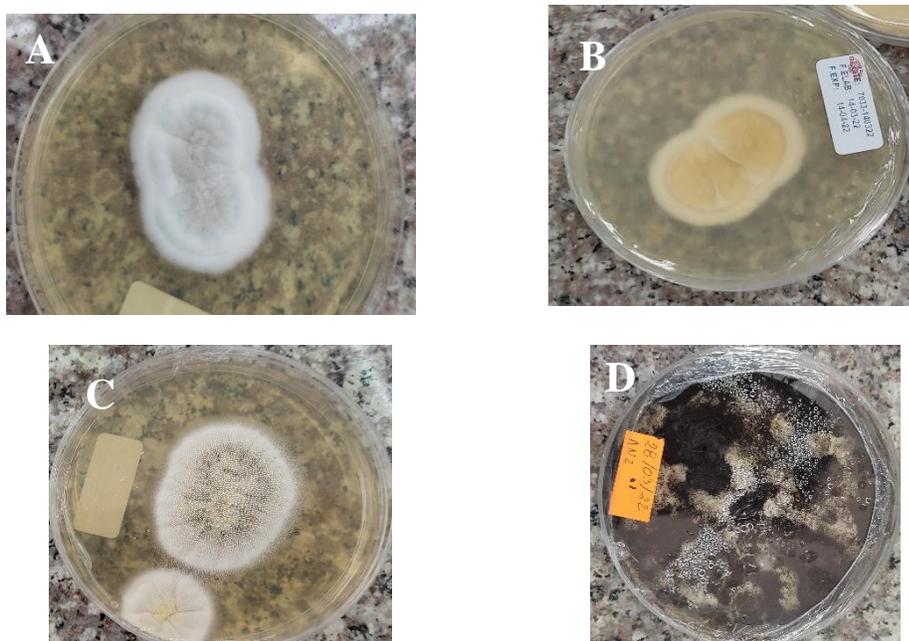


Figura 8. Características microscópicas. A) Anverso de la colonia. B) Reverso de la colonia. C) Colonia 8 días de siembra. D) Colonia madura.

Según (Abarca, 2000) La forma de la colonia del género *Aspergillus* es circular y de textura algodonosa, de color blanco en el anverso de la colonia (Figura 8A); mientras que en el adverso existe presencia de esclerocio de color amarillo pálido (Figura 8B), también presenta gotas de exudado y carece de pigmentos difusibles dentro de la caja Petri (Figura 8C); aproximadamente a 10 días desde la siembra empieza a presentar conidios; una vez que los conidios invadan la parte de la superficie en caja Petri la colonia se encuentra lista para la identificación microscópica (Figura 8D).

3.1.2. Características microscópicas

Se espera a que la colonia presente esporas o conidios en más del 50 % de la colonia para realizar estas observaciones Figura 9.



Figura 9. Características microscópicas A) Conidióforo y cabezas conidiales. B) Cabeza conidial a 100x. C) Esporas

En la Figura 9A se observa el conidióforo que es hialino y liso mientras la cabeza conidial es redonda y biselada (Figura 9A), formada por una vesícula globosa (Figura 9B), de donde se generan las metulas y fiálides, aparentemente dos por cada metula, los conidios (Figura 9C) presentan forma circular de color negro bien definida y con distribución radial de la misma forma que describieron (Maneesha & Pramod, 2019) en sus resultados.

Una vez realizado las observaciones correspondientes, se determinó que las características del espécimen estudiado corresponden a la especie *Aspergillus niger*.

3.2. Análisis de las variables de control y respuesta en la cinética de obtención de ácido cítrico.

Se analizó la influencia de tres niveles de temperatura y la adición de suplemento para maximizar la obtención de ácido cítrico durante la fermentación; las variables de respuesta fue el rendimiento de producto/sustrato y biomasa/producto así mismo se tomó en cuenta la productividad diaria.

Una vez obtenidos los datos en la fase experimental se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre los tratamientos el mismo se realizó en el programa estadístico INFOSTAT, la ANOVA de las variables de respuesta fueron altamente significativas.

3.2.1. Análisis de varianza para la Concentración de ácido cítrico.

Para el análisis del ANOVA se tomó en cuenta el promedio de los valores obtenidos en la fase experimental; en la Tabla 15 se observa el P-Valor menor a 0.05 siendo significativa

Tabla 14

Análisis de varianza de la concentración de ácido cítrico.

FACTOR	Suma de cuadrados	GL	CM	F	P-Valor
Modelo	0.08	5	0.02	11.87	0.0003**
Temperatura (A)	0.05	2	0.02	18.25	0.0002**
Suplemento (B)	0.02	1	0.02	14.05	0.0028**
A x B	0.01	2	0.01	4.39	0.0370**
Error	0.02	12	0.0013		
Total	0.09	17			

** : Altamente significativo

Los datos obtenidos en el análisis de varianza muestran que las medias de los tratamientos son significativas estadísticamente debido al P-Valor es menor a 0.05 la temperatura y el suplemento influyen positivamente en la producción de ácido cítrico y obteniendo la mejor concentración de ácido cítrico en el T2 (25 °C, con suplemento) el mismo que formo 0.37 g/l de producto estos resultados son semejantes con el trabajo de (Betancourt, 2003), la autora precisa que la baja concentración de ácido cítrico se debe a que los mohos del género *Aspergillus niger* tiene dificultades para asimilar lactosa durante la fermentación, para obtener mayor concentración de ácido cítrico, es preciso realizar la hidrolisis del lactosuero con el objetivo de disociar la lactosa a monosacáridos

(glucosa y galactosa) permitiendo que el microorganismo asimilare de mejor manera la glucosa.

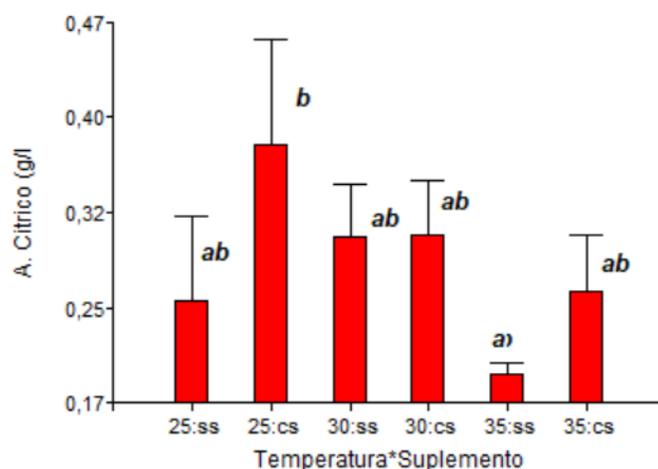


Figura 10. Prueba Tukey para concentración de ácido cítrico

La mayor producción de ácido cítrico se dio en el tratamiento T2 (25 °C; suplementado), seguido del tratamiento T4 y T3 que son iguales estadísticamente respecto a la concentración de ácido cítrico, en la Figura 10 también se observa que el T5 posee la menor concentración de producto.

3.2.2. Análisis de varianza para biomasa producida.

En la Tabla 16 se indica la ANOVA para la biomasa producida durante la obtención de ácido cítrico.

Tabla 15

Análisis de varianza para biomasa producida

FACTOR	Suma de Cuadrados	GL	CM	F	P-Valor
Modelo	0.01	5	0.0024	5.13	0.0003**
Temperatura (A)	0.01	2	0.01	11.52	0.0002**
Suplemento (B)	0.00025	1	0.00025	0.54	0.0028**
A x B	0.00098	2	0.00049	1.03	0.0370**
Error	0.01	12	0.00047		
Total	0.02	17			

** : Altamente significativo.

Los valores presentes en la Tabla 16 muestran que el promedio de la media entre los tratamientos es estadísticamente diferente debido a que el P-valor que se obtuvo en el experimento es de 0.0002 y 0.0028 para las variables de temperatura y suplemento por lo que se realizó la prueba Tukey (Figura 11) para determinar las diferencias entre los tratamientos

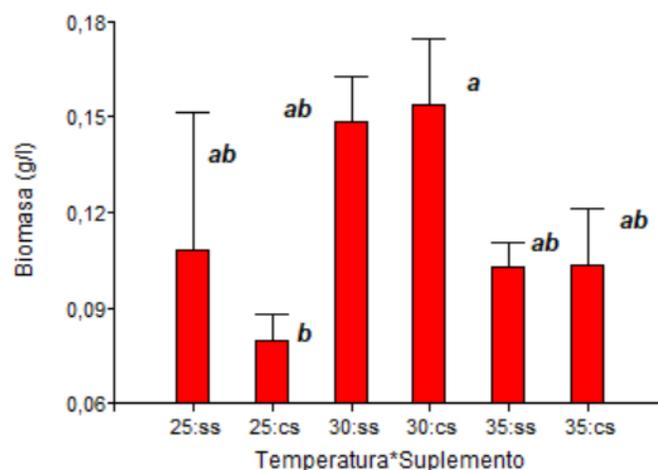


Figura 11. Prueba Tukey para producción de biomasa.

La biomasa obtenida en T2 fue de 0.07 g/l comprobando que la producción de biomasa es inversamente proporcional al ácido cítrico producido lo que indica que es un metabolito secundario al metabolismo de *Aspergillus niger* trabajo se asemeja al obtenido En el trabajo de (Cortés Sánchez et al., 2014) la mayor producción de biomasa se obtuvo a una temperatura de 30 °C coincidiendo con este trabajo.

3.2.3. Análisis de varianza de rendimiento: PRODUCTO/SUSTRATO (g de AC/g de Lactosa)

Para determinar el rendimiento se tomó en cuenta la ecuación 1 obteniendo rendimientos entre 4% y 1% (m/m); en la Tabla 16 se encuentra el análisis de varianza para esta variable rendimiento lo que permitirá determinar la diferencias entre los tratamientos.

Tabla 16

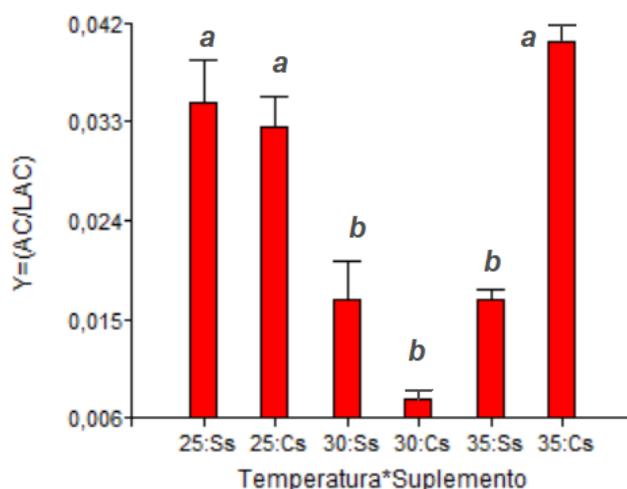
Análisis de la varianza para rendimiento Producto/Sustrato

FACTOR	Suma de cuadrados	GL	CM	F	P-Valor
Modelo	0,03	5	0,01	6,05	0,0051*
Temperatura (A)	0,01	2	0,01	5,56	0,0195*
Suplemento (B)	0,01	1	0,01	5,89	0,0319*
A x B	0,01	2	0,01	6,60	0,0117*
Error	0,01	12	0,0009		
Total	0,04	17			

*: significativo

Los resultados del ANOVA con respecto a la variable respuesta de rendimiento producto/sustrato muestra valores significativos entre los tratamientos ya que estadísticamente los valores en el P-valor son < 0.05 tanto para la temperatura y sustrato, así de la misma forma la interacción entre las variables da un valor de 0.0117 indicando que esta interacción es significativa teniendo que realizar una prueba Tukey al 5% para determinar las diferencias entre los tratamientos.

En la Figura 12 se presenta la prueba de Tukey la misma que muestra diferencia entre las medias de los tratamientos, el T6 presenta mayor rendimiento (4%) de ácido cítrico el mismo que se produjo a partir del disacárido en el lactosuero.

**Figura 12.** Prueba Tukey rendimiento producto/sustrato

Los resultados del rendimiento: producto/sustrato obtenido en este trabajo es mayor al que obtuvo (Toro et al., 2004) el mismo que uso una cepa nativa de *Aspergillus niger* inoculada en lactosuero hidrolizado, desproteinizado y entero los cuales se fermentaron durante 8 días para la obtención de ácido cítrico.

3.2.4. Análisis de varianza para productividad (g de AC/l*días)

Tabla 17

Análisis de varianza para productividad.

FACTOR	Suma de cuadrados	GL	CM	F	P-Valor
Modelo	0,0016	5	0,0003	11,87	0,0003**
Temperatura (A)	0,0009	2	0,0004	18,25	0,0002**
Suplemento (B)	0,0003	1	0,0003	14,05	0,0028**
A x B	0,0002	2	0,0001	4,39	0,0370*
Error	0,0003	12	<0,0001		
Total	0,0019	17			

*: significativo **: altamente significativo

El análisis de ANOVA para la variable respuesta de productividad nos muestra datos en P-Valor por debajo de 0,05 esto significa que los valores son estadísticamente diferentes y que la temperatura y la aplicación de suplemento son esenciales para la productividad de ácido cítrico, debido a que existe diferencias entre los tratamientos se procede a realizar la prueba Tukey al 5% la cual se detalla en la figura 13

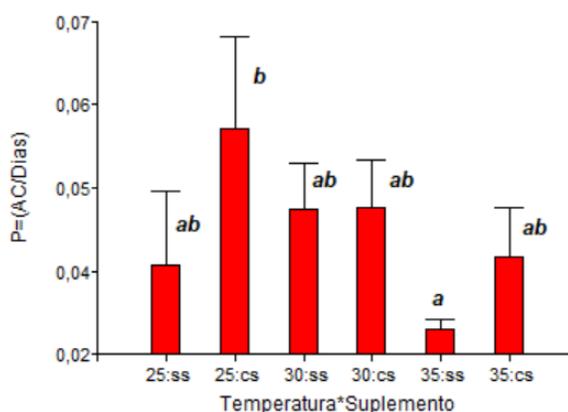


Figura 13. Prueba Tukey para productividad.

La mejor productividad se dio en el tratamiento 2 (25 °C; con suplemento), el mismo que produjo 0.054 (g de AC/l*día), valores inferiores a los obtenidos por (Gómez et al., 2014) el autor uso en su trabajo una sepa modificada al exponerla a rayos UV además que el caldo de cultivo era sacarasa la cual tiene mayor asimilación por parte del microorganismo, es importante destacar que para el autor del trabajo menciona que los parámetros de fermentación deben ser óptimos para una buena producción de ácido cítrico a nivel industrial.

3.3. Establecer un proceso para la obtención de ácido cítrico.

Se obtuvo ácido cítrico a nivel de laboratorio según los procesos indicados en la figura 6 del capítulo anterior; los procesos fueron:

Preparación de inóculo:

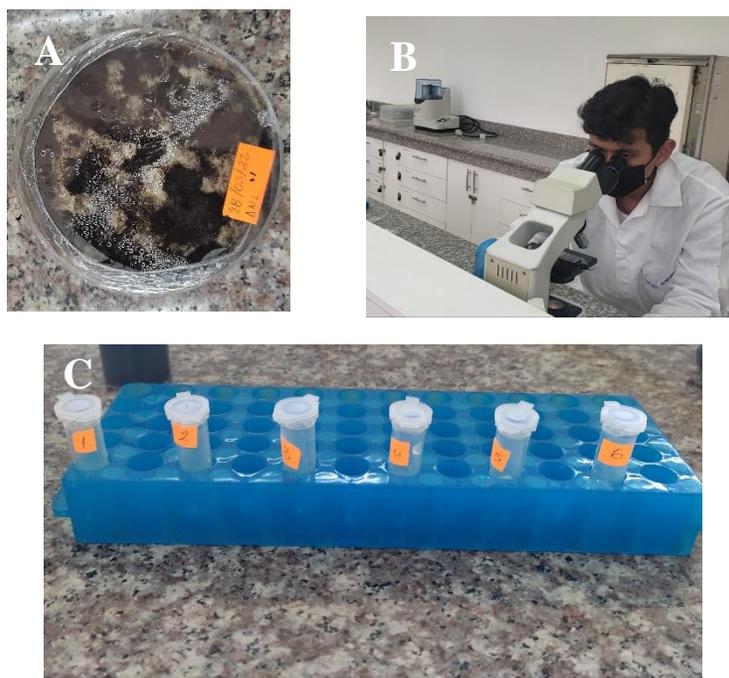


Figura 14. Preparación de inóculo. A) Colonia madura B) conteo de UFC C) inóculos con 1.7×10^7 UFC/ml

Fermentación:

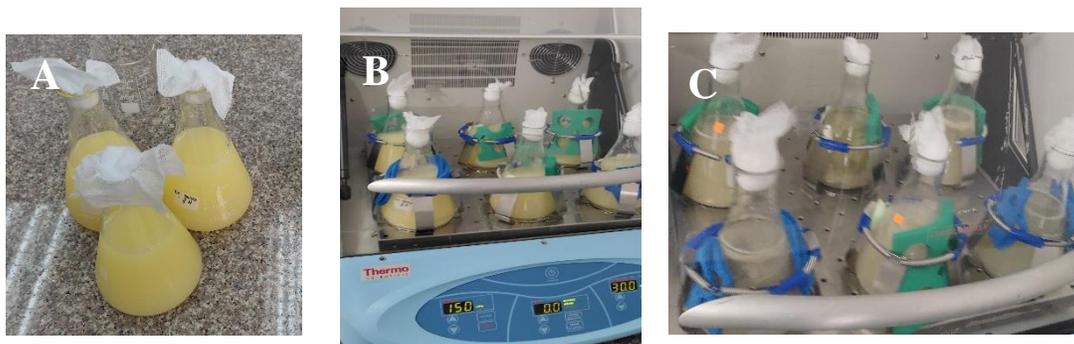


Figura 15. Fermentación. A) Lactosuero estéril. B) Agitador orbital C) Fermentación luego de 168 h

Separación:



Figura 16. Separación A) Adición de hidróxido de calcio B) Citrato cálcico (blanco) y fase líquida C) separación

Purificación:

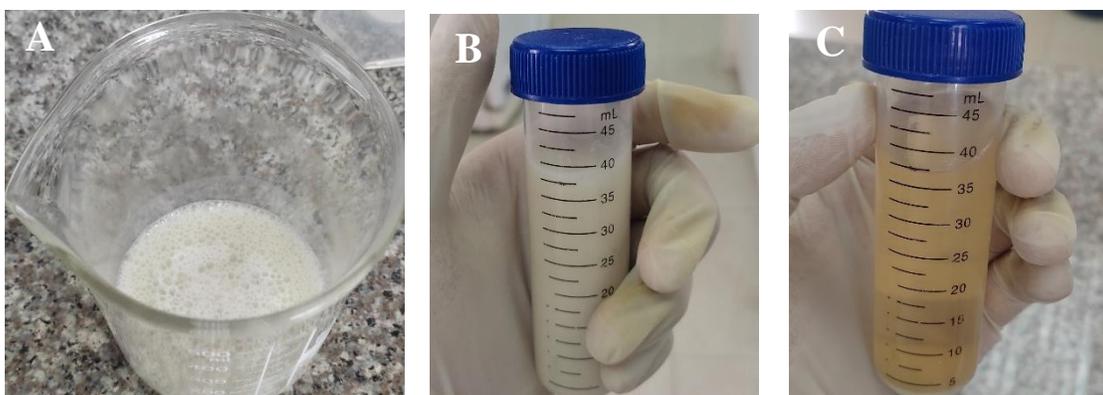


Figura 17. Purificación A) Adición de ácido sulfúrico B) Ácido cítrico mezclado C) Ácido cítrico disponible en la fase líquida

Evaporación:

Figura 16. *Evaporación*

Cristalización:

Figura 17. *Cristalización A) agua evaporada 80 % B) Filtrado de cristales C) Cristales de ácido cítrico*

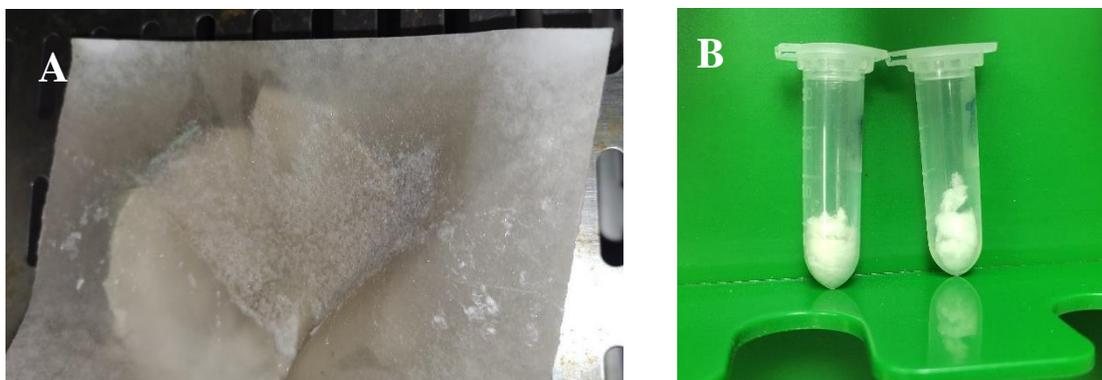
Secado y almacenamiento:

Figura 18. *A) Producto secado por aire seco B) Empacado en material plástico*

Una vez realizado el proceso de obtención de ácido cítrico en el laboratorio se propone un esquema de producción industrial que se muestra en la Figura 19 donde se evidencia los equipos y procesos ingenieriles para la implementación de una planta de ácido cítrico, también se incluye el balance de materiales para el procesamiento de 1 m³ de lactosuero, cabe aclarar que no se ha tomado en cuenta la capacidad total de la planta, ni la distribución de áreas comunes, sistemas hidrosanitarios ni estructurales dentro de este estudio.

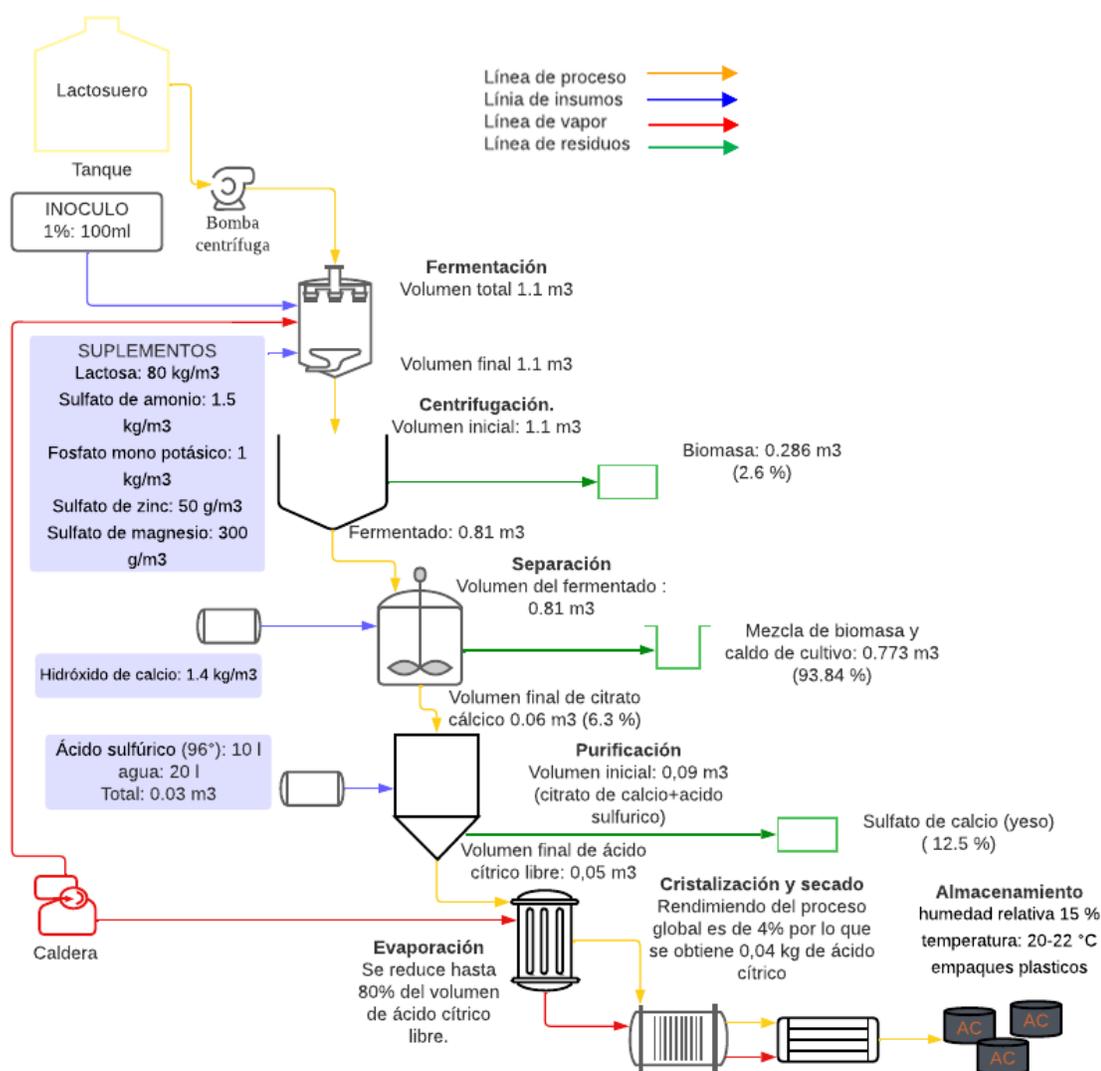


Figura 19. Bioproceso para 1m³ de lactosuero

Debido a la naturaleza de la materia prima no es necesario eliminar trazas de metales antes del proceso de fermentación, pero de ser necesario filtrar el lactosuero se puede hacer con un filtro o un lienzo delgado. La fermentación inicia luego de esterilizar la materia prima con vapor; para la incorporación del inóculo es necesario enfriar hasta 25 °C; el tiempo aproximado para que el microorganismo se adapte y propague es de 48 h; el tiempo máximo de fermentación es de 168 h, luego de ese tiempo el volumen total fermentado pasa a centrifugación donde se separa la biomasa del caldo fermentado que es donde se encuentra el ácido cítrico.

A partir de aquí inicia el proceso de separación por la adición de hidróxido de calcio el cual se agrega y se deja reposar por 24 h para que la reacción sea en su totalidad. Durante este paso se obtiene dos fases: una mezcla de restos de biomasa con agua y citrato cálcico en forma sólida de color blanco, este pasa a un tanque agitado en donde se añade ácido sulfúrico para liberar el ácido cítrico en la fase líquida además se genera sulfato de calcio (yeso), la evaporación se realiza a baja temperatura (60-70) para evitar la descomposición del producto; una vez reducido el 80% de volumen se cristaliza filtrando los cristales que se va obteniendo. Por último, se seca con un deshidratador de bandejas y se empaca en material plástico para almacenarlo con humedad de 15 %.

Para este esquema propuesto se estima que los rendimientos de ácido cítrico utilizando lactosuero estaría entre 4-5% (m/v), la pureza alcanzada debe ser de grado industrial el cual se podría aumentar adicionando pasos de purificación sofisticado, en esto último debería tener en cuenta que, el aumento de los pasos de purificación incidiría en los costos (Alcoser et al., 2021).

Conclusiones

- Se demostró por sus características morfológicas, microscópicas y macroscópicas que la cepa corresponde al género *Aspergillus* de la sección *níger*.
- Es posible obtener ácido cítrico a partir del lactosuero en un proceso de fermentación sumergida utilizando el hongo *Aspergillus níger*, demostrando que la temperatura y tipo de suplemento influyen significativamente en la concentración y productividad de este.
- Se logró desarrollar un bioproceso de ácido cítrico a escala de laboratorio obteniendo un producto que cumple con los requerimientos de uso industrial.
- Se acepta la hipótesis alternativa debido a que se obtuvo mayor concentración de ácido cítrico en los tratamientos con suplemento

Recomendaciones.

- Caracterizar de la cepa estudiada a través de métodos moleculares.
- Realizar estudios de obtención y separación de ácido cítrico a una mayor escala ya sea en fermentación por lotes o continuo
- Realizar estudios sobre los metabolitos generados durante el proceso de fermentación.

Bibliografía:

- Abarca, L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, 79–84.
<http://reviberoammicol.com/2000-17/S79S84.pdf>
- Alcoser, M., Salazar, K., Rodríguez, A., & Brito, H. (2021). *Evaluación del proceso de producción de ácido cítrico por fermentación con el uso de Aspergillus niger*. 7, 1136–1158. <https://doi.org/10.23857/dc.v7i3.2045>
- Ali, S., Haq, I., Qadeer, M. A., & Iqbal, J. (2002). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5(3), 19–20. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582002000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=en
- AOAC 925.10: SOLIDS (TOTAL) AND LOSS ON DRYING (MOISTURE) IN FLOUR. AIR OVEN METHOD. (n.d.). Retrieved February 14, 2023, from https://global.ihs.com/doc_detail.cfm?item_s_key=00848313
- Betancourt, A. (2003). *Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación en cultivo líquido*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
- Camacho, F., Albuja, W., Viera, M., Fraga, E., Abarca, J., & Mejía, A. (2010). *ANÁLISIS DE MATERIAS PRIMAS Y PRODUCTOS 2010 Encuesta nacional de Manufactura y Minería*.
- Campaña, X., Aguilar, P., Pedrera, A., & Granja, D. (2021). *Estudio de Mercado Sector Lácteo*.

- Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A., Cárdenas, M., & Estupiñán, N. (2012). *Biología de hongos*. Ediciones Uniandes.
- Cortés Sánchez, A. D. J., Guadarrama, L. M., & Díaz Ramírez, M. (2014). PRODUCCIÓN DE BIOMASA A PARTIR DE *Aspergillus oryzae* EN CULTIVO SUMERGIDO. *BIOtecnia*, 16(3), 11. <https://doi.org/10.18633/bt.v16i3.106>
- Fallas, J. (2012). *ANÁLISIS DE VARIANZA*.
- Ganeshprasad. (2020). *Is Coenzyme Molecule: 9 Interesting Facts (Read This First!) -*. <https://lambdageeks.com/is-coenzyme-molecule/>
- Gastalver, M. (2015). *Procesos básicos de elaboración de quesos* (Quinta Edición). Editorial Elearning.
- Gómez, A. L., Sánchez De Prager, M., Muñoz, J. E., & Valencia, I. C. (2014). *Efecto del fósforo y del potasio en la producción de ácido cítrico utilizando una cepa de Aspergillus niger*.
- Granda, A. (2018, December 3). *Cinco de 67 industrias lecheras procesan el lactosuero*. <https://elproductor.com/2018/12/cinco-de-67-industrias-lecheras-procesan-el-lactosuero/>
- Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial*. <https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PA202&dq=sustratos+fermentaciones&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjvzZPE0uzlAhUto1kKHV8zD6sQ6AEIKDAA#v=onepage&q=sustratos%20fermentaciones&f=false>

- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la Investigación* (Sexta Edición). Mcgraw-Hill.
- Hesham, A. E. L., Mostafa, Y. S., & Alsharqi, L. E. O. (2020). Optimization of Citric Acid Production by Immobilized Cells of Novel Yeast Isolates. *Https://Doi.Org/10.1080/12298093.2020.1726854*, 48(2), 122–132.
<https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1726854>
- Imandi, S. B., Bandaru, V. V. R., Somalanka, S. R., & Garapati, H. R. (2007). Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(5), 1367–1372.
<https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2006.10.012>
- Instituto ecuatoriano de normalización. (2011). *NTE INEN 2594*.
- Juliano, P., Muset, G., & Castells, M. (2017). *Valorización del lactosuero* (Primera Edición). INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA INDUSTRIAL.
- Kareem, S. O., Akpan, I., & Alebiowu. (2010). Production of citric acid by *Aspergillus niger* using pineapple waste. *Malaysian Journal of Microbiology*, 6(2), 161–165.
- Krebs, H. (1953). The citric acid cycle. *Nobel Prize*, 399–410.
<https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/krebs-lecture.pdf>
- Lanteri, A., & Cigliano, M. (2006). *Sistemática Biológica: Fundamentos teóricos y ejercitaciones* (Tercera edición). Editorial de la Universidad de la Plata.
- Latorre, A., del Rincón, D., & Arnal, J. (2005). *Bases metodológicas de la investigación educativa* (Primera Edición). Ediciones Experiencia, S.L.

Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., & El-Helow, E. R. (2007). Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, *98*(18), 3470–3477.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2006.11.032>

Maneesha, G., & Pramod, R. (2019). Morphology, molecular identification and phylogenetic analysis based on internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal nuclear DNA (rDNA) sequence of a pathogenic fungal isolate *Aspergillus niger* LKO1. *The Journal of the Society for Tropical Plant Research*, *6*(2019), 166–170.

<https://doi.org/10.22271/tpr.2019.v6.i2.024>

Marier, J. R., & Boulet, M. (1958). Direct Determination of Citric Acid in Milk with an Improved Pyridine-Acetic Anhydride Method. *Journal of Dairy Science*, *41*(12), 1683–1692. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(58\)91152-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(58)91152-4)

Mokobi, F. (2021, April 21). *Aspergillus niger- An Overview*.

<https://microbenotes.com/aspergillus-niger/>

Morrone, J. J. (2013). *Sistemática: fundamentos, métodos, aplicaciones*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.

Piontelli L., E. (2008). APORTES MORFOTAXONÓMICOS EN EL GENERO *Aspergillus* Link: CLAVES PARA LAS ESPECIES AMBIENTALES Y CLINICAS MAS COMUNES. *Boletín Micológico*, *23*.

<https://doi.org/10.22370/BOLMICOL.2008.23.0.122>

- Prado, P., Luis Rodriguez Flores, J., & Edgar, R. (2018). Remoción de DQO y DBO del lactosuero ácido mediante una celda de electrocoagulación. *Universidad Nacional Del Centro Del Perú*. <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/20.500.12894/5168>
- Rangel, E. (2019). *CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS NATIVOS DE Aspergillus flavus EFICACES PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN CON AFLATOXINAS DEL ENSILAJE DE MAÍZ EN AGUASCALIENTES*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Roukas, T., & Kotzekidou, P. (2020). Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(12), 13105–13113. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-07928-9/METRICS>
- Sawant, O., Mahale, S., Ramchandran, V., Nagaraj, G., & Bankar, A. (2018). FUNGAL CITRIC ACID PRODUCTION USING WASTE MATERIALS: A MINI-REVIEW. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 8(2), 821–828. <https://doi.org/10.15414/JMBFS.2018.8.2.821-828>
- Soriano, J. (2015). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz Santos. https://www.google.com.ec/books/edition/Micotoxinas_en_alimentos/wuZvCQAAQB-AJ?hl=es&gbpv=1&dq=caracterizacion+morfologica+de+aspergillus&printsec=frontcover
- Teles, F. F. F., Young, C. K., & Stull, J. W. (1978). A Method for Rapid Determination of Lactose. *Journal of Dairy Science*, 61(4), 506–508. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83626-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83626-1)

Toro, O., Ortiz, M., & Betancourt, A. (2004). Obtención de ácido cítrico a partir de suero de leche por fermentación con *Aspergillus* spp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 6, 43–54.

Vázquez, S. (2017). *PUESTA A PUNTO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DE LACTOSA EN BASES LÁCTEAS*. Universidad de Oviedo.

Anexos



INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA

NTE INEN 2594:2011

SUERO DE LECHE LÍQUIDO. REQUISITOS.

Primera Edición

FLUID WHEY. REQUIREMENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, otros productos lácteos, suero de leche líquido, requisitos.
AL: 03.01-448
CDU: 637.142
CIIU: 3112
ICS: 67.100.99

Anexo 1. Norma INEN para suero líquido

6. REQUISITOS

6.1 Requisitos físicos y químicos

6.1.1 El suero de leche líquido, ensayado de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 1.

TABLA 1. Requisitos físico-químicos del suero de leche líquido

Requisitos	Suero de leche dulce		Suero de leche ácido		Método de ensayo
	Min.	Max.	Min.	Máx.	
Lactosa, % (m/m)	--	5,0	--	4,3	AOAC 984.15
Proteína láctea, % (m/m) ⁽¹⁾	0,8	--	0,8	--	NTE INEN 16
Grasa láctea, % (m/m)	--	0,3	--	0,3	NTE INEN 12
Ceniza, % (m/m)	--	0,7	--	0,7	NTE INEN 14
Acidez titulable, % (calculada como ácido láctico)	--	0,16	0,35	--	NTE INEN 13
pH	6,8	6,4	5,5	4,8	AOAC 973.41

⁽¹⁾ el contenido de proteína láctea es igual a 6,38 por el % nitrógeno total determinado

6.1.2 *Requisitos microbiológicos.* El suero de leche líquido ensayado de acuerdo con las normas correspondientes, debe cumplir con lo establecido en la tabla 2.

TABLA 2. Requisitos microbiológicos para el suero de leche líquido.

Requisito	n	m	M	c	Método de ensayo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos ufc/g.	5	30 000	100 000	1	NTE INEN 1529-5
Recuento de <i>Escherichia coli</i> ufc/g.	5	< 10	-	0	NTE INEN 1529-8
<i>Staphylococcus aureus</i> ufc/g.	5	< 100	100	1	NTE INEN 1529-14
<i>Salmonella</i> /25g.	5	ausencia	-	0	NTE INEN 1529-15
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	ausencia	-	0	ISO 11290-1

Donde:

n = Número de muestras a examinar.

m = índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M = índice máximo permisible para identificar nivel aceptable de calidad.

c = Número de muestras permisibles con resultados entre m y M.

6.1.3 *Aditivos.* Se permite el uso de los aditivos enlistados en la NTE INEN 2074.

Anexo 2. Requisitos físicoquímicos y microbiológicos para suero de leche

CODEX ALIMENTARIUS

NORMAS INTERNACIONALES DE LOS ALIMENTOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



Organización
Mundial de la Salud

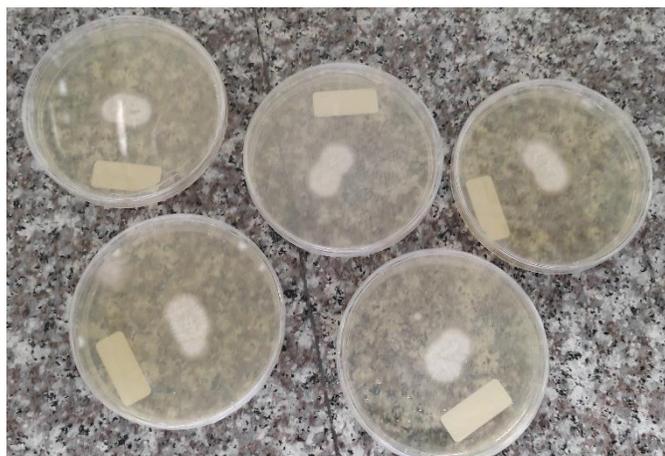
E-mail: codex@fao.org - www.codexalimentarius.org

NORMA GENERAL PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS

CODEX STAN 192-1995

Adoptado en 1995. Revisión 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009,
2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2021.

Anexo 3. Norma general para los aditivos alimentarios. Codex Stan 192-1995



Anexo 4. Siembras sobre agar Sabouraud



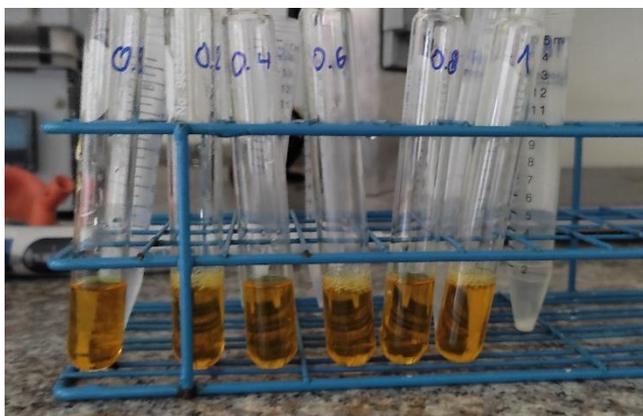
Anexo 5. Materiales usados en la identificación del espécimen



Anexo 6. Obtención de biomasa



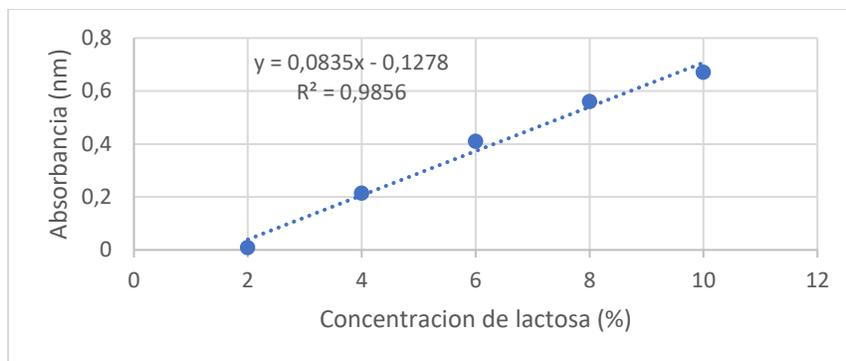
Anexo 7. Mezcla del reactivo de Tales



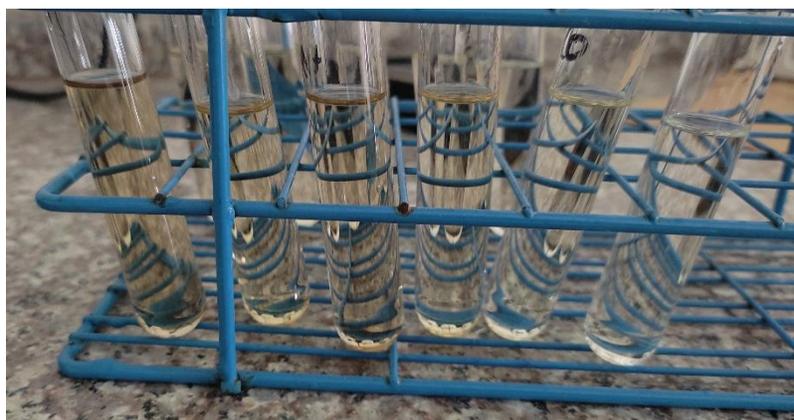
Anexo 8. Soluciones de lactosa antes de reacción térmica



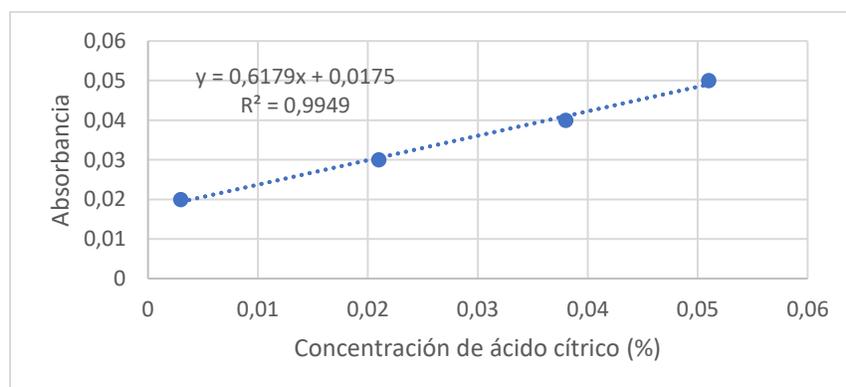
Anexo 9. soluciones de lactosa después de reacción térmica



Anexo 10. Curva de calibración estándar de lactosa



Anexo 11. Soluciones de ácido cítrico



Anexo 12. Curva de calibración estándar para ácido cítrico